

МИКРОБНЫЙ ФАКТОР КАК ПАРАДОКС КРИТИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПРИ АБДОМИНАЛЬНОМ СЕПСИСЕ

Карсанов А.М.¹, Карсанова З.О.¹, Саламова Ф.Т.¹

¹Негосударственное учреждение здравоохранения "Узловая больница на ст. Владикавказ ОАО "РЖД", Владикавказ, e-mail: rzdbolnica@live.ru

Статья посвящена детализации микробного фактора при грамнегативном сепсисе. Грамотрицательный, в том числе – нозокомиальный сепсис является актуальной проблемой клинической медицины. В «физиологических» концентрациях эндотоксин является необходимым стимулятором иммунокомпетентных клеток, системы коагуляции и миелопоэза, что отражает состоятельность природных антиэндотоксиновых систем. При генерализации воспаления грамнегативной этиологии, в ответ на мощное воздействие эндотоксина на клетки эндотелия и иммунного реагирования, происходит каскадное высвобождение биологически активных веществ и компенсаторная противовоспалительная реакция путем секреции/активации белково-рецепторных комплексов и цитокинов. Попытки использовать антиэндотоксиновый иммунитет при тяжелом сепсисе пока безуспешны. Перспективы улучшения результатов лечения больных с сепсисом могут быть связаны с разработкой и внедрением антицитокиновой, анти-TLR, анти-DAMP терапии, а также возможностью прерывания ядерного фактора транскрипции.

Ключевые слова: воспаление, сепсис, липополисахарид, иммунитет, лечение.

MICROBAL FACTOR, AS PARADOX CRITICAL STATE WITH ABDOMINAL SEPSIS

Karsanov A.M.¹, Karsanova Z.O.¹, Salamova F.T.¹

¹ Union station hospital, Vladikavkaz, Russian Railways, e-mail: rzdbolnica@live.ru

Article is devoted to detailing microbial factors in Gram-negative sepsis. Gram, including - nosocomial sepsis is an important problem in clinical medicine. At physiological concentrations of endotoxin is essential stimulator of immune cells and myelopoiesis coagulation system that reflects consistency antiendotoxin natural systems. At generalization of Gram-negative inflammatory etiology, in response to the powerful effect of endotoxin on the endothelial cells and the immune response, there is a cascading release of biologically active substances and compensatory anti-inflammatory response by secretion/activation protein-receptor complexes and cytokines. Attempts to use the anti-endotoxin immunity in severe sepsis so far unsuccessfully. Prospects for improving the results of treatment of patients with sepsis may be connected with the development and implementation of anti-cytokine, anti-TLR, anti-DAMP therapy, as well as the possibility of interruption of nuclear transcription factor.

Keywords: inflammation, sepsis, lipopolysaccharide, immunity, treatment.

Целесообразность выделения грамотрицательного сепсиса обусловлена особой актуальностью проблемы абдоминального сепсиса (АС), а также других нозокомиальных источников генерализованных инфекций у больных в критических состояниях [1].

Грамотрицательные бактерии (ГОб) населяют покровные ткани, являясь источником эндотоксина, который в «физиологической» концентрации 0,001 мг/кг стимулирует иммунокомпетентные клетки, систему коагуляции, миелопоэз. Авторство термина "эндотоксин" принадлежит Richard Pfeiffer, который в 1890-х годах установил различия токсических свойств эндогенных веществ ГОб, по сравнению с токсинами, выделяемыми вне бактериальной клетки, которые были ранее названы "экзотоксины" [7]. Эндотоксин представляет собой сложный комплекс внешней оболочки ГОб с активной субстанцией – липополисахаридом (ЛПС), состоящим из липида А и ковалентно связанной с ним

полисахаридной части, что лежит в основе его термостабильности и, вероятно, низкой иммуногенности. Каждая бактериальная клетка *E. Coli* имеет приблизительно 10^6 молекул ЛПС [7].

Некоторое количество кишечного эндотоксина постоянно проникает в лимфатическую систему и кровь из воротной вены, несмотря на то, что кишечная слизистая представляет собой мощный барьер. Толерантность к эндотоксину, или иначе – антиэндотоксиновый иммунитет (АЭИ), может быть индуцирован при введении малых доз ЛПС, что было продемонстрировано еще в 60-е годы на добровольцах.

ЛПС обладает широким спектром биологического воздействия на макроорганизм, ввиду чего он уже давно определен не только в качестве потенциального маркера грамнегативной инфекции, но и в виде потенциальной мишени для антиэндотоксиновой терапии [7, 8, 15].

Наличие в системном кровотоке малых доз ЛПС не сопровождается выраженными токсическими реакциями, что может быть объяснено наличием в организме природных гуморальных и клеточных антиэндотоксических систем, способных достаточно эффективно связывать и детоксицировать ЛПС, снижая его биологическую активность в тысячи раз [8].

При экспериментальном введении животным эндотоксина было выявлено около 20 различных эффектов, но до сих пор не выявлен главный коррелятор выживаемости при грамтрицательном сепсисе [15]. Дозозависимый эффект экзогенно введенного эндотоксина, из всех представителей животного мира в наибольшей степени проявляется на человеке, как наименее толерантном к нему из всех живых организмов [13]. Главные точки приложения действия эндотоксина – клетки эндотелия и иммунного реагирования. Известно, что в результате воздействия на моноциты/макрофаги эндотоксин обеспечивает высвобождение биологически активных веществ: интерлейкинов, лейкотриенов, простагландинов, фактора некроза опухоли- α , метаболитов кислорода, фактора активации тромбоцитов, серотонина, фактора Виллебранда, оксида азота, фактора Хагемана, лизосомальных ферментов [2, 8].

Важнейшая роль в формировании АЭИ отводится липополисахарид-связывающему белку (ЛСБ) плазмы, который представляет собой секретируемый сывороточный белок, компонент острой фазы воспаления, который с высокой афинностью связывается с липидом А, компонентом бактериального эндотоксина, и обеспечивает его доставку на мембранный рецептор CD14 на макрофагах, тем самым обеспечивая первый этап в процессе моноцитарного иммунного ответа, реализуемого в виде синтеза провоспалительных цитокинов и иных медиаторов воспаления при тяжелой генерализованной инфекции [3, 8].

На базе понимания высокой афинности ЛСБ к ЛПС возникла и была осуществлена идея синтеза антиэндотоксиновых антител, как возможной основы для терапии тяжелого

сепсиса (ТС) на уровне блокирования “цитокинового шквала” [3]. Однако на данном этапе преждевременно говорить о перспективности этого направления в лечении ТС, поскольку приходится принимать во внимание целый ряд непреодолимых пока факторов [8]. Прежде всего, приходится учитывать, что грамнегативный сепсис не однороден по этиологическому фактору. Наиболее изучены свойства ЛПС кишечной палочки, а свойства ЛПС других многочисленных представителей этой группы микроорганизмов известны гораздо хуже. При развитии сепсиса исходно неизвестно, какой из возбудителей является доминантным патогеном? В рейтинге морбидности среди ГОБ лидирует синегнойная палочка, в то время как кишечная палочка является наиболее “безобидной” в этом ряду.

Оказалось, что при подтвержденной грамнегативной бактериемии, эндотоксинемия не подтверждается у 20-50% пациентов, а ее доказанность коррелирует с риском смерти только при многофакторном анализе. Так, по результатам метаанализа J.C. Hurley и соавт., посвященного изучению частоты летальности в зависимости от грамнегативной бактериемии и эндотоксинемии, наибольшая летальность была в группе больных с сочетанием обоих факторов (19%), в сравнении с их изолированной констатацией и грамположительным сепсисом (менее 10%) [8].

Функциональную конкурентность ЛСБ составляет так называемый белок, усиливающий бактерицидное действие нейтрофилов (англ. bactericidal/permeability-increasing protein – BPI), представляющий из себя 456-фрагмент катионного белка (~50 kDa), продуцируемого только предшественниками полиморфноядерных лейкоцитов и содержащийся в первичных гранулах этих клеток [5]. Для BPI характерна высокая аффинность и избирательная способность к связыванию эндотоксинов бактерий посредством образования комплекса с ЛПС. Эти свойства аминоконцевых фрагментов молекулы BPI послужили основанием для доклинических и последующих клинических испытаний применения рекомбинантных аминоконцевых фрагментов BPI у разных категорий пациентов, правда пока с неоднозначными и избирательными клиническими эффектами [10].

Важнейшая роль в антиэндотоксиновом иммунитете принадлежит CD14 – мембранному гликозилфосфатидилинозитол-связанному белку, экспрессированному на поверхности клеток миелоидного ряда, особенно макрофагах, являющемуся компонентом тройного рецепторного комплекса CD14/TLR4/MD2, избирательно распознающего ЛПС и вне которого (без ко-рецепторов) CD14 не способен генерировать трансмембранный сигнал [9, 15].

Ключевую роль во врожденном иммунитете играют толл-подобные рецепторы (TLR) – класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный

иммунный ответ [6]. У человека существует 10 толл-подобных рецепторов (от TLR1 до TLR10). Механизм активации TLR4, распознающего и связывающегося с ЛПС клеточной стенки ГОБ, достоверно не известен, хотя с равной вероятностью возможна как прямая, так и опосредованная активация. После того, как комплекс LPS-LBP-CD14 активирует TLR4, который в свою очередь посредством MyD88-цитозольного адаптерного белка и фермента интерлейкин рецептор-ассоциированной киназы (IRAK), представляющей собой серин/треонин-киназу, индуцирует синтез ядерного фактора- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) [9, 12]. NF- $\kappa\beta$ содержит транскрипционные факторы, которые проникают в ядро клетки и активируют гены, регулирующие противовоспалительную фазу, включая регуляцию и синтез противовоспалительных цитокинов и белков острой фазы, активацию ферментов (циклооксигеназы, липооксигеназы, синтазы NO) и протеаз [1, 15].

Что касается MD-2, то он представляет собой секретируемый белок, который связывается с внеклеточным доменом TLR4 и также играет важную роль в трансмембранной сигнализации. При ТС сигнал многократно усиливается и передается другим клеткам и тканям, трансформируясь в неконтролируемый каскад, а свободные (растворимые) молекулы CD14 также связывают эндотоксин и переносят его к эндотелиальным клеткам, которые собственных поверхностных CD14 не имеют. Одновременно свободные молекулы CD14 обеспечивает встраивание эндотоксина в липопротеиды, тем самым противодействуя развитию воспаления [13].

В физиологических условиях адекватно функционирующие эндотоксинсвязывающие факторы организма обеспечивают достаточно эффективную защиту от вредных последствий действия высоких концентраций ЛПС. Причинами увеличения проникновения ЛПС в системный кровоток (СК) могут быть как нарушения барьерной функции стенки кишечника (непосредственное ее повреждение, нарушения микроциркуляции в сосудах брыжейки), так и массовое разрушение бактерий. При развитии различных инфекционных процессов, стресса, ряда заболеваний неинфекционного генеза увеличивается транслокация интестинального ЛПС в СК, что приводит к истощению факторов АЭИ и снижению титра антиэндотоксиновых антител. Таким образом, АЭИ является одним из факторов естественной защиты организма, а все перечисленные выше вещества ответственны за всю клиническую картину грамотрицательного сепсиса [2, 3, 13].

В ряде исследований последних лет было установлено, что внутриклеточные молекулы (например, внутриклеточные белки или их фрагменты, ДНК и даже неорганические кристаллы), которые экспрессируются или высвобождаются после травмы тканей хозяина, являются молекулярными паттернами повреждения (Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP)). К ключевым DAMP относятся: митохондриальная ДНК [19] и

высоко мобильный ядерный протеин-B1 (англ. high-mobility group protein B1(HMGB1)) или амфотерин – стабилизатор нуклеосом практически во всех эукариотических клетках [17].

Суммируя достаточно доказанные на сегодняшний день представления о патофизиологической концепции сепсиса можно заключить, что системное воспаление – это типовой, мультисиндромный, фазоспецифичный патологический процесс, характеризующийся тотальной воспалительной реактивностью эндотелиоцитов, плазменных, клеточных факторов крови и соединительной ткани, а на заключительных этапах и микроциркуляторными расстройствами в жизненно важных органах и тканях [1].

Септический ответ – сложная цепь событий, связанных с про- и противовоспалительными процессами, гуморальной и клеточной реакцией и вызванными вследствие этого глубокими изменениями на микроциркуляторном уровне. Значимость некоторых из отдельных маркеров сепсиса не подвергается сомнению, однако путь, направленный на методичное изучение роли каждого из огромного количества постоянно пополняющихся за счет впервые открытых биологических маркеров и мишеней физиологических сигналов, не решит проблему точного диагноза или прогноза эффективности лечения [1, 11, 12, 15]. Разработанные по результатам таких экспериментов схемы лечения дают хорошие результаты только в доклинической фазе испытаний [8]. В клинической практике пока реальных результатов нет, но с формированием цельного научного понимания активаторных механизмов и всей совокупности взаимодействий специфических лигандов и рецепторов, есть шансы приблизить решение такой крайне сложной общебиологической и клинической проблемы, как сепсис [16].

Значение дальнейшего изучения патофизиологических закономерностей септического ответа заключается в том, что результаты новых масштабных исследований могут стать основанием для признания в качестве перспективных методов терапии сепсиса: антицитокиновой [15], анти-TLR [6, 9] анти-DAMP, в частности таргетную к HMGB1 [17, 18], а также терапию, акцентированную на прерывание ядерного фактора транскрипции [4, 14].

Список литературы

1. Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение / Практическое руководство под ред. Савельева В.С., Гельфанда Б.Р. – М.: МИА. – 2010. – 352 с.
2. Andra J. Interactions between lipid A and serum proteins / J. Andra, T. Gutschmann, M. Muller, A.B. Schromm // Adv. Exp. Med. Biol. – 2009. – Vol. 667. – P. 39–51.
3. Brandenburg K. Peptide-based treatment of sepsis / K. Brandenburg, J. Andra, P. Garidel, T. Gutschmann // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 90. – № 3. – P. 799–808.

4. Calzado M.A. NF-kappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer / M.A. Calzado, S. Bacher, M.L. Schmitz // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14. – № 3. – P. 367–376.
5. Elsbach P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense / P. Elsbach // *J. Leucoc. Diol.* – 1998. – Vol. 64. – № 1. – P. 14–18.
6. Hennessy E.J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? / E.J. Hennessy, A.E. Parker, L.A. O'Neill // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2010. – Vol. 9. – № 4. – P. 293–307.
7. Hitchcock P.J. Lipopolysaccharide nomenclature—past, present, and future / P.J. Hitchcock, L. Leive L, P.H. Makela et al. // *J. Bacteriol.* – 1986. – Vol. 166. – № 3. – P. 699–705.
8. Hurley J.C. Towards clinical applications of anti-endotoxin antibodies; a re-appraisal of the disconnect / J.C. Hurley // *Toxins (Basel)* – 2013. – Vol. 5. – № 12. – P. 2589–2620.
9. Leon C.G., Tory R., Jia J. et al. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases / C.G. Leon, R. Tory, J. Jia et al. // *Pharm. Res.* – 2008. – Vol. 25. – № 8. – P. 1751–1761.
10. Levy O. Therapeutic potential of the bactericidal/permeability-increasing protein / O. Levy // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2002. – Vol. 11. – № 2. – P. 159–167.
11. Namas R., Zamora R., Namas R. et al. Sepsis: Something old, something new, and a systems view / R. Namas, R. Zamora, R. Namas et al. // *J. Crit. Care* – 2012. – Vol. 27. – № 3. – P. 314.e1–314.e11.
12. Nduka O.O. The pathophysiology of septic shock / O.O. Nduka, J.E. Parrillo // *Crit. Care Clin.* – 2009. – Vol. 25. – № 4. – P. 677–702.
13. Opal S.M. The clinical relevance of endotoxin in human sepsis: A critical analysis / S.M. Opal // *J. Endotoxin. Res.* – 2002. – Vol. 8. – № 6. – P. 473–476.
14. Uwe S. Anti-inflammatory interventions of NF-kappaB signaling: potential applications and risks / S. Uwe // *Biochem. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 75. – № 8. – P. 1567–1579.
15. Vincent J.L. The last 100 years of sepsis / J.L. Vincent, E. Abraham // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2006. – Vol. 173. – № 3. – P. 256–263.
16. Vodovotz Y. Translational systems biology of inflammation and healing / Y. Vodovotz // *Wound repair regen.* – 2010. – Vol. 18. – № 1. – P. 3–7.
17. Wang H. Novel HMGB1-inhibiting therapeutic agents for experimental sepsis / H. Wang, M.F. Ward, A.E. Sama // *Shock.* – 2009. – Vol. 32. – № 4. – P. 348–357.
18. Yang H. Targeting HMGB1 in inflammation / H. Yang H, K.J. Tracey // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1799. – №№ 1–2. – P. 149–156.
19. Zhang Q. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang, M. Raouf, Y. Chen et al. // *Nature.* – 2010. – Vol. 464. – № 7285. – P. 104–107.

Рецензенты:

Слепушкин В.Д., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии с курсом ФПДО ГБОУ ВПО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, Заслуженный деятель науки РФ, г. Владикавказ;

Хестанов А.К., д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней № 3 ГБОУ ВПО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Владикавказ.