

© Припуло Л.Ф.

УДК 616.27-008 : 612.027.39

МЕХАНИЗМЫ ЭНДОТОКСИНЗАВИСИМОГО ИММУННОГО ОТВЕТА КАК КРИТЕРИИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ У ДЕТЕЙ НА ЭТАПЕ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ

Л.Ф.Припуло

Крымский государственный медицинский университет им. С.И.Георгиевского, г. Симферополь

МЕХАНІЗМИ ЕНДОТОКСИНЗАЛЕЖНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ЯК КРИТЕРІЇ ПАТОГЕНЕТИЧНОЇ ІМУНОКОРЕКЦІЇ ГНІЙНО-СЕПТИЧНИХ СТАНІВ У ДІТЕЙ НА ЕТАПІ ГОСПІТАЛІЗАЦІЇ

Резюме. Обстежили 444 дітей із гнійно-септичними захворюваннями у віці 1-14 років. Першу групу становили 220 дітей з гострою деструктивною пневмонією, другу – 110 дітей з гострим гематогенним остеомієлітом, третю – 114 дітей з перитонітом. Ендотоксин грам-негативної інфекції призводить до різкого зниження загального IgG і анти-ET-IgG, що зумовлено пригніченням цитокінів гуморального профілю (ІЛ-4, ІЛ-10), масивною гіперсекрецією прозапальних медіаторів і неспецифічних компонентів антиендотоксिनного імунітету – LBP та sCD14.

Ключові слова: ендотоксин, імунітет, гнійно-септичні стани, діти.

С середины 80-х годов прошлого столетия многие исследователи отмечают рост частоты и тяжести гнойно-септических заболеваний у детей, что делает проблему лечения хирургической инфекции особенно актуальной [1]. В настоящее время главным звеном в защите макроорганизма от инфекции считают собственную иммунологическую резистентность больного. Нарушения в иммунной системе часто способствуют возникновению различных гнойных осложнений, частота которых колеблется от 23,5 % до 71,2 % [2]. Существующие в настоящее время способы диагностики эндотоксического синдрома, оценки иммунологических нарушений и их интерпретация лежат в плоскости междисциплинарной интеграции. Быстрота определения тяжести этого синдрома позволяет адекватно провести его коррекцию [3].

Ввиду того, что именно эндотоксемия, а

не бактериальная инфекция, чаще выявляется у больных с развернутым SIRS и шоком, возникла теория транслокации эндотоксинов из кишечника, которые способствуют развитию септического синдрома. Гипоксическое повреждение слизистой оболочки может вызвать повышение проницаемости кишечной стенки с последующей эндотоксемией или даже бактериемией [4]. Теория бактериальной транслокации лежит в основе множества тяжелых патологических реакций, возникающих как в начале развития, так и в финальной стадии сепсиса. По данным аутопсии, нарушения (от поверхностного до тотального некроза) выявляются у 53 % взрослых и 61 % детей [5]. Проницаемость слизистой оболочки ведет к транслокации бактерий, бактериальных продуктов и провоспалительных цитокинов в порталный и системный кровоток. Кроме транслокации бактерий и их продуктов

через кишечную стенку, значительную роль в системной интоксикации играет их попадание в лимфатическую систему кишечника, причем патологическое влияние проявляется в основном на местном уровне [6]. Таким образом, системная воспалительная реакция определяется составом и вирулентностью идентифицируемых микроорганизмов и по характеру своих основных клинических и лабораторных проявлений является универсальной в характеристике определенных нозологических форм неотложной хирургической патологии. Практически все наблюдаемые реакции опосредованы действием токсинов и медиаторов различной природы.

Основные клинические проявления сепсиса и полиорганной недостаточности связывают с высоким уровнем провоспалительных цитокинов, на них же основаны некоторые критерии, которые предлагаются в качестве прогностических признаков. Однако данные об уровнях тех или иных цитокинов следует трактовать осторожно. Плазменные уровни про- или противовоспалительных субстанций могут не отражать локальный статус. Например, у больных перитонитом концентрация TNF- α , IL-6 и эндотоксина была во много раз выше в перитонеальном экссудате, чем в крови [7].

Считается, что LPS грам-негативной флоры играет одну из ведущих ролей в формировании синдрома эндогенной интоксикации [8, 9]. Он обладает исключительно высокой биологической активностью и относится к числу наиболее сильных экзогенных модуляторов иммунологической реактивности. Основное патофизиологическое действие LPS опосредуется индукцией выброса целого ряда эндогенных медиаторов воспаления, синтезируемых в основном клетками миеломоноцитарного ряда [10].

Цель исследования. Проанализировать эндотоксин-зависимый иммунный ответ как критерий обоснования патогенетической иммунокоррекции гнойно-септических состояний у детей на этапе госпитализации.

Материал и методы. Обследовано 444 детей с гнойно-септическими заболеваниями в возрасте 1-14 лет. Количество мальчиков, девочек и возраст в исследуемых группах больных были одинаковыми. Больные разделены на группы: 1 группа – 220 детей с острой деструктивной пневмонией (ОДП), 2 группа – 110 детей с острым гематогенным остеомиелитом (ОГО), 3 группа – 114 детей с перитонитом. Контрольную группу составили 110 условно здоровых детей того же возраста.

Из 220 больных с ОДП у 140 (64 %) была легочная форма пневмонии, у 80 (36 %) – легочно-плевральная. Больные ОГО распределены следующим образом: токсическая форма выявлена у 15 (13,6 %) детей, септикопиемическая – 36 (32,7 %), локальная – 59 (53,6 %). Согласно классификации В.К.Гостищева (1992), больные перитонитом распределены на: местный перитонит – 70 (61,4 %), диффузный – 28 (24,5 %), разлитой – 16 (14,0 %). В зависимости от тинкториальных свойств возбудителя пациенты разделены на 3 субгруппы: с грам-негативной, грам-позитивной и смешанной флорой.

Основой оценки состояния системы иммунитета служила классическая развернутая иммунограмма, включающая общее количество лимфоцитов, концентрацию основных типов иммуноглобулинов (IgA, IgG, IgM), количество В-лимфоцитов (CD22+), Т-супрессоров (CD8+), Т-хелперов (CD4+), CD16-позитивных клеток. Дополнительно определяли активационный маркер CD25, уровень экспрессии Fas (CD95) как классического маркера готовности клеток к экзогенному апоптозу. Для оценки процессов передачи антигенных сигналов определяли также уровень экспрессии классических молекул антигенов главного комплекса гистосовместимости (HLA-I и HLA-II). Уровень экспрессии маркеров CD на иммунокомпетентных клетках (лимфоцитах) определяли с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител фирмы "Протеиновый контур" (Россия). Для исследования иммуноглобулинов А, М и G использовали иммуноферментный анализ с использованием тест-систем "Имуноглобулины А, М, G-ИФА" производства ООО НВЛ "Гранум". Концентрацию цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИФ- γ) в сыворотке крови исследовали иммуноферментным методом на основе двухэтапного процесса с пероксидазой хрена в качестве индикаторного

фермента. Использовали наборы реагентов "Diacclone" для определения ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и "Immunotech" для ИФ-γ (Франция). Измерение активности связанной пероксидазы проводили на автоматическом фотометре для микроплашкетов "Stat Fax 2100" (США). Провоспалительные цитокины (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа при помощи тест-систем производства института им. Пастера и ООО "Протеиновый контур" (Россия). Содержание цитокинов выражали в пг/мл. Содержание С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови определяли "сэндвич"-вариантом тИФА с использованием биотин-стрептавидиновой системы усиления сигнала. Источником антител к СРБ служила коммерческая овечья антисыворотка к СРБ человека производства ООО "Микрофлора" (Россия). Оптическую плотность конечного продукта ферментативной реакции определяли с помощью иммуноферментного анализатора Stat Fax 2100 (Awareness Tech. Inc., USA) при длине волны 492 нм. Содержание СРБ выражали в мкг/мл. Уровни антиэндоксинных антител классов А, М, G (соответственно анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа [11]. В качестве антигена использовали LPS грамотрицательной энтеробактерии *Escherichia coli* K30 (O9:K30:H12), выделенной из бактериальной биомассы методом водно-фенольной экстракции и дополнительно очищенной от примесей РНК обработкой цетавлоном (Serva, Германия). Уровни анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM и анти-ЭТ-IgG выражали в условных единицах оптической плотности конечного продукта ферментативной реакции для разведения тестируемой сыворотки крови 1:50 (для анти-ЭТ-IgA, анти-ЭТ-IgM) и 1:200 (для анти-ЭТ-IgG). Для исследования LBP и sCD14 использовали тест-системы "Hbt Human LBP ELISA Kit, Product Number: HK315 и Hbt Human sCD14 ELISA Kit, Product Number: HK320" ("Hycult biotechnology", Голландия). Образцы и стандартные растворы инкубировали в титрационный микроплашкет, покрытый антителами против LBP или sCD14. Во время инкубации LBP или sCD14 связывались с антителами, несвязанный материал извлекался вымыванием. Биотинилированные вторые антитела к LBP или sCD14 добавлялись в микроплашкет, пос-

ле чего проводили вторичную отмывку. Стрептовидин-пероксидазный конъюгат добавляли в образцы, после чего остаток удаляли повторным вымыванием, останавливали реакцию добавлением лимонной кислоты. Оптическую плотность определяли на анализаторе "StatFox 2100" на длине волны 450 нм [12]. Содержание LBP и sCD14 выражали в мкг/мл.

Все полученные результаты подвергнуты статистической обработке для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы "MedStat" (серийный № MS0011) ДНПП ООО "Альфа" (Донецк).

Результаты исследования и их обсуждение. При деструктивной пневмонии у детей на первые сутки госпитализации наблюдается вторичный комбинированный иммунодефицит: уровень CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD25+, В-лимфоцитов и иммуноглобулинов А, М, G достоверно ниже контроля, при этом иммунодефицит сильнее выражен при легочно-плевральной форме. У больных с грам-негативной флорой при легочной форме клеточный иммунодефицит практически нивелируется, а при легочно-плевральной значительно менее выражен, чем в случае с грам-позитивной и смешанной флорой; гуморальный иммунодефицит протекает со значительным снижением IgG в случае грам-негативной флоры, а степень его выраженности преобладает при легочно-плевральной форме. Уровень экспрессии проапоптотического маркера CD95 и HLA-II достоверно выше у больных с пневмонией по сравнению с контролем, при более тяжелой легочно-плевральной форме в субгруппах с грам-позитивной и смешанной флорой степень экспрессии CD95 и HLA-I достоверно выше по сравнению с легочной формой.

ОГО приводит к дисрегуляции как клеточного, так и гуморального звена иммунного ответа, который связан с активацией лимфоцитов посредством рецепторных структур CD25, CD95 и HLA-II и проявляется активацией цитотоксических механизмов (увеличение уровня CD8+, CD16+ клеток) с одной стороны, с другой – к Т-хелперопении в ассоциации с низкими уровнями

IgG и IgM. Для токсической и септикопиемической формы ОГО характерны следующие изменения: концентрация CD4+ клеток достоверно ниже в грам-положительной и смешанной субгрупп, чем в грам-отрицательной; при токсической форме в грам-отрицательной субгруппе количество CD8+, CD16+, CD25+ клеток достоверно выше, чем в двух других; в субгруппах с грам-отрицательной флорой были самые низкие значения IgG, которые достоверно отличались от других субгрупп в пределах одной формы.

Перитонит у детей приводит к резкому снижению клеточного и гуморального звена иммунитета в ассоциации с повышением экспрессии проапоптотического маркера CD95 и HLA-II по сравнению с показателями контрольной группы. Признаки комбинированного приобретенного иммунодефицита в случае грам-отрицательной флоры достоверно превосходит по тяжести грам-положительную и смешанную субгруппы с максимальной степенью выраженности при разлитой форме перитонита.

Таким образом, анализируя показатели системного иммунитета у детей с гнойно-септическими заболеваниями в период госпитализации, можно утверждать, что грам-отрицательная инфекция вызывает в основном иммунодефицит гуморального звена иммунитета, который проявляется резким снижением общего IgG.

Следующим этапом работы стал анализ провоспалительных медиаторов и цитокинов Т-хелперов 1, 2 типа. У детей с деструктивной пневмонией уровни ИЛ-1 β , ФНО- α и СРБ значительно выше ($P < 0,01$) от показателей контроля. При легочно-плевральной форме и грам-отрицательной флоре наблюдаются самые высокие уровни ИЛ-1 β и СРБ. Кроме того, деструктивная пневмония с грам-отрицательной и смешанной формой ассоциируется с высокими значениями ИЛ-2 и ИФ- γ и низкими уровнями ИЛ-4 и ИЛ-10, при этом самые низкие уровни зафиксированы для грам-отрицательной субгруппы.

Интенсивность воспалительного про-

цесса (уровень провоспалительных медиаторов) тесно зависит от формы ОГО и связана с цитокиновым дисбалансом Т-хелперов 1, 2 типов, с активацией цитокинов клеточного типа и угнетением гуморальных. Дисрегуляция цитокинов Тх₁/Тх₂ не зависит от формы ОГО. Грам-отрицательная инфекция при ОГО ассоциируется с преобладанием цитокинов клеточного типа и угнетением гуморального, при этом данный дисбаланс при грам-отрицательной флоре связан с гиперактивацией провоспалительных медиаторов.

Гиперсекреция провоспалительных медиаторов в брюшной полости при перитоните у детей связана с дисбалансом в системе цитокиновой регуляции Т-хелперов 1, 2 типов, который проявляется гиперсекрецией цитокинов клеточного профиля (ИЛ-2, ИФ- γ) и снижением гуморального (ИЛ-4, ИЛ-10). Грам-отрицательная инфекция по сравнению с грам-положительной и смешанной при перитоните ассоциируется более выраженной секрецией провоспалительных медиаторов, которая связана с преобладанием цитокинов клеточного профиля.

Выявленные нами изменения у детей с различными гнойно-септическими состояниями свидетельствуют о том, что грам-отрицательная инфекция приводит к гиперсекреции провоспалительных медиаторов и активации цитокинов Т-хелперов 1 типа (ИЛ-2, ИФ- γ), угнетению цитокинов Т-хелперов 2 типа (ИЛ-4, ИЛ-10) по сравнению с грам-положительной и смешанной флорой.

На заключительном этапе исследования проанализировали показатели антиэндоксинного иммунитета. У детей с деструктивной пневмонией наблюдается дисбаланс антиэндоксинного иммунитета: уровни анти-ЭТ-IgG при легочной и легочно-плевральной формах достоверно ниже по сравнению с контролем и достоверно не отличаются ($P > 0,05$) между легочной и легочно-плевральной формами; уровень анти-ЭТ-IgM достоверно выше контроля, значения которого не отличаются ($P > 0,05$) между формами пневмонии; анти-ЭТ-IgA досто-

верно выше при легочно-плевральной форме по сравнению с контролем и легочной формой; уровни LBP и sCD14 значительно выше контроля. В зависимости от тинкториальных свойств возбудителя антиэндотоксиновый иммунитет характеризуется следующими изменениями: уровень анти-ЭТ-IgG грам-отрицательной флоры легочно-плевральной формы достоверно выше от значений аналогичной субгруппы легочной формы, а содержание анти-ЭТ-IgG в грам-положительной субгруппе выше для легочной формы; уровень анти-ЭТ-IgM самый высокий для грам-отрицательной субгруппы по сравнению с грам-положительной и смешанной как для легочной, так и легочно-плевральной форм; значения LBP и sCD14 самые высокие для грам-отрицательной субгруппы легочной и легочно-плевральной форм.

ОГО у детей приводит к дефициту высокоаффинных анти-ЭТ-IgG и активации неспецифических (врожденных) компонентов (LBP и sCD14), низкоаффинных анти-ЭТ-IgM, анти-ЭТ-IgA антиэндотоксинового иммунного ответа, который связан с тяжестью состояния детей. Грам-отрицательная инфекция при ОГО ведет к резкому снижению концентрации анти-ЭТ-IgG и возрастанию концентрации анти-ЭТ-IgM, анти-ЭТ-IgA, LBP и sCD14 в сыворотке крови детей на первые сутки госпитализации. При этом наиболее выраженные изменения установлены для токсической формы ОГО. Амплитуда изменения показателей также связана с типом возбудителя и была наибольшей в грам-отрицательных субгруппах.

Перитонит у детей приводит к дисрегуляции в системе антиэндотоксинового иммунитета, которая проявляется угнетением специфического звена (резкое снижение высокоаффинных анти-ЭТ-IgG) и активацией неспецифических компонентов (повышение уровня LBP и sCD14) с наибольшей степенью выраженности для разлитой формы перитонита. Установленная зависимость тяжести перитонита от степени дисрегуляции антиэндотоксинового иммуните-

та наиболее характерна для грам-отрицательной флоры, при которой наблюдается резкое снижение анти-ЭТ-IgG и повышение анти-ЭТ-IgM, анти-ЭТ-IgA, LBP и sCD14 по сравнению с грам-положительной и смешанной инфекцией.

Анализ показателей антиэндотоксинового иммунитета у детей с гнойно-септическими состояниями еще раз продемонстрировал основные иммунопатогенетические характеристики грам-отрицательной инфекции эндотоксин-зависимого иммунного ответа. Эндотоксинемия у детей приводит к резкому снижению высокоаффинных анти-ЭТ-IgG и активации неспецифических компонентов LBP и sCD14 по сравнению с грам-положительной и смешанной инфекцией.

Полученные результаты реагирования системы иммунитета на эндотоксин грам-отрицательной инфекции указывают на то, что резкое снижение общего IgG и анти-ЭТ-IgG связано с угнетением цитокинов гуморального профиля (ИЛ-4, ИЛ-10) с одной стороны, с другой – с массивной гиперсекрецией провоспалительных медиаторов и неспецифических компонентов антиэндотоксинового иммунитета LBP и sCD14.

Выводы. 1. Гнойно-септические заболевания у детей, вызванные грам-отрицательной инфекцией, приводят к дефициту специфических антител класса G к эндотоксину. 2. Дефицит специфических антител класса G к эндотоксину у детей с гнойно-септическими состояниями ассоциируется с низким уровнем общего IgG, гиперсекрецией провоспалительных медиаторов и неспецифических компонентов антиэндотоксинового иммунитета LBP и sCD14.

Перспективы дальнейших исследований. С учетом полученных данных о реагировании иммунитета на эндотоксин грам-отрицательной флоры у больных с гнойно-септическими состояниями целесообразно изучить патогенетическую иммунокоррекцию с использованием донорской плазмы, обогащенной специфическими антителами к эндотоксину, у данной категории детей в зависимости от стадийности септического процесса.

Литература

1. Баиров Г.А. Срочная хирургия детей: [рук. для врачей] / Баиров Г.А. – СПб., 1997. – 462 с. 2. Цуман В.Г. Гнойно-септические осложнения острых хирургических заболеваний у детей / В.Г.Цуман, А.Е.Машиков. – М.: Медицина, 2005. – 288 с. 3. Белоцкий С.М. Механизмы иммунитета при инфекциях, вызванных условно-патогенными микроорганизмами / С.М.Белоцкий // Иммунология инфекционного процесса; под ред. В.И.Покровского, С.И.Гордиенко, В.И.Литвинова. – М., 1994. – С. 199-209. 4. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma: relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiply organ failure / R.M.Roumen, T.Hendriks, J. van der Ven-Jonderkrijg [et al.] // *Ann. Surg.* – 1993. – Vol. 218. – P. 769-776. 5. Ischemic intestinal complications in patients with burns / M.H.Desai, D.N.Herndon, R.L.Rutan [et al.] // *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1991. – Vol. 172. – P. 257-261. 6. Peng Y. Intestinal lymphatic circulation is one of the important portals for microbial translocation after thermal injury / Y.Peng, G.X.Xiao, L.Ma // *Chin. J. Plastic Surg. Burns.* – 1996. – № 12. – P. 83-85. 7. de Bel E.E. Systemic inflammation after trauma, infection, and cardiopulmonary bypass: is autodestruction a necessary evil? / E.E. de Bel, R.J.S.Goris // *Multiply Organ Failure.* – 2000. – P. 71-80. 8. Fry D.E. Multiple system organ failure / D.E.Fry // *Surg. Clin. J. Amer.* – 1988. – Vol. 68, № 1. – P. 107-122. 9. Heine H. The biology of endotoxin / H.Heine, E.T.Rietschel, A.J.Ulmer // *Mol. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 19, № 3. – P. 279-296. 10. LPS and cytokine-activated endothelium / A.Bierhaus, J.Chen, B.Liliensiek, P.P.Nawroth // *Semin. Thromb. Hemost.* – 2000. – Vol. 26, № 5. – P. 571-587. 11. Гордиенко А.И. Микротурбидиметрический метод определения IgG, IgM, IgA человека / А.И.Гордиенко, В.А.Белоглазов, А.И.Гордиенко // *Имунол. та алергол.* – 2000. – № 1. – С. 12-15. 12. Novel enzyme immunoassay utilizing lipopolysaccharide-binding protein as a capture molecule for the measurement of chlamydial lipopolysaccharide in serum / T.Tirola, A.Jaakkola, A.Bloigu [et al.] // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2006. – Vol. 54, № 1. – P. 7-12.

МЕХАНИЗМЫ ЭНДОТОКСИНЗАВИСИМОГО ИММУННОГО ОТВЕТА КАК КРИТЕРИИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИММУНОКОРРЕКЦИИ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ У ДЕТЕЙ НА ЭТАПЕ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ

Резюме. Обследовали 444 детей с гнойно-септическими заболеваниями в возрасте 1-14 лет. Первую группу составили 220 детей с острой деструктивной пневмонией, вторую – 110 детей с острым гематогенным остеомиелитом, третью – 114 детей с перитонитом. Эндотоксин грам-негативной инфекции приводит к резкому снижению общего IgG и анти-ET-IgG, которое связано с угнетением цитокинов гуморального профиля (ИЛ-4, ИЛ-10), массивной гиперсекрецией провоспалительных медиаторов и неспецифических компонентов антиэндотоксинового иммунитета – LBP и sCD14.

Ключевые слова: эндотоксин, иммунитет, гнойно-септические состояния, дети.

MECHANISMS OF ENDOTOXIN-DEPENDENT IMMUNE RESPONSE AS CRITERIA OF PATHOGENETIC IMMUNOCORRECTION OF PURULENT-SEPTIC CONDITIONS IN CHILDREN AT THE STAGE OF HOSPITALISATION

Abstract. 444 children of 1-14 years old with purulent-septic diseases have been examined. The first group consisted of 220 children with acute destructive pneumonia, the second one – 100 children with acute hematogenous osteomyelitis the third one – 114 children with peritonitis. The endotoxic of a gram-negative infection leads to a sharp drop of total Ig G and anti-ET-Ig G that is linked with an inhibition of the cytokines of the humoral profile (IL-4, IL-10), a massive hypersecretion of proinflammatory mediators and nonspecific components of antiendotoxic immunity – LBP and sCD-14.

Key words: endotoxin, immunity, purulent-septic states, children.

S.I.Georgiyevsky Crimean State Medical University (Simferopol')

Надійшла 13.03.2009 р.

Рецензент – проф. Б.М.Боднар (Чернівці)

© Прилуло Л.Ф.