

Уровень липополисахарид-связывающего белка при острых кишечных инфекциях и влияние интерлейкинов-1 β и -10 на его синтез

Наталья Владимировна Епифанцева*, Альвина Николаевна Емельянова,
Эльвира Николаевна Калинина, Татьяна Михайловна Караваева

Читинская государственная медицинская академия,
г. Чита, Россия

Реферат

Цель. Определить уровень липополисахарид-связывающего белка при острой кишечной инфекции в зависимости от этиологии и тяжести течения заболевания, установить влияние уровня интерлейкинов-1 β и -10 на экспрессию липополисахарид-связывающего белка.

Методы. Проведено исследование сыворотки крови 62 пациентов с определением концентрации липополисахарид-связывающего белка, интерлейкинов-1 β и -10 методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов ELISA (США) и Вектор-Бест (г. Новосибирск). В первую группу вошли 33 пациента с бактериальной кишечной инфекцией, вторую группу составили 29 пациентов с вирусными диареями, группа контроля — 20 условно здоровых человек. Статистическая обработка осуществлена при помощи электронных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 6.0, с определением статистической значимости различий при достигнутом уровне $p \leq 0,05$ с использованием критерия Манна–Уитни (U-тест). При расчёте корреляционных связей использовали коэффициент Спирмена. Оценка распределения признаков проведена с помощью критерия Шапиро–Уилка W.

Результаты. В процессе работы нами установлено наличие липополисахарид-связывающего белка во всех исследуемых группах, при этом в группе бактериальных кишечных инфекций отмечено значительное повышение содержания липополисахарид-связывающего белка в сравнении с другими группами. При рассмотрении уровня этого белка в зависимости от степени тяжести наибольшие показатели зарегистрированы при лёгком течении острых кишечных инфекций бактериальной природы, при вирусных диареях колебания липополисахарид-связывающего белка не превышали норму. При бактериальных кишечных инфекциях установлена прямая взаимосвязь липополисахарид-связывающего белка с интерлейкинами-1 β , -10.

Вывод. Определение концентрации липополисахарид-связывающего белка можно использовать для первичной дифференциальной диагностики кишечных инфекций, вызванных бактериальными агентами, что позволит значительно сузить диагностический поиск и определить тактику этиотропной терапии; также, учитывая взаимосвязь уровня липополисахарид-связывающего белка со степенью тяжести, данный показатель можно использовать в качестве прогностического признака течения заболевания.

Ключевые слова: кишечные инфекции, липополисахарид-связывающий белок, цитокины.

Для цитирования: Епифанцева Н.В., Емельянова А.Н., Калинина Э.Н., Караваева Т.М. Уровень липополисахарид-связывающего белка при острых кишечных инфекциях и влияние интерлейкинов-1 β и -10 на его синтез. *Казанский мед. ж.* 2020; 101 (4): 590–594. DOI: 10.17816/KMJ2020-590.

The level of lipopolysaccharide-binding protein in acute intestinal infections, the effect of IL-1 β and IL-10 on its production.

N.V. Epifantseva, A.N. Emelyanova, E.N. Kalinina, T.M. Karavaeva
Chita State Medical Academy, Chita, Russia

Abstract

Aim. To determine the level of lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in acute intestinal infection, depending on the etiology and severity of the disease, and the effect of interleukin (IL)-1 β and IL-10 levels on the expression of LBP.

Methods. Serum samples of 62 patients were assayed by solid phase enzyme-linked immunosorbent assay using a set of reagents ELISA (USA) and Vector-best (Novosibirsk) for levels of LBP, IL-1 β , IL-10. The first group included 33 patients with bacterial intestinal infection, the second group consisted of 29 patients with viral diarrhea, and the control group comprised 20 conditionally healthy patients. Analyses were performed using Microsoft Excel 2010 and Statistica version 6.0 software. Statistical differences were determined by using the Mann–Whitney U Test, the p-value ≤ 0.05 were regarded as statistically significant. Spearman's correlation coefficient was used to examine relationships. Shapiro–Wilk W test was used to check for normal distribution of the features.

Results. We detected the presence of LBP in all the studied groups, with the content of LBP was significantly increased in the group of bacterial intestinal infections compared with other groups. With regard to disease severity, LBP level was the highest for mild acute intestinal infections caused by bacteria, and for viral diarrhea, fluctuations in LBP did not exceed the norm. In intestinal infections caused by bacteria, the levels of LBP were directly related to the levels of IL-1 β and IL-10.

Conclusion. Detection of LBP concentration can be used for the initial differential diagnosis of intestinal infections caused by bacteria, which would significantly narrow the diagnostic search and determine the tactics of etiotropic therapy; also, considering the relationship between the concentration of LBP and disease severity, this indicator can be used as a predictive sign of the course of the disease.

Keywords: intestinal infectious diseases, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), cytokines.

For citation: Epifantseva N.V., Emelyanova A.N., Kalinina E.N., Karavaeva T.M. The level of lipopolysaccharide-binding protein in acute intestinal infections, the effect of IL-1 β and IL-10 on its production. *Kazan Medical Journal*. 2020; 101 (4): 590–594. DOI: 10.17816/KMJ2020-590.

Актуальность. Острые кишечные инфекции (ОКИ) занимают второе место среди инфекционной патологии всех групп населения, а изучение механизмов иммунопатогенеза представляет интерес для инфекционистов. Этиологический фактор ОКИ в основном представлен вирусами и спектром грамотрицательных бактерий, где повреждающим фактором становится эндотоксин — липополисахарид, участвующий в развитии как местных, так и общих воспалительных реакций [1,2].

В случае массивной липополисахарид-обусловленной эндотоксемии системный ответ организма может становиться неконтролируемым, что сопровождается маргинальным лейкостазом, гранулоцитопенией, истощением миелопоэза, высвобождением лизосомальных ферментов нейтрофилами, повышением сосудистой проницаемости («капиллярной протечкой») и перераспределением жидкости из сосудистого русла в прилегающие ткани [3]. В процессе развития воспалительных реакций в ответ на поступление в организм эндотоксина стимулируется синтез липополисахарид-связывающего белка (ЛПБ). ЛПБ синтезируется в печени, эпителии кишечника и лёгких под влиянием провоспалительных цитокинов с последующим формированием малотоксичного комплекса липополисахарид + ЛПБ [4]. Уровень ЛПБ регулируется медиаторами воспаления.

Цель. Изучить уровень ЛПБ у пациентов с ОКИ, зависимость его концентрации от тяжести течения заболевания, влияние интерлейкинов (ИЛ-1 β и ИЛ-10) на синтез ЛПБ.

Материал и методы исследования. Нами был проведён ретроспективный анализ историй болезни и исследование сыворотки крови 62 пациентов с ОКИ, находившихся на лечении в краевом стационаре. Первую группу составили 33 пациента с ОКИ бактериальной этиологии, средний возраст 27,2 \pm 8,7 года. Во вторую группу (группу сравнения) вошли 29 человек с вирусными диареями, средний возраст 23,2 \pm 8,4 года.

Основными критериями включения пациентов в исследования были следующие условия:

- возраст от 15 до 55 лет;
- наличие лабораторно подтверждённой кишечной инфекции в остром периоде;
- отсутствие сопутствующих заболеваний в стадии декомпенсации и/или в период обострения, а также отсутствие другой острой патологии.

У всех пациентов этиологический фактор ОКИ был подтверждён методом бактериологических, серологических исследований и полимеразной цепной реакции.

Контрольную группу, сформированную методом случайной выборки, составили 20 соматически здоровых человек соответствующего возраста (средний возраст 23,3 \pm 1,4 года).

Определение концентрации ЛПБ и цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-10 в сыворотке крови, взятой с письменного разрешения пациентов, проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов ELISA (США) и Вектор-Бест (Россия, г. Новосибирск).

Таблица 1. Уровень липополисахарид-связывающего белка (ЛПБ) и интерлейкинов (ИЛ-1 β и ИЛ-10) при острых кишечных инфекциях (ОКИ)

Показатель	Первая группа, бактериальные ОКИ (n=33)	Вторая группа, вирусные диареи (n=29)	Третья группа, контрольная (n=20)
ЛПБ, мг/мл	5533 [4856,5–6374,5], p* \leq 0,05, p** \leq 0,05	5372 [4342–6139], p* \geq 0,05, p** \leq 0,05	4177 [3880–4868]
ИЛ-1 β , пг/мл	0,534 [0–1,866], p* \geq 0,05, p** \geq 0,05	0 [0–1,6], p* \geq 0,05, p** \geq 0,05	1,046 [0,409–1,613]
ИЛ-10, пг/мл	5,518 [0,345–7,931], p* \leq 0,01, p** \geq 0,05	5,518 [0–11,25], p* \leq 0,01, p** \geq 0,05	0 [0–0]

Примечание: p* — уровень достоверности различий при сравнении с группой контроля; p** — уровень достоверности различий при сравнении вирусных диарей с ОКИ бактериальной природы (непараметрический метод Манна–Уитни — U-критерий; медиана, интерквартильный интервал между 25-м и 75-м перцентилями).

Статистическая обработка полученных данных осуществлена при помощи электронных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica 6.0. Для сравнения полученных данных использовали методы непараметрического анализа с применением U-критерия Манна–Уитни. В том случае, если рассчитанное значение U-критерия было равно критическому или меньше, признавали статистическую значимость различий. Оценку распределения признаков проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка W.

Проведение представленного исследования одобрено региональным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава РФ, протокол №57 от 10.11.2013.

Результаты и их обсуждение. В процессе работы во всех исследуемых группах в сыворотке крови установлено наличие ЛПБ. Наибольший уровень белка зарегистрирован в группе пациентов с ОКИ бактериальной этиологии, он составлял 5533 [4856,5–6374,5] мг/мл, что значительно превышало показатели группы контроля, где концентрация ЛПБ была в пределах 4177 [3880–4868] мг/мл ($p \leq 0,05$).

Высокий уровень ЛПБ связан с тем, что бактерии, вызывающие кишечные инфекции, являются грамотрицательными и, разрушаясь под действием неспецифических факторов защиты, выделяют значительное количество эндотоксина. А поскольку липополисахарид — мощный структурный компонент грамотрицательных бактерий [1], для его распознавания, в первую очередь рецепторами TLR4, служащими важнейшими участниками в сигнальной системе клеток хозяина [5], и дальнейшего запуска каскада иммунологических реакций, направленных на ограничение и ликвидацию

воспалительного процесса и формирование иммунитета, необходим достаточный синтез ЛПБ.

В низких концентрациях ЛПБ определялся и среди пациентов с вирусными диареями, и в группе контроля. Так, во второй группе его уровень составлял 5372 [4342–6139] мг/мл, что не отличалось от нормы, ($p \geq 0,05$; табл. 1). Это обусловлено тем, что липополисахарид — естественный антиген, и непрерывный контакт происходит с ним на протяжении всей жизни в результате повсеместной циркуляции грамотрицательных бактерий в окружающей среде и наличия грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в дистальных отделах желудочно-кишечного тракта человека.

Таким образом, ЛПБ распознаёт, связывает и последовательно презентует бактериальный эндотоксин наследственно закодированным рецепторам, присутствующим на лейкоцитах и других клетках, что обеспечивает повышение чувствительности рецепторов к патогену и усиление сигнала опасности инфицирования [6] при попадании возбудителя в макроорганизм, а также поддержание иммуногенной активности в норме.

Учитывая выраженную индукцию и экспрессию ЛПБ у пациентов с бактериальной кишечной инфекцией, следующим этапом нашего исследования стало установление взаимосвязи уровня синтеза ЛПБ и степени тяжести заболевания. В результате определено, что синтез ЛПБ как при лёгком (5533 [4690–6576] мг/мл), так и при среднетяжёлом (5351 [4221–6078] мг/мл) течении достоверно превышал уровень ЛПБ здоровых людей (4177 [3880–4868] мг/мл; $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$ соответственно). При этом для пациентов со средней степенью тяжести заболевания были характерны более низкие показатели ЛПБ в сравнении с лёгким течением ОКИ ($p \leq 0,05$).

При вирусных диареях независимо от тяжести заболевания показатели ЛПБ оставались в пределах условной нормы: лёгкая степень тяжести — 4675 [4019–5861] мг/мл, среднетяжёлая — 5131 [4121–5848] мг/мл. Цифры были соизмеримы с контрольной группой ($p \geq 0,05$).

Необходимо учитывать, что экспрессия ЛПБ регулируется медиаторами воспаления, в том числе ИЛ-1 β и ИЛ-10, которые играют одну из ведущих ролей ответа на липополисахарид [7]. При сравнительном анализе установлено значительное повышение уровня противовоспалительного ИЛ-10 в группах с ОКИ в сравнении с контролем. Так, при бактериальных ОКИ уровень ИЛ-10 определялся в пределах 5,518 [0,345–7,931] пг/мл, при вирусных — 5,518 [0–11,25] пг/мл, в контроле — 0 [0–0] пг/мл ($p \leq 0,01$). Показатели провоспалительного ИЛ-1 β варьировали в границах нормы и составили 0,534 [0–1,866] пг/мл и 0 [0–1,6] пг/мл в сравнении с 1,046 [0,409–1,613] пг/мл соответственно ($p \geq 0,05$). Не выявлено преимущественного синтеза цитокинов в зависимости от этиологического фактора ($p \geq 0,05$; табл. 2).

В дальнейшем мы оценили взаимодействие ИЛ-1 β , ИЛ-10 и ЛПБ в случае бактериальных ОКИ как реакцию на стимуляцию липополисахаридом. Установлена прямая зависимость синтеза ЛПБ от ИЛ-1 β ($r=+0,659$, $p \leq 0,05$). ИЛ-1 β , будучи плеiotропным цитокином, изменяет реакцию макроорганизма на воспалительный, инфекционный процесс [7, 8], воздействуя на медиаторы воспаления на всех уровнях иммунопатогенеза, в том числе и на синтез ЛПБ. В свою очередь ЛПБ индуцирует экспрессию ИЛ-10 в качестве прямой связи средней силы ($r=+0,601$, $p \leq 0,05$; см. табл. 2) в противовес липополисахариду, где отмечена обратная связь с ИЛ-10 [7]. Необходимо отметить, что ИЛ-10 играет ключевую роль в разрешении инфекции, и индукция этого цитокина может значительно улучшить иммунный ответ хозяина [9]. Следовательно, мы можем расценивать наличие высокой или низкой концентрации ЛПБ в сыворотке крови как прямой прогностический признак тяжести течения заболевания.

При ретроспективном анализе наличия и продолжительности лихорадочно-интоксикационного синдрома у пациентов с ОКИ бактериального генеза установлено, что на момент поступления лихорадочно-интоксикационный синдром был более выражен при среднетяжёлом течении и проявлялся лихорадкой до 38 °C [38–39 °C] ($p \leq 0,05$), выраженной слабостью, головными болями, отсутствием аппетита. При лёгкой степени присутствовала субфебрильная

Таблица 2. Корреляция между липополисахарид-связывающим белком (ЛПБ) и уровнем цитокинов ($p \leq 0,05$)

Клиническая группа	ЛПБ, мг/мл	ИЛ-1 β	ИЛ-10
Вирусные диареи (n=29)	5372 [4342–6139]	-0,036	-0,027
Уточнённые бактериальные диареи (n=33)	5533 [4856,5–6374,5]	+0,659	+0,601

Примечание: $r=0-0,3$ — слабая связь; $r=0,3-0,7$ — связь средней силы; $r=0,7-1$ — сильная связь; в случае результата со знаком «+» связь прямая, со знаком «-» связь обратная; ИЛ — интерлейкин.

температура тела — 37,3 °C [36,6–38 °C], вышеперечисленные симптомы были выражены слабо или отсутствовали. В стационаре на фоне проводимой терапии данное состояние сохранялось в среднем 3 ± 1 сут при средних показателях температуры тела для среднетяжёлых форм 37,8 °C [37,2–38,4 °C], лёгких — 37 °C [36,6–38,3 °C] ($p \geq 0,05$). В результате корреляционного анализа не установлена зависимость выраженности и длительности лихорадочно-интоксикационного синдрома от уровня экспрессии ЛПБ ($p \geq 0,05$).

ВЫВОДЫ

1. Липополисахарид-связывающий белок присутствует в организме как больных острыми кишечными инфекциями, так и здоровых людей. Наиболее высокий уровень липополисахарид-связывающего белка зарегистрирован у пациентов с острой кишечной инфекцией бактериальной этиологии, с преобладанием его синтеза при лёгкой степени тяжести заболевания.

2. Установлена прямая взаимосвязь липополисахарид-связывающего белка и интерлейкинов-1 β и -10. Интерлейкин-1 β индуцирует экспрессию липополисахарид-связывающего белка, который в свою очередь стимулирует синтез интерлейкина-10.

3. Определение концентрации липополисахарид-связывающего белка можно использовать для первичной дифференциальной диагностики кишечных инфекций, вызванных бактериальными агентами, что позволит значительно сузить диагностический поиск, а также прогнозировать тяжесть течения заболевания и возможность неблагоприятного исхода.

Участие авторов. Е.Н.В. и К.Т.М. проводили исследования и анализ результатов; К.Э.Н. отвечала за сбор информации; Е.А.Н. — руководитель работы.

Источник финансирования. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гюлазян Н.М., Белая О.Ф., Малое В.А. и др. Липополисахариды/эндотоксины грамотрицательных бактерий: роль в развитии интоксикации. *Эпидемиол. и инфекц. болезни.* 2014; (2): 11–16. [Gyulazyan N.M., Belaia O.F., Malov V.A. et al. Lipopolysaccharides/endotoxins of gram-negative bacteria: their role in the development of intoxication. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni.* 2014; (2): 11–16. (In Russ.)]
2. Саванович И.И., Зенова Н.Г., Пучкова Н.В. Липополисахарид-связывающий протеин и растворимый CD14 как показатели микрoэкологического нарушения в системе грамотрицательная флора и макроорганизм при функциональных нарушениях ЖКТ у детей. *Мед. ж.* 2007; (4): 96–98. [Savanovich I.I., Zenova N.G., Puchkova N.V. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 as indicators of microecological disturbance in the system of gram-negative flora and macroorganism in functional disorders of the gastrointestinal tract in children. *Meditsinskiy zhurnal.* 2007; (4): 96–98. (In Russ.)]
3. Мавзютов А.Р., Мавзютова Г.А., Бондаренко К.Р. и др. Характер изменений уровня липополисахарид-связывающего белка при различных инфекционных процессах и дисбиозах. *Ж. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.* 2011; (2): 66–72. [Mavzyutov A.R., Mavzyutova G.A., Bondarenko K.R. et al. Character of lipopolysaccharidebinding protein level changes in different pathological conditions and dysbiosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii.* 2011; (2): 66–72. (In Russ.)]
4. Бондаренко В.М., Рябченко Е.В., Веткова Л.Г. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов. *Ж. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.* 2004; (3): 98–105. [Bondarenko V.M., Ryabchenko E.V., Vetkova L.G. Molecular aspects of the damaging effects of bacterial lipopolysaccharides. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii.* 2004; (3): 98–105. (In Russ.)]
5. Зубова С.В., Грачёв С.В., Прохоренко И.Р. Участие Toll-подобного рецептора 4 в интернализации бактерий *Escherichia coli* нейтрофилами крови человека в присутствии липополисахаридов. *Мед. иммунол.* 2012; (3): 219–222. [Zubova S.V., Grachev S.V., Prokhorenko I.R. Participation of TLR4 in engulfment of escherichia coli by human blood neutrophils in presence of lipopolysaccharides. *Meditsinskaya immunologiya.* 2012; (3): 219–222. (In Russ.)] DOI: 10.15789/1563-0625-2012-3-219-222.
6. Самуилова Д.Ш., Боровкова У.Л. Липополисахарид-связывающий белок: основные функции и клиническое значение. *Клин. физиол. кровообращения.* 2013; (4): 5–9. [Samilova D.Sh., Borovkova U.L. Lipopolysaccharide-binding protein: main functions and clinical value. *Klinicheskaya fiziologiya krovoobrashcheniya.* 2013; (4): 5–9. (In Russ.)]
7. Baillie J.K., Arner E., Daub C. et al. Analysis of the human monocyte-derived macrophage transcriptome and response to lipopolysaccharide provides new insights into genetic aetiology of inflammatory bowel disease. *PLoS Genet.* 2017; 13 (3): 1006641. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006641.
8. Schmitz J., Owyang A., Oldham E. et al. IL-33 an Interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2 — associated cytokines. *Immunity.* 2005, 23: 479–490. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.09.015.
9. Peñaloza H.F., Schultza B.M., Nietoa P.A. et al. Opposing roles of IL-10 in acute bacterial infection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016, 32: 17–30. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2016.07.003.