

Эндотоксемия и эндотоксический шок: патогенез, диагностика и лечение



Научный вклад в нефрологию
Том 167

Редактор серии

Клаудио Ронко (г. Виченца, Италия)

Эндоксемия и эндоксический шок

Патогенез, диагностика и лечение

Редакторы тома

Клаудио Ронко (г. Виченца, Италия)

Паскаль Пиччинни (г. Виченца, Италия)

Митчелл Г. Рознер (г. Шарлотсвилл, штат Виргиния, США)

22 иллюстрации (4 цветных) и 10 таблиц; 2010 год

KARGER

Базель · Фрайбург · Париж · Лондон · Нью-Йорк · Бангалор ·
Бангкок · Шанхай · Сингапур · Токио · Сидней

Клаудио Ронко

Отделение нефрологии, диализа и трансплантации
Международный научно-исследовательский институт нефрологии
Больница Сан-Бортоло
IT-36100, г. Виченца (Италия)

Паскаль Пиччинни

Отделение нефрологии, диализа и трансплантации
Международный научно-исследовательский институт нефрологии
Больница Сан-Бортоло
IT-36100, г. Виченца (Италия)

Митчелл Г. Рознер

Отделение нефрологии
Система здравоохранения Университета штата Виргиния
г. Шарлотсвилл, штат Виргиния, 22908

Библиографическая запись Библиотеки Конгресса США

Endotoxemia and endotoxin shock: disease, diagnosis, and therapy / volume
editors, Claudio Ronco, Pasquale Piccinni, Mitchell H. Rosner.

р.; см. -- (Contributions to nephrology, ISSN 0302-5144; v. 167)

Включает библиографические ссылки и указатели.

ISBN 978-3-8055-9484-4 (твердый переплет : щелочная бумага) -- ISBN 978-3-8055-9485-1
(e-ISBN)

1. Endotoxemia. 2. Septic shock. I. Ronco, C. (Claudio), 1951- II.
Piccinni, Pasquale. III. Rosner, Mitchell H. IV. Series: Contributions to
nephrology, v. 167. 0302-5144;

[DNLM: 1. Endotoxemia--therapy. 2. Endotoxemia--diagnosis. 3.
Hemoperfusion--methods. 4. Polymyxin B--therapeutic use. 5. Shock,
Septic--diagnosis. 6. Shock, Septic--therapy. W1 CO778UN v.167 2010 / WC
240 E557 2010]

RC182.S4E527 2010

616.9'4407--dc22

2010017258

Библиографические указатели. Данная публикация зарегистрирована различными библиографическими службами, включая Current Contents® и Index Medicus.

Заявление об ограничении ответственности. Заявления, взгляды и данные, представленные в этой публикации, принадлежат исключительно авторам и соавторам, а не издателю или редактору(ам). Товарные знаки, которые встречаются в этой книге, не являются гарантией качества, подтверждением качества или выражением благоприятного мнения о той или иной продукции или услугах, а также не указывают на эффективность, качество или безопасность соответствующей продукции или услуг. Издатель и редактор(ы) снимают с себя ответственность за любой ущерб, нанесенный физическим лицам или собственности в результате использования идей, методов, указаний или продукции, упомянутых в этой книге.

Доза лекарственного препарата. Авторы и издатель приложили все усилия для того, чтобы выбор лекарственных препаратов и подбор доз, описанные в тексте этой книги, на момент публикации соответствовали современным рекомендациям и стандартам медицинской практики. Тем не менее, учитывая продолжающиеся научные исследования, изменения нормативных актов, а также постоянный поток информации, связанной с лекарственной терапией и лекарственными реакциями, читателю настоятельно рекомендуется проверять инструкции по медицинскому применению каждого препарата на предмет любых изменений в показаниях, дозах, предостережениях и мерах предосторожности. Это особенно важно, если рекомендованный лекарственный препарат используется недавно и (или) редко.

Все права защищены. Ни один из фрагментов данной публикации не может быть переведен на другие языки, скопирован или использован в любой форме и при помощи любых методов, электронных или механических, включая фотокопирование, запись и микрокопирование, или системы хранения и воспроизведения информации, без предварительного письменного разрешения издателя.

© Авторские права (2010 год) принадлежат S. Karger AG, а/я CH-4009, г. Базель (Швейцария).

www.karger.com

Книга напечатана в Швейцарии на бескислотной, долговечной бумаге (ISO 9706) типографией Reinhardt Druck (г. Базель).

ISSN 0302-5144

ISBN 978-3-8055-9484-4

e-ISBN 978-3-8055-9485-1

Содержание

Предисловие	VII
Ронко К.; Пиччинни П. (г. Виченца); Рознер М. Г. (г. Шарлотсвилл, штат Виргиния)	
<u>Эндотоксемия: сведения о патофизиологии</u>	
Роль эндотоксина в патогенезе сепсиса	1
Маршалл Д. К. (г. Торонто, Онтарио)	
Эндотоксины и другие факторы, провоцирующие развитие сепсиса	13
Оупэл С. М. (г. Потакет, штат Род-Айленд)	
<u>Экстракорпоральное удаление эндотоксина: теория и технология</u>	
Обоснование экстракорпорального удаления эндотоксина при сепсисе: теория, выбор времени и техника	23
Ронко К.; Пиччинни П. (г. Виченца); Кэллум Д. (г. Питтсбург, штат Пенсильвания)	
Экстракорпоральное удаление эндотоксина: картридж с иммобилизованным полимиксином В	32
Тэни Т. (г. Оцу); Шоджи Х. (г. Токио); Гуаданьи Г. (г. Милан); Перего А. (г. Монселиче)	
Механизм экстракорпорального удаления эндотоксина с применением полимиксина В: молекулярное взаимодействие	41
Весентини С.; Сончини М.; Фиоре Д. Б.; Ределли А. (г. Милан)	
Механизм экстракорпорального удаления эндотоксина с применением полимиксина В: гидродинамика сорбции	50
Фиоре Д. Б.; Сончини М.; Весентини С.; Ределли А. (г. Милан)	
<u>Удаление эндотоксина при септическом шоке в клинических условиях</u>	
Удаление эндотоксина при помощи картриджа с иммобилизованным полимиксином В способствует инактивации проапоптозных факторов в циркулирующей крови	60
Мартин Э. Л.; Раньери В. М. (г. Турин)	
Гемоперфузия с полимиксином В и удаление эндотоксина: обзор литературы	71
Круз Д. Н.; де Каль М.; Пиччинни П.; Ронко К. (г. Виченца)	
Удаление эндотоксина в клинической практике при помощи полимиксина В: результаты исследования EUPHAS	77
Антонелли М. (г. Рим); Фумагалли Р. (г. Монца); Круз Д. Н. (г. Виченца); Бриенза Н. (г. Бари); Гьюнта Ф. (г. Пиза) от лица исследовательской группы EUPHAS	
Раннее лечение эндотоксемии с использованием теста на активность эндотоксина и гемоперфузии с полимиксином В	85
Новелли Г.; Ферретти Г.; Руберто Ф.; Морабито В.; Пуглиезе Ф. (г. Рим)	
Уровень активности эндотоксина и септический шок: потенциальное значение для специфической антиэндотоксиновой терапии	95
Монти Ж.; Боттироли М.; Пиццилли Г.; Миннини М.; Терци В.; Веччи И.; Гезу Д.; Бриоши П.; Вескони С.; Каселла Ж. (г. Милан)	
<u>Удаление эндотоксина: накопление достоверных сведений</u>	
Удаление эндотоксина: что необходимо для окончательного подтверждения обоснованности метода? На смену исследованию EUPHAS приходит исследование EUPHRATES	104

Рашуан Ж. С. (г. Камден, штат Нью-Джерси); Фостер Д. (г. Торонто, Онтарио);
Деллинджер Р. Ф. (г. Камден, штат Нью-Джерси)

Удаление эндотоксина: что необходимо для окончательного подтверждения обоснованности метода? Проект EURHAS 2	112
Мартин Э. Л. (г. Турин); Круз Д. Н. (г. Виченца); Монти Ж.; Каселла Ж.; Вескони С. (г. Милан); Раньери В. М. (г. Турин); Ронко К. (г. Виченца); Антонелли М. (г. Рим)	
Список авторов	119
Предметный указатель	120

Отзыв материала

"Acute Heart Failure Treatment: Traditional and New Drugs" by Gheorghide M, Palazzuoli A, Ronco C. Contrib Nephrol, 2010;165;112-128.

("Лечение острой сердечной недостаточности: традиционная терапия и применение современных лекарственных препаратов". Авторы: Георгиаде М., Палаццуоли А., Ронко К. Научный вклад в нефрологию, 2010;165;112-128.)

Эта глава из предшествующего тома серии "Научный вклад в нефрологию" была отозвана по требованию автора. Отсутствие взаимопонимания между соответствующим автором и соавторами послужило причиной опубликования незавершенной статьи.

Предисловие

Некоторые проявления сепсиса обусловлены присутствием эндотоксинов в кровотоке. В исследованиях, выполненных с участием лабораторных животных и людей, был подтвержден явный иммунологический отклик на попадание бактерий в организм хозяина и последующее высвобождение эндотоксинов в системный кровоток. Попадание эндотоксинов в кровоток приводит к нарушению функции сердечно-сосудистой системы и легких, а также к острому повреждению почек. Это состояние зачастую соответствует клинической картине сепсиса и септическому шоку. Поскольку данный синдром имеет гуморальное происхождение, логично попытаться максимально удалить из кровотока циркулирующий эндотоксин для того чтобы уменьшить его биологическое и клиническое влияние на клеточном, тканевом и органном уровне. В настоящее время этого можно достигнуть благодаря использованию высокоспецифичного гемоперфузионного процесса с применением картриджей с иммобилизованным полимиксином В в составе экстракорпорального контура. Судя по всему, благодаря использованию этого метода можно удалить большое количество эндотоксина и добиться значительного снижения его концентрации в кровотоке.

В данном томе описаны основные принципы, обоснование и клинические результаты применения этого современного метода лечения. Авторы этой книги представляют группу выдающихся ученых, чьи исследования помогли существенно расширить научные познания в этой области. В нескольких главах описаны клинические эффекты нового метода гемоперфузии, которые указывают на подавление септического каскада на ранних этапах его развития, а также на улучшение прогноза и исходов у больных сепсисом. Последние клинические исследования оправдывают ожидания, связанные с этим методом гемоперфузии, поскольку их результаты свидетельствуют об уменьшении смертности больных с ранними признаками абдоминального сепсиса на фоне недавно перенесенного оперативного вмешательства. Эти достижения открывают новые подходы к применению специфических методов лечения при сепсисе, а также представляют собой важный материал для очередной книги из серии *"Научный вклад в нефрологию"*.

Мы хотим поблагодарить всех авторов и соавторов за их огромный труд и высочайшее качество написанных глав этой книги. Кроме того, мы хотим поблагодарить всех, кто помог опубликовать эту книгу, а особенно компанию Karger за превосходную редакторскую работу.

Мы полагаем, что данная книга сыграет роль важного рубежа в области экстракорпоральной терапии при сепсисе, а также станет подспорьем как для ученых, так и для клиницистов в аспекте непрерывного совершенствования собственных знаний.

Клаудио Ронко (г. Виченца, Италия)

Паскаль Пиччинни (г. Виченца, Италия)

Митчелл Г. Рознер (г. Шарлотсвилл, штат Виргиния, США)

Эндотоксемия: сведения о патофизиологии

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 1-13

Роль эндотоксина в патогенезе сепсиса

Джон К. Маршалл

Отделение хирургии, Университет г. Торонто, Институт знаний Ли Ка Шинга, Клиника Сейнт Майкл, г. Торонто, Онтарио, Канада

Реферат

Слово "сепсис" - это описательный термин, который обозначает клинический синдром, вызванный активацией внутренней реакции организма хозяина на инфекцию. Сепсис - это важное понятие, подчеркивающее тот факт, что заболеваемость серьезной инфекционной патологией обусловлена реакцией организма хозяина, а не внутренними цитопатическими эффектами микроорганизма. Тем не менее, определить популяцию пациентов, в которой проявились бы преимущества терапии, модулирующей эту реакцию, не удастся. Синдром характеризуется непостоянством клинических проявлений. Кроме того, он неспецифичен по отношению к инфекции как причине. Постепенное постижение биологической сущности внутреннего иммунного отклика организма хозяина позволило установить, что клеточную реакцию могут провоцировать разнообразные факторы, сигнализирующие о существовании опасности для организма хозяина, включая продукты жизнедеятельности микробов и те молекулы организма, которые в норме располагаются внутриклеточно. Разобшение концепции и заболевания, которое препятствовало проведению клинических исследований, отчетливо прослеживается в реакции организма хозяина на эндотоксин. Эндотоксемия встречается не только у многих больных сепсисом, но и при многочисленных клинических состояниях неинфекционной природы. Более того, по своим биологическим эффектам эндотоксин больше напоминает гормон, а не ядовитое вещество. Следовательно, при некоторых обстоятельствах слабая эндотоксемия может оказывать положительное влияние. Успех предстоящих исследований антиэндотоксиновой терапии при острой патологии более вероятен при участии больных с эндотоксемией и при титровании терапии до оптимального уровня.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Сепсис определяется как системная реакция организма хозяина на попадание инфекции [1]. Такое, казалось бы, простое определение скрывает значительно более сложную биологическую сущность, которая предполагает, что взаимодействие организма хозяина и микроорганизма является эволюционно древним, тесным и, по большому счету, симбиотическим, а не патологическим. Тем не менее, в практике клинического врача этот нюанс отсутствует. Для клинициста сепсис - это потенциально разрушительное клиническое расстройство, представляющее собой грандиозную проблему с терапевтической точки зрения. В развитых странах сепсис является ведущей причиной смерти пациентов, госпитализированных в отделения интенсивной терапии (ОИТ). В Северной Америке сепсисом ежегодно заболевает приблизительно один миллион человек. Более 200000 таких пациентов умирают [2]. При рассмотрении с глобальной точки зрения можно сделать вывод, что сепсис представляет собой процесс, который лежит в основе ведущих причин смерти жителей развитых стран мира (например, малярии, пневмонии,

паразитарных заболеваний, туберкулеза и диареи детей младенческого возраста). Следовательно, существуют все основания утверждать, что сепсис является лидирующей причиной предотвратимой заболеваемости и смертности в современном мире.

Клинический синдром сепсиса включает большое количество взаимосвязанных пусковых факторов и реакций организма хозяина. Тогда как общепринятые определения подчеркивают, что обязательным условием для установления диагноза является наличие инфекции, вызванной жизнеспособными микроорганизмами, идентичный биологический отклик с идентичными клиническими последствиями может быть вызван неинфекционными причинами. В действительности, изменяющееся толкование тесного и симбиотического взаимодействия эукариотического хозяина и прокариотического микробного мира указывает на все большее несоответствие традиционного представления об инфекции.

Этот короткий обзор посвящен эволюционированию представлений о сепсисе, современному пониманию взаимодействия между организмом хозяина и микроорганизмами, пониманию биологических процессов, ответственных за развитие клинического синдрома, а также специфической роли эндотоксина как пускового фактора.

Сепсис: история понятия

Слово "сепсис" имеет греческое происхождение. Предполагается, что этот термин впервые использовал Гиппократ (460-370 гг. до н. э.) (рис. 1) [3]. Он полагал, что для живых организмов предусмотрены два основных пути умирания. Сепсис, по мнению Гиппократа, представляет собой процесс умирания, порождающий болезнь, и проявлением его служит разложение, гниение и неприятный запах. Пепсис, в противоположность сепсису, является процессом распада тканей, который предполагает созидание и наблюдается, например, при переваривании пищи или брожении винограда с образованием вина. Идеи Гиппократа предвосхищали формулировку микробной теории болезней более чем на две тысячи лет, и древний ученый скорее говорил о последствиях распада тканей, чем о причинах патологического процесса.

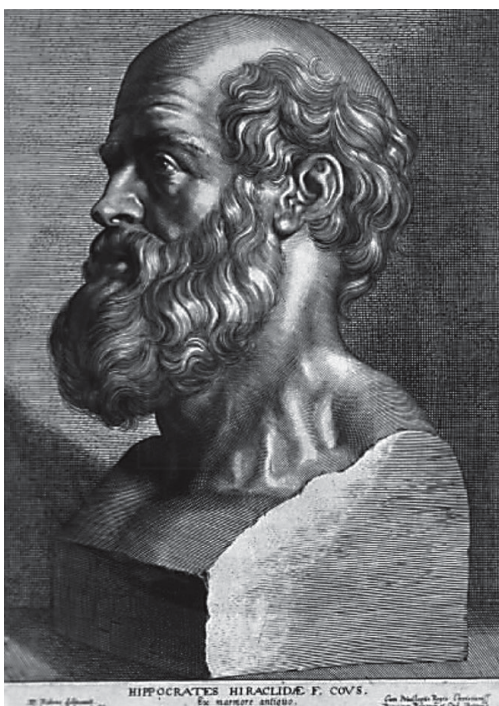


Рис. 1. Гиппократ (460-370 гг. до н. э.) - греческий врач, который впервые использовал термин "сепсис".

В XIX столетии работа Земмельвейса, Пастера и Листера показала, что инфекция может передаваться от одного пациента к другому, и возникать в результате размножения микроорганизмов внутри организма хозяина. С другой стороны, исследования этих ученых свидетельствовали, что передачу инфекции можно предупредить благодаря соблюдению принципов асептики. Создание микробной теории болезней оказало серьезное воздействие на понимание модели развития инфекционной патологии у человека (рис. 2). Инфекции можно избежать при соблюдении таких мер, как стерилизация или пастеризация молока, вакцинация убитыми или ослабленными возбудителями. Инфекционный процесс можно успешно излечить путем применения противомикробных препаратов, которые способны селективно уничтожать возбудителя болезни. Арсенал таких препаратов продолжает расширяться. Поскольку наиболее драматичными и важными примерами предшествующего представления о сепсисе были такие болезни, как чума, натуральная оспа и масса других инфекционных заболеваний, логичным концептуальным шагом было признание сепсиса клиническим проявлением инфекции, и эти два термина в ряде случаев начали использовать как синонимы. Еще в 1970-х гг. в медицинских словарях термин "сепсис" определялся как "присутствие гноеродных микроорганизмов в кровотоке".

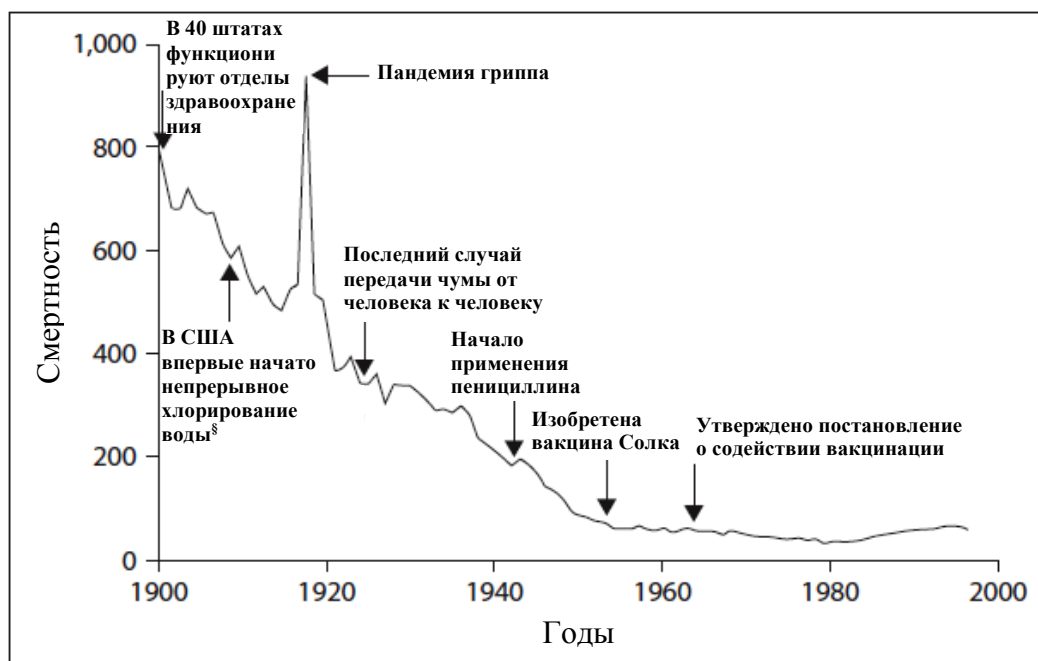


Рис. 2. Смертность от инфекционной патологии в XX столетии. Смертность стремительно снизилась в первой половине XX века преимущественно благодаря достижениям в области общественного здравоохранения. Появление антибиотиков и отделений интенсивной терапии оказало значительно менее выраженное влияние на показатели смертности на популяционном уровне [6].

Тем не менее, в течение нескольких десятилетий после того, как стало известно, что бактерии являются причиной распространения инфекционных заболеваний, было установлено, что клинические последствия инфекции обусловлены более сложными процессами, чем простое неконтролируемое размножение микробов в организме хозяина. Немецкий микробиолог Рихард Пфейфер (рис. 3) в процессе изучения патогенного микроорганизма *Vibrio cholerae* (холерный вибрион) обнаружил, что даже убитые бактерии могли вызывать развитие заболевания у лабораторных животных. Он предположил, что возбудителем заболевания был токсин, входящий в состав клеточной стенки бактерии. Поскольку этот токсин был эндогенным по отношению к бактерии, и токсичным для организма млекопитающего, ученый назвал его "эндотоксином".



Рис. 3. Немецкий микробиолог Рихард Пфейфер (стоя), которому приписывается открытие эндотоксина, и Роберт Кох (сидя).

Появление антибиотиков в начале двадцатого века предоставило дополнительные доводы в пользу того, что сепсис является патологическим состоянием бактериальной природы, и его можно излечить путем уничтожения болезнетворного микроорганизма. В то же время, некоторые новые научные данные свидетельствовали о том, что все не так просто.

Во-первых, очевидно, что даже во времена, предшествовавшие антибиотикотерапии, большинство пациентов с серьезной инфекционной патологией, такой как пневмония, выживали [4]. С другой стороны, масштабное внедрение антибиотиков в клиническую практику не привело к снижению распространенности инфекционной патологии или смертности от инфекционных заболеваний, но лишь способствовало смене доминирующих возбудителей [5]. Популяционные показатели смертности от инфекционной патологии, зарегистрированные в течение двадцатого века, свидетельствуют, что наиболее выраженное снижение смертности произошло в первой половине столетия, до внедрения антибиотиков и ОИТ в клиническую практику. Вероятнее всего, это снижение было связано с обширной реформой общественного здравоохранения [6] (рис. 2).

Во-вторых, достижения, связанные с пониманием биологического механизма реакции организма на инфекционный процесс, показали, что многие кардинальные признаки инфекции, такие как лихорадка, лейкоцитоз и характерные гемодинамические нарушения, обусловлены не прямым влиянием токсинов, выделяемых микроорганизмом, а опосредованным действием через активацию факторов, которые синтезируются и высвобождаются организмом хозяина [7, 8]. Проведенные исследования свидетельствуют,

что клинические проявления инфекции, вызванной грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами, неотличимы [9], и аналогичны клиническим проявлениям вирусной инфекции [10], или даже инфузии стерильных стрессовых гормонов [11] или провоспалительных цитокинов [12] здоровым добровольцам.

И наконец, эпидемиологические исследования показали, что прогноз тяжелобольных пациентов в большей мере зависит от выраженности септической реакции, чем от факторов, связанных с очагом инфекции или бактериологическими свойствами инфекционного заболевания [13]. Этот вопрос изучался в рамках когортного исследования 211 тяжелобольных пациентов, длительность пребывания которых в ОИТ составляла, по меньшей мере, 2 дня. Диагностика инфекции была основана исключительно на микробиологических критериях, которые идентифицировали патогенный микроорганизм в тканях (стерильных у здорового человека) вне связи с реакцией организма хозяина. Для выполнения количественного анализа выраженности клинического отклика использовалась шкала оценки сепсиса, позволяющая определять тяжесть состояния по пяти обособленным параметрам: температура, количество лейкоцитов в крови, нарушения сознания, усиленный минутный сердечный выброс и инсулинорезистентность. Тогда как с повышенным риском смерти пациентов ОИТ коррелировали как развитие инфекции, так и уровень системного септического ответа (выраженность которого измерялась при помощи шкалы оценки сепсиса), для больных с подтвержденной инфекцией (рис. 4) и пациентов с выраженным септическим откликом (таблица 1) прогностическим фактором суммарной смертности в ОИТ была только тяжесть септической реакции.

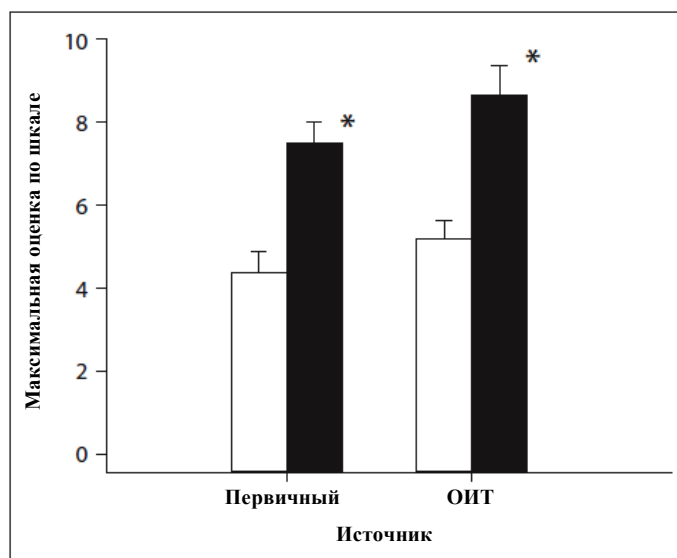


Рис. 4. В популяции пациентов, госпитализированных с инфекцией, а также в популяции пациентов, у которых инфекция развилась во время пребывания в ОИТ, максимальная оценка сепсиса была значительно выше в группах умерших больных (черные столбцы), чем в группах выживших пациентов (белые столбцы); * $p < 0,01$ [13].

Таблица 1. Факторы, определяющие неблагоприятный исход больных сепсисом (оценка по шкале сепсиса ≥ 7) [13].

Тип инфекции	Выжившие	Умершие	p
Первичная, %	38,1	46,7	НС
Заражение в ОИТ, %	76,2	60	НС
Отсутствует, %	14,3	13,2	НС
Пневмония, %	47,6	53,3	НС
Перитонит, %	33,3	40	НС

Бактериemia, %	42,9	20	НС
Оценка по шкале сепсиса	7,7 ± 0,2	8,9 ± 0,4	< 0,01

НС - несущественная разница.

Современная терминология отражает осознание того, что необходимо разграничивать стимул (инфекция) и отклик, который он провоцирует. Таким образом, инфекция определяется как внедрение микроорганизмов в ткани, которые в норме должны быть стерильными. Реакция на это явление может быть местной или системной. Такая системная реакция носит название "сепсис". Следовательно, сепсис - это системная воспалительная реакция организма хозяина на инфекцию. Эта реакция носит приспособительный характер. Она направлена на то, чтобы помочь организму избавиться от инфекции. Тем не менее, в ряде случаев последствия системной реакции могут быть неадекватными. Понятие "тяжелый сепсис" предполагает развитие органной дисфункции, связанной с септической реакцией, тогда как термин "септический шок" обозначает сопутствующие сердечно-сосудистые изменения, которые сопровождаются нарушением тканевой перфузии. Поскольку реакция организма не всегда специфична инфекции, для описания клинического синдрома независимо от его причины, была дана формулировка понятию синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) [1].

Согласованная терминология позволяет внести ясность в общее представление о сепсисе, однако она оказалась не особенно пригодной для характеристики сепсиса как заболевания [14]. Описание заболевания предполагает не только понимание патологического механизма, но и определение популяции пациентов, в которой проявились бы преимущества специфической терапии, модифицирующей реакцию организма на инфекцию.

Каким образом микроорганизмы провоцируют отклик организма хозяина?

Многочлеточные организмы, такие как организм человека, живут в непосредственной близости с микробным миром. Наши слизистые оболочки заселены чрезвычайно разнообразной группой бактерий. Согласно современным подсчетам, микрофлора здорового человека представлена приблизительно 500-1000 видов [15]. Микробные клетки по численности превосходят клетки организма хозяина приблизительно в 10 раз [16], тогда как количество микробных генов превосходит количество генов человеческого организма ориентировочно в 100 раз [17]. Тем не менее, такое взаимодействие не только благотворно, но и необходимо для нормального физиологического развития организма, и одна из наиболее выдающихся способностей иммунной системы человека заключается в том, чтобы не реагировать на собственную микрофлору.

Постоянную угрозу для нашего организма составляет попадание чужеродных микробов в ткани с развитием инфекционного процесса. С целью противостояния этой угрозе организм человека использует сложную систему реагирования. Реакция организма основана на способности распознавать молекулы, которые чужеродны и сигнализируют об опасности [18]. В распознавании этой опасности участвует семейство толл-подобных рецепторов (англ. *Toll-like receptor, TLR*), кодированных в генетическом материале клеток зародышевой линии. Различные TLR характеризуются особыми молекулярными механизмами связывания и активации [19]. Например, TLR2 связываются с компонентами клеточной стенки грамположительных микроорганизмов, такими как липотейхоевая кислота и пептидогликан, тогда как TLR5 активируются белком флагеллином, который содержится в жгутиках бактерий. TLR9 соединяются с CpG-мотивами, характерными для ДНК бактериальных клеток, а TLR3, TLR7 и TLR8 способны распознавать нуклеиновые кислоты вирусов. TLR4 активируются эндотоксином клеточной стенки грамотрицательных бактерий и разнообразными эндогенными лигандами, включая окисленные фосфолипиды [20], эластазу [21] и белок HMGB1 [22].

Эффекты взаимодействия лиганда с TLR сложны, но заслуживают внимания, поскольку они предоставляют ценные сведения о том, как изменяется отклик организма на инфекцию, и, следовательно, как модифицировать отклик терапевтическим путем. Эндотоксин (или липополисахарид), который находится в центре внимания данного тома, представляет собой прототипический агонист TLR, индуцирующий активацию клеток после взаимодействия с TLR4 (рис. 5). Взаимодействие эндотоксина с элементами иммунной системы организма хозяина больше напоминает эффекты гормона, а не ядовитого вещества [23].

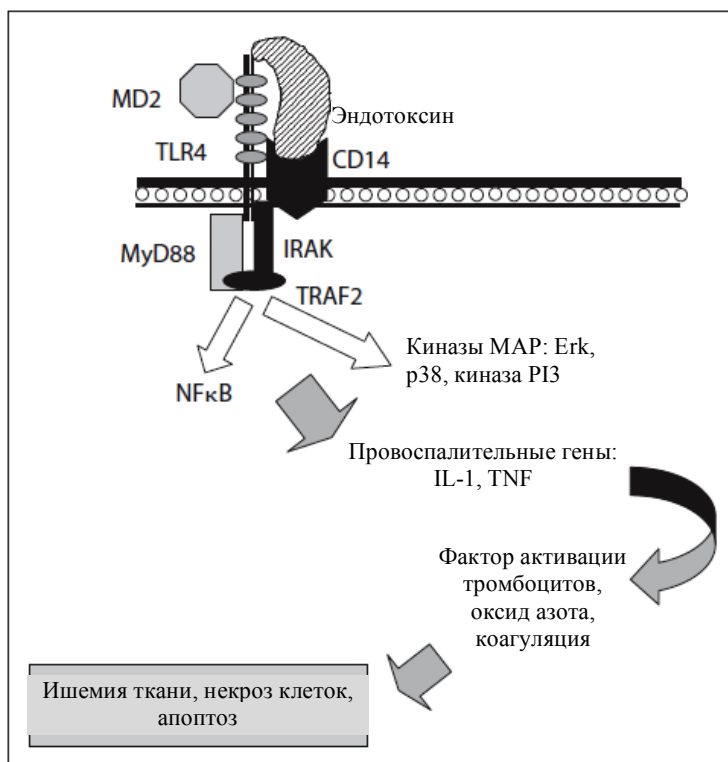


Рис. 5. Схематическое представление взаимодействия эндотоксина и клеток хозяина. Эндотоксин воздействует на клетки посредством специфического рецепторного комплекса. В результате активируется сложный транскрипционный процесс, который приводит к дифференциальной экспрессии более чем 3700 генов (дополнительная информация представлена в тексте).

Эндотоксин, попавший в кровоток из просвета кишечника или из легких, или высвободившийся в процессе инвазивной грамотрицательной инфекции, транспортируется в комплексе со специфическим белком-переносчиком, который носит название липополисахарид-связывающий белок. Комплекс липополисахарид-связывающий белок:эндотоксин способен взаимодействовать с TLR4. Тем не менее, для полной активации TLR4 необходимо присутствие мембранного рецептора CD14 и вспомогательного белка MD2. Взаимодействие с TLR4 сопровождается присоединением нескольких белков-адаптеров, в том числе MyD88, TIRAP и IRAK. В результате образуется сигнальный комплекс, который обеспечивает нисходящее распространение сигнала посредством киназы митоген-активированного белка (англ. *mitogen-activated protein*, MAP) и киназы фосфатидилинозитола-3 (англ. *phosphatidylinositol-3*, PI3), а также активации фактора транскрипции NF-κB.

На следующем этапе происходит транскрипция представителей семейства ранних провоспалительных генов, таких как интерлейкин-1 (англ. *interleukin-1*, IL-1) и фактор некроза опухоли (англ. *tumor necrosis factor*, TNF), с последующим их высвобождением из

клетки. Затем IL-1 и TNF воздействуют на клетки-мишени посредством собственных специфических рецепторов, и провоцируют дальнейший ответ со стороны клеток организма хозяина. Этот ответ определяет проявления сепсиса, например, за счет активации коагуляционного процесса в результате усиленной экспрессии тканевого фактора, или за счет индуцирования вазодилатации путем стимуляции синтеза оксида азота при катализирующем действии синтазы оксида азота. Сложность отклика подчеркивается тем наблюдением, что воздействие эндотоксина *in vivo* сопровождается активацией или подавлением экспрессии более чем 3700 генов [24].

Биологические эффекты активации толл-подобных рецепторов подтверждаются наблюдениями, сделанными в ходе клинических исследований, согласно которым воспалительный ответ при сепсисе неспецифичен для той или иной инфекции. Кроме того, ответ со стороны организма хозяина может быть спровоцирован эндогенными лигандами немикробного происхождения, которые при патологическом состоянии выходят за пределы клетки. Таким образом, рецептор эндотоксина TLR4 также может быть активирован ядерным белком HMGB1, высвободившимся из поврежденных клеток, или окисленными фосфолипидами клеточных мембран. В действительности, учитывая длительное и тесное взаимодействие организма хозяина и микробного мира, разграничение провоцирующих факторов инфекционной природы можно считать несколько произвольным. Например, митохондрии берут свое эволюционное начало от протобактерий, которые паразитировали в примитивных одноклеточных организмах более миллиарда лет тому назад [25]. Таким образом, было положено начало дифференцировке клеток и эволюционированию многоклеточных организмов. В то же время, митохондрии сохранили некоторые характерные биохимические свойства своих древних предшественников. Митохондриальная ДНК, богатая CpG-мотивами, которые также обнаруживаются в ДНК бактерий, способна активировать нейтрофилы путем взаимодействия с TLR9 [26]. Это еще один механизм, благодаря которому поврежденная ткань может провоцировать реакцию, неотличимую от таковой при бактериальной инфекции.

Как на клиническом, так и на биохимическом уровне прослеживаются условность и несоответствие разграничения между инфекционными и неинфекционными причинами системного воспалительного ответа. Попытки регулировать реакцию организма терапевтическим путем принесли неудовлетворительные результаты, поскольку понятие о сепсисе не позволяет определить популяцию пациентов, в которой проявились бы преимущества терапии. Ничто не свидетельствует об этом более ярко, чем подходы к лечению сепсиса, основанные на определении активности эндотоксина.

Эндотоксин и сепсис: в чем состоит связь?

Судя по всему, эндотоксин присутствует в системном кровотоке большинства пациентов, удовлетворяющих классическим клиническим критериям сепсиса [27, 28], хотя некоторые ученые считают иначе [29, 30]. Такое разногласие не только отчасти отражает хорошо известные ограничения анализа белоксодержащих проб на эндотоксин, основанного на применении лизата амебоцитов мечехвоста (англ. *Limulus amoebocyte lysate assay*), но и указывает на важный клинический факт: эндотоксин определяется у некоторых, но не у всех больных сепсисом, а также у многих больных острой жизнеугрожающей патологией, которая не соответствует критериям сепсиса (рис. 6). Более того, присутствие эндотоксина в системном кровотоке не обязательно служит достаточным основанием для его удаления.

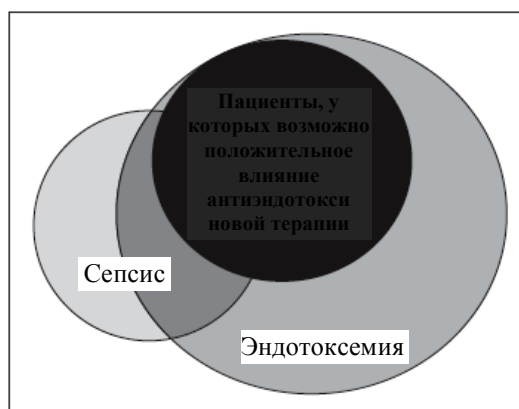


Рис. 6. Взаимосвязь между сепсисом и эндотоксемией. У большинства пациентов, удовлетворяющих клиническим критериям сепсиса, можно обнаружить повышенное содержание эндотоксина в крови. Тем не менее, повышенный уровень эндотоксина также определяется у большого числа больных острой патологией, которые не соответствуют критериям сепсиса. Судя по всему, в популяции больных с эндотоксемией положительный эффект терапии, направленной на удаление эндотоксина, проявится только в подгруппе, которая до сих пор не установлена.

Эндотоксемия наблюдается при разнообразных клинических состояниях, например, у пациентов, которые перенесли операцию экстракорпорального кровообращения [31], у больных застойной сердечной недостаточностью [32], хронической почечной недостаточностью [33], циррозом [34], а также у пациентов с разрывом аневризмы брюшного отдела аорты [35]. Тогда как эндотоксемия является ярким проявлением сепсиса у тяжелобольных, ее также можно диагностировать более чем у половины всех пациентов в день госпитализации в ОИТ, при том, что большинство таких пациентов не соответствуют критериям сепсиса [28]. В действительности, эндотоксемия развивается даже при интенсивной физической нагрузке [36], при табакокурении [37], а также после употребления пищи с высоким содержанием жира [38]. Эндотоксемия достаточно распространена при физиологических состояниях, которые сопровождаются стрессом, поэтому она может рассматриваться как компонент адаптивной реакции, а не только как нежелательный внешний повреждающий фактор.

Если эндотоксемия имеет исключительно патологический характер, можно ожидать воспроизводимого положительного эффекта антиэндотоксиновой терапии, при условии, что эта терапия используется при патологическом процессе, таком как сепсис, когда эндотоксемия весьма вероятна. Ранние исследования подтвердили эту гипотезу. Например, Ziegler и соавт. [39] показали, что нейтрализация эндотоксина при помощи антисыворотки приводит к увеличению показателей выживаемости больных с грамотрицательной инфекцией, а особенно пациентов с шоком. По данным многоцентрового исследования, выполненного в популяции из 543 пациентов [40], моноклональные антитела к эндотоксину мутантного штамма *Escherichia coli* также характеризовались положительным влиянием, хотя в последующем, более крупном исследовании [41] этот эффект воспроизвести не удалось. Объединенные данные, зарегистрированные в ходе многочисленных небольших исследований, выполненных в гетерогенной популяции пациентов [42], а также результаты исследования, которое проводилось в популяции больных с тяжелой абдоминальной инфекцией [43], свидетельствуют об эффективности методики экстракорпорального удаления эндотоксина при помощи колонок с полимиксином В.

Тем не менее, существуют сведения о том, что устранение эндотоксемии не всегда оказывает положительное влияние. Отсутствие эффективности разнообразных способов

нейтрализации эндотоксинов, которые были изучены в рамках нескольких недавних исследований, выполненных в популяции больных сепсисом [44, 45], можно объяснить недостатками вмешательства, использованием субоптимальных доз, а также низкой распространенностью эндотоксемии в целевой популяции. Кроме того, результаты этих исследований могут говорить о том, что в некоторых случаях эндотоксемия носит адаптивный характер и оказывает благотворное влияние на состояние больных с жизнеугрожающей инфекцией. К примеру, исследования, выполненные с участием лабораторных животных, показали, что при генетически детерминированном отсутствии способности реагировать на присутствие эндотоксина наблюдаются нарушения общей реакции организма на инфекцию, вызванную грибами рода *Candida* [46], а для пациентов с полиморфизмом гена TLR4 характерна повышенная восприимчивость к этому возбудителю [47]. Интересно, что нейтрализация эндотоксина при помощи моноклональных антител характеризовалась повышенным риском смерти больных с грамположительной инфекцией [41].

Повышенное содержание эндотоксина в крови может послужить причиной развития синдрома, ответственного за большинство клинических проявлений сепсиса [48], а при одномоментном массивном поступлении эндотоксина в кровоток возможно формирование органной дисфункции [49]. Тем не менее, специфической целью терапевтического вмешательства является скорее эндотоксемия, а не сепсис, и в настоящее время все еще не определена та популяция пациентов с эндотоксемией, на которую терапевтическое вмешательство может оказать благотворное действие.

Выводы

Повышенный уровень эндотоксина бактериальных клеток в крови является важным компонентом сепсиса, который вероятно связан с патогенезом, определяющим окончательную заболеваемость. Тем не менее, с точки зрения терапевтической перспективы, нейтрализация эндотоксина может оказывать положительное влияние только при лечении пациентов с чрезмерной эндотоксемией. Наша задача состоит в том, чтобы изменить направление своей научной деятельности на изучение антиэндотоксиновой терапии в популяции больных с эндотоксемией, а не в популяции пациентов с недостаточно определенным синдромом сепсиса. Кроме того, нужно определить, для каких представителей целевой популяции нейтрализация эндотоксина будет полезна, а для каких, напротив, опасна.

Ссылки

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101:1644-1655.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303-1310.
3. Majno G: The ancient riddle of sigma psi iota sigma (sepsis). *J Inf Dis* 1991;163:937-945.
4. Capps JA, Coleman GH: Influence of alcohol on prognosis of pneumonia in Cook County Hospital. *JAMA* 1923;80:750-752.
5. Rogers DE: The changing pattern of life-threatening microbial disease. *N Engl J Med* 1959;261:677-683.
6. Achievements in public health, 1900-1999. *MMWR* 1999;48:621-629.
7. Atkins E, Wood WB Jr: Studies on the pathogenesis of fever. II. Identification of an endogenous pyrogen in the blood stream following the injection of typhoid vaccine. *J Exp Med* 1955;102:499-516.
8. Michalek SM, Moore RN, McGhee JR, Rosenstreich DL, Mergenhagen SE: The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. *J Infect Dis* 1980;141:55-63.

9. Wiles JB, Cerra FB, Siegel JH, Border JR: The systemic septic response: does the organism matter? *Crit Care Med* 1980;8:55-60.
10. Deutschman CS, Konstantinides FN, Tsai M, Simmons RL, Cerra FB: Physiology and metabolism in isolated viral septicemia. Further evidence of an organism independent host dependent response. *Arch Surg* 1987;122:21-25.
11. Watters JM, Bessey PQ, Dinarello CA, Wolff SM, Wilmore DW: Both inflammatory and endocrine mediators stimulate host responses to sepsis. *Arch Surg* 1986;121:179-190.
12. Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, et al: Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 1988;104:280-286.
13. Marshall JC, Sweeney D: Microbial infection and the septic response in critical surgical illness. Sepsis, not infection, determines outcome. *Arch Surg* 1990;125:17-23.
14. Marshall JC: Rethinking sepsis: from concepts to syndromes to diseases. *Sepsis* 1999;3:5-10.
15. Guarner F, Malagelada JR: Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-519.
16. Savage DC: Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Med* 1977;31:107-133.
17. Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355-1359.
18. Matzinger P: The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-305.
19. Miyake K: Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* 2007;19:3-10.
20. Imai Y, Kuba K, Neely GG, et al: Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* 2008;133:235-249.
21. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG: Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett* 2003; 544:129-132.
22. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, et al: The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med* 2005;201:1135-1143.
23. Marshall JC: Lipopolysaccharide: an endotoxin or an exogenous hormone? *Clin Infect Dis* 2005;41(Suppl 7):S470-S480.
24. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, et al: A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 2005;437:1032-1037.
25. Dyllal SD, Brown MT, Johnson PJ: Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 2004;304:253-257.
26. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, et al: Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104-107.
27. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999;180:1584-1589.
28. Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004;190:527-534.
29. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parrillo JE: Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99:169-175.
30. Bates DW, Parsonnet J, Ketchum PA, et al: Limulus amebocyte lysate assay for detection of endotoxin in patients with sepsis syndrome. AMCC Sepsis Project Working Group. *Clin Infect Dis* 1998;27:582-591.
31. Riddington DW, Venkatesh B, Boivin CM, et al: Intestinal permeability, gastric intramucosal pH, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *JAMA* 1996;275:1007-1012.
32. Niebauer J, Volk HD, Kemp M, et al: Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet* 1999;353:1838-1842.
33. Goncalves S, Pecoits-Filho R, Perreto S, et al: Associations between renal function, volume status and endotoxaemia in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2788-2794.
34. Lin CY, Tsai IF, Ho YP, et al: Endotoxemia contributes to the immune paralysis in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2007;46:816-826.

35. Roumen RMH, Frieling JTM, van Tits HWHJ, et al: Endotoxemia after major vascular operations. *J Vasc Surg* 1993;18:853-857.
36. Jeukendrup AE, Vet-Joop K, Sturk A, et al: Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. *Clin Sci (Lond)* 2000;98:47-55.
37. Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, et al: Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck study. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1975-1981.
38. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ: A high-fat meal induces low-grade endo-toxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1286-1292.
39. Ziegler EJ, McCutchan JA, Fierer J, et al: Treatment of Gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 1982;307:1225-1230.
40. Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL, et al: Treatment of Gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N Engl J Med* 1991;324:429-436.
41. McCloskey RV, Straube RC, Sanders C, Smith SM, Smith CR, the CHESSTrial Study Group: Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1994;121:1-5.
42. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, et al: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care* 2007;11:R47.
43. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301: 2445-2452.
44. Angus DC, Birmingham MC, Balk RA, et al: E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in Gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. E5 Study Investigators. *JAMA* 2000;283:1723-1730.
45. Dellinger RP, Tomayko JF, Angus DC, et al: Efficacy and safety of a phospholipid emulsion (GR270773) in Gram-negative severe sepsis: results of a phase II multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-finding clinical trial. *Crit Care Med* 2009;37:2929-2938.
46. Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verscheueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ: The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 2002;185: 1483-1489.
47. Van Der Graaf CA, Netea MG, Morre SA, et al: Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:29-34.
48. Lowry SF: Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. *Shock* 2007;24(Suppl 1):94-100.
49. Taveira Da Silva AM, Kaulach HC, Chuidian FS, Lambert DR, Stuffredini AF, Danner RL: Brief report: shock and multiple organ dysfunction after self administration of salmonella endotoxin. *N Engl J Med* 1993; 328:1457-1460.

Джон К. Маршалл, доктор медицины
 Клиника Сейнт Майкл, 4-й этаж соединяющего крыла, каб. 4-007
 Бонд-Стрит 30
 г. Торонто, Онтарио, М5В 1W8 (Канада)
 Телефон: +1 416 864 5225. Факс: +1 416 864 5141.
 Электронная почта: marshallj@smh.ca

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 14-24

Эндотоксины и другие факторы, провоцирующие развитие сепсиса

Стивен М. Оупэл

Отделение инфекционных болезней, Мемориальная больница штата Род-Айленд, г. Потакет, штат Род-Айленд, США

Реферат

Эндотоксин, или, если использовать более точный термин, бактериальный липополисахарид (ЛПС), считается самым мощным медиатором микробного происхождения, участвующим в патогенезе сепсиса и септического шока. Несмотря на то, что этот фактор был открыт более ста лет тому назад, основная роль эндотоксина, присутствующего в системном кровотоке большинства пациентов с септическим шоком, до сих пор не установлена и является предметом выраженной полемики. ЛПС - это наиболее существенная "сигнальная молекула", которая воспринимается системой раннего предупреждения естественного иммунитета хозяина, как предвестник внедрения грамотрицательных микроорганизмов во внутреннюю среду организма. Небольшие дозы ЛПС в ограниченном тканевом пространстве помогают организму хозяина организовать эффективную противомикробную защиту и удаление возбудителей во внешнюю среду. В то же время, внезапное высвобождение большого количества ЛПС, напротив, обладает пагубным влиянием на организм хозяина, поскольку в таком случае запускается неуправляемый и угрожающий жизни организма выброс многочисленных медиаторов воспаления и прокоагулянтов в системный кровоток. Выраженной реакции хозяина на эту молекулу, распознающую внедрение бактерий во внутреннюю среду организма, достаточно для того, чтобы вызвать диффузное повреждение эндотелия, гипоперфузию тканей, диссеминированное внутрисосудистое свертывание и рефрактерный шок. Многочисленные попытки блокировать активность эндотоксина, предпринятые в рамках клинических исследований, выполненных в популяции больных сепсисом, характеризуются противоречивыми и, главным образом, отрицательными результатами. Тем не менее, в течение предшествующего десятилетия были сделаны значительные открытия в области молекулярных основ ЛПС-опосредованной клеточной активации и тканевого повреждения, которые возродили оптимизм, связанный с возможным успехом применения терапии нового поколения, направленной на специфическое блокирование сигнальной системы ЛПС. В настоящее время считается, что другие медиаторы микробного происхождения, которые входят в структуру грамположительных бактерий, вирусов и грибов, также способны активировать многочисленные системы защиты организма хозяина, на которые воздействует ЛПС. Эти сведения открывают для нас новые пути совершенствования методов лечения больных сепсисом.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Сепсис и полиорганная недостаточность, которые часто осложняют течение тяжелых инфекционных заболеваний, остаются основной причиной смерти больных в отделениях

интенсивной терапии (ОИТ) [1]. Подсчитано, что ежегодно в Соединенных Штатах сепсисом заболевают приблизительно 650000-750000 человек. Аналогичные показатели распространенности сепсиса регистрируются в Европе и во всех странах мира [2]. Приблизительно у половины таких больных сепсис приобретает тяжелое течение и осложняется септическим шоком. Смертность, связанная с септическим шоком, удерживается на уровне 30-45%, несмотря на прогресс в области поддерживающей терапии и многочисленные попытки улучшить исход заболевания [1-3].

За последние 25 лет микробиологическая характеристика сепсиса существенно изменилась. В 1970-х гг. основными бактериальными возбудителями были кишечные грамотрицательные палочковидные бактерии и синегнойная палочка. К концу 1980-х гг. наблюдался переход преимущественно к грамположительной бактериальной флоре [3]. Быстрое распространение, приобретение генов, определяющих резистентность к антибактериальным препаратам, а также способность грамположительных бактерий к адгезии и существованию на поверхности внутрисосудистых катетеров и других имплантируемых медицинских устройств способствуют увеличению распространенности сепсиса, вызванного грамположительными микроорганизмами. Кроме того, все чаще причиной сепсиса становятся условно-патогенные грибы [3].

Примечательно, что по данным последних исследований в настоящее время наблюдается тенденция к восстановлению позиции грамотрицательных бактерий как наиболее распространенных возбудителей инфекционной патологии в ОИТ [4].

Эндотоксин, медиаторы микробного происхождения и распознавание септического процесса

В рамках недавней кампании по борьбе с сепсисом (англ. *surviving sepsis campaign*) были обновлены согласованные рабочие определения таких клинических терминов, как сепсис, септический шок, синдром системного воспалительного ответа и синдром полиорганной недостаточности [2]. При формулировке этих определений были учтены многочисленные возбудители инфекционной патологии и медиаторы микробного происхождения, участвующие в патогенезе сепсиса. Истинная инфекция кровотока, вызванная этими возбудителями, подтверждается на момент диагностирования сепсиса клиническим врачом только у трети пациентов, тогда как признаки генерализованного воспаления и прокоагулянтной активности присутствуют почти во всех случаях. У человека системный воспалительный ответ при сепсисе первоначально запускается высокозащищенными микробными макромолекулами, которые обладают поверхностными свойствами, нехарактерными для тканей человеческого организма. Наиболее мощной из всех молекул, определяющих антигенные свойства возбудителя (англ. *pathogen-associated molecular pattern, PAMP*), является бактериальный липополисахарид (ЛПС), также известный как эндотоксин. Большое количество других PAMP-молекул входит в структуру грамположительных бактерий, грибов, паразитов и вирусов. Эти молекулы выступают в роли лигандов для антигенраспознающих рецепторов эффекторных клеток иммунной системы, которые носят название толл-подобных рецепторов (англ. *Toll-like receptor, TLR*) [5, 6]. Характеристика основных медиаторов сепсиса и соответствующих толл-подобных рецепторов представлена в таблице 1.

Таблица 1. PAMP-молекулы, DAMP-молекулы (англ. *damage-associated molecular pattern, DAMP*; молекулы определяющие реакцию организма на повреждение) и соответствующие рецепторы человеческого организма.

	Происхождение	TLR
<i>Бактериальные PAMP-молекулы</i>		
ЛПС-MD2	Грамотрицательные бактерии	TLR4
Липотейхоевая кислота	Грамположительные бактерии	TLR2 ^a

Пептидогликан	Грамположительные или грамотрицательные бактерии	TLR2
Триацил-липopeптиды	Грамположительные или грамотрицательные бактерии	TLR1/TLR2
Диацил-липopeптиды	<i>Mycoplasma spp.</i>	TLR2/TLR6
Порины, НБМ	<i>Neisseria spp.</i>	TLR2
Флагеллярный белок	Подвижные грамположительные или грамотрицательные бактерии	TLR5
СрG ДНК	Бактерии, некоторые ДНК-содержащие вирусы	TLR9
<i>Вирусные PAMP-молекулы</i>		
Двухцепочечная РНК	Вирусы, содержащие двухцепочечную РНК	TLR3
Одноцепочечная РНК	Вирусы, содержащие одноцепочечную РНК	TLR7/8
<i>Грибковые PAMP-молекулы</i>		
Антикомплементарный фактор	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TLR2/TLR6
Фосфолипоманнан	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Маннан	<i>Candida albicans</i>	TLR4
О-связанные остатки маннозила	<i>Candida albicans</i>	TLR4
Бета-глюканы	<i>Candida albicans</i>	TLR2/дектин-1
<i>DAMP-молекулы</i>		
Белки S100a	Организм хозяина	RAGE
Белки теплового шока	Организм хозяина	TLR4
Фибриноген, фибронектин	Организм хозяина	TLR4
Гиалуроновая кислота	Организм хозяина	TLR4
Бигликаны	Организм хозяина	TLR4
HMGB1	Организм хозяина	TLR4, TLR2

НБМ - наружный белок мембраны; СрG - мотив цитозин-фосфат-гуанин (англ. *cytosine-phosphate-guanine*); RAGE - рецептор сложных конечных продуктов гликозилирования (англ. *receptor for advanced glycation end products*); HMGB1 - белок с высокой электрофоретической подвижностью 1 типа (англ. *high mobility group box-1*).

^a При идентификации липотейхоевой кислоты некоторых возбудителей TLR6 выступает в роли корецептора TLR2.

Семейство TLR является наиболее важным, но не единственным рецепторным комплексом внутренней иммунной системы человека, который способен распознавать PAMP-молекулы. TLR представляют собой трансмембранные рецепторы 1 типа, чья функция состоит в распознавании ЛПС и многих других медиаторов микробного происхождения, таких как пептидогликан, липopeптиды, флагеллярные белки, микробные нуклеиновые кислоты, множественные компоненты клеточной стенки грибов, вирусные белки и липотейхоевая кислота. На сегодняшний день анализ генома человека позволил идентифицировать десять TLR [5].

Микробная вирулентность и возбудители сепсиса

Важно понимать, что у большинства микроорганизмов отсутствуют способности, необходимые для эффективного внедрения во внутреннюю среду человеческого организма. В большинстве случаев, встреча микроорганизма с иммунной системой человека заканчивается быстрым уничтожением и выведением микроба из организма. За это отвечает наш врожденный и приобретенный иммунитет. Лишь небольшое число избранных возбудителей наделено высокоорганизованной и сложной вирулентной

системой, которая служит для уклонения от защитной системы организма, внедрения в ткани и обнаружения стрессовых сигналов. Кроме того, некоторые патогенные микроорганизмы обладают специфическими приспособлениями, доставляющими токсины в клетки-мишени [7, 8]. Такие возбудители обладают способностью к компоновке и обмену важной генетической информацией (например, гены антибиотикорезистентности, гены вирулентности, островки патогенности, гены репарации и гены контроля мутаций). Сеть генов вирулентности, также известная как "virulome", согласованно действует, провоцируя развитие заболевания, при условии, что она остается нераспознанной защитной системой организма хозяина [8].

Роль бактериального эндотоксина

Бактериальный ЛПС - это неотъемлемый компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий, который необходим для поддержания жизнеспособности микроорганизмов кишечной группы. ЛПС составляет ориентировочно 75% внешней мембраны кишечных бактерий. Клеточная стенка каждой бактерии содержит до 4 миллионов молекул ЛПС [8]. О специфической активности эндотоксина свидетельствует характеристика недавно идентифицированного штамма *Neisseria meningitidis*, который лишен эндотоксина. По своей способности индуцировать выработку цитокинов этот штамм приблизительно в 100 раз уступает штаммам дикого типа [9]. ЛПС выступает в роли сигнальной молекулы, своевременно предупреждающей хозяина о возможности внедрения грамотрицательных бактерий во внутреннюю среду организма [10]. Высвобождение ЛПС в системный кровоток провоцирует развитие мощного системного воспалительного ответа. Потенциально смертельные последствия высвобождения ЛПС обусловлены реакцией организма хозяина на ЛПС, а не внутренними свойствами самого эндотоксина. Сравнительный анализ показал, что люди, шимпанзе и лошади особенно восприимчивы к иммуностимулирующему действию ЛПС, тогда как мыши и крысы сравнительно резистентны к ЛПС-опосредованным токсическим эффектам.

ЛПС - это бифосфорилированная полярная макромолекула, которая обычно содержит три различных компонента: (1) высокозащищенная гидрофобная последовательность жирных кислот в составе липида А; (2) менее защищенный центральный гликолипид, содержащий несколько фрагментов гептозы и гексозы; а также (3) гидрофильные элементы, расположенные на полисахаридной основе, и направленные к структурам наружной поверхности [11]. В водной среде ЛПС спонтанно образует микроагрегаты (мини-мицеллы). Гидрофобные липидные элементы располагаются в центре таких мицелл, а гидрофильные полисахаридные компоненты - на их поверхности. В биологических жидкостях, таких как плазма, ЛПС быстро вступает во взаимодействие с разнообразными сывороточными или мембранными липофильными белками. В свободном состоянии в плазме находится лишь очень небольшое количество ЛПС, поскольку почти все молекулы ЛПС быстро соединяются с белками и липопротеинами циркулирующей крови. На сегодняшний день в клетках человеческого организма идентифицированы три рецептора к ЛПС: (1) растворимые или мембранные молекулы CD14-MD2-TLR4; (2) молекулы CD11/CD18 (β 2-интегрины); и (3) фагоцитарные рецепторы, активные в отношении липидных молекул. Растворимые и мембранные молекулы CD14 в значительной мере потенцируют реакцию организма хозяина на небольшое количество ЛПС или других медиаторов микробного происхождения [11].

Распространению ЛПС в плазме крови человека и других жидких средах человеческого организма в значительной мере способствует образованный в печени, острофазовый белок плазмы, известный как ЛПС-связывающий белок (англ. *LPS-binding protein, LBP*). LBP представляет собой молекулу-переносчик, которая захватывает полимерные агрегаты ЛПС и переносит мономеры ЛПС на CD14. LBP конкурирует с другой ЛПС-связывающей молекулой, источником которой являются нейтрофилы. Эта молекула называется бактерицидным белком, повышающим проницаемость (англ. *bactericidal/permeability-*

increasing protein, BPI). Несмотря на то, что 45% первичной аминокислотной последовательности BPI аналогичны таковым LBP, BPI обладает специфическим антагонизмом по отношению к активности LBP, связанной с представлением ЛПС. LBP обеспечивает транспорт ЛПС к эффекторным иммунокомпетентным клеткам, тогда как BPI подавляет перенос ЛПС на CD14. Относительная концентрация этих двух ЛПС-связывающих белков определяет суммарный эффект высвобождения ЛПС [12].

CD14 представляет собой гликозил-фосфатидилинозитол-связанный белок, который обнаруживается преимущественно на поверхности миелоидных клеток. Этот белок лишен трансмембранного и внутриклеточного домена, поэтому он неспособен передавать липополисахаридный сигнал через клеточные мембраны с целью активации клеток-мишеней. После стыковки с мембранным рецептором CD14, ЛПС соединяется с основным внеклеточным белком-адаптером, который называют фактором миелоидной дифференцировки 2 типа (англ. *myeloid differentiation factor-2, MD2*) [10, 13]. Благодаря работе Park и соавт. [14], которые успешно выполнили кристаллизацию и определили локализацию атомов в структуре ЛПС-MD2 и TLR4, в настоящее время достоверно известны молекулярные особенности связывания ЛПС с гидрофобным фрагментом MD2 на ультраструктурном уровне. Гекса-ацилированный липид А с 12 или 14 точно ориентированными углерод-связанными жирными кислотами прочно соединяется с белком MD2. Структуры ЛПС, которые обычно характеризуются наличием длинноцепочечных углерод-связанных жирных кислот (C16-C18) или короткоцепочечных жирных кислот (C8-10), плохо соединяются с MD2, поэтому они являются слабыми активаторами комплекса MD2-TLR4. Кроме того, тетра-ацилированные липидные структуры (например, эритран или липид-4а) занимают центральную часть MD2, но не обладают поверхностными свойствами, необходимыми для активации TLR4. Они скорее действуют как антагонисты, а не агонисты ЛПС-опосредованной активации.

R2- β -гидроксимиристиновая кислота располагается на поверхности липида А и ее гидрофобный конец направлен в сторону выемки, которая проходит по внутренней поверхности эктодомена TLR4 на границе между С-терминальным доменом TLR4 и богатыми лейцином повторами 15-17 [14]. Как только комплекс ЛПС-MD2 стыкуется с внеклеточным доменом TLR4, образуется крупная димерная структура из двух молекулярных комплексов ЛПС-MD2-TLR4, которые соединяются между собой, сближая трансмембранный и внутриклеточный домены двух молекул TLR (эти комплексы зачастую определяются на поверхности клеток, как скопления липидов). Произошедшие изменения способствуют активации необходимых молекул-адаптеров путем взаимодействия с доменом рецептора толл-интерлейкин-1 (англ. *Toll interleukin-1 receptor, TIR*). В результате начинает функционировать система внутриклеточной сигнализации. Конечным результатом этого каскада является активация ЛПС-реактивной программы в ядре клетки-мишени.

После соединения TLR4 с лигандом ЛПС возможны два пути активации клетки, а именно активация посредством фактора миелоидной дифференцировки-88 (англ. *myeloid differentiation factor 88, MyD88*) или посредством TIR домен-содержащего адаптерного белка, индуцирующего интерферон-бета (англ. *TIR domain-containing adaptor inducing interferon-beta, TRIF*) [6, 10]. Серия сигналов сопровождается последовательную активацию специфических тирозин- и треонин/серин-киназ. Этот сигнальный каскад в конечном счете приводит к фосфорилированию, убиквитинилированию и деградации ингибиторного белка κB (англ. *inhibitory κB , I κB*) и других активаторов транскрипции. Деградация I κB сопровождается освобождением участков связывания ядерного фактора κB (англ. *nuclear factor κB , NF κB*) с ядерной мембраной, и последующим проникновением внутрь ядра клетки. Гены факторов свертывания, комплемента, других острофазовых белков, цитокинов, хемокинов и синтазы оксида азота содержат участки связывания NF κB в своих промоторных зонах. Реакция организма на ЛПС в виде выработки воспалительных

цитокинов и других медиаторов воспаления приводит к формированию генерализованного воспалительного ответа, усилению прокоагулянтной активности, повреждению ткани и развитию септического шока [15, 16].

Связь воспаления и коагуляции

Активация свертывающей системы крови с развитием коагулопатии потребления и диффузного тромбообразования является хорошо известным осложнением тяжелого сепсиса (рис. 1). Исследования реакции на введение эндотоксина и TNF, выполненные в популяции здоровых добровольцев, свидетельствуют о том, что внешний путь активации свертывания (индуцируемый тканевым фактором) является основным механизмом запуска свертывания крови при сепсисе у людей [17-19]. Контактная система внутреннего пути также активируется при сепсисе, усиливая свертывание и вазодилатацию путем выработки брадикинина. Активация внутрисосудистого свертывания приводит к образованию микротромбов, что способствует развитию полиорганной недостаточности, сопровождающей тяжелый септический процесс. Истощение запасов факторов свертывания, а также активация плазмина, антитромбина III и протеина С могут послужить причиной развития геморрагического диатеза как окончательного проявления диссеминированного внутрисосудистого свертывания [18].

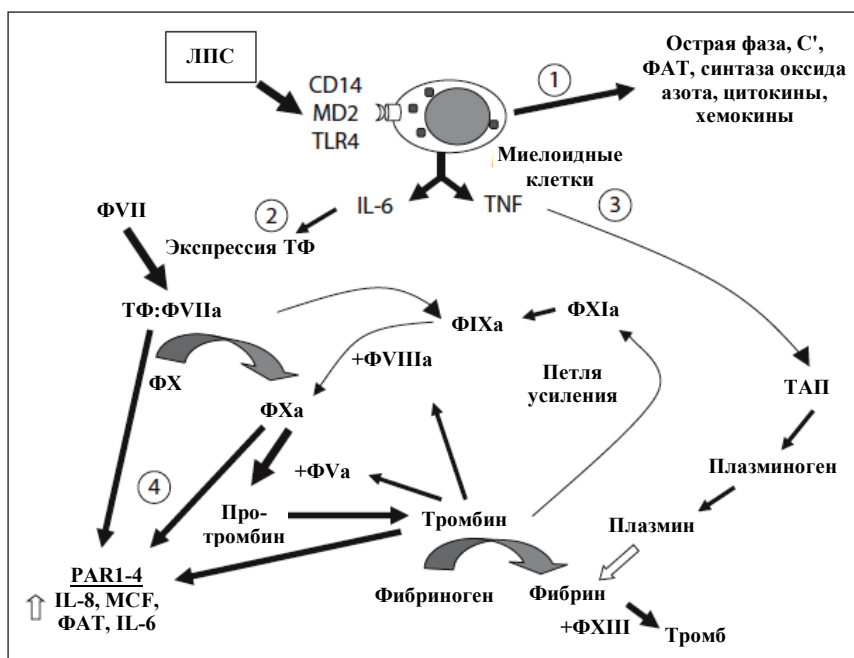


Рис. 1. Связь и взаимодействие эндотоксина и процесса коагуляции. (1) Распознавание ЛПС эффекторными клетками иммунной системы приводит к запуску острофазового отклика. (2) Интерлейкин (IL-6)-опосредованная экспрессия тканевого фактора (ТФ). (3) Активация фибринолитической системы, опосредованная фактором некроза опухоли-альфа (TNF- α). (4) Тканевой фактор в комплексе с фактором VIIa, фактор Ха и тромбин активируют протеаза-активированные рецепторы (англ. *protease activated receptor, PAR*) 1-4. ТАП - тканевой активатор плазминогена; ФАТ - фактор активации тромбоцитов. Схема модифицирована с разрешения Оупэл [26].

Тесная взаимосвязь между коагуляцией и внутренним иммунным ответом на уровне микроциркуляции послужила поводом для многочисленных попыток улучшить прогноз при сепсисе за счет контроля над процессом свертывания крови [2, 8, 20]. Тромбин и другие факторы свертывания могут напрямую стимулировать синтез цитокинов и хемокинов в микроциркуляторном русле путем активации эндотелиальных клеток, нейтрофилов и моноцитов. Стимуляция работы этих клеток происходит посредством

протеаза-активированных рецепторов (англ. *protease-activated receptors, PAR*) [21]. PAR-1 активируются тромбином и фактором X. Связь PAR с лигандами серин-протеазы на поверхности эндотелия усиливает экспрессию P-селектина и молекул адгезии, которые обеспечивают соединение лейкоцитов с эндотелиоцитами. Взаимодействие лейкоцитов с эндотелием оказывает благотворное влияние при локализованной инфекции, направляя фагоцитарные клетки к месту повреждения ткани. Тем не менее, при генерализованном воспалительном процессе и нарушениях коагуляции, сопровождающих сепсис, это взаимодействие, напротив, сказывается неблагоприятно, поскольку диффузное связывание лейкоцитов с поверхностью эндотелия приводит к повреждению ткани и развитию недостаточности микроциркуляции [17].

Толерантность к эндотоксину (репрограммирование) и сепсис-индуцированная иммуносупрессия

Феномен толерантности к эндотоксину (или репрограммирование) хорошо изучен в экспериментальных моделях сепсиса. Предполагается, что этот феномен также применим к сепсису в человеческой популяции. Толерантность к эндотоксину представляет собой десенсибилизацию к ЛПС-индуцированной летальности, обусловленную эффектом стимулирующей (небольшой) дозы ЛПС, предшествующим введению летальной (при иных обстоятельствах) дозы ЛПС. Репрограммирование происходит главным образом на уровне транскрипции и предполагает блокирование генов, кодирующих синтез провоспалительных цитокинов и прочих острофазовых белков. Первичная десенсибилизирующая доза эндотоксина повышает активность эндогенных кортикостероидов и противовоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-10, снижает экспрессию TLR и основных антигенов гистосовместимости на поверхности клеток, модифицирует ядерную транслокацию сигнальных молекул, а также снижает стабильность матричной РНК (мРНК) генов, кодирующих цитокины [20].

Экспериментальный и клинический опыт свидетельствует о том, что репрограммирование может сопровождаться генерализованной иммуносупрессией. Помимо вышеописанных изменений программы транскрипции, у больных сепсисом наблюдается выраженный апоптоз отдельных подгрупп лимфоцитов, дендритных клеток и эпителиальных клеток [8, 20]. Кроме того, у людей, страдающих сепсисом, достаточно распространена некоторая иммунная рефрактерность. Широко распространенное мнение о том, что сепсис представляет собой монополярное состояние чрезмерного воспалительного ответа, носит чрезвычайно упрощенный характер. Это мнение основано на результатах исследования острого действия эндотоксинов в моделях с участием лабораторных животных. В настоящее время установлено, что у многих пациентов развивается слабый системный воспалительный ответ. Такое состояние зачастую наблюдается на поздних стадиях септического шока. Многократное повреждающее действие медиаторов микробного происхождения характеризуется менее выраженными физиологическими нарушениями, по сравнению с изменениями, сопровождающими начальный этап тяжелого сепсиса [8, 20, 22].

Распознавание других микробных медиаторов антигенраспознающими рецепторами

TLR4 - это основной рецептор для ЛПС, тогда как TLR2 и его гетеродимерные аналоги (TLR1 или TLR6) распознают множество других медиаторов микробного происхождения, которые выступают в роли PAMP-молекул грибов, вирусов, паразитов и грамположительных бактерий [10, 13, 22, 23]. Аналогично связыванию с ЛПС, CD14 первично соединяется с бактериальным пептидогликаном, липотейхоевой кислотой и липопептидами грамположительных бактерий, а затем переносит эти микробные лиганды на TLR2 для последующей передачи сигнала на внутриклеточном уровне. TLR5 распознает флагеллярный белок (флагеллин) грамотрицательных и грамположительных бактерий, способных передвигаться посредством бактериальных жгутиков [5, 15].

Грамположительные (лишенные ЛПС) и грамотрицательные бактерии сильно отличаются по характеру отклика организма хозяина и профилям транскрипции. Следовательно, сигнальные цепи, предусмотренные для грамположительных бактерий, не похожи на таковые бактерий, наружная оболочка которых содержит эндотоксин [24-27].

Специфические генетические элементы бактерий и некоторых вирусов распознаются специальными TLR. Эти рецепторы способны идентифицировать нуклеиновые кислоты внутри клетки на уровне эндосом. TLR9 распознает неметилированные CpG-мотивы бактериальной ДНК [28], тогда как одноцепочечные и двухцепочечные РНК вирусов распознаются TLR7/8 и TLR3, соответственно [6, 10, 13]. Естественный лиганд TLR10 до сих пор не идентифицирован. Судя по всему, этот рецептор способен вступать во взаимодействие с TLR2 с образованием гетеродимерной структуры, которая может распознавать некоторые микробные лиганды [15].

Даже если возбудитель остается нераспознанным и проникает во внутриклеточное пространство, его присутствие все равно может быть обнаружено другим семейством антигенраспознающих рецепторов, известных как белки с доменом олигомеризации нуклеотида и повтором, богатым лейцином (англ. *nucleotide oligomerization domain-leucine rich repeat, NOD-LRR*). Эти белки распознают специфические компоненты пептидогликана грамотрицательных и грамположительных бактерий, и активируют генетические программы, направленные на удаление возбудителя [15, 22]. Отдельная внутриклеточная система распознавания, которая представлена хеликазами, подобными гену 1 типа, индуцируемому ретиноевой кислотой (англ. *retinoic acid-inducible gene-1-like helicases, RLH*), идентифицирует вирусный геном внутри клетки и оповещает иммунную систему о присутствии возбудителя [22].

К другим антигенраспознающим молекулам относятся альтернативные компоненты комплемента, манноза-связывающий лектин и CD14 [22, 29]. Врожденный иммунитет по своей природе является системой раннего реагирования и неспецифической противомикробной защиты. Для врожденного иммунитета нехарактерна точность, присущая адаптивной иммунной системе (например, В-клетки и Т-клетки). Тем не менее, способность к быстрому реагированию с участием фагоцитоза и выведением возбудителя с лихвой компенсирует этот недостаток точности. Врожденный иммунитет - это механизм, который необходим для поддержания жизнедеятельности организма, и его клеточный компонент (нейтрофилы, моноциты, макрофаги и естественные клетки-киллеры) играет ведущую роль в патогенезе септического шока [20].

Другие микробные токсины, участвующие в патогенезе сепсиса

Еще одним важным медиатором микробного происхождения, который участвует в патогенезе септического шока, является бактериальный суперантиген. Суперантигены представляют собой разнородную группу белковых экзотоксинов, вырабатываемых стрептококками, стафилококками и другими патогенными микроорганизмами. Все экзотоксины способны связываться со специфическими участками молекул главного комплекса гистосовместимости II класса на антигенпредставляющих клетках, а также активировать большое количество Т-клеток CD4+. Таким образом, суперантигены минуют обычный механизм обработки и представления антигена [30].

Тогда как обычный белковый антиген стимулирует только 1×10^5 лимфоцитов циркулирующей крови, способных распознать каждый эпитоп, суперантиген (например, токсин синдрома токсического шока 1 типа, который вырабатывается золотистым стафилококком и связывается с участком V β 2 Т-клеток) способен стимулировать до 10-20% популяции циркулирующих лимфоцитов. Это приводит к избыточной активации лимфоцитов и макрофагов с исходом в неконтролируемый синтез и высвобождение воспалительных цитокинов. Полимикробные инфекции, возбудители которых способны высвобождать как бактериальные суперантигены, так и эндотоксин, могут быть особенно

губительны для организма хозяина. Восприимчивость к ЛПС усиливается под действием суперантигенов, которые подготавливают иммунную систему к последующему воздействию ЛПС.

Выводы

Функция врожденного иммунитета состоит в том, чтобы распознавать ряд высокозащищенных молекул, предупреждающих о проникновении возбудителя во внутреннюю среду организма. Система распознавания защищает всех нас от многочисленных легких травм и инфекций на протяжении всей нашей жизни. Эта же система предупреждения потенциально летальна, если ее активация происходит при нерегулируемой и генерализованной системной реакции, характерной для сепсиса. Экстракорпоральное удаление медиаторов микробного происхождения, таких как эндотоксин, суперантигены и другие медиаторы, источником которых являются возбудители, является закономерным терапевтическим мероприятием при лечении больных сепсисом. В настоящее время доступны средства для успешного удаления этих медиаторов. Для определения показаний к использованию этих технологий по "очистке крови" пациентов, страдающих сепсисом, необходимо провести дополнительные клинические исследования.

Ссылки

1. Angus DC, Liinde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310.
2. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson T, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL, International Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee, American Association of Critical-Care Nurses, American College of Chest Physicians, American College of Emergency Physicians, Canadian Critical Care Society, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, European Society of Intensive Care Medicine, European Respiratory Society, International Sepsis Forum, Japanese Association for Acute Medicine, Japanese Society of Intensive Care Medicine, Society of Critical Care Medicine, Society of Hospital Medicine, Surgical Infection Society, World Federation of Societies of Intensive and Critical Care Medicine: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008;36:296-327.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-1554.
4. Opal SM, Calandra T: Antibiotic usage and resistance. gaining or losing ground on infections in critically ill patients? *JAMA* 2009;302:2367-2368.
5. Akira S, Takeda K: 2004. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499.
6. Takeda K: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2005;11:51.
7. Merrell DS, Falkow S: Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature* 2004;403:250-256.
8. van der Poll T, Opal SM: Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008;8:32-43.
9. Pridmore AC, Wyllie DH, Abdillahi F, Steeghs L, van der Ley P, Dower SK, Read RC: A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR)2 but not via TLR4/MD2. *J Infect Dis* 2001;183:89-96.
10. Beutler B: Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature* 2004;430:257-263.
11. Opal SM, Scannon P, Vincent J-L, Carroll S, White M, Palardy JE, Parejo N, Pribble JP, Lemke J: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein in severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999;180:1584-1589.
12. Opal SM, Marra MN, McKelligan B, Fisher CJ, Palardy JE, Scott R: Relative concentrations of endogenous endotoxin binding proteins in infected body fluids. *Lancet* 1994;344:429-431.

13. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
14. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO: The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 2009;458:1191-1196.
15. Cristofaro P, Opal SM: Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs* 2006;66:15-29.
16. Reitsma PH, Branger J, Van Den Blink B, Weijer S, van der Poll T, Meijers JC: Procoagulant protein levels are differentially increased during human endotoxemia. *J Thromb Haemost* 2003;1:1019-1023.
17. Levi M, Opal SM: Coagulation abnormalities in critically ill patients. *Crit Care* 2006;10:222-228.
18. Opal SM, Esmon C: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care* 2003;7:23-38.
19. Riewald M, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W: Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002;296:1880-1882.
20. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-150.
21. Coughlin SR: Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature* 2000;407:258-264.
22. Cinel I, Opal SM: Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med* 2009;37:291-304.
23. Levitz SM: Interactions of Toll-like receptors with fungi. *Microbes Infect* 2004;6:1351-1355.
24. Jenner RG, Young RA: Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nature Rev* 2005;3:281-294.
25. Opal SM, Cohen J: Clinical Gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from Gram-negative bacterial sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:1608-1616.
26. Opal SM: The host response to endotoxin, anti-LPS strategies and the management of severe sepsis. *Int J Med Microbiol* 2007;297:365-377.
27. Yu SL, Chen HW, Yang PC, Peck K, Tsai MH, Chen JJW, Lin FY: Differential gene expression in Gram-negative and Gram-positive sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1135-1143.
28. Dalpke A, Frank J, Peter M, Heeg K: Activation of Toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun* 2006;74:940-946.
29. Hoffmann JA, Kafatos KC, Janeway CA, Ezekowitz RAB: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313-1317.
30. Sriskandan S, Ferguson M, Elliot V, Faulkner L, Cohen J: Human intravenous immunoglobulin for experimental streptococcal toxic shock: bacterial clearance and modulation of inflammation. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:117-124.

Стивен М. Оупэл, доктор медицины, профессор медицины
 Отделение инфекционных болезней, Мемориальная больница штата Род-Айленд
 Брустер-Стрит 111
 г. Потакет, Род-Айленд, 02860 (США)
 Телефон: +1 401 729 2545. Факс: +1 401 729 2795.
 Электронная почта: Steven_Opal@brown.edu

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 25-34

Обоснование экстракорпорального удаления эндотоксина при сепсисе: теория, выбор времени и техника

Клаудио Ронко^{а,б} · Паскаль Пиччинни^{а,б} · Джон Кэллум^в

^а Отделение нефрологии, диализа и трансплантации, больница Сан-Бортоло, г. Виченца, Италия

^б Международный научно-исследовательский институт нефрологии, г. Виченца, Италия

^в Отделение реанимации, Университет г. Питтсбург, г. Питтсбург, штат Пенсильвания, США

Реферат

Некоторые проявления сепсиса обусловлены присутствием эндотоксина в кровотоке. Исследования, выполненные с участием людей и животных, свидетельствуют о явном иммунологическом отклике на попадание эндотоксина в организм. Кроме того, при сепсисе и эндотоксемии распространены острые нарушения функции сердечно-сосудистой системы, легких и почек. В связи с этим, чрезвычайно важно выявлять сепсис на ранней стадии его развития и распознавать гуморальные нарушения, связанные с течением этого заболевания, в том числе идентифицировать эндотоксин в циркулирующей крови и выполнять соответствующую количественную оценку. После получения необходимой информации логичным шагом является удаление максимально возможного количества эндотоксина с целью подавления клинических эффектов патологического процесса. В настоящее время этого можно достигнуть благодаря использованию высокоспецифичного гемоперфузионного процесса с применением картриджей с иммобилизованным полимиксином В в составе экстракорпорального контура. Судя по всему, благодаря использованию этого метода можно удалить большое количество эндотоксина и добиться значительного снижения его концентрации в кровотоке. Клинические эффекты этой методики состоят в подавлении септического каскада на ранних стадиях его развития, а также в улучшении исхода заболевания. Последние клинические исследования оправдывают ожидания, связанные с этим методом гемоперфузии, поскольку их результаты свидетельствуют об уменьшении смертности больных с ранними признаками абдоминального сепсиса на фоне недавно перенесенного оперативного вмешательства. Эти достижения открывают новые подходы к применению специфических методов лечения при сепсисе.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Эндотоксемия в экспериментальной модели сепсиса у людей и лабораторных животных

Последние исследования значительно расширили наше представление о биологии тяжелого воспалительного и инфекционного процесса у людей [1]. В настоящее время считается, что врожденная иммунная реакция на внедрение возбудителя во внутреннюю среду организма реализуется преимущественно за счет распознавания молекулярных мотивов иммунокомпетентными клетками с последующей активацией многочисленных киназных путей. Кроме того, установлено, что подобные реакции сопровождаются

временным пересечением про- и противовоспалительных сигналов. К сожалению, вариабельность клинического фенотипа зачастую препятствует интерпретации подобных изменений в реальном времени, и ограничивает возможность эффективного вмешательства в патологический процесс.

В рамках нескольких исследований был изучен первичный иммунный ответ на избирательное введение эндотоксина - липополисахарида (ЛПС), который является основным компонентом наружной оболочки грамотрицательных бактерий. В течение одного часа после внутривенного введения эндотоксина (ЛПС) у пациентов могут появиться различные клинические проявления, например, озноб, головная боль, боль в спине, миалгии, тошнота и фотофобия. Выраженность дискомфорта, связанного с этими симптомами, непостоянна. Тем не менее, почти у всех испытуемых наблюдалось постепенное регрессирование клинических проявлений в течение 4-6 часов.

К наиболее распространенным симптомам можно отнести повышение температуры тела (на 1-4°C) и увеличение частоты сердечных сокращений. Эти проявления системной воспалительной реакции обычно затухают в течение 6-8 часов [2, 3]. Выработка цитокинов характеризуется определенной последовательностью. Сначала повышается активность фактора некроза опухоли (англ. *tumor necrosis factor, TNF*). Увеличение концентрации TNF в системном кровотоке наблюдается через 45-60 минут после введения ЛПС. Эндотоксемия сопровождается динамическими и воспроизводимыми изменениями количества и функции лейкоцитов циркулирующей крови. Количество лейкоцитов в системном кровотоке начинает снижаться через 15-30 минут после воздействия ЛПС [4], предшествуя клиническим проявлениям и выработке специфических медиаторов. Выраженная моноцитопения характеризуется регрессией и восстановлением нормальных показателей по истечении 6-8 часов.

Прогрессирующее снижение общего числа лимфоцитов также регистрируется вскоре после введения ЛПС и продолжается от 9 до 12 часов. Лейкоцитарная формула изменяется преимущественно за счет популяции полиморфноядерных лейкоцитов. После первоначального снижения, количество этих клеток в течение 4-6 часов возрастает до уровня, превышающего исходный, и возвращается к норме в течение 24 часов. Клетки эндотелия можно отнести к популяции иммунокомпетентных клеток, которые активируются после воздействия ЛПС *in vivo*. При помощи маркеров-имитаторов, таких как растворимый E-селектин, было установлено, что отчетливая реакция эндотелиальных клеток может наблюдаться в течение 2 часов после введения ЛПС и сохраняться на протяжении последующих 6 часов.

Реакция сердечно-сосудистой системы при сепсисе

Септический шок сопровождается выраженными нарушениями функции сердечно-сосудистой системы. Предполагается, что эндотоксин бактериальных клеток выступает в роли одного из ведущих медиаторов, ответственных за реакцию сердечно-сосудистой системы при сепсисе [5]. Эмпирическим путем было доказано, что введение эндотоксина здоровым лицам приводит к подавлению функции левого желудочка, независимо от изменений объема левого желудочка и сосудистого сопротивления. Изменения функции аналогичны таковым при септическом шоке, и свидетельствуют о том, что эндотоксин является основным медиатором дисфункции сердечно-сосудистой системы при этом состоянии.

Септический шок характеризуется миокардиальной дисфункцией, вазоплегией и микрососудистым тромбообразованием с исходом в полиорганную недостаточность и смерть организма. Выраженное подавление функции сердца, сопровождающее сепсис у человека, было моделировано в рамках многочисленных экспериментов. Введение ЛПС здоровым добровольцам приводит к развитию синдрома, подобного сепсису, который предполагает снижение фракции выброса желудочков, бивентрикулярную дилатацию, а

также изменения сердечного индекса [6]. ЛПС реализует свои эффекты не только оказывая прямое влияние на клетки, но и опосредованно, при помощи таких медиаторов, как цитокины, молекулы адгезии, оксид азота и активные формы кислорода. Kumar и соавт. [7] показали, что индуцированная ЛПС дисфункция миокарда развивается при содействии TNF, интерлейкина-1b (англ. *interleukin-1b*, *IL-1b*) и прочих медиаторов воспаления. Другие ученые [8] после воздействия ЛПС обнаружили увеличение миокардиального TNF, который отчасти синтезировался самими кардиомиоцитами. Локальный миокардиальный уровень TNF может быть важным фактором, ответственным за прогрессирование дисфункции миокарда, поскольку TNF не только подавляет сократительную способность сердечной мышцы, но и стимулирует апоптоз кардиомиоцитов [9].

Реакция легких при сепсисе

Легкие особенно восприимчивы к острому повреждению, которое сопутствует шоку. Такое повреждение может прогрессировать с развитием жизнеугрожающего состояния - острого респираторного дистресс синдрома взрослых [10]. Способность эндотоксина индуцировать высвобождение IL-1 и TNF как моноцитами циркулирующей крови, так и печенью, свидетельствует о том, что эндотоксин также способен прямо или опосредованно стимулировать локальную выработку этих медиаторов воспаления в легких альвеолярными макрофагами. После высвобождения, IL-1 и TNF могут воздействовать на альвеолярные капилляры аналогично известному влиянию этих соединений на эндотелий системных сосудов. В результате повышается проницаемость альвеолокапиллярной мембраны и происходит вторичное накопление жидкости. Таким образом, персистирование дисфункции легких после исчезновения системных проявлений септического шока свидетельствует о том, что местные факторы безусловно играют важную роль в развитии шокового легкого.

Реакция почек при сепсисе и сепсис-ассоциированное острое повреждение почек

При сепсисе почка является органом-мишенью. Значительным изменениям подвергается как структура, так и функция почки. Острое повреждение почек при сепсисе тесно связано с апоптозом почечных клеток [11]. При грамтрицательном сепсисе ЛПС могут индуцировать апоптоз канальцевых клеток Fas-опосредованным и каспаза-опосредованным путями. У больных сепсисом было обнаружено повышенное содержание растворимого Fas-антигена в плазме крови [12]. Кроме того, экспериментальные модели сепсиса показали, что усиленная активация каспазы сигнализирует о наличии острой почечной недостаточности [13].

Апоптоз (энергезависимый процесс программированного умирания клеток организма) принимает непосредственное участие в патогенезе острой почечной недостаточности. Недавно Jo и соавт. [11] и Bordoni и соавт. [14] высказали предположение, что Fas-опосредованный и каспаза-опосредованный апоптоз канальцевых клеток может быть одним из механизмов формирования почечной дисфункции, индуцированной эндотоксемией. В пользу этого предположения свидетельствуют результаты нескольких исследований, которые показали, что ЛПС циркулирующей крови могут провоцировать неадекватную активацию проапоптозных путей в иммунных, эпителиальных и эндотелиальных клетках [15]. Более того, ЛПС способны воздействовать непосредственно на клетки почек, например, на подоциты и канальцевый эпителий, оказывая стимулирующее влияние на синтез медиаторов воспаления. Таким образом, появляется логическое обоснование для удаления ЛПС из кровотока при помощи экстракорпоральных методов, с последующей инактивацией проапоптозных факторов с целью профилактики повреждения почек [16]. Безусловно, подобные лечебные мероприятия необходимо предпринять до развития нарушений функции почек.

Эндотоксемия - важный фактор, определяющий заболеваемость и смертность при сепсисе

Хотя существует распространенное предположение, согласно которому эндотоксин является основным бактериальным токсином, ответственным за развитие синдрома септического шока, обнаружение эндотоксина в кровотоке человека при сепсисе нестойко коррелировало как с бактериемией, так и с важными клиническими критериями [17]. Почти три четверти всех клинически диагностированных случаев септического шока с определяемой эндотоксемией характеризуются отсутствием документального подтверждения инфекции, вызванной грамотрицательными патогенными микроорганизмами. Следовательно, уровень эндотоксина в крови может поддерживаться или возрастать даже после того, как защитные силы организма или антибиотики (или и то, и другое) удалили возбудителя из кровотока. Более того, у некоторых пациентов идентификация эндотоксина в крови может быть связана с наличием внесосудистых источников, таких как желудочно-кишечный тракт или изолированные очаги инфекции. И наоборот, эндотоксемия наблюдается не у всех пациентов с грамотрицательной бактериемией. Этот феномен хорошо известен [18]. Вероятно, причина состоит в слабовыраженной бактериемии и быстром выведении всех свободных эндотоксинов из кровотока. Таким образом, источником эндотоксемии может служить нераспознанная грамотрицательная бактериемия или поступление эндотоксина из внесосудистых источников. В отличие от эндотоксемии, положительный результат бактериологического посева крови или наличие грамотрицательной бактериемии не связаны с какими-либо показателями, указывающими на тяжесть заболевания или прогнозирующими исход. У людей септический шок сопровождается характерными изменениями структуры и функции сердечно-сосудистой системы, включая низкий уровень системного сосудистого сопротивления, большой минутный сердечный выброс, расширенную полость желудочка и сниженную фракцию выброса левого желудочка. Снижение фракции выброса обыкновенно наблюдается в течение первых двух дней после начала сепсиса. У пациентов, переживших более 7-10 дней болезни, эти изменения обратимы.

При септическом шоке эндотоксемия обыкновенно сопровождается существенными лабораторными, сердечно-сосудистыми и клиническими осложнениями сепсиса, включая лактат-ацидоз, миокардиальную дисфункцию, органную недостаточность и смерть. Предшествующие исследования свидетельствуют, что стойкая гипотензия (обусловленная низким уровнем системного сосудистого сопротивления или тяжелой депрессией миокарда) или полиорганная недостаточность являются наиболее распространенными причинами смерти при септическом шоке [19]. Такая связь отчетливо свидетельствует о том, что эндотоксин является важным медиатором, определяющим высокую заболеваемость и смертность при септическом шоке.

Уровень ЛПС и ЛПС-связывающего белка в плазме крови

Уровень ЛПС и ЛПС-связывающего белка (англ. *LPS-binding protein, LBP*) в плазме крови являются важными показателями при сепсисе и септическом шоке. По данным исследования Oral и соавт. [20], в рамках которого все участники соответствовали согласованным критериям тяжелого сепсиса, у 80% пациентов был диагностирован септический шок. Средняя оценка по шкале оценки острых физиологических и хронических изменений состояния здоровья II версии (англ. *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II, APACHE II*) достигала $26 \pm 13,6$, а показатель общей смертности за 28 дней для всей популяции исследования ($n = 253$) составил 32,4%. В группе больных тяжелым сепсисом с повышенным содержанием эндотоксина в крови был зарегистрирован значительно больший уровень смертности, чем в группе пациентов, у которых концентрация эндотоксина в крови не поддавалась определению. Результаты некоторых исследований свидетельствуют о том, что уровень общей смертности за 28-дневный период достигал 35% в популяции больных с эндотоксемией, и только 22% в

популяции пациентов, у которых признаки эндотоксемии отсутствовали. Кроме того, была отмечена тенденция к меньшему времени выживания при повышенном содержании эндотоксина в плазме крови ($p < 0,05$). Определяемый уровень эндотоксина в плазме чаще встречался у больных с септическим шоком, чем у больных без шока. Для таких пациентов была нехарактерна корреляция между уровнем эндотоксина и уровнем LBP в системном кровотоке.

Существенная связь между типом возбудителя септического процесса и концентрацией эндотоксина или LBP в плазме крови также отсутствовала. В целом, у больных с подтвержденным грамотрицательным бактериальным сепсисом содержание эндотоксина и LBP в плазме крови было таким же, как у пациентов с грамположительным бактериальным сепсисом или сепсисом, вызванным грибами. Это исследование показало, что при сепсисе эндотоксин зачастую обнаруживается в системном кровотоке, независимо от типа возбудителя. В некоторых случаях эндотоксемия могла быть вызвана нераспознанной грамотрицательной инфекцией или бактериями, обитающими в желудочно-кишечном тракте [21]. Предполагается, что транслокации возбудителя из просвета кишечника в системный кровоток способствуют такие факторы, как региональная гипоперфузия и ишемия слизистых оболочек [21, 22].

Введение эндотоксина в организм животных и здоровых людей приводит к активации сигнального каскада, аналогичного таковому при сепсисе. Выраженная реакция может привести к органной дисфункции. Тем не менее, уровень органной дисфункции не обладает прямой взаимосвязью с количеством ЛПС, введенного в организм [23]. Исследования, выполненные *in vivo*, показали, что отклик организма человека на попадание эндотоксина зависит от генетических особенностей и половой принадлежности [24]. Согласно результатам клинического тестирования, уровень эндотоксина на момент госпитализации в отделение интенсивной терапии (ОИТ) прогнозирует формирование органной дисфункции у больных сепсисом [25]. Эндотоксемия широко распространена у тяжелобольных пациентов, и с течением времени уровень эндотоксина в крови варьирует [22, 26].

Уровень эндотоксина в крови здорового человека тщательно регулируется посредством высокозащищенных механизмов, которые обеспечивают связывание с эндотоксином, оповещение о присутствии эндотоксина в организме, а также последующее его удаление. Преходящая эндотоксемия наблюдается и у здоровых людей, например, у марафонцев, профессиональных атлетов или курильщиков [27, 28]. Тем не менее, при патологии механизмы взаимодействия с эндотоксином могут отличаться, поскольку воспалительный ответ и провоцирующее его повреждение разобщаются. Разобщение регуляторных механизмов наряду с продолжающейся транслокацией эндотоксина кишечных бактерий может способствовать колебаниям его концентрации у некоторых пациентов. Кроме того, непостоянство концентрации может быть связано с неконтролируемым и рецидивирующим течением грамотрицательного сепсиса.

Связь периодического воздействия эндотоксина с чрезмерным и неконтролируемым системным воспалительным ответом при полиорганной недостаточности представляется весьма правдоподобной. Если варьирование уровня эндотоксина выступает не только в роли маркера продолжающегося повреждения, но и в роли медиатора, не исключено, что удастся определить выраженность соответствующих колебаний, а также регулировать этот процесс. Более широкое понимание кинетики изменений уровня эндотоксина при тяжелой патологии может оказать положительное влияние на определение времени и цели специфической антиэндотоксиновой терапии [29].

Диагностическое и прогностическое значение эндотоксемии при тяжелой патологии

Хотя эндотоксин распространен повсеместно, хорошо известен тот факт, что достоверно определить его содержание у больного человека затруднительно. Наиболее

распространенный диагностический метод - хромогенный анализ, основанный на применении лизата амебоцитов мечехвоста, широко применяется для идентификации эндотоксина в лекарственных препаратах и жидких средах. Тем не менее, применимость этого метода для анализа биологических проб ограничена [30] в связи с присутствием ингибиторов коагуляционной реакции в системном кровотоке. Более того, другие продукты жизнедеятельности микроорганизмов (например, грибов) также способны активировать реакцию, лежащую в основе этого диагностического метода. Таким образом, этот тест неспецифичен для эндотоксина. Грамотрицательная инфекция является одной из многих других причин эндотоксемии. Хотя по данным когортных исследований микробиологически подтвержденная инфекция встречается нечасто, на момент госпитализации в ОИТ эндотоксемия присутствует у большинства пациентов.

В рамках когортного исследования Marshall и соавт. [25] использовали новый тест на активность эндотоксина (АЭ), который санкционирован Управлением по контролю качества пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США (англ. *Food and Drug Administration, FDA*). Результаты этого исследования свидетельствуют, что уровень АЭ составлял $\leq 0,40$ у 367 пациентов (42,8% популяции), $0,40-0,60$ у 228 пациентов (26,6% популяции), и $\geq 0,60$ у 262 пациентов (30,6% популяции). Таким образом, на момент госпитализации в ОИТ у большинства пациентов уровень эндотоксина в крови был повышен. Критериям тяжелого сепсиса на момент госпитализации соответствовали 74 пациента (8,6% когорты исследования). Уровень смертности в ОИТ в группе больных сепсисом был выше, чем в группе пациентов без сепсиса (соответственно, 32,4% против 11,5%; $p < 0,001$). Уровень АЭ был значительно выше у тех пациентов, которые удовлетворяли критериям тяжелого сепсиса (соответственно, $0,57 \pm 0,26$ против $0,46 \pm 0,26$ единиц; $p < 0,001$). Кроме того, риск тяжелого сепсиса возрастал при увеличении уровня АЭ. Популяция больных с эндотоксемией характеризовалась повышенной смертностью в ОИТ, а также повышенной внутрибольничной смертностью. Продолжительность пребывания в ОИТ оказалась несколько большей у пациентов с уровнем АЭ $\geq 0,60$ на момент поступления в ОИТ (соответственно, $6,8 \pm 12,2$ против $4,9 \pm 10,7$ дня; $p < 0,05$). В то же время, у пациентов с умеренным или высоким уровнем эндотоксина на момент госпитализации в ОИТ заболевание протекало заметно тяжелее, о чем свидетельствует более высокая оценка по шкале APACHE II на момент поступления, а также большая распространенность тяжелого сепсиса. Более того, в популяции больных с максимальным уровнем эндотоксина в циркулирующей крови был существенно повышен риск смерти пациента на момент пребывания в ОИТ. Таким образом, наличие эндотоксемии определяет подгруппу повышенного риска, представленную тяжелообольными пациентами.

Тогда как в настоящее время отсутствуют сведения о том, можно ли снизить повышенный риск смерти благодаря использованию специальных мер, направленных на нейтрализацию эндотоксина, такая гипотеза весьма привлекательна. Результаты исследований, выполненных с участием лабораторных животных, свидетельствуют в пользу патогенетической роли повышенной концентрации эндотоксина. Кроме того, предшествующий анализ результатов исследований нейтрализации эндотоксина при сепсисе у человека показал, что наиболее выраженного положительного эффекта можно ожидать у больных с эндотоксемией, тогда как пациентам с инфекцией, вызванной микроорганизмами, которые не относятся к числу грамотрицательных, подобное вмешательство может причинить вред [31].

Целенаправленное экстракорпоральное лечение эндотоксемии

От момента открытия эндотоксемии известно, что, независимо от источника, присутствие эндотоксина в системном кровотоке сопровождается органной дисфункцией и повышенным риском смерти тяжелообольных пациентов [25]. Кроме того, с течением времени уровень эндотоксина в крови пациентов варьирует. Это указывает на

волнообразное поступление эндотоксина в результате инфекционного процесса или транслокации из просвета кишечника. Тем не менее, несмотря на появление новых методов обнаружения эндотоксина, лечебные мероприятия весьма ограничены. Лечение бактериальной инфекции основано на применении антибактериальных препаратов, тогда как эффективные методы восстановления барьерной функции кишечника отсутствуют. Более того, многие антибиотики вызывают дополнительное высвобождение эндотоксина вследствие гибели возбудителя.

Антиэндотоксиновая терапия, подобно антиэндотоксиновым антителам (НА-1А или Е5), не оправдала возложенных на нее надежд. При лечении пациентов с подтвержденным грамтрицательным сепсисом преимущества этого метода не подтвердились. Полимиксин В - это хорошо известный антибиотик, который обладает высоким сродством к эндотоксину и способен его нейтрализовать. Системное применение полимиксина В ограничивается его нейротоксичностью и нефротоксичностью. С 1994 года полимиксин В используется в иммобилизованном состоянии - в соединении с полистироловыми волокнами. В рамках гемоперфузионной терапии иммобилизованный полимиксин В способен эффективно связываться с эндотоксином как *in vitro*, так и *in vivo*. Этот метод начал применяться в Японии в 1994 году. Благодаря его использованию были излечены тысячи пациентов. К сожалению, несмотря на распространенное применение в Японии, эффективность гемоперфузионной терапии на основе полимиксина В не была подтверждена в рамках крупных рандомизированных исследований.

Тем не менее, несколько небольших исследований все же были выполнены. В большинстве случаев, в этих исследованиях изучались аналогичные группы пациентов. В рамках недавнего систематического обзора Cruz и соавт. [32] идентифицировали 28 публикаций (включая публикации результатов рандомизированных контролируемых исследований), посвященных использованию гемоперфузионной терапии с полимиксином В с целью лечения сепсиса и септического шока. Гемоперфузионная терапия с полимиксином В характеризовалась значительно меньшей смертностью по сравнению с традиционными методами лечения (относительный риск: 0,53, 95% ДИ: 0,43-0,65). Существенная разница также затрагивала дополнительные показатели эффективности, такие как увеличение среднего артериального давления, уменьшение дозы вазопрессоров, а также увеличение отношения среднего парциального давления кислорода в артериальной крови к фракционной концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе. В целом, гемоперфузионная терапия с полимиксином В оказывает благоприятное влияние на выживаемость и гемодинамику. Авторы полагают, что необходимо провести дополнительные тщательные исследования этого вида терапии.

Совсем недавно те же авторы сообщили результаты многоцентрового рандомизированного контролируемого исследования, выполненного в популяции больных септическим шоком, осложнившим течение абдоминальной инфекции [33]. Авторы выполнили проспективный анализ и сообщили о том, что для пациентов, которые прошли два сеанса гемоперфузии с полимиксином В, был зарегистрирован лучший исход, чем для пациентов, которые получали терапию, соответствующую современным стандартам клинической практики. Результаты этого исследования открывают новые подходы к оценке этого метода лечения в других популяциях больных с эндотоксин-опосредованным септическим шоком. В действительности, учитывая плохие исходы сепсиса, обусловленные эндотоксемией, гемоперфузия с полимиксином В должна успешно применяться, особенно теперь, когда появились более совершенные методы идентификации эндотоксемии. Следовательно, пришло время подтвердить недавно опубликованные, многообещающие данные путем проведения достаточно мощных исследований, а также формирования клинических реестров, в которых будут фиксироваться сведения о диагностических и лечебных мероприятиях, связанных с синдромами, опосредованными действием эндотоксина.

Теоретические данные свидетельствуют в пользу использования экстракорпоральных методов в тех случаях, когда другие методы лечения оказались неэффективными. Обоснование для применения этих методов полностью согласуется с экспериментальными данными, которые были получены в рамках исследований, выполненных с участием человека и лабораторных животных. Методика проста, безопасна и доступна для широкого применения. Новый рецепт включает все ингредиенты, необходимые для того, чтобы достичь успеха.

Ссылки

1. Lowry SF: Human endotoxemia: a model for mechanistic insight and therapeutic targeting. *Shock* 2005;24(Suppl 1):94-100.
2. Suffredini AF, Shelhamer JH, Neumann RD, Brenner M, Baltaro RJ, Parillo JE: Pulmonary and oxygen transport effects of intravenously administered endotoxin in normal humans. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:1398-1403.
3. Smith PD, Suffredini AF, Allen JB, Wahl LM, Parillo JE, Wahl SM: Endotoxin administration to humans primes alveolar macrophages for increased production of inflammatory mediators. *J Clin Immunol* 1994;14:141-148.
4. Richardson RP, Rhyne CD, Fong Y, Hesse DG, Tracey KJ, Marano MA, Lowry SF, Antonacci AC, Calvano SE: Peripheral blood leukocyte kinetics following in vivo lipopolysaccharide (LPS) administration to normal human subjects: influence of elicited hormones and cytokines. *Ann Surg* 1989;210:239-245.
5. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE: the cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989;321:280-287.
6. Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escol G, Jilma B, Key NS: Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004;103:4545-4553.
7. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parillo JE: Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1-beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996;183:949-958.
8. Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B: The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest* 1992;90:693-698.
9. Meldrum DR: Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998;274:R577-R595.
10. Smith PD, Suffredini AF, Allen JB, Wahl LM, Parillo JE, Wahl SM: Endotoxin administration to humans primes alveolar macrophages for increased production of inflammatory mediators. *J Clin Immunol* 1994;14:141-148.
11. Jo SK, Cha DR, Cho WY, Kim HK, Chang KH, Yun SY, Won NH: Inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce Fas-mediated apoptosis in renal tubular cells. *Nephron* 2002;91:406-415.
12. Guo R, Wang Y, Minto AW, Quigg RJ, Cunningham PN: Acute renal failure in endotoxemia is dependent on caspase activation. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3093-3102.
13. Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A: The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 2007;8:493-500.
14. Bordoni V, Bolgan I, Brendolan A, Crepaldi C, Gastaldon F, D'Intini V, Pilotto L, Inguaggiato P, Bonello M, Galloni E, Everard P, Bellomo R, Ronco C: Caspase-3 and -8 activation and cytokine removal with a novel cellulose triacetate superpermeable membrane in an *in vitro* sepsis model. *Int J Artif Organs* 2003;26:897-905.
15. Camussi G, Mariano F, Biancone L, De Martino A, Bussolati B, Montrucchio G, Tobias PS: Lipopolysaccharide binding protein and CD14 modulate the synthesis of platelet-activating factor by human monocytes and mesangial and endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol* 1995;155:316-324.
16. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D, Romanazzi GM, Pacitti A, Lanfranco G, Puntorieri V, Martin EL, Mascia L, Monti G, Casella G, Segoloni GP, Camussi G, Ranieri VM: Polymyxin-B hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. *Intensive Care Med* 2008;34:1638-1645.
17. Stumacher RJ, Kovnat MJ, McCabe WR: Limitations of the usefulness of the limulus assay for endotoxin. *N Engl J Med* 1973;283:1261-1264.

18. Jorgensen JH: Clinical applications of the limulus amoebocyte lysate test; in Proctor RA (ed): *Clinical Aspects of Endotoxin Shock: Handbook of Endotoxin*. Amsterdam, Elsevier, 1986, vol 4, pp 127-160.
19. Herring WB, Herion JC, Walker RI, Palmer JG: Distribution and clearance of circulating endotoxin. *J Clin Invest* 1963;43:79-87.
20. Opal SM, Scannon OJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH: Relationship between plasma levels of LPS and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999;180:1584-1589.
21. Hurley JC: Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:268-292.
22. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE: Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99:169-175.
23. Stephens RC, O'Malley CM, Frumento RJ, et al: Low-dose endotoxin elicits variability in the inflammatory response in healthy volunteers. *J Endotoxin Res* 2005;11:207-212.
24. Coyle SM, Calvano SE, Lowry SF: Gender influences in vivo human responses to endotoxin. *Shock* 2006;26:538-543.
25. Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004;190:527-534.
26. Klein DJ, Derzko A, Foster D, Seely AJE, Brunet F, Romaschin AD, Marshall JC: Daily variation in endotoxin levels is associated with increased organ failure in critically ill patients. *Shock* 2007;28:524-529.
27. Brock-Utne JG, Gaffin SL, Wells MT, et al: Endotoxaemia in exhausted runners after a long-distance race. *S Afr Med J* 1988;73:533-536.
28. Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, et al: Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 1999;115:829-835.
29. Opal SM, Gluck T: Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003;31(Suppl 1):57-64.
30. Cohen J: The detection and interpretation of endotoxemia. *Intensive Care Med* 2000;26(Suppl 1):S51-S56.
31. Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL, et al: Treatment of Gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1991;324:429-436.
32. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, de Cal M, Polanco N, Corradi V, Lentini P, Nalesso F, Ueno T, Ranieri VM, Ronco C: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Critical Care* 2007;11:R47.
33. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301: 2445-2452.

Клаудио Ронко, доктор медицины
 Отделение нефрологии, диализа и трансплантации, больница Сан-Бортоло
 Виале Родольфи 37
 IT-36100, г. Виченца (Италия)
 Телефон: +39 0 444993869. Факс: +39 0 444993949.
 Электронная почта: cronco@goldnet.it

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 35-44

Экстракорпоральное удаление эндотоксина: картридж с иммобилизованным полимиксином В

Тору Тэни^а · Хисатака Шоджи^б · Гуалтиеро Гуаданьи^в · Анджело Перего^г

^а Отделение хирургии, Университет медицинских наук префектуры Сига, г. Оцу

^б Отделение неотложной помощи и реанимации, Торэй Медикал Компани лимитед, г. Токио, Япония

^в ESTOR S.p.A., г. Милан

^г U.O.C Nefrologia e Dialisi, больница г. Монселиче, Италия

Реферат

Эндотоксин - это липополисахарид (ЛПС), который является компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Проникнув в системный кровоток из инфекционного очага или из просвета желудочно-кишечного тракта, эндотоксин играет важную роль в патогенезе тяжелого сепсиса и септического шока. Он вступает во взаимодействие с моноцитами и макрофагами. В результате взаимодействия эти клетки активируются и начинают вырабатывать разнообразные медиаторы. Синтезированные медиаторы повреждают клетки эндотелия, что приводит к формированию нарушений микроциркуляции. Как следствие развивается полиорганная недостаточность. Нейтрализация и удаление эндотоксина из системного кровотока являются перспективными подходами к лечению тяжелого сепсиса и септического шока. Селективная сорбентная терапия, направленная на элиминацию эндотоксина, применяется в клинических условиях более 15 лет. Этот метод получил преимущественное распространение в Японии. Позже он начал использоваться в Италии и в других странах. В настоящее время доступен картридж для селективного удаления эндотоксина из крови, который носит название Тогаумухип^{ТМ} (PMX; компания Торэй, г. Токио, Япония). PMX представляет собой полимиксин В (ПМ-В), ковалентно связанный с полистироловыми волокнами. Общеизвестно, что ПМ-В способен вступать во взаимодействие с эндотоксином, а также то, что он обладает бактерицидной активностью. Для ПМ-В характерна высокая степень сродства к эндотоксину. Ионный и гидрофобный механизмы позволяют ПМ-В связываться с липидом А эндотоксина. Внутривенное введение ПМ-В характеризуется выраженными нефротоксическими и нейротоксическими эффектами. В то же время, ПМ-В, ковалентно связанный с сорбентами PMX, не проникает в системный кровоток. Этим достигается клиническая эффективность ПМ-В при отсутствии токсических эффектов препарата. В структуру каждого картриджа входит адсорбент, представленный волокнами, на которых фиксирован ПМ-В. Направление крови, проходящей через картридж, регулируется системой радиального потока. Эффект PMX достигается при гемоперфузии со скоростью потока крови от 80 до 120 мл/мин. В качестве антикоагулянта желателно использовать гепарин. В Японии клиническое применение PMX было начато в 1994 году под эгидой национальной программы страхования здоровья. Подсчитано, что в Японии терапию PMX получили более 80000 пациентов, хотя эффективность и безопасность PMX была подтверждена в клинических условиях не только в Японии, но и в других странах.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Бактериальный липополисахарид (ЛПС или эндотоксин) представляет собой одну из наиболее мощных сигнальных молекул бактериальных клеток. Животные и человек наделены чувствительными механизмами распознавания ЛПС в собственных тканях. В структуру моноцитов, макрофагов и нейтрофилов входят специфические рецепторы - трансдукторы CD14 и толл-подобные рецепторы 4 типа. Эти рецепторы особенно чувствительны к ЛПС. Имунокомпетентные клетки реагируют на ЛПС выработкой медиаторов воспалительного ответа, которые усиливают и преобразуют сигнал ЛПС с последующей активацией защитных систем организма, изолирующих и уничтожающих возбудителя.

По не совсем ясным причинам отклик на ЛПС может быть чрезмерным. В таких случаях возможно развитие сепсиса, септического шока и даже летального исхода.

В середине 1970-х гг. было установлено, что полимиксин В (ПМ-В) обладает защитными эффектами при гемодинамическом шоке, индуцированном эндотоксином. В то же время, стало известно о выраженном токсическом воздействии ПМ-В на почки и центральную нервную систему. Ученые предложили несколько направлений антиэндотоксиновой терапии (например, моноклональные антитела, антиэндотоксиновые вакцины, подавление синтеза эндотоксина), однако эти направления не обладали воспроизводимым влиянием на исход сепсиса. В 1983 году корпорация Торэй Индастриз разработала картридж для удаления эндотоксина из системного кровотока методом прямой гемоперфузии - Тогаумухин™ (PMX). PMX состоит из волокнистого сорбента на основе полистирола, с которым ковалентно связан антибиотик ПМ-В, выступающий в роли лиганда, нейтрализующего эндотоксин. PMX был официально зарегистрирован в Японии в 1994 году, а знак соответствия европейским директивам качества он получил в 1998 году. С 2002 года PMX реализуется на территории Европы. В настоящее время PMX является единственным доступным устройством, предназначенным для удаления эндотоксинов из кровотока. Принцип работы PMX основан на способности ПМ-В нейтрализовать эндотоксин. Поскольку при системном применении ПМ-В обладает выраженными побочными эффектами, в картридже PMX его молекула связана с инертным материалом. Ковалентная связь препятствует высвобождению ПМ-В в кровоток.

Эндотоксины и полимиксин В

Попадание эндотоксина в организм сопровождается незамедлительной реакцией моноцитов, которые связываются с эндотоксином и запускают воспалительный ответ. После активации моноцитов в реакцию вступают липопротеины, которые также связывают свободный эндотоксин с помощью липида А, и пытаются захватить ЛПС, фиксированный моноцитами, то есть липопротеины оказывают противодействие нарастающему воспалительному ответу организма [1].

При высоком содержании эндотоксина в крови реакция моноцитов преобладает над липопротеин-опосредованным удалением ЛПС. В результате создаются предпосылки для развития сепсиса. Таким образом, для удаления эндотоксина из системного кровотока необходим выраженный связывающий эффект, поскольку необходимо вывести из организма ЛПС, которые уже связались с моноцитами и липопротеиновыми комплексами.

ПМ-В - это антибактериальный препарат с мощной бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных микроорганизмов, а также выраженным аффинитетом к эндотоксину. ПМ-В обладает двойным действием в отношении эндотоксина, поскольку он обеспечивает не только связывание, но и нейтрализацию. Нейтрализация - это наиболее важный эффект, который зависит от взаимодействия между гидрофобными радикалами ПМ-В и цепями жирных кислот ЛПС. В результате этого химического взаимодействия образуется одномолекулярное соединение (рис. 1).

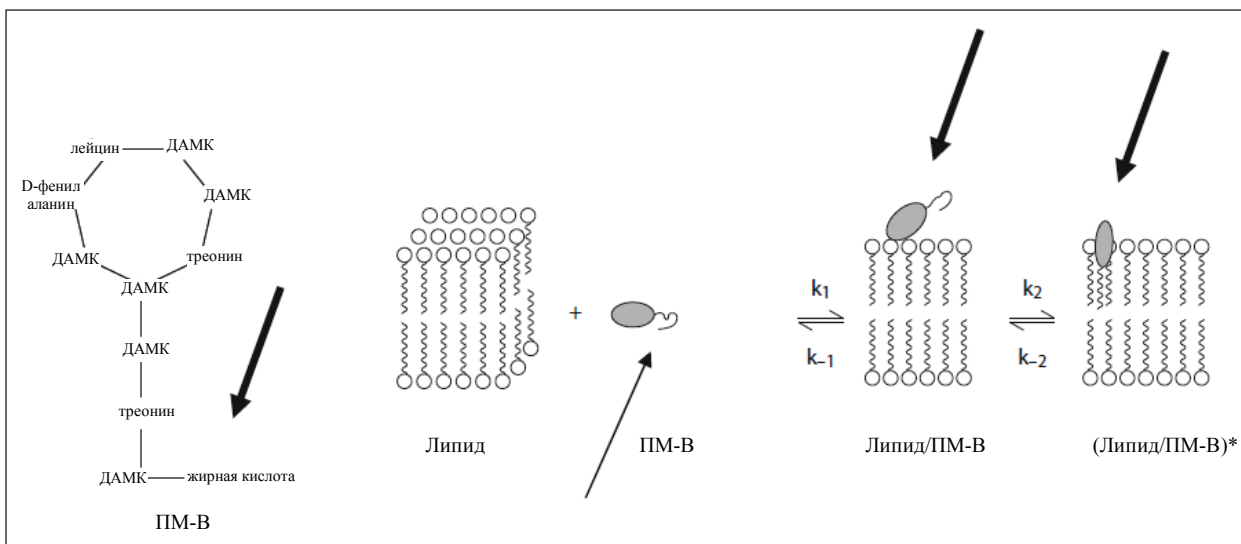


Рис. 1. Взаимодействие между гидрофобными радикалами ПМ-В и цепями жирных кислот ЛПС. Гидрофобные радикалы указаны стрелками. ДАМК - диаминомасляная кислота.

Какова структура картриджа и волокон с иммобилизованным ПМ-В

ПМ-В нельзя вводить внутривенным путем, поскольку он обладает выраженной нефротоксичностью и нейротоксичностью. В связи с этим, с целью последующего применения в качестве селективного сорбента для удаления эндотоксина из кровотока, ПМ-В был ковалентно связан с нерастворимой основой как лиганд. Волоконная основа картриджа представлена соединением полистироловых и полипропиленовых волокон по типу "остров в море". Полипропилен (компонент "остров") необходим для усиления волокна. Из пучков поликомпонентных волокон сформирован тканый материал, а полистироловый компонент химически модифицирован с целью включения α -хлорацетамид-метильных групп в качестве функциональных групп, фиксирующих ПМ-В. Молекула ПМ-В включает пять основных аминогрупп α, γ -диаминомасляной кислоты. ПМ-В ковалентно иммобилизован на поверхности волокон. Иммобилизация достигается химической реакцией между основными аминогруппами ПМ-В и активным атомом хлора функциональных групп (рис. 2) [2].

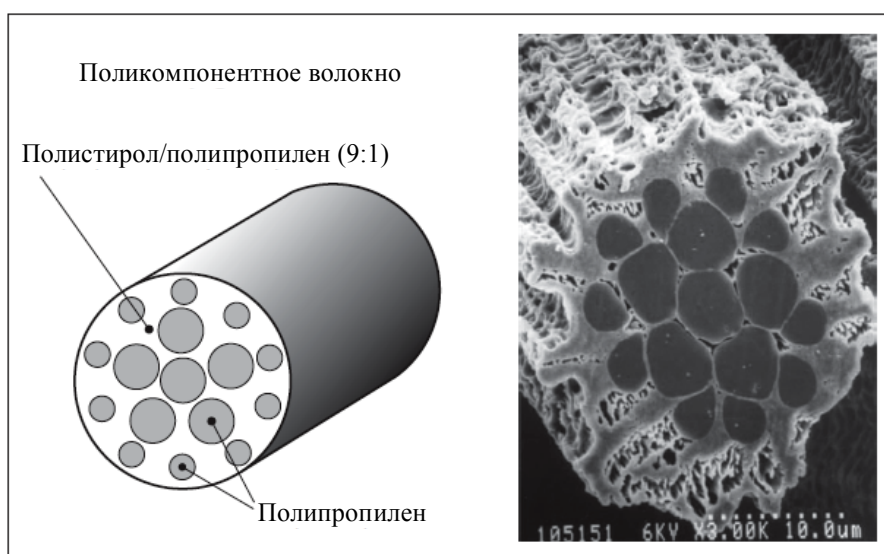


Рис. 2. Слева схематично показан поперечный срез поликомпонентного волокна типа "остров в море". Компонент "остров" представлен полипропиленовым полимером, а компонент "море" - смешанным полимером из полистирола и полипропилена (9:1). Справа представлена электронная микрофотография поперечного среза поликомпонентного волокна.

Взаимодействие между ПМ-В и эндотоксином основано на ионном и гидрофобном эффектах. Ионная связь обеспечивается отрицательно заряженными фосфатными группами липида А в структуре эндотоксина и положительно заряженным остатком α, γ -диаминаomásляной кислоты ПМ-В. Поскольку основные аминокислоты также участвуют в реакции иммобилизации, необходимо было оптимизировать иммобилизацию ПМ-В таким образом, чтобы не пострадала способность ПМ-В к взаимодействию с эндотоксином. Было установлено, что чем выше число аминокислот в структуре фиксированного ПМ-В, тем более выражена способность волокон с иммобилизованным ПМ-В к нейтрализации эндотоксина. Иммобилизация ПМ-В осуществлялась таким образом, чтобы молекула фиксированного ПМ-В включала 3-4 активные аминокислоты.

Адсорбирующая часть картриджа представлена тканым материалом, который состоит из волокон с иммобилизованным ПМ-В (рис. 3). Тканый материал обернут вокруг центрального канала с многочисленными боковыми отверстиями. Адсорбирующая часть, заключенная в футляр, представляет собой готовый к применению картридж РМХ. Особое строение картриджа обеспечивает равномерный ток крови. Кровь поступает в картридж через входное отверстие и продвигается по центральному каналу. Проникая через боковые отверстия стенки центрального канала, кровь проходит через слой тканого материала и вступает в соприкосновение с сорбентом. Специально разработанная система радиального потока обеспечивает равномерное распределение крови и, соответственно, эффективное использование сорбента.

Оценка безопасности

Для определения биологической совместимости и безопасности картриджа РМХ было выполнено специальное исследование с участием здоровых собак. Испытуемых животных подвергли двухчасовой экстракорпоральной гемоперфузии с помощью картриджа РМХ. При этом проводился мониторинг среднего артериального давления, гематокрита, количества тромбоцитов, количества лейкоцитов, а также уровня белка и трансаминаз в сыворотке крови. Мониторинг завершился спустя 3 часа после прекращения сеанса гемоперфузии. В течение или после сеанса все показатели оставались на прежнем уровне или возвратились к исходным значениям. Летальные случаи отсутствовали. В этом исследовании не было зарегистрировано ни одного неблагоприятного явления.

Эффективность картриджа с иммобилизованным ПМ-В

Для того чтобы оценить эффективность РМХ в аспекте нейтрализации ЛПС, необходимо рассмотреть два понятия. Первое понятие, "эндотоксиновая нагрузка", обозначает количество эндотоксина в кровотоке пациента с (эндотоксическим) септическим шоком. Согласно результатам исследования MEDIC [3], высокий уровень активности эндотоксина соответствует результатам теста на активность эндотоксина (АЭ) $>0,6$. По данным исследования, выполненного Monti и соавт. [4], у больных с септическим шоком АЭ превышала 0,9. Если рассматривать эндотоксин *Escherichia coli*, то концентрация соответствующего ЛПС в крови достигает 7,0 нг/мл или 70 ЭЕ/мл (ЭЕ - единицы эндотоксина). Следовательно, для мужчины с массой тела 70 кг при вышеупомянутом состоянии эндотоксиновая нагрузка составит: 70×5000 (объем циркулирующей крови = 5 л) = 350000 ЭЕ.

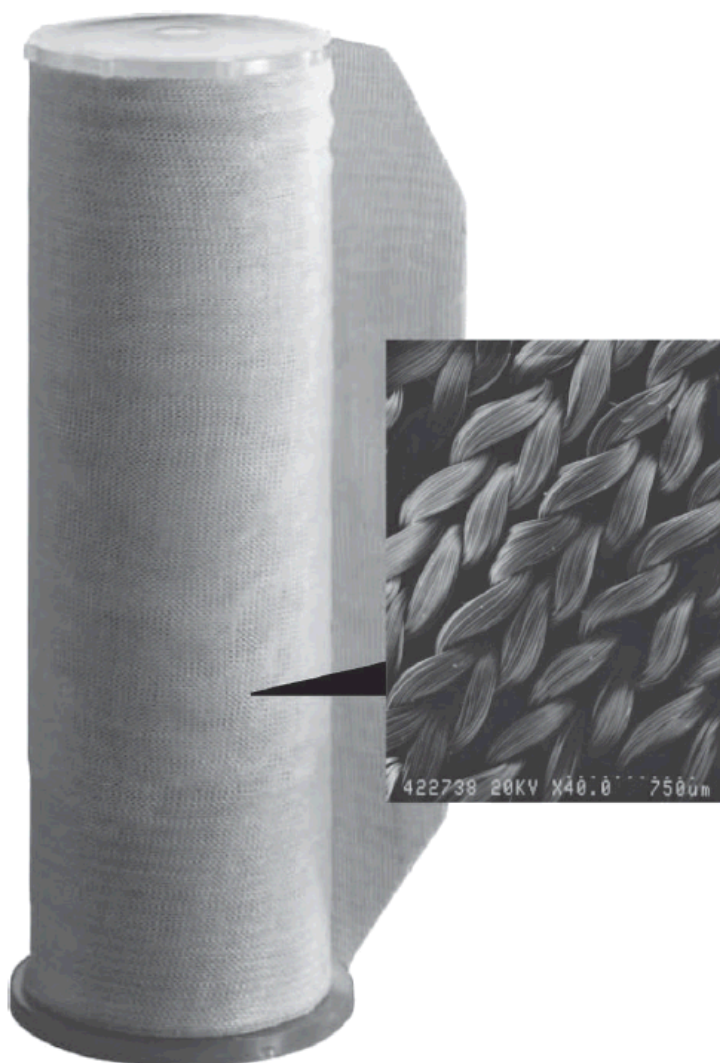


Рис. 3. Адсорбирующая часть картриджа Тогаумухин.

Второе понятие - "адсорбционная способность устройства" (АСУ). АСУ определяет количество ЭЕ, которые может удалить из кровотока один картридж РМХ. АСУ РМХ официально не заявлена. Тем не менее, этот показатель можно достаточно точно рассчитать на основании ранее опубликованных результатов некоторых *in vitro* исследований. Кроме того, для расчета АСУ можно использовать опыт, приобретенный в последние годы при проведении *in vivo* исследований с контролем активности эндотоксина. В таблице 1 представлены величины АСУ картриджа РМХ (тип РМХ-20R), рассчитанные в трех разных ситуациях: (1) *in vitro* с применением растворов гемоглобина; (2) *in vitro* с применением бычьей крови (2 литра рециркулирующей крови); и (3) для предполагаемого больного сепсисом, вызванным *E. coli*, с исходным значением АЭ - 0,85 (что соответствует концентрации ЛПС *E. coli* - 43 ЭЕ/мл). После гемоперфузии с применением РМХ, АЭ у предполагаемого пациента должна снизиться до 0,6 (что соответствует концентрации ЛПС *E. coli* - 15 ЭЕ/мл). Такой пациент абсолютно реалистичен, а вышеприведенные сведения согласуются с данными, которые опубликованы различными исследователями (таблица 1) [4, 5].

Таблица 1. Способность устройства адсорбировать эндотоксин *in vitro* и *in vivo*.

Адсорбция ЛПС устройством Toxamuxin	Условия эксперимента	Первоначальная концентрация эндотоксина	Адсорбционная способность устройства
<i>In vitro</i> данные (Tani et al. [9], 1992); статическая модель; раствор гемоглобина - волокна РМХ	раствор гемоглобина +2 г волокон РМХ; время инкубации - 1 час	686 ЭЕ/мл	1404480 ЭЕ
<i>In vitro</i> данные (Sakai et al. [10], 1993); перфузионная модель; бычья кровь	<i>in vitro</i> перфузия - бычья кровь: 2 литра; время перфузии - 2 часа	400 ЭЕ/мл	640000 ЭЕ
Больные с септическим шоком, вызванным <i>E. coli</i> ; мониторинг АЭ	предполагаемый больной с инфекцией, вызванной <i>E. coli</i> ; АЭ = 0,9 исходно; АЭ = 0,6 после процедуры	70 ЭЕ/мл	275000 ЭЕ

Не принимая во внимание результаты первого *in vitro* теста, который очень отдален от клинических условий, одно устройство РМХ в рамках стандартного сеанса способно нейтрализовать приблизительно 300000 ЭЕ. Этот показатель вызывает дополнительный интерес тем, что он соответствует уровню эндотоксиновой нагрузки.

Принцип работы устройства

РМХ спроектирован таким образом, чтобы в процессе гемоперфузии через картридж проходила цельная кровь. Большая площадь соприкосновения достигается использованием сорбционного материала с малым диаметром волокон. Кроме того, волокна характеризуются пористой поверхностью, которая формируется в результате химической реакции, направленной на включение функциональных групп. Все это способствует увеличению поверхности адсорбирующего материала. С другой стороны, потери давления на отрезке между входным и выходным отверстиями картриджа остаются низкими за счет использования волокнистого (тканого) материала в качестве адсорбента, а также благодаря контролируемому гомогенному потоку, который обеспечивает стабильное воздействие на цельную кровь. АСУ РМХ была изучена *in vitro* путем сравнения циркуляции 1,5 литра раствора телячьей сыворотки, содержащего очищенный ЛПС *E. coli* в концентрации 10 нг/мл, через картридж РМХ при скорости потока 100 мл/мин, и через волоконный картридж без ПМ-В. Спустя 2 часа циркуляции была выполнена оценка изменений концентрации ЛПС в двух исследуемых растворах. Уровень ЛПС снижался только при использовании картриджа РМХ.

Недавно Nishibori и соавт. [6] изучили клеточный компонент колонки РМХ после выполнения процедуры гемоперфузии у больных сепсисом. Доподлинно известно, что при септическом шоке происходит активация различных популяций лейкоцитов. При этом изменяются их адгезивные свойства. В связи с этим, ученые высказали предположение, что в процессе гемоперфузии некоторые популяции лейкоцитов могут адсорбироваться в колонке РМХ и элиминироваться из системного кровотока. Анализ, выполненный с помощью иммуноцитохимической техники и электронной микроскопии, показал, что РМХ избирательно связывает моноциты периферической крови больных сепсисом.

Избирательное удаление моноцитов из кровотока больных сепсисом может оказывать положительное влияние за счет уменьшения взаимодействия между моноцитами и

функционально связанными с ними клетками, такими как клетки эндотелия. Механизм адсорбции моноцитов на поверхности сорбента с иммобилизированным ПМ-В до сих пор не установлен. Основная гипотеза состоит в том, что этот эффект обусловлен физическими свойствами волокон с иммобилизированным ПМ-В, или взаимодействием, связанным с удалением эндотоксина. Вторая гипотеза (все еще не доказанная) основана на предположении, что участки связывания эндотоксина и ПМ-В отличаются от таковых эндотоксина и моноцитов. Таким образом, возможно, что РМХ удаляет моноциты в составе комплекса ЛПС-моноцит. В любом случае, чрезвычайно важно удалить эндотоксин как пусковой фактор воспалительного ответа. Тот факт, что РМХ способен элиминировать некоторые иммунокомпетентные клетки, очень интересен с точки зрения потенциального иммуномодулирующего эффекта, который может использоваться при лечении сепсиса и септического шока.

Преимущества применения адсорбционного метода для удаления эндотоксина

Одним из способов "очистки" крови является удаление медиаторов воспаления, вовлеченных в патогенез и (или) патофизиологию тяжелого сепсиса и септического шока. Существует множество медиаторов, которые играют важную роль в системном воспалительном ответе. Примерами могут служить эндотоксин и экзотоксин из экзогенных источников, или такие эндогенные медиаторы, как цитокины, хемокины и различные формы липидов. Молекулярная масса этих соединений варьирует в широком диапазоне. Этот показатель имеет значение при выборе полуволоконного фильтра с границей фильтрации, варьирующей от 10 до 20 кДа. Таким образом, для селективного удаления того или иного медиатора необходимо создать соответствующие условия. Физико-химический аспект переноса вещества предполагает участие таких механизмов, как диффузия, фильтрация и адсорбция. Заместительная почечная терапия, например, гемодиализ, гемофильтрация и гемодиофильтрация, основана на принципах диффузии и фильтрации, тогда как процесс адсорбции не зависит от границы фильтрации полуволоконного фильтра. Следовательно, при использовании метода адсорбции возможно воздействие на молекулярном уровне.

Молекула эндотоксина состоит из полисахарида, который включает О-специфическую боковую цепь, внутренней и наружной части кор-олигосахарида, а также липида А, выполняющего роль активного центра ЛПС. Эндотоксемия может развиваться не только при граммотрицательном, но и при грамположительном сепсисе (в результате транслокации бактерий или эндотоксина из просвета кишечника). Молекулярные свойства эндотоксина в крови или плазме достоверно не изучены. Тем не менее, известно, что в крови эндотоксин не всегда представлен исключительно молекулой ЛПС. Он может существовать в различных формах (как часть клеточной оболочки или везикула) в соединении с фосфолипидами бактериальной клетки. В кровотоке эндотоксин способен связываться с разнообразными компонентами плазмы. Кроме того, ЛПС может формировать мицеллы. Таким образом, молекулярная масса эндотоксина настолько велика, что его трудно удалить при помощи гемодиализа и гемофильтрации. Одним из способов удаления эндотоксина из крови является заменное переливание плазмы. Тем не менее, для этого метода необходимо большое количество дорогостоящей свежезамороженной плазмы, и, кроме того, переливание плазмы сопряжено с риском инфекционных осложнений.

Выводы

Эндотоксин длительное время рассматривается в качестве объекта терапии при сепсисе. Тем не менее, такие реагенты, как антиэндотоксиновые моноклональные антитела и бактерицидный белок, повышающий проницаемость (англ. *bactericidal/permeability-increasing protein, BPI*), которые способны нейтрализовать эндотоксин, не улучшают исход сепсиса. В связи с этим возник вопрос, является ли эндотоксин истинным объектом

для разработки новых средств терапии. Недавно были опубликованы положительные результаты применения E5564 [7]. Однако, использование эмульсии фосфолипидов не снижает общий уровень смертности за 28-дневный период, а также не уменьшает распространенность впервые выявленной органной недостаточности у больных с подозреваемым или подтвержденным тяжелым грамотрицательным сепсисом [8]. Таким образом, использование эндотоксина в качестве объекта лечебного воздействия характеризуется переменным успехом и противоречивостью.

Причина того, почему некоторые антиэндотоксиновые реагенты недостаточно эффективны, не всегда понятна. Это может быть связано с низкой нейтрализующей активностью самого реагента. В прошлом, основная задача состояла в том, чтобы определить наиболее эффективную стратегию антиэндотоксиновой терапии. При этом рассматривались два существенных направления: нейтрализация эндотоксина при помощи специальных реагентов внутри организма или экстракорпоральное удаление эндотоксина из крови. Спустя 15 лет клинического применения можно сказать, что экстракорпоральное удаление эндотоксина методом гемоперфузии с полимиксином В является рациональным способом лечения тяжелого сепсиса и септического шока. Кроме того, использование адсорбентов для удаления эндотоксина целесообразно, поскольку эндотоксин существует в крови в форме крупных молекул или агрегатов.

Чрезвычайно большое значение имеет разработка адсорбента, обладающего высоким сродством к эндотоксину, циркулирующему в крови. Разработка сорбента возможна благодаря использованию различных лигандов. ПМ-В - это наиболее мощное соединение, которое обладает высоким уровнем сродства к эндотоксину и может использоваться в составе специфического сорбента, способного связывать циркулирующие ЛПС, даже в комплексе с поликомпонентными структурами. С 1994 года РМХ успешно используется в Японии для лечения тяжелого сепсиса и септического шока, с 2002 года картридж РМХ применяется в Италии, и с каждым годом его использование становится все более распространенным.

Еще один важный нюанс связан с диагностикой. Правильность определения уровня эндотоксина в крови в рамках предшествующих исследований антиэндотоксиновой терапии вызывает сомнения. Метод определения содержания эндотоксина в крови по-прежнему является предметом для дискуссии. Тем не менее, в настоящее время доступен современный тест на активность эндотоксина, утвержденный FDA. Этот метод может помочь в проведении целенаправленной антиэндотоксиновой терапии путем выбора соответствующей популяции больных. РМХ и тест на активность эндотоксина составляют один из перспективных подходов к лечению тяжелого сепсиса и септического шока.

Ссылки

1. Bhor VM, Thomas CJ, Surolia N, Surolia A: Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol Biosyst* 2005;1: 213-222.
2. Shoji H: Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther Apher Dial* 2003;7:108-114.
3. Marshall JC, Foster D, Vincent JL, Cook DJ, Dellinger RP, Opal S, Abraham E, Brett S, Smith T, Mehta S, Derzko A, Romaschin A: Diagnostics and prognostic implications of endotoxemia in critically illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004;190:527-534.
4. Monti G, Terzi V, Mininni M, Colombo S, Vesconi S, Casella G: Polymyxin B hemoperfusion in high endotoxin activity level septic shock patients. *Critical Care* 2008;12(Suppl 2):P458, DOI: 10.1186/cc6679.
5. Novelli G, Rossi M, Poli L, Ferretti G, Ruberto F, Spoletini G, Levi Sandri GB, Mennini G, Morabito V, Berloco PB (Roma): Valutazione precoce dell'endotossinemia in pazienti affetti da sepsi nel periodo post operatorio mediante lo spectral's EAA (TM) endotoxin activity assay XXXIII Congresso nazionale SITO, Milano 13-15 Dicembre 2009.

6. Nishibori M, Takahashi HK, Katayama H, Mori S, Saito S, Iwagaki H, Tanaka N, Morita K, Ohtsuka A: Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin B-immobilized filter column. *Acta Med Okayama* 2009;63:65-69.
7. Tidswell M, Tillis W, LaRosa SP, Lynn M, Wittek AE, Kao R, Wheeler J, Gogate J, Opal SM, the Eritoran Sepsis Study Group: Phase 2 trial of Eritoran tetrasodium (E5564), a Toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2010;38:72-83.
8. Dellinger RP, Tomakyo JF, Angus DC, Opal S, Cupo MA, McDermont S, Ducher A, Calandra T, Cohen J, the Lipid Infusion and Patient Outcomes in Sepsis (LIPOS) Investigators: Efficacy and safety of a phos-pholipid emulsion (GR270773) in Gram-negative severe sepsis: results of a phase II multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-finding clinical trial. *Crit Care Med* 2009;37:2929-2938.
9. Tani T, Chang TMS, Kodama M, Tsuchiya M: Endotoxin removed from hemoglobin solution using polymyxin B immobilized fiber followed by a new turbidometric endotoxin assay. *Biomater Art Cells & Immob Biotech* 1992;20:457-462.
10. Sakay Y, Shoji H, Kobayashi T, Terada R, Sugaya H, Murakami M, Moriyama K, Minaga M, Kunimoto T, Takeyama T: New extracorporeal blood purification devices for critical care medicine under development. *Therapeutic Plasmapheresis* 1993;12:837-842.

Тору Тэни, доктор медицины, доктор наук
Отделение хирургии, Университет медицинских наук префектуры Сига
Цукива-чо, Сэта
г. Оцу, префектура Сига, 520-2121 (Япония)
Телефон: +81 077 548 2237. Факс: +81 077 548 2240.
Электронная почта: tan@belle.shiga-med.ac.jp

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 45-54

Механизм экстракорпорального удаления эндотоксина с применением полимиксина В: молекулярное взаимодействие

С. Весентини · М. Сончини · Д. Б. Фиоре · А. Ределли

Отдел биотехнологий, Politecnico di Milano, г. Милан, Италия

Реферат

Наружный слой клеточной оболочки грамотрицательных бактерий содержит большое количество липополисахаридов, известных как эндотоксины. Эти липополисахариды играют ведущую роль в патогенезе септического шока. Известно, что молекула полимиксина В (ПМ-В) наделена как антибактериальными, так и антиэндотоксиновыми свойствами. ПМ-В способен воздействовать на наружный слой клеточной оболочки бактерий и связываться с липополисахаридами. Таким образом он нейтрализует токсические эффекты липополисахаридов. Для удаления эндотоксинов из системного кровотока используется методика экстракорпоральной гемоперфузии, основанная на применении картриджей, которые содержат волокна с иммобилизованным ПМ-В (Toxaμyxin PMX-F; Торэй Индастриз, г. Токио, Япония). В рамках данного исследования мы сосредоточили свои усилия на исследовании молекулярного взаимодействия, связанного с формированием комплекса ПМ-В-эндотоксин. В частности, для оценки энергии взаимодействия и силы взаимодействия двух молекул использовалась молекулярная механика. В ходе исследования оценивалось взаимодействие ПМ-В с пятью различными по своей структуре участками молекулы липополисахарида. Энергия взаимодействия была рассчитана для каждого молекулярного соединения при различном межмолекулярном расстоянии, а прочность связи оценивалась на основании сведений об энергии взаимодействия. Результаты исследования свидетельствуют, что ближнее взаимодействие между ПМ-В и эндотоксинами опосредовано преимущественно гидрофобными силами, тогда как при дальнем взаимодействии комплекс формируется исключительно благодаря ионной связи. Методом молекулярной механики было установлено, что максимальная сила связи для комплекса ПМ-В-эндотоксин варьирует в диапазоне от 1,39 до 3,79 нН. Понимание механизма взаимодействия в пределах одного молекулярного комплекса имеет значение как для определения молекулярных свойств такого взаимодействия, так и для выполнения более масштабного анализа, когда использование наномасштаба практически нецелесообразно, но применимо для объяснения некоторых молекулярных изменений.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Сепсис - это генерализованная инфекция, которая характеризуется присутствием бактерий в системном кровотоке (бактериемия). В последнее время, параллельно клиническим и научным разработкам, связанным с антибиотикотерапией, активно изучается антиэндотоксиновая терапия. При этом ведется поиск новых способов непосредственного

воздействия на эндотоксин, который является основным компонентом наружной оболочки клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Особый интерес вызывает стратегия антиэндотоксиновой терапии, основанная на применении экстракорпорального устройства Toгамухин РМХ-В (Торэй Индастриз, г. Токио, Япония), в структуру которого входит полимиксин В (ПМ-В), фиксированный на адсорбенте. Это устройство способно селективно удалять эндотоксин из циркулирующей крови. ПМ-В представляет собой катионный амфифильный циклический декапептид, который может повреждать клеточную стенку бактерий (антибактериальный эффект), а также связывать бактериальные эндотоксины (антиэндотоксиновый эффект) [1]. Известно, что местное и системное введение ПМ-В в организм сопровождается нефротоксическим и нейротоксическим действием, а экстракорпоральное применение позволяет избежать неблагоприятных эффектов, связанных с попаданием молекул ПМ-В в кровоток. В составе устройства Toгамухин молекулы ПМ-В ковалентно связаны с поверхностью волокон (тканый материал, состоящий из полипропилена и α -хлорацетамид-метилполистирола).

Высокоамфифильные свойства ПМ-В обусловлены наличием гидрофобных групп, перемежающихся с положительно заряженными гидрофильными остатками диаминоасляной кислоты (ДАМК) [2]. Такое строение позволяет молекулам ПМ-В связываться со специфическим участком липополисахарида (ЛПС) - липидом А, а также нейтрализовать токсические эффекты ЛПС путем воздействия на пространственную ориентацию цепей жирных кислот.

ЛПС состоит из гидрофильного полисахаридного домена, связанного с гидрофобным липидным "хвостом" (липид А). Именно эта часть ЛПС залегает в наружном слое клеточной стенки бактерий (рис. 1). Молекула липида А представлена каркасом из дифосфорилированного дисахарида D-глюкозамина, который несет на себе до семи асимметрично расположенных цепей жирных кислот. Полисахаридный фрагмент состоит из последовательности олигосахаридных единиц (О-антиген), а также наружной и внутренней части кор-олигосахарида. О-антиген определяет принадлежность к тому или иному серотипу, и полярные свойства общей структуры ЛПС, тогда как липид А ответственен за большинство патологических эффектов ЛПС. У разных видов бактерий структура О-антигена существенно отличается. В то же время, наружная и внутренняя части кор-олигосахарида характеризуются слабой межвидовой вариабельностью, а липид А является наименее изменчивой частью ЛПС [3-5].

Выраженность эндотоксического эффекта регулируется специфическим равновесием между гидрофильными (каркас из дифосфорилированного дисахарида, ионизированные фосфатные группы) и гидрофобными (количество, длина и положение цепей жирных кислот) участками молекулы ЛПС. Это равновесие определяет молекулярные механизмы, лежащие в основе неблагоприятных биохимических эффектов, индуцированных связыванием ЛПС со специфическими рецепторами иммунной системы в здоровых клетках *in vivo*. Переход в активную форму обеспечивается димером 2-кето-3-дезоксиманнооктоновой кислоты (Kdo) внутренней части кор-олигосахарида, который непосредственно связан с сахаридным каркасом липида А [6, 7]. В структуре комплекса Kdo-Kdo-липид А, который носит название ReLPS (рис. 1а), отрицательные заряды оказывают регуляторное влияние на ионизацию дисахаридного каркаса, от которой зависит положение цепей жирных кислот. Амфифильный характер ПМ-В обеспечивает селективное связывание с липидом А ЛПС. В результате устраняется неблагоприятное влияние эндотоксина на клетку.

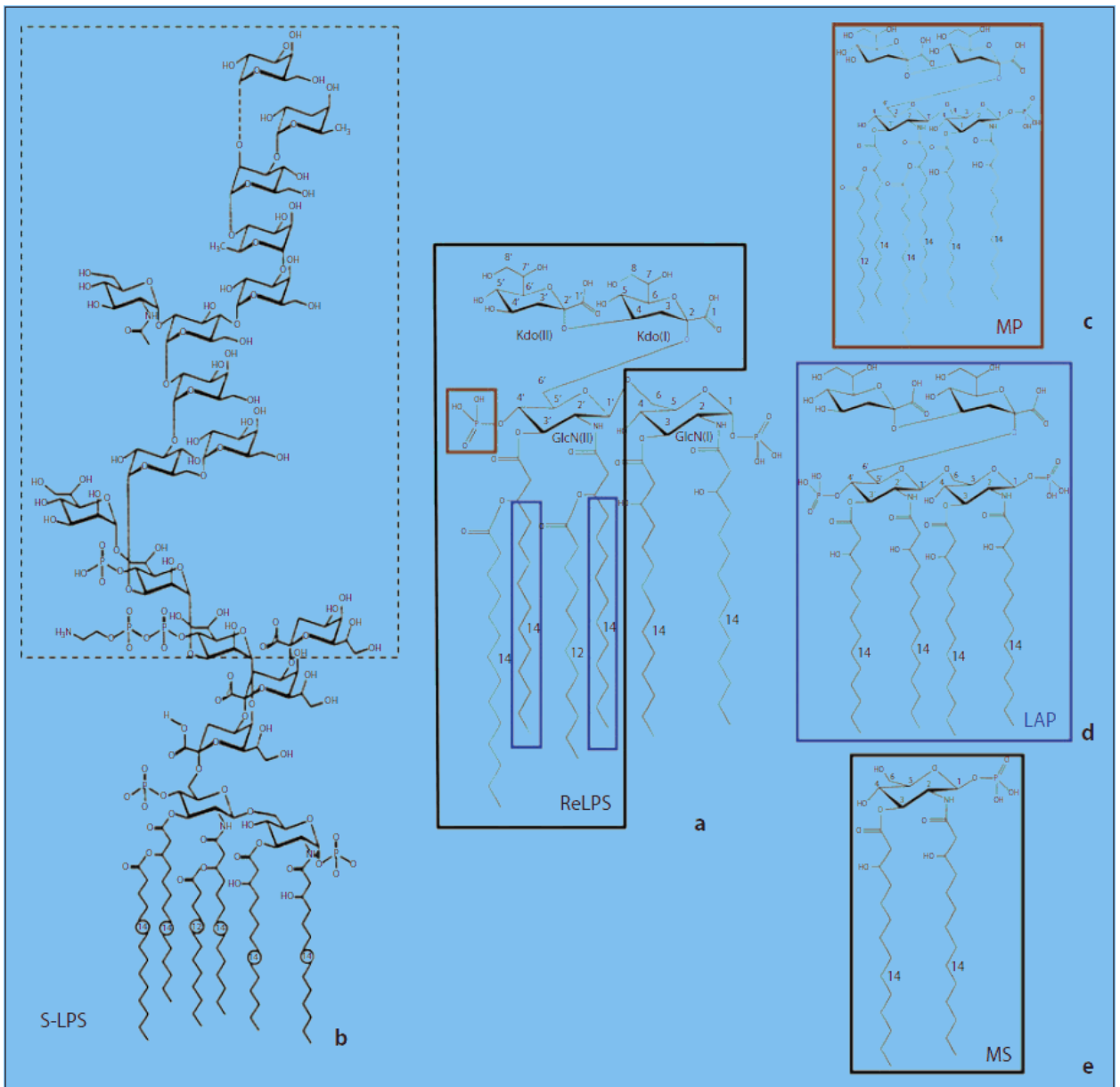


Рис. 1. Молекулярная структура ЛПС. **а)** Минимальная структура, необходимая для реализации эндотоксического эффекта ЛПС (ReLPS), состоит из липида А (дисахарид D-глюкозамина [GlcN(I) и GlcN(II)] с двумя фосфатными группами в положениях 1 и 4', и шесть цепей жирных кислот, соединенных с сахаридным каркасом) и внутренней части кор-олигосахарида (α-(2, 4)-димер 2-кето-3-дезоксимагнооктоновой кислоты [Kdo-Kdo группа]). **б)** Полная структура молекулы ЛПС (S-LPS): к внутренней части кор-олигосахарида и липиду А ReLPS присоединен О-антиген и наружная часть кор-олигосахарида (отмечена пунктиром). **в)** Структура ReLPS монофосфата (MP): из структуры ReLPS в положении 4 удалена фосфатная группа (удаленная фосфатная группа отмечена красным цветом на рисунке **а**). **д)** Предшественник липида А (LAP): ReLPS без дополнительных боковых цепей жирных кислот (удаленные цепи жирных кислот отмечены синим цветом на рисунке **а**). **е)** Моносахарид ReLPS (MS), лишенный одного из сахаров сахаридного каркаса [GlcN (II)], соответствующих цепей жирных кислот и группы Kdo-Kdo (удаленные структуры отмечены черным контуром на рисунке **а**). Числа, представленные рядом с цепями жирных кислот, обозначают количество атомов углерода.

Этот документ кратко описывает крупное исследование [8], задача которого состояла в изучении сил взаимодействия ЛПС и ПМ-В на молекулярном уровне, а также в

прояснении механизмов формирования комплекса ЛПС-ПМ-В. В ходе исследования были созданы разнообразные молекулярные модели ЛПС. Энергия взаимодействия ЛПС и ПМ-В оценивалась при различном межмолекулярном расстоянии. Для оценки энергии взаимодействия использовалась молекулярная механика.

Методы

В ходе исследования была разработана и изучена молекулярная модель ПМ-В, а также пяти различных вариантов ЛПС. Молекулярный анализ выполнялся при помощи коммерческой версии программы Hyperchem[®] 6.01 (Гиперкьюб, Канада), специально предназначенной для работы в области вычислительной химии. Силовое поле (Amber 3) было специфичным для биологических молекул. Поддержанием диэлектрической постоянной на уровне 78 достигалась симуляция предполагаемой водной среды.

Модель ПМ-В

Активная структура ПМ-В была моделирована на основании атомных координат, предоставленных Pristovsek и Kidric [2]. В активном состоянии молекула ПМ-В в обычной конфигурации связана с липидом А эндотоксина. Для определения атомных зарядов модели ПМ-В использовался эмпирический метод Gasteiger и Marsili [9]. Для аминогруппы (NH₂) каждого остатка ДАМК был назначен суммарный заряд +0,5e (e обозначает заряд электрона), который равномерно распределялся между двумя атомами водорода. Молекулярная структура не оптимизировалась в предполагаемой водной среде для сохранения активной структуры связанного ПМ-В [2]. Таким образом поддерживалась высокоамфифильная конфигурация модели ПМ-В, когда гидрофобные радикалы располагались на одной стороне, а гидрофильные радикалы - на противоположной стороне. Общая длина молекулы достигала 2,6 нм.

Модели ЛПС

Дизайн исследования предполагал оценку взаимодействия ПМ-В с пятью различными вариантами ЛПС (рис. 1). Полная структура молекулы ЛПС (S-LPS) показана на рисунке 1b, а минимальная структура, необходимая для реализации эндотоксинового эффекта ЛПС (которая представляет собой комплекс Kdo-Kdo-липид А, ReLPS) - на рисунке 1a. Модели ReLPS и S-LPS основаны на атомарных моделях, предложенных Kastowsky и соавт. [6]. Кроме того, для оценки эффектов ионного и гидрофобного взаимодействия, определяющих формирование молекулярного комплекса, путем удаления некоторых функциональных групп из структуры ReLPS были получены еще три варианта ЛПС. В частности, предшественник монофосфата (MP) использовался для оценки эффекта уменьшения ионного взаимодействия за счет удаления фосфатной группы в положении 4 (рис. 1c); предшественник липида А (LAP) был получен из ReLPS с целью оценки уменьшения гидрофобного взаимодействия за счет удаления дополнительных цепей жирных кислот (рис. 1d); а моносахарид (MS) был моделирован с целью оценки эффекта снижения как ионного, так и гидрофобного взаимодействия за счет отсутствия одного из сахаров сахаридного каркаса, соответствующей фосфатной группы и цепей жирных кислот (рис. 1e).

Для определения атомных зарядов модели использовался метод Gasteiger и Marsili [9], основанный на частичной компенсации схемы орбитальной электроотрицательности. Уровень ионизации молекулярной модели ReLPS был установлен в соответствии с методом, описанным Din и соавт. [10]. Отрицательные заряды располагаются на двух фосфатных группах липида А (-1e для каждой фосфатной группы), а также на двух карбоксилатных группах Kdo (-0,5e для двух атомов кислорода каждой карбоксилатной группы). Уровень ионизации S-LPS был установлен в соответствии с атомными зарядами, использованными для фрагмента Kdo-Kdo-липид А модели ReLPS. Третий остаток Kdo устанавливался аналогично двум другим группам Kdo.

Энергетическая оптимизация выполнялась как для модели S-LPS, так и для модели ReLPS с использованием кратчайшего спуска и алгоритма минимизации Полака-Райбера. В результате была получена первоначальная структура, обладающая минимальной потенциальной энергией молекулярной системы. Комбинация двух алгоритмов минимизации позволяет эффективно провести процедуру оптимизации, что снижает стоимость вычислений.

Модели MP, LAP и MS были разработаны на основе оптимизированной модели ReLPS. При этом поддерживался должный уровень ионизации. Модели предшественников были оптимизированы с помощью той же схемы минимизации, которая использовалась для оптимизации крупных комплексов.

Расчет силы взаимодействия ЛПС и ПМ-В

Пять эндотоксиновых моделей (S-LPS, ReLPS, MP, LAP, MS) были объединены с молекулярной моделью ПМ-В. В результате были получены пять различных молекулярных комплексов (C_{S-LPS} , C_{ReLPS} , C_{MP} , C_{LAP} , C_{MS}). Каждый молекулярный комплекс ЛПС-ПМ-В был энергетически минимизирован для обеспечения стабильности соединения между ПМ-В и ЛПС.

Затем оптимизированные комплексы использовались в качестве первоначальной конфигурации для последующего расчета силы взаимодействия при различном межмолекулярном расстоянии. Межмолекулярное расстояние зависело от смещения молекулы ЛПС относительно положения ПМ-В. Энергетическая оптимизация выполнялась в два этапа с целью достижения минимальной энергетической конфигурации. В частности, на первом этапе молекула ПМ-В фиксирована, а ЛПС полностью подвижен, тогда как на втором этапе подвижны обе молекулы. Одиночная реакционная координата (r_{PL}) была задана воздействием на центр массы ЛПС (CM_L) при поддержании фиксированного положения центра массы ПМ-В (CM_P). ЛПС передвигался по линии, соединяющей CM_L и CM_P , с шагом 0,05 нм. Показатель r_{PL} отображает межмолекулярное расстояние и рассчитывается следующим образом:

$$r_{PL} = \sqrt{(x_{CM_P} - x_{CM_L})^2 + (y_{CM_P} - y_{CM_L})^2 + (z_{CM_P} - z_{CM_L})^2} \quad (1)$$

$$x_{CM} = \frac{\sum_k m_k x_k}{\sum_k m_k}; \quad y_{CM} = \frac{\sum_k m_k y_k}{\sum_k m_k}; \quad z_{CM} = \frac{\sum_k m_k z_k}{\sum_k m_k} \quad (2),$$

где x_k , y_k и z_k - атомарные пространственные координаты, а m_k - атомная масса каждого k атома.

Для каждого межмолекулярного расстояния была рассчитана энергия взаимодействия (E'_{PL}). E'_{PL} рассчитывалась путем вычитания потенциальной энергии ПМ-В (E_P) и ЛПС (E_L) из потенциальной энергии целой молекулярной системы (E_{TOT}):

$$E'_{PL} = E_{TOT} - E_P - E_L \quad (3)$$

Энергия взаимодействия (E_{PL}) между двумя молекулами в зависимости от межмолекулярной дистанции (r_{PL}) была рассчитана путем интерполирования показателя E'_{PL} в сравнении с r_{PL} посредством потенциала Леннарда-Джонса (Л-Д):

$$E_{PL} = 4\hat{a} \left[\left(\frac{\hat{a}}{r_{PL}} \right)^{12} - \left(\frac{\hat{a}}{r_{PL}} \right)^6 \right] \quad (4),$$

где ε и σ - параметры Л-Д, установленные при помощи алгоритма максимального соответствия. В частности, параметр ε отображает равновесную энергию ($\varepsilon = E_{PLmin}$), а σ - равновесную длину ($\sigma 2^{1/6} = r_{PLmin}$).

Сила связи рассчитывается как первая производная E_{PL} относительно реакционной координаты r_{PL} :

$$F(r_{PL}) = -\frac{dE_{PL}}{dr_{PL}} = 24\dot{a} \left[2 \frac{\dot{o}^{12}}{r_{PL}^{13}} - \frac{\dot{o}^6}{r_{PL}^7} \right] \quad (5)$$

Результаты и обсуждение

После завершения процедуры расчета показателей взаимодействия, для всех комплексов была выполнена оценка энергии взаимодействия. Задача состояла в том, чтобы произвести количественную оценку энергии взаимодействия с помощью кривой, отражающей потенциал Л-Д. Эта кривая характеризует каждый комплекс ПМ-В-ЛПС. Сила связи рассчитывалась на основании интерполированных кривых потенциала Л-Д в зависимости от межмолекулярного расстояния.

Энергия взаимодействия в пределах комплекса ЛПС-ПМ-В определяется преимущественно гидрофобными эффектами, которые в ван-дер-ваальсовом выражении обеспечивают 96% общей энергии взаимодействия. Единственным исключением является комплекс C_{MS} , для которого общая энергия взаимодействия представлена ван-дер-ваальсовыми связями лишь на 44%, что связано со значительным сокращением количества цепей жирных кислот в структуре этого предшественника ЛПС.

Диапазоны максимальных показателей силы взаимодействия представлены в таблице 1 (первая колонка) для каждого комплекса. Большие комплексы характеризуются более выраженной силой взаимодействия по сравнению с комплексами меньшего размера (таблица 1, колонка 1). Такая разница определенно связана с меньшим числом функциональных групп в структуре малых предшественников ЛПС. Разница в силе взаимодействия особенно заметна для C_{LAP} и C_{MS} , но незначительна для C_{MP} . Зарегистрированные особенности вероятнее всего определяются количеством цепей жирных кислот в структуре моделей ЛПС [11]. В действительности, в моделях S-LPS, ReLPS и MP участок, соответствующий липиду А, включает 6 цепей жирных кислот, тогда как в структуру LAP и MS входят, соответственно, 4 и 2 цепи жирных кислот. Согласно данным, предоставленным Din и соавт. [10], максимальная сила взаимодействия характерна для тех комплексов, которые включают полную структуру липида А (C_{S-LPS} и C_{ReLPS}). Для комплексов C_{S-LPS} и C_{ReLPS} максимальные показатели силы связи варьировали от 1,94 до 3,79 нН. Меньшая сила связи (диапазон от 1,39 до 1,85 нН) была зарегистрирована при анализе остальных трех комплексов (C_{MP} , C_{LAP} и C_{MS}).

Таблица 1. Характеристика комплексов ЛПС-ПМ-В: сила связи и параметры кривой Л-Д.

Комплекс ЛПС-ПМ-В	F_{max} (нН)	ε (кДж/моль)	σ (нм)
C_{S-LPS}	2,69±1,10	274,0±33,0	0,63±0,13
C_{ReLPS}	1,13±1,04	196,0±35,0	0,58±0,16
C_{MP}	1,28±0,57	222,5±10,7	0,41±0,14
C_{LAP}	0,98±0,41	156,3±21,8	0,72±0,21
C_{MS}	0,96±0,84	132,9±31,7	0,46±0,10

F_{max} - максимальная сила связи; ε - равновесная энергия; σ - равновесная длина.

Механизмы связывания структур ПМ-В и ЛПС отражает последовательность рисунков, на которых показан комплекс ReLPS-ПМ-В при различной дистанции взаимодействия (рис.

2). Для каждой конфигурации представлены показатели межмолекулярного расстояния и максимальной силы взаимодействия, рассчитанные при помощи параметров Л-Д, которые были получены путем аппроксимации энергетической кривой Л-Д ($\sigma = 0,74$ нм и $\varepsilon = 231$ кДж/моль для C_{ReLPS}). На рисунке 2 показаны конфигурации с малым межмолекулярным расстоянием (А, В и С) и конфигурации с большим межмолекулярным расстоянием (D-H), отражающие различную структуру комплекса при возрастающей межмолекулярной дистанции. При ближнем взаимодействии сила связи составляет приблизительно 2 нН. В таком случае механизм связывания обусловлен как ионными, так и гидрофобными эффектами, а стабилизация комплекса обеспечивается цепями жирных кислот. При дальнем взаимодействии сила связи снижается в десятки раз по мере увеличения расстояния между молекулами. В этой ситуации преобладают ионные силы.

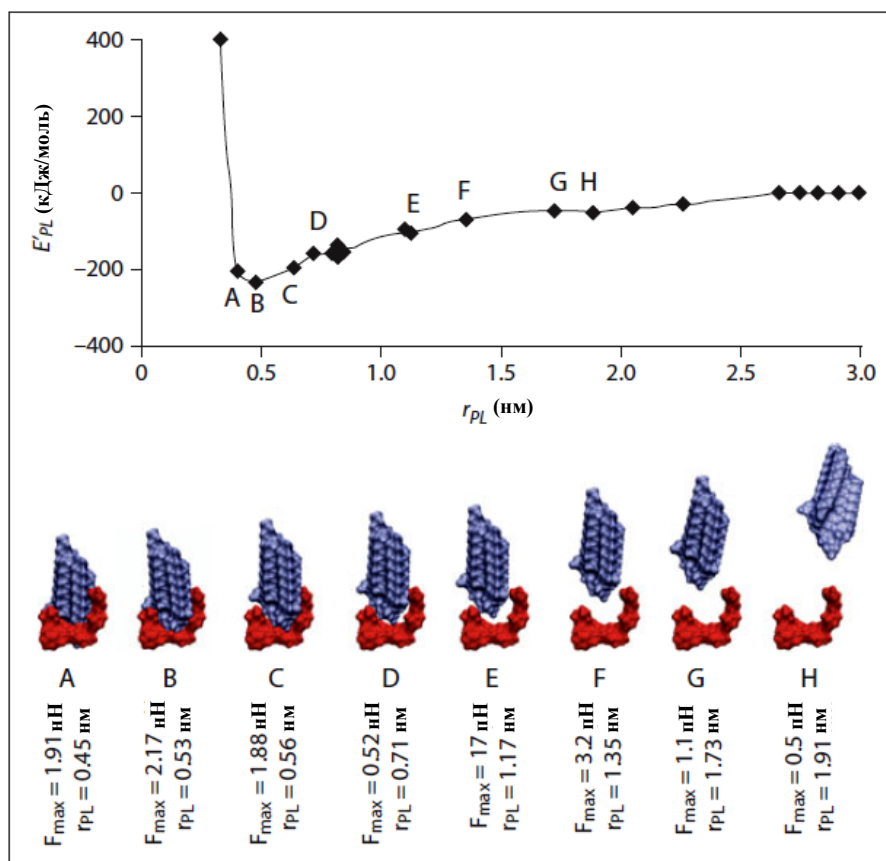


Рис. 2. Энергетическая кривая Л-Д, полученная для молекулярного комплекса C_{ReLPS} (верхний график), и последовательность конфигураций этого молекулярного комплекса при различном межмолекулярном расстоянии (нижний рисунок). Конфигурации с малым межмолекулярным расстоянием (А, В и С) характеризуются небольшой дистанцией между молекулами и высокой прочностью связи (на этом этапе формирования комплекса регистрируется как ионное, так и гидрофобное взаимодействие). Конфигурации с большим межмолекулярным расстоянием (D-H) отличаются меньшей прочностью связи (в формировании комплекса преобладают гидрофобные эффекты).

Результаты исследования силы взаимодействия в рамках комплекса ЛПС-ПМ-В, полученные методом молекулярной механики, несколько превышают (хотя и в пределах одного порядка) показатели, зарегистрированные методом атомно-силовой микроскопии для различных биологических комплексов: (1) комплекс антиген-антитело (0,1-0,05 нН; [12]), (2) белковый комплекс, участвующий в клеточной адгезии (0,4 нН; [13]); и (3) комплекс, образованный рецепторным белком *Escherichia coli* и соответствующим белковым субстратом (0,4-0,9 нН; [14]). Сравнение результатов оценки комплексов ЛПС-

ПМ-В, выполненной в ходе данного исследования, с опубликованными сведениями о других распространенных биологических комплексах, наводит на мысль о том, что крупные (S-LPS, ReLPS) и мелкие молекулы-предшественники (MP, LAP и MS) способны формировать высокостабильные комплексы с ПМ-В, а это, в свою очередь, подтверждает антиэндотоксические свойства молекул последнего.

Выводы

Эффективность антиэндотоксиновой терапии основана на стабильном и специфичном взаимодействии эндотоксина с молекулами ПМ-В на молекулярном уровне. Для определения стабильности взаимодействия ПМ-В и ЛПС, молекулярная модель ПМ-В была объединена с пятью молекулярными моделями ЛПС, различными по своей структуре. Расчет энергии взаимодействия в пределах образованных комплексов выполнялся с помощью метода молекулярной механики при различном межмолекулярном расстоянии. Сила связи рассчитывалась путем аппроксимации сведений об энергии взаимодействия и энергетической кривой Л-Д. Согласно результатам анализа, максимальные показатели силы связи для различных комплексов ПМ-В-ЛПС варьировали в диапазоне от 1,94 до 3,79 нН (максимальные значения представлены в таблице 1), что согласуется с данными, полученными для других биологически значимых комплексов, а также подтверждает способность ПМ-В стабильно связываться с крупными молекулами ЛПС и предшественниками таких молекул. Механизм взаимодействия при коротком межмолекулярном расстоянии основан на действии ионных и гидрофобных сил, тогда как при большом расстоянии между молекулами доминируют ионные силы.

Изучение комплексов ЛПС-ПМ-В на молекулярном уровне может предоставить ценные сведения для последующих более масштабных динамических исследований с применением многоуровневого подхода для оценки эффективности устройств, предназначенных для удаления эндотоксина. В частности, на уровне микрошкалы можно выполнить оценку гидродинамики в картридже. Таким образом, становится возможным дальнейшее изучение конкурентного взаимодействия влекущей силы потока жидкости, воздействующей на ЛПС, и силы сцепления молекул ПМ-В (см. главу, написанную Фиоре и соавт.; стр. 50-59).

Благодарности

Авторы благодарят доктора П. Пристовсек из Национального института химии (г. Любляна, Словения) за предоставление атомных координат молекулы ПМ-В, а также доктора М. Й. Кастовски из Института им. Макса Планка (г. Йена, Германия) за предоставление атомных координат липополисахаридов S-LPS и ReLPS.

Ссылки

1. Morrison DC, Jacobs DM: Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry* 1976;13:813-818.
2. Pristovsek P, Kidric J: Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study. *J Med Chem* 1999;42:4604-4613.
3. Brade H, Brade L, Rietschel ET: Structure-activity relationships of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). Current and future aspects. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* 1988;268:151-179.
4. Rietschel ET, Brade L, Schade U, Seydel U, Zaringer U, Kusumoto S, Brade H: Bacterial endotoxins: properties and structure of biologically active domains; in Schrinner E, Richmond MH, Seibert G, Schwarz U (eds): *Surface Structures of Microorganisms and Their Interactions with the Mammalian Host*. Weinheim, VCH, 1993, pp 1-41.
5. Zahringer U, Lindner B, Rietschel ET: Molecular structure of lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 1994;50:211-276.
6. Kastowsky M, Obst S, Bradaczek H: Molecular dynamics simulations of six different fully hydrated monomeric conformers of *Escherichia coli* re-lipopolysaccharide in the presence and absence of Ca²⁺. *Biophys J* 1997;72:1031-1046.

7. Wang Y, Hollingsworth RI: An NMR spectroscopy and molecular mechanics study of the molecular basis for the supramolecular structure of lipopolysaccharides. *Biochemistry* 1996;35:5647-5654.
8. Vesentini S, Soncini M, Zaupa A, Silvestri V, Fiore GB, Redaelli A: Multi-scale analysis of the toraymyxin adsorption cartridge. Part I: molecular interaction of polymyxin B with endotoxins. *Int J Artif Organs* 2006;29:239-250.
9. Gasteiger J, Marsili M: Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 1980;36:3219-3222.
10. Din ZZ, Mukerjee P, Kastowsky M, Takayama K: Effect of pH on solubility and ionic state of lipopolysaccharide obtained from the deep rough mutant of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1993;32:4579-4586.
11. Yin N, Marshall RL, Matheson S, Savage PB: Synthesis of lipid A derivatives and their interactions with polymyxin B and polymyxin B nonapeptide. *J Am Chem Soc* 2003;125:2426-2435.
12. Dammer U, Hegner M, Anselmetti D, Wagner P, Dreier M, Huber W, Guntherodt HJ: Specific antigen/antibody interactions measured by force microscopy. *Biophys J* 1996;70:2437-2441.
13. Dammer U, Popescu O, Wagner P, Anselmetti D, Guntherodt HJ, Misevic NC: Binding strength between cell adhesion proteoglycans measured by atomic force microscopy. *Science* 1995;267:1173-1175.
14. Vinckier A, Gervasoni P, Zaugg F, Ziegler U, Lindner P, Groscurth P, Pluckthun A, Semenza G: Atomic force microscopy detects changes in the interaction forces between GroEL and substrate proteins. *Biophys J* 1998;74:3256-3263.

Симоне Весентини
Отдел биотехнологий, Politecnico di Milano
Пiazza Леонардо да Винчи, 32
г. Милан, IT-20132 (Италия)
Телефон: +39 02 23993375. Факс: +39 02 23993360.
Электронная почта: simone.vesentini@polimi.it

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 55-64

Механизм экстракорпорального удаления эндотоксина с применением полимиксина В: гидродинамика сорбции

Д. Б. Фиоре · М. Сончини · С. Весентини · А. Ределли

Отдел биотехнологий, Politecnico di Milano, г. Милан, Италия

Реферат

Удаление эндотоксинов из крови пациентов при помощи экстракорпорального сорбционного устройства ToraymuXin основано на способности иммобилизованного полимиксина В (ПМ-В) надежно и высокоспецифично связывать эндотоксины. Хотя адсорбция происходит на молекулярном уровне, этот процесс предполагает наличие гидродинамических эффектов, которые проявляются как в макроскопическом, так и в супрамолекулярном масштабе. В данной статье мы описываем результаты вычислительного многоуровневого исследования гидродинамической функциональности этого устройства. Для исследований большего масштаба были разработаны трехмерные компьютерные гидродинамические модели. Свойства потока в сорбирующем материале изучались с помощью модели гомогенного потока, основанной на законе Дарси (крупномасштабное исследование), или реалистичных геометрических моделей тока жидкости сквозь тканый материал (среднемасштабное исследование). В рамках микромасштабного исследования применялись упрощенные двухмерные модели, позволяющие проследить за движением моделированных частиц эндотоксина, подверженных конкурентному взаимодействию влекущей силы потока жидкости и молекулярного притяжения к ПМ-В. Результаты анализа, выполненного для каждого уровня, по меньшей мере, могут служить исходными данными для последующего исследования. Крупномасштабное исследование предоставило сведения о максимальной скорости поля течения, которое формируется в сорбенте. Эти данные использовались в среднемасштабном анализе. В результате был получен реалистичный диапазон показателей касательного напряжения в жидкости, контактирующей с поверхностью волокон сорбента. При соблюдении этого диапазона проводилось отслеживание движения частиц эндотоксина как рядом с одиночной иммобилизованной молекулой ПМ-В, так в присутствии слоя молекул ПМ-В, равномерно распределенных по поверхности волокон. Результаты эксперимента свидетельствуют, что способность захватывать молекулы эндотоксина сохраняется на расстоянии не менее 10-20 нм от поверхности, что на порядок выше расстояния, необходимого для формирования стабильной межмолекулярной связи. Мы полагаем, что многоуровневый подход обладает достаточной мощностью для того, чтобы пролить свет как на физические особенности каждого уровня, так и на взаимное влияние эффектов, зарегистрированных на разных уровнях.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Согласно современным статистическим данным, сепсис является ведущей причиной смерти пациентов в ОИТ некоронарного профиля [1], а также занимает одиннадцатое место в структуре общей смертности в США [2]. Для пожилых людей и пациентов с

иммунодепрессией сепсис составляет еще бóльшую угрозу [3, 4]. Учитывая значимость этой проблемы, были предприняты попытки воздействия на основной пусковой фактор воспалительного процесса (то есть, на эндотоксины) [5]. В 1970-х был открыт специфический белок - полимиксин В (ПМ-В), который оказался эффективен при эндотоксин-индуцированном гемодинамическом шоке [6-8]. Однако, ПМ-В оказывает выраженное токсическое влияние на почки и центральную нервную систему [9-11]. Для исключения недостатков, связанных с системной токсичностью, было предложено использовать способность иммобилизованного ПМ-В связывать эндотоксины экстракорпорально. Молекулы ПМ-В, ковалентно связанные с инертными волокнами, способны выполнять функцию адсорбента и захватывать эндотоксины из экстракорпорального кровотока, контактирующего с поверхностью волокон.

Адсорбция происходит на молекулярном уровне. Тем не менее, этот процесс предполагает наличие гидродинамических эффектов, которые проявляются как в макроскопическом, так и в супрамолекулярном масштабе. В действительности, эффективное удаление эндотоксина основано на прохождении крови через небольшой адсорбционный картридж, который обеспечивает пролонгированное и действенное взаимодействие потока крови с активной поверхностью волокон. Этот эффект достигается точным гидродинамическим дизайном устройства. В 1994 году компания Торэй Медикал (г. Токио, Япония) вывела на японский рынок устройство для экстракорпорального удаления эндотоксина, которое носит название Тогаумухин. Знак соответствия европейским директивам качества это устройство получило в 1998 году. На европейском рынке картридж Тогаумухин доступен с 2002 года. Венозная кровь пациента входит в картридж через цилиндрический распределитель. Далее кровь радиально распространяется через волоконный материал (который окутывает центральный распределитель), попадает в сборочную камеру, а затем выходит из устройства. Волоконная зона содержит иммобилизованный ПМ-В, который предназначен для захвата эндотоксина из проходящей крови. Эффективность устройства Тогаумухин была подтверждена клинически [12-15], хотя и возник ряд вопросов, связанных с базовой функциональностью картриджа [16-18].

В данном документе представлены результаты многоуровневого анализа гидродинамических свойств картриджа Тогаумухин [19]. Мы изучили механизмы функционирования устройства на трех различных уровнях. Крупномасштабный анализ был основан на применении метода вычислительной гидродинамики. Этот метод использовался для определения общих гидродинамических показателей устройства Тогаумухин, как единого целого. На среднем уровне изучались эффекты структуры тканого материала. Кроме того, среднемасштабный анализ включал моделирование с использованием метода вычислительной гидродинамики. При этом входящая скорость потока соответствовала наихудшим показателям, полученным в рамках крупномасштабного анализа. На микроуровне оценивалась способность иммобилизованного ПМ-В захватывать молекулы эндотоксина с учетом конкурентного взаимодействия влекущей силы потока жидкости и молекулярного притяжения эндотоксина к ПМ-В. Молекулярное взаимодействие было подробно изучено в другом исследовании, посвященном молекулярной механике эндотоксина и ПМ-В (см. главу, написанную Весентини и соавт.; стр. 41-49).

Материалы и методы

Крупномасштабное исследование: общие сведения о гидродинамике в картридже

Наше компьютеризированное гидродинамическое исследование устройства как единого целого было начато с построения трехмерной геометрической модели (рис. 1а). За основу были взяты технические чертежи, предоставленные производителем. Учитывая симметричность устройства, была моделирована только четвертая часть картриджа, на которую была наложена сетка из 1560000 четырехгранных ячеек.

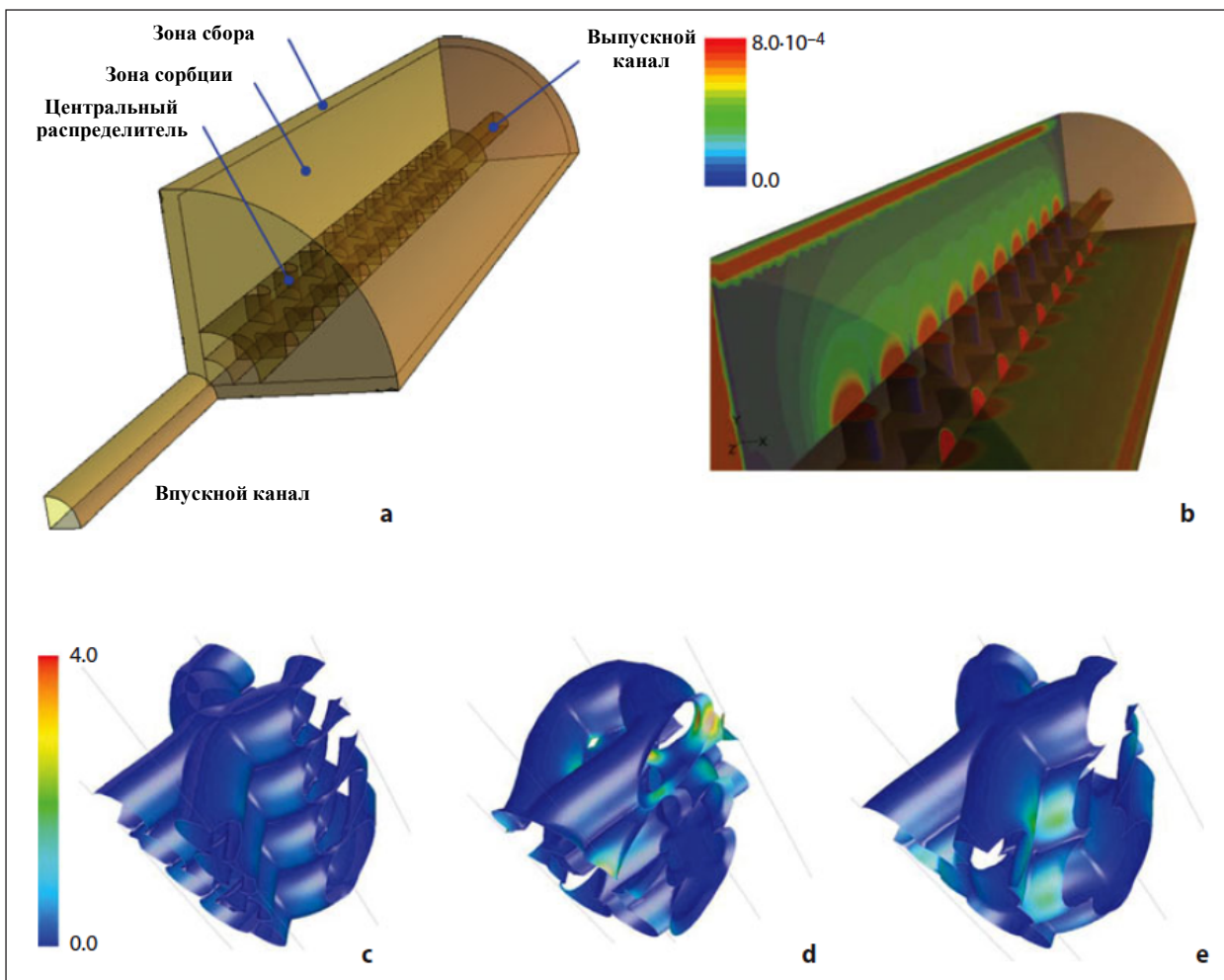


Рис. 1. **а)** Трехмерное изображение крупномасштабной геометрической модели фильтра Тогаутухип (учитывая симметричность устройства, была моделирована только четвертая часть картриджа). **б)** Крупномасштабное исследование: скорость потока в зоне сорбции (м/с). Максимальная скорость регистрируется непосредственно над поверхностью сорбента. **с-е)** Среднемасштабное исследование: касательное напряжение в жидкости, контактирующей с поверхностью волокон (Па). Для блока А (**с**) зарегистрировано достаточно гомогенное касательное напряжение. Блоки В и С (соответственно, **д** и **е**) характеризуются неравномерным касательным напряжением.

Для крупномасштабного гидродинамического моделирования использовалось программное обеспечение Fluent (корпорация Энсис). При моделировании соблюдались следующие условия: ламинарные потоки, ньютоновская, гомогенная и несжимаемая жидкость.

Модель соответствовала стандартным условиям функционирования картриджа Тогаутухип, то есть при входящей скорости потока 100 мл/мин и температуре 37°C. Сорбирующий материал был гидравлически моделирован как проницаемая пористая среда, которая подчиняется закону Дарси:

$$\nabla p = -\frac{\mu}{\alpha} v,$$

где ∇p - градиент давления, v - так называемый "предполагаемый" вектор скорости потока жидкости; μ - вязкость жидкости; и α - проницаемость пористой среды. На основании данных, предоставленных производителем, в качестве α использовались два

показателя ($5,90 \cdot 10^{11}$ и $7,05 \cdot 10^{11} \text{ м}^{-2}$). Показатель плотности крови (ρ) был установлен на уровне 1060 кг м^{-3} , а показатели вязкости (μ) варьировали в диапазоне $(2,7-4,0) \cdot 10^{-3} \text{ кг м}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [20].

Среднемасштабное исследование: динамика тока жидкости через волокна

При моделировании гидродинамических эффектов в субмиллиметровой шкале, невозможно игнорировать истинные геометрические свойства тканого волоконного сорбционного материала. Однослойная модель использовалась в рамках данного исследования в качестве структурной единицы. Она применялась для создания многослойных блоков, дающих представление о том, как перекрываются слои волокон в процессе производства. Каждый блок представлен четырьмя ткаными слоями. Блок А состоит из полностью упорядоченных волокон различных слоев, тогда как в состав блоков В и С входят преобразованные слои волокон. В рамках каждого блока объем жидкости (рассчитанный путем вычитания объема блока из объема твердой фазы) измерялся 230000 четырехгранными ячейками.

Общие условия проведения среднемасштабного исследования были аналогичны таковым крупномасштабного исследования: плотность крови (ρ) = 1060 кг м^{-3} и вязкость (μ) = $4,0 \cdot 10^{-3} \text{ кг м}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Компьютерное гидродинамическое моделирование выполнялось при скорости входящего потока, соответствующей наибольшему показателю, полученному в рамках крупномасштабного исследования. После повторной обработки был зарегистрирован диапазон показателей касательного напряжения, необходимый для последующего микромасштабного исследования.

Микромасштабное исследование: конкуренция между влекущей силой потока и силой сцепления ПМ-В с молекулами эндотоксина

В рамках микромасштабного исследования измерения производились на субмикрометровом уровне. При таком масштабе можно изучить движение молекулы эндотоксина, вызванное силами, действующими на эту молекулу, а именно влекущей силой потока жидкости и силой межмолекулярного взаимодействия, которая измеряется при помощи методов молекулярной механики. Масштаб анализируемых эффектов достаточно мал для изолированной оценки гидродинамики единого слоя плазмы, прилегающего к поверхности волокон. В связи с этим была использована двухмерная картезианская система координат: ось z располагается на поверхности волокна и ориентирована в направлении тока плазмы, а положительные y -координаты измеряют расстояние от поверхности. Жидкость характеризовалась сдвиговым течением. При этом скорость была параллельна оси z и пропорциональна y -координатам, а сдвиг зависел от скорости касательного напряжения. Предполагалось, что скоростной профиль не зависел от наличия движущихся частиц. Плазма характеризовалась следующими показателями: плотность (ρ) = 1035 кг м^{-3} и вязкость (μ) = $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ кг м}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Моделирование выполнялось при пяти различных показателях касательного напряжения. При моделировании использовался диапазон, установленный в рамках среднемасштабного исследования.

Суспендированные молекулы эндотоксина были представлены сферическими частицами, радиус которых был рассчитан на основе соответствующих ван-дер-ваальсовых молекулярных объемов. Предполагалось, что под действием потока жидкости эти частицы подчиняются закону Стокса:

$$\mathbf{F}_d = 6 \pi \mu r_{eq} (\mathbf{v} - \mathbf{v}_p),$$

где \mathbf{F}_d - вектор касательного напряжения, а $\mathbf{v} - \mathbf{v}_p$ - разница между вектором скорости потока и вектором скорости частиц. При моделировании учитывалась как полная структура эндотоксина (S-LPS, приведенный радиус (r_{eq}) = 1,56 нм), так и минимальная структура эндотоксина, демонстрирующая его активность (ReLPS, r_{eq} = 1,07 нм) [21].

Молекулы ПМ-В размещались на поверхности волокон, а участки связывания были направлены наружу при $y = 2,6$ нм по длине всей молекулы. Динамика частиц эндотоксина оценивалась как рядом с одиночной иммобилизированной молекулой ПМ-В, так и в присутствии слоя молекул ПМ-В, равномерно распределенных по поверхности волокон. В последнем случае, на основании данных, предоставленных производителем, была избрана средняя плотность $0,25$ молекул/нм², то есть (в двухмерной проекции) средняя линейная плотность соответствовала приблизительно 1 молекуле на каждые 2 нм.

Сила молекулярного взаимодействия была приложена к центру массы частицы эндотоксина и направлена в сторону участка связывания с ПМ-В. Ее величина зависела от межмолекулярной дистанции (r) и выражалась потенциалом Леннарда-Джонса (положительные значения обозначают притяжение):

$$F_{LJ} = 24\epsilon \left[2 \frac{\sigma^{12}}{r_{PL}^{13}} - \frac{\sigma^6}{r_{PL}^7} \right],$$

где ϵ и σ - параметры соответствующего выражения энергии взаимодействия ($\sigma = 0,63$ нм и $\epsilon = 274$ кДж/моль для взаимодействия S-LPS с ПМ-В, и $\sigma = 0,58$ нм и $\epsilon = 196$ кДж/моль для взаимодействия ReLPS с ПМ-В; показатели выбраны с учетом минимальной пиковой силы притяжения; см. главу, написанную нашим коллегой).

Результаты

Крупномасштабное исследование

Результаты моделирования показали, что распределение показателей скорости в зоне сорбции является достаточно однородным. Пример представлен на рисунке 1b. Даже если в зоне распределения (в частности, в том месте, где поток изменяет свое направление) регистрировались более высокие показатели скорости потока (максимальный показатель: 8 мм/с), по мере оттока жидкости от распределителя к зоне сорбции скорость потока быстро снижалась. В зоне сорбции участки максимальной скорости потока располагаются непосредственно над поверхностью сорбента (диапазон от 0,354 до 0,356 мм/с). Этот показатель был почти нечувствителен к проницаемости α , вязкости μ или осевому положению.

Среднемасштабное исследование

На рисунках 1с-е для трех блоков представлены показатели касательного напряжения в жидкости, контактирующей с поверхностью волокон. Блок А, представленный полностью упорядоченными слоями волокон, характеризовался достаточно гомогенным касательным напряжением, тогда как блоки В и С отличались неравномерностью соответствующих показателей.

Распределение показателей касательного напряжения по частоте характеризовалось преобладанием низких значений. Основные показатели распределения, зарегистрированные для блоков А, В и С (медиана, девяностый процентиль и максимум), представлены в таблице 1. Наименее благоприятные показатели были получены для блоков В и С. Именно они использовались в качестве контрольных значений касательного напряжения в микромасштабной модели.

Таблица 1. Значимые показатели касательного напряжения, зарегистрированные в рамках среднемасштабного исследования.

Обозначение блока	Количество элементов в стенке волокна	Медиана касательного напряжения (Па)	90-й процентиль касательного напряжения (Па)	Максимальный показатель касательного напряжения (Па)
А	25066	0,0657	0,364	0,824

B	21423	0,140	1,04	4,91
C	16756	0,154	0,935	2,89

Микромасштабное исследование

В присутствии одиночной молекулы ПМ-В, фиксированной на поверхности волокна, поведение частицы эндотоксина зависит как от первоначального расстояния до стенки волокна, так и от выраженности касательного напряжения. При любом касательном напряжении (диапазон от 0,06 до 5 Па) существует пороговое значение (y_T). Частицы, которые начинают движение при $y < y_T$, захватываются молекулой ПМ-В, тогда как частицы, начинающие движение при $y > y_T$, увлекаются потоком жидкости. На рисунке 2а графически представлена зависимость между пороговыми дистанциями молекул S-LPS и ReLPS, и показателями касательного напряжения. Плоскость y разделена на две зоны: зона связывания (ниже линии), определяющая условия для захвата и связывания эндотоксина с молекулой ПМ-В, и зона отсутствия связывания, описывающая условия, при которых превалирует касательное напряжение.

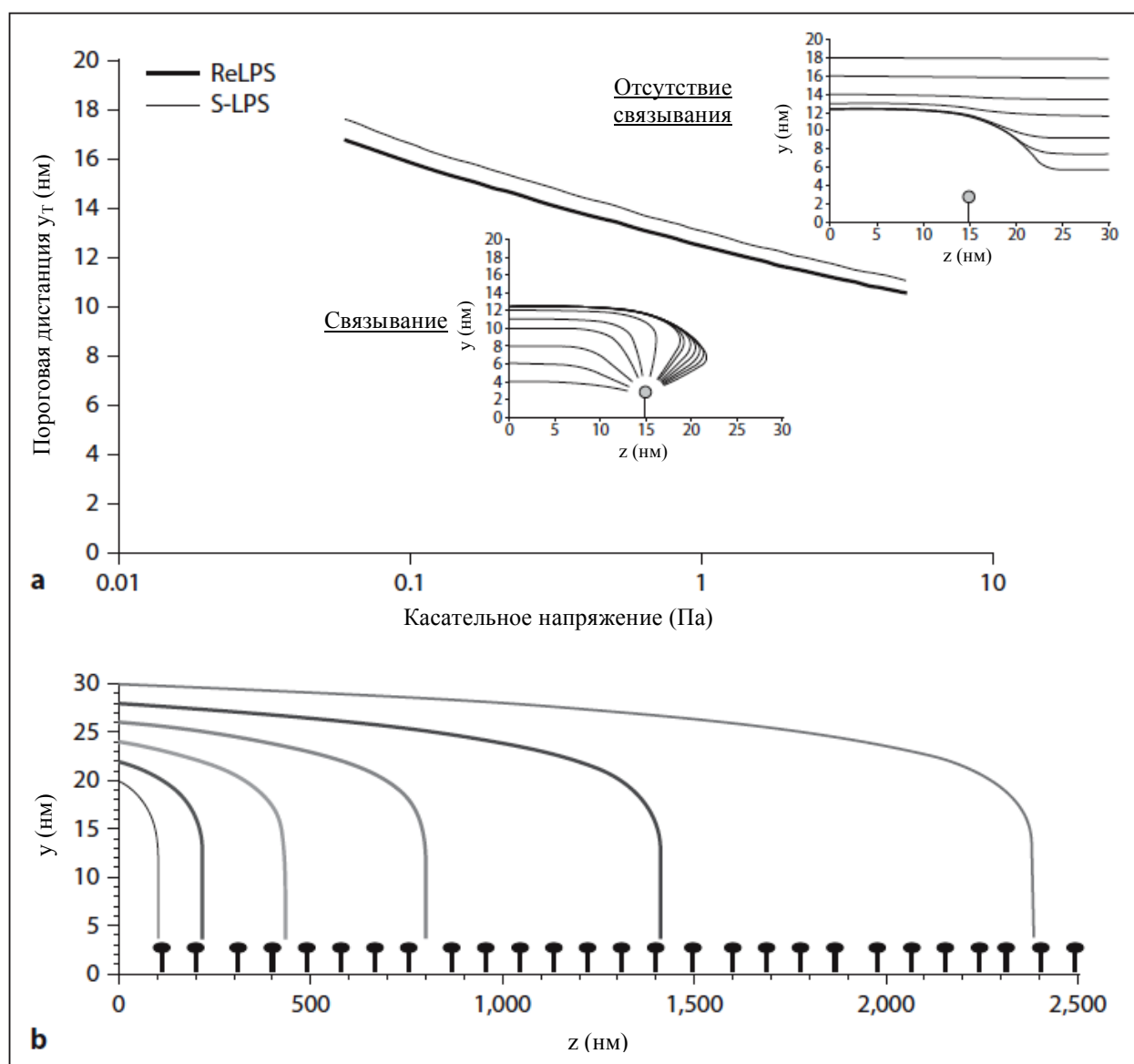


Рис. 2. Микромасштабное исследование. **а)** Взаимосвязь между пороговой дистанцией и касательным напряжением, зарегистрированная для молекул S-LPS и ReLPS в присутствии одиночной молекулы ПМ-В, фиксированной на поверхности сорбента. Каждая линия разделяет плоскость на 2 зоны: зона связывания и зона отсутствия

связывания. Показатели касательного напряжения представлены на логарифмической шкале. На вставках показаны траектории частиц, типичные для связывания и отсутствия связывания. **b)** Траектории частиц эндотоксина при равномерном распределении молекул ПМ-В на поверхности волокон сорбента. В данном случае, частицы ReLPS начинают движение на расстоянии 20-30 нм от поверхности (шаг - 2 нм) при касательном напряжении 5 Па.

При наличии слоя молекул ПМ-В, равномерно распределенного по поверхности волокон, а также при отсутствии каких-либо препятствующих факторов, частица эндотоксина определенно будет стремиться к слою ПМ-В (рис. 2b). Тем не менее, даже небольшое увеличение первоначальной дистанции от частицы эндотоксина до стенки волокна способствует значительному увеличению расстояния, которое частица должна пройти до поверхности сорбента, где она будет захвачена молекулой ПМ-В.

Обсуждение

Процесс адсорбции эндотоксина в устройстве Toxamuxin основан на способности иммобилизованного ПМ-В высокоспецифично и надежно связывать эндотоксины. Формирование связи определяется гидрофобным взаимодействием при короткой межмолекулярной дистанции (до 1 нм), а также электростатическим взаимодействием при большем расстоянии между молекулами. Электростатическое взаимодействие значительно слабее гидрофобного. Следовательно, обеспечение должного контакта насыщенной эндотоксином плазмы с поверхностью волокон сорбента является важным фактором, определяющим эффективное удаление эндотоксина. В этой работе мы сконцентрировали внимание на гидродинамических свойствах крови и плазмы. Мы начали с анализа общей гидродинамики, а затем перешли на субмиллиметровый и субмикрометровый уровень. При переходе с одного уровня на другой, из соображений безопасности мы использовали худшие показатели (пессимистический подход), чтобы получить общее представление о наиболее неблагоприятных вариантах работы устройства. Учитывая исходные предпосылки, согласно результатам нашего исследования иммобилизованный ПМ-В способен захватывать молекулы эндотоксина из слоя плазмы, простирающегося на десятки нанометров от поверхности волокон сорбента. Хотя это лишь небольшая часть слоя плазмы, соответствующее расстояние значительно превышает интервал ближнего действия, необходимый для формирования абсолютно стабильной межмолекулярной связи.

В рамках многоуровневого моделирования, основная задача крупномасштабного исследования состояла в регистрации пиковых значений скорости потока в зоне сорбции. Наиболее неблагоприятные показатели были включены в последующее среднемасштабное исследование. Тем не менее, для большей части сорбента показатели скорости потока оказались намного ниже пиковых значений, зарегистрированных непосредственно у поверхности волокон. Однородность показателей скорости потока говорит о том, что доступный объем сорбента эффективно эксплуатируется потоком крови. Это наблюдение подтверждает результаты предшествующих экспериментов [22]. Затем, на среднемасштабном уровне были сконструированы реалистичные трехмерные модели потока вблизи волокон, формирующих адсорбирующий материал. В результате был получен диапазон наиболее неблагоприятных показателей касательного напряжения в жидкости, контактирующей с поверхностью волокон сорбента. Этот диапазон использовался в рамках анализа, выполненного на микроуровне. Для микромасштабного исследования был выбран уровень наблюдения, при котором жидкость все еще можно рассматривать как непрерывную среду, а молекулы эндотоксина можно представить как суспендированные частицы. Такой масштаб позволил нам изучить феномен локальной адсорбции эндотоксина с точки зрения конкурентного взаимодействия силы притяжения

молекул ПМ-В, фиксированных на поверхности сорбента, и влекущей силы потока, заставляющей молекулы эндотоксина двигаться вместе с потоком жидкости (и, следовательно, выходить из устройства). Наш анализ был упрощен относительно реальных условий. Мы не учитывали пространственные особенности молекул, за исключением их размеров (приведенный радиус молекул эндотоксина; длина молекул ПМ-В, фиксированных на поверхности сорбента). Касательное напряжение было выражено классическим законом Стокса, несмотря на близость соответствующего предела достоверности (рассматриваемые молекулы эндотоксина на один порядок превышают молекулы воды). Тем не менее, благодаря своей упрощенности, разработанная модель обладает достаточной мощностью для описания важных особенностей взаимодействия.

Способность молекул ПМ-В, фиксированных на поверхности волокон, захватывать эндотоксины была изучена путем отслеживания траекторий движения молекул эндотоксина, перемещающихся вместе с потоком жидкости на различном расстоянии от поверхности. Неожиданным открытием было то, что при диапазоне показателей касательного напряжения, охватывающем два порядка (0,06-5 Па), одиночная молекула ПМ-В способна захватывать молекулы эндотоксина, которые находятся на расстоянии 10-20 нм от поверхности волокон, а ведь это достаточно большое расстояние для молекулярного взаимодействия. Это открытие само по себе указывает на то, каким образом гидродинамика может воздействовать на адсорбционный потенциал устройства. Важно понимать, что при такой дистанции сила молекулярного притяжения в 8-10 раз ниже максимальной силы притяжения. При синергической работе множественных молекул ПМ-В, равномерно распределенных на поверхности сорбента, захват молекул эндотоксина может происходить даже на расстоянии, превышающем 20 нм. Тем не менее, для взаимодействия на таком расстоянии необходимо, чтобы молекула эндотоксина продвигалась вблизи поверхности сорбента на протяжении, по меньшей мере, нескольких микрометров. В результате возрастает вероятность того, что возмущающий потенциал (не учитывается в нашем эксперименте) окажет влияние на молекулярное притяжение.

Выводы

Описанный в данной статье многоуровневый подход позволяет составить общее представление о механизмах, оказывающих влияние на антиэндотоксиновый эффект устройства Тогаутухин. Вблизи поверхности волокон сорбента, даже при достаточно высоких показателях касательного напряжения, почти мгновенно должен формироваться слой жидкости, лишенный молекул эндотоксина. За пределами определенной дистанции (десятки нанометров) ПМ-В не будет оказывать существенного влияния на концентрацию эндотоксина. Как следствие этого, должен появиться концентрационный градиент, способствующий диффузии молекул эндотоксина по направлению к стенке волокон сорбента. Поскольку жидкость представлена слоем плазмы, диффузия должна выступить в роли основного фактора, лимитирующего всасывание. Это ограничение (наряду с фактором насыщения сорбента, который не учитывался в данной работе) целесообразно компенсировать большой активной поверхностью волокон. Общая поверхность волокон устройства Тогаутухин превышает 500 м². При переходе к более крупному масштабу моделирования становится ясно, что в транспорте эндотоксина к поверхности волокон участвуют конвекционные эффекты. Следовательно, выраженное сдвиговое течение крови можно считать целесообразным благодаря наличию микроконвекционных эффектов, обусловленных вращением отдельных эритроцитов или групп эритроцитов в сдвиговом потоке [23]. Усиления сдвигового течения можно добиться увеличением извилистости тока крови вблизи волокон сорбента, даже если рекомендуется, чтобы поток через сорбент, как единое целое, характеризовался отсутствием любой динамической неравномерности (например, участки полного торможения потока или преимущественные пути тока жидкости).

Мы изучили механизмы, лежащие в основе экстракорпорального удаления эндотоксина с помощью иммобилизованного ПМ-В. Для этого мы провели многоуровневое компьютеризированное исследование. Уровень оценки варьировал от наношкалы, позволяющей оценить молекулярное взаимодействие эндотоксина и ПМ-В, до макрошкалы, которая характеризует общие изменения потока крови, поступающей в устройство из организма пациента. Даже если на каждом уровне оценки необходимо использовать упрощенную модель, многоуровневый подход обладает достаточной мощностью для того, чтобы составить полное представление о физических эффектах и взаимном влиянии феноменов, зарегистрированных на различных уровнях.

Благодарности

Авторы благодарят доктора Гуалтиеро Гуаданьи (Estor SpA, г. Милан, Италия) и доктора Хисатака Шоджи (корпорация Торэй Медикал, г. Токио, Япония) за предоставленные материалы, технические чертежи и сведения о дизайне.

Ссылки

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-1554.
2. Murphy SL: Deaths: final data for 1998. *Natl Vital Stat Rep* 2000;48:1-105.
3. Friedman G, Silva E, Vincent JL: Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* 1998;26:2078-2086.
4. Balk RA: Pathogenesis and management of multiple organ dysfunction or failure in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Clin* 2000;16:337-352, vii.
5. Opal SM, Gluck T: Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003;31:S57-S64.
6. Palmer JD, Rifkind D: Neutralization of the hemodynamic effects of endotoxin by polymyxin B. *Surg Gynecol Obstet* 1974;138:755-759.
7. From AH, Fong JS, Good RA: Polymyxin B sulfate modification of bacterial endotoxin: effects on the development of endotoxin shock in dogs. *Infect Immun* 1979;23:660-664.
8. Baldwin G, Alpert G, Caputo GL, Baskin M, Parsonnet J, Gillis ZA, Thompson C, Siber GR, Fleisher GR: Effect of polymyxin B on experimental shock from meningococcal and *Escherichia coli* endotoxins. *J Infect Dis* 1991;164:542-549.
9. Cooperstock MS: Inactivation of endo-toxin by polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1974;6:422-425.
10. Danner RL, Joiner KA, Rubin M, Patterson WH, Johnson N, Ayers KM, Parrillo JE: Purification, toxicity, and antiendotoxin activity of polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33: 1428-1434.
11. Wheeler AP: Bacterial peritonitis: innovative experimental treatment. *Crit Care Med* 1999;27:1055-1056.
12. Suzuki H, Nemoto H, Nakamoto H, Okada H, Sugahara S, Kanno Y, Moriwaki K: Continuous hemodiafiltration with polymyxin-B immobilized fiber is effective in patients with sepsis syndrome and acute renal failure. *Ther Apher* 2002;6:234-240.
13. Shoji H: Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther Apher Dial* 2003;7:108-114.
14. Kushi H, Miki T, Okamoto K, Nakahara J, Saito T, Tanjoh K: Early hemoperfusion with an immobilized polymyxin B fiber column eliminates humoral mediators and improves pulmonary oxygenation. *Crit Care* 2005;9:R653-R661.
15. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock. The EUPHAS randomized control trial. *JAMA* 2009;301: 2445-2452.
16. Nakamura T, Matsuda T, Suzuki Y, Shoji H, Koide H: Polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion in patients with sepsis. *Dial Transplant* 2003;32:602-607.
17. Nemoto H, Nakamoto H, Okada H, Sugahara S, Moriwaki K, Arai M, Kanno Y, Suzuki H: Newly developed immobilized polymyxin B fibers improve the survival of patients with sepsis. *Blood Purif* 2001;19:361-369.

18. Vincent JL, Laterre PF, Cohen J, Burchardi H, Bruining H, Lerma FA, Wittebole X, De Backer D, Brett S, Marzo D, Nakamura H, John S: A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. *Shock* 2005;23:400-405.
19. Fiore B, Soncini M, Vesentini S, Penati A, Visconti G, Redaelli A: Multiscale analysis of the Toraymyxin adsorption cartridge. Part II: computational fluid-dynamic study. *Int J Artif Organs* 2006;29:251-260.
20. Wells R: Syndromes of hyperviscosity. *N Engl J Med* 1970;283:183-186.
21. Vesentini S, Soncini M, Zaupa A, Silvestri V, Fiore GB, Redaelli A: Multiscale analysis of the Toraymyxin adsorption cartridge. Part I: molecular interaction of polymyxin B with endotoxins. *Int J Artif Organs* 2006;29:239-250.
22. Ronco C, Brendolan A, Scabardi M, Ronco F, Nakamura H: Blood flow distribution in a polymyxin coated fibrous bed for endotoxin removal. Effect of a new blood path design. *Int J Artif Organs* 2001;24:167-172.
23. Wang NL, Keller KH: Augmented transport of extracellular solutes in concentrated erythrocyte suspensions in Couette flow. *J Colloid Interface Sci* 1985;103:210-225.

Джанфранко Б. Фиоре, инженер
Отдел биотехнологий, Politecnico di Milano
Пiazza Leonardo da Vinci, 32
г. Милан, IT-20133 (Италия)
Телефон: +39 02 23993337. Факс: +39 02 23993360.
Электронная почта: gianfranco.fiore@polimi.it

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 65-76

Удаление эндотоксина при помощи картриджа с иммобилизированным полимиксином В способствует инактивации проапоптозных факторов в циркулирующей крови

Эрика Л. Мартин · В. Марко Раньери

Отделение анестезиологии и реанимации, Университет г. Турин, Ospedale S. Giovanni Battista-Molinette, г. Турин, Италия

Реферат

Общие сведения и задачи. Тяжелый сепсис и септический шок остаются серьезными клиническими проблемами, поскольку они обуславливают высокий уровень смертности. Липополисахариды (ЛПС) - это компоненты клеточной оболочки грамотрицательных бактерий. Считается, что при сепсисе ЛПС запускают передачу специфического сигнала, определяющего развитие системного воспалительного ответа и повреждение органов (в том числе, формирование острой почечной недостаточности). Гемоперфузионная терапия с полимиксином В (ПМ-В) при сепсисе оказывает положительное влияние на выживаемость, а также уменьшает выраженность органной дисфункции. Эти эффекты достигаются удалением липополисахаридов из кровотока. К сожалению, некоторые клиницисты отказываются от использования этого современного метода. Причина такого отношения заключается в недостаточном понимании соответствующих клеточных механизмов. Известно, что апоптоз (или программированное умирание клетки) участвует в развитии острой почечной недостаточности и общей органной дисфункции при сепсисе. Этот процесс может активироваться ЛПС-опосредованным путем. Следовательно, нефропротекторный эффект, который наблюдается при гемоперфузионной терапии с ПМ-В у больных сепсисом, может быть связан с влиянием на клеточный апоптоз. В этой главе представлен анализ последних сведений о роли профилактики апоптоза в механизме, способствующем улучшению исходов и уменьшению вероятности развития острой почечной недостаточности на фоне гемоперфузионной терапии с ПМ-В при сепсисе.

Методы. Исходно, а также спустя 72 часа после начала лечения у пациентов, получавших стандартную терапию, и у больных, которые прошли два сеанса гемоперфузионной терапии с ПМ-В, были взяты пробы крови. Полученная плазма использовалась для воздействия на клетки почечных канальцев или на гломерулярные подоциты. Конечная задача состояла в оценке способности плазмы индуцировать апоптоз.

Результаты. Вся плазма из исходных проб, а также плазма, полученная из проб крови, взятых через 72 часа после начала лечения у пациентов, которые получали традиционную терапию, значительно усиливала апоптоз. В то же время, плазма полученная из проб крови пациентов, которые прошли два сеанса терапии ПМ-В, индуцировала апоптоз в значительно меньшей степени. Ослабленное проапоптозное действие обусловлено подавлением внешней и внутренней сигнализации, о чем свидетельствуют снижение активности каспазы, уровень экспрессии Fas и баланс Bax/Bcl-2.

Вывод. Защитное влияние экстракорпоральной терапии ПМ-В при развитии острой почечной

недостаточности у больных сепсисом отчасти обусловлено снижением системного проапоптозного влияния на клетки почек.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Тяжелый сепсис и септический шок, сопровождаемые распространенным системным воспалением и инфекционным процессом, представляют собой серьезные медицинские состояния, которые по-прежнему составляют большую проблему для отделений интенсивной терапии [1]. Несмотря на интенсивную научно-исследовательскую работу и прогресс в понимании патогенеза септического процесса, уровень летальности при сепсисе по-прежнему достигает 40-60%. Смерть часто наступает в результате полиорганной недостаточности, которая осложняет течение сепсиса при его прогрессировании [1]. Одним из органов, функция которых нарушается при сепсисе, является почка. Острая почечная недостаточность развивается у 23% больных тяжелым сепсисом и у 51% пациентов с септическим шоком [2]. Кроме того, наличие острой почечной недостаточности увеличивает вероятность летального исхода до 70% [2].

Считается, что одним из ведущих факторов, способствующих развитию острой почечной недостаточности при сепсисе, является липополисахарид (ЛПС) - компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий [3]. ЛПС реализует свои многочисленные эффекты посредством активации толл-подобных рецепторов 4 типа. Как следствие запускается сигнальный каскад, в котором принимают участие митоген-активированные протеинкиназы и фактор транскрипции NF-κB. В результате усиливается воспалительный ответ, индуцируется повреждение клеток и формируется органная дисфункция [4]. Удаление ЛПС из кровотока при помощи гемоперфузии с использованием иммобилизованного полимиксина В (ПМ-В) оказывает положительное влияние на исход сепсиса, а также способствует уменьшению вероятности развития острой почечной недостаточности как осложнения септического процесса [5-7]. Тем не менее, некоторые клинические врачи не решаются использовать этот современный метод лечения в связи с недостаточным пониманием клеточных механизмов, определяющих его положительные эффекты.

Апоптоз

Апоптоз предполагает активное уничтожение клеток путем активации процесса программированного умирания [8]. При обычных обстоятельствах этот процесс запускается, когда клетка повреждена и не подлежит восстановлению. Апоптоз может быть инициирован самой клеткой, окружающими ее тканями или иммунной системой [8]. Процесс апоптоза характеризуется специфическими изменениями формы и структуры клетки, включая выпячивание плазматической мембраны, нарушения симметрии и фиксации плазматической мембраны, сморщивание клетки, фрагментацию ядра, конденсацию хроматина, фрагментацию хромосомной ДНК, а также наличие апоптозных телец [9].

В конечном счете этот процесс завершается удалением продуктов распада клеток путем фагоцитоза, что предупреждает развитие воспалительной реакции и повреждение органов [9].

Пути развития апоптоза

В развитии апоптоза участвуют три различных сигнальных пути: внешний (опосредованный рецепторами смерти; англ. *death receptor, DR*) путь, внутренний (митохондриальный) путь, а также стресс-индуцированный (опосредованный эндоплазматическим ретикулумом) путь [8].

Рецепторы смерти, принимающие участие в развитии апоптоза по внешнему пути, относятся к надсемейству мембранных рецепторов фактора некроза опухоли (англ. *tumor necrosis factor, TNF*) [8]. Хотя к настоящему времени описаны несколько рецепторов смерти, Fas-антиген и TNF-рецептор 1 типа (англ. *TNF receptor 1, TNF-R1*) являются доминирующими и наиболее хорошо изученными активаторами внешнего пути апоптоза [8, 10]. В результате воздействия Fas лиганда (англ. *Fas ligand, FasL*) и TNF- α , соответственно, на Fas-антиген и TNF-R1 инициируется процесс тримеризации с образованием специфического сигнального комплекса. Кроме того, усиливается образование адаптерных белков FADD (для Fas-антигена) или TRADD (для TNF-R1) [8, 10]. Этот сигнальный комплекс способен связываться с активированными доменами прокаспазы-8, что приводит к ее активации и расщеплению [8]. Каспаза-8, в свою очередь, расщепляет каспазу-3, каспазу-6 и каспазу-7. В конечном счете, происходит расщепление ДНК с исходом в апоптоз [8]. Более того, каспаза-8 способна активировать проапоптотную молекулу BID, которая индуцирует перекрестное реагирование и развитие апоптоза по внутреннему пути [11].

Внутренний путь развития апоптоза может запускаться клеточным или митохондриальным стрессом, в том числе изменениями содержания таких веществ, как факторы роста, цитокины, стероидные гормоны, активные формы кислорода, оксид азота и белки теплового шока [8]. Такие сигналы индуцируют транслокацию проапоптотных факторов семейства Bcl-2 (BID, Bax) из цитозоля к митохондриальной мембране, где они снижают потенциал этой мембраны. При нормальных обстоятельствах представители антиапоптотного семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL) блокируют высвобождение цитохрома C из митохондрий [8]. Тем не менее, когда над антиапоптотными факторами из семейства Bcl-2 начинают преобладать проапоптотные, из митохондрий высвобождается большое количество деструктивного цитохрома C [8]. После высвобождения цитохром C соединяется с аденозинтрифосфатом, ферментом Араф и прокаспазой-9. В результате взаимодействия этих факторов образуется апоптосома, которая расщепляет и активирует каспазу-3, каспазу-6 и каспазу-7. Аналогично внешнему пути, эти каспазы обеспечивают расщепление ДНК с последующей гибелью клетки [8].

Стресс-индуцированный путь, опосредованный эндоплазматическим ретикуломом, наименее изучен. Его могут активировать различные формы клеточного стресса, например, гипоксия, окислительное повреждение, инфекция или нарушения обмена кальция [12]. Каждое из этих нарушений сопровождается накоплением развернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме. В результате, глюкозозависимый белок (78 кДа) отделяется от трех стрессовых рецепторов эндоплазматического ретикулума (PERK, ATF6, IRE1). Таким образом активируется отклик со стороны развернутого белка [12]. Диссоциация глюкозозависимого белка (78 кДа) инициирует нисходящую передачу сигнала, что приводит к: (1) прямой индукции апоптоза путем активации каспазы-12 или ее гомолога каспазы-4; (2) активации внутреннего митохондриального пути; или (3) инициации каспаза-независимой гибели клеток [12].

Влияние апоптоза на функцию тканей и органов

Выраженный апоптоз может оказывать неблагоприятное влияние на активность и функцию соответствующей ткани или органа за счет снижения критического числа жизнеспособных клеток или нарушения связи между клетками [9, 13]. При сепсисе апоптоз затрагивает разные типы клеток, что приводит к формированию различных форм органной недостаточности [9]. Это подтверждается следующими фактами: апоптоз лимфоцитов, клеток вилочковой железы и (или) селезенки приводит к иммуносупрессии; сосудистая проницаемость может нарушаться при апоптозе клеток эндотелия; сердечная недостаточность может быть каспаза-зависимой; выраженность острого повреждения легких коррелирует с интенсивностью Fas/FasL-индуцированного апоптоза альвеолоцитов [14].

Индукцированная сепсисом острая почечная недостаточность также специфически связана с активацией апоптозных механизмов в различных почечных клетках, включая клетки почечных канальцев, гломерулярные эндотелиальные клетки и подоциты [15-18]. После воздействия плазмой больных сепсисом на клетки почечных канальцев наблюдалось усиление апоптоза, воспалительные изменения, нарушения проницаемости, адгезии, а также изменения структуры канальцев [17, 19]. Кроме того, у таких пациентов проапоптозный сигнал коррелирует с выраженностью протеинурии [17]. Аналогичным образом, почечные эндотелиальные клетки, обработанные плазмой пациентов с острой почечной недостаточностью, характеризуются выраженной экспрессией Fas и апоптозом. Этот эффект можно блокировать гиперэкспрессией антиапоптозного медиатора Bcl-2 или ингибированием каспаз [20]. Более того, в рамках отдельного исследования было установлено, что как ЛПС, так и TNF- α индуцируют апоптоз в эндотелиальных клетках гломерулярного аппарата, которые необходимы для эффективной регуляции клубочковой ультрафильтрации. Это влияние является каспаза-зависимым [18]. Подоциты (или висцеральные эпителиальные клетки) участвуют в процессе клубочковой фильтрации. Апоптоз этих клеток также стимулируется плазмой больных сепсисом [19].

Активация апоптоза липополисахаридами

Механизмы стимуляции апоптоза липополисахаридами до конца не ясны. Тем не менее, некоторые данные свидетельствуют о преобладании внешнего и внутреннего путей активации. Несколько исследований отчетливо показали, что индуцированный сепсисом апоптоз почечных клеток зависит от активности каспаз. Об этом свидетельствуют результаты экспериментов с ингибиторами каспазы или мышами с дефицитом этого фактора [16, 21, 22]. Кроме того, Guo и соавт. [21] показали, что ингибирование каспазы способствует уменьшению воспалительных изменений в почечной ткани, несмотря на тот факт, что процесс апоптоза считается невоспалительным по своей природе. Следовательно, блокирование каспаза-зависимого апоптоза может уменьшить неапоптозное повреждение почек. Предполагается, что внешний путь характеризуется активацией апоптоза липополисахаридами, поскольку как ЛПС, так и TNF, синтезируемый под действием ЛПС, стимулируют экспрессию мРНК Fas и FasL в клетках почечных канальцев [23]. Таким образом, ЛПС активируют как Fas-антиген, так и TNF-R1, запуская внешний путь развития апоптоза. Кроме того, воспалительный ответ, индуцированный ЛПС, сопровождается высвобождением многочисленных цитокинов, которые способны активировать внутренний путь, оказывая влияние на баланс семейства Bcl-2 [19].

Гемоперфузия с полимиксином В и апоптоз

Поскольку апоптоз играет важную роль в развитии сепсис-индуцированной острой почечной недостаточности, а ЛПС, который является ключевым медиатором, участвующим в патогенезе сепсиса, способен инициировать апоптоз различных почечных клеток, было высказано предположение, что гемоперфузионная терапия с ПМ-В, позволяющая удалить ЛПС из кровотока больных сепсисом, способна снизить вероятность развития острой почечной недостаточности благодаря уменьшению проапоптозных эффектов [19]. Для того чтобы проверить эту гипотезу, плазму больных сепсисом, которые получали только стандартную терапию или стандартную терапию в сочетании с двумя сеансами гемоперфузии с ПМ-В, использовали для воздействия на клетки почечных канальцев и на гломерулярные подоциты.

При формировании популяции данного исследования использовались следующие критерии включения: подтвержденная или заподозренная граммотрицательная инфекция, по меньшей мере три признака синдрома системного воспалительного ответа, дисфункция по меньшей мере одного органа, и возможность рандомизации в течение 24 часов [19]. Непосредственно после подписания информированного согласия у пациентов были взяты

пробы крови (нулевая временная отметка). Пациенты, распределенные в группу терапии ПМ-В, при включении в исследование получили один сеанс гемоперфузии. Второй сеанс экстракорпоральной терапии состоялся спустя 24 часа после первого. В обеих группах взятие проб крови выполнялось через 2, 26 и 72 часа после включения в популяцию исследования. Кроме того, в течение 72-часового периода осуществлялась регистрация демографических и клинических данных.

На момент формирования популяции существенные различия между группами пациентов отсутствовали. Тем не менее, у представителей группы терапии ПМ-В было зарегистрировано значительное снижение оценки по шкале SOFA в течение 72 часов, тогда как в группе традиционной терапии сепсиса улучшения оценки по этой шкале не наблюдалось [19]. Более того, сходная динамика была отмечена при оценке по шкале RIFLE: в группе ПМ-В наблюдалось существенное улучшение, а в группе стандартной терапии положительная динамика отсутствовала. Кроме того, в группе традиционной терапии потребность в заместительной почечной терапии была значительно выше, чем в группе терапии ПМ-В [19]. В целом, результаты анализа эффектов плазмы, полученные в этом исследовании, согласуются с результатами предшествующих исследований, и подтверждают защитное влияние гемоперфузии с ПМ-В, которая предупреждает развитие острой почечной недостаточности у больных сепсисом.

Цитотоксическое влияние на почки

При помощи колориметрического анализа (ХТТ-метод) были определены жизнеспособность клеток и цитотоксичность. Результаты анализа свидетельствуют, что при воздействии на гломерулярные подоциты и канальцевые клетки плазмой больных, получавших гемоперфузию с ПМ-В, цитотоксический эффект был выражен в значительно меньшей степени, чем при использовании плазмы пациентов, которые еще не получали лечение, или плазмы больных, получавших традиционную терапию [19]. Этот эффект регистрировался непосредственно после обоих сеансов гемоперфузии, а также спустя 72 часа после включения пациентов в исследование. Такие наблюдения свидетельствуют об устойчивости эффекта гемоперфузионной терапии с ПМ-В. Тем не менее, тогда как данный анализ создает общее представление о клеточной цитотоксичности, он не уточняет характер умирания клеток.

Оценка апоптоза при помощи метода TUNEL

Для определения специфической роли апоптоза, клетки почечных канальцев, обработанные плазмой крови больных, получавших традиционную терапию сепсиса или терапию с применением ПМ-В, были исследованы при помощи метода концевое мечения 2'-дезоксидуридин-5'-трифосфата, опосредованного терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазой (англ. *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL*) (рис. 1). По сравнению с плазмой здоровых добровольцев, исходно взятая плазма крови больных сепсисом из обеих групп терапии индуцировала выраженный апоптоз канальцевых клеток [19]. Интересно, что тогда как плазма, взятая на 72 часу у пациентов, получавших стандартную терапию, продолжала индуцировать апоптоз с такой же интенсивностью, что и первоначальная проба, плазма, взятая на 72 часу у больных, которые прошли 2 сеанса гемоперфузионной терапии с ПМ-В, вызывала значительно менее выраженный апоптоз, по сравнению с исходной пробой или плазмой пациентов, получавших традиционную терапию сепсиса. Таким образом, после гемоперфузии с ПМ-В наблюдалось уменьшение апоптоза и, следовательно, увеличение защитного влияния на уровне клеток [19]. Более того, когда ПМ-В добавлялся к плазме в дозе, которая должна подавлять биологическую активность ЛПС без гибели канальцевых клеток, были обнаружены признаки апоптоза в обеих группах пациентов исходно, а также в группе традиционной терапии на 72 часу. В то же время, добавление ПМ-В не оказывало ни малейшего влияния на 72 часу в группе пациентов, получивших сеансы гемоперфузии с

ПМ-В [19]. Следовательно, защитный эффект, зарегистрированный при анализе плазмы, взятой на 72 часу у пациентов, которые получали гемоперфузионную терапию с ПМ-В, обусловлен пониженной биологической активностью ЛПС.

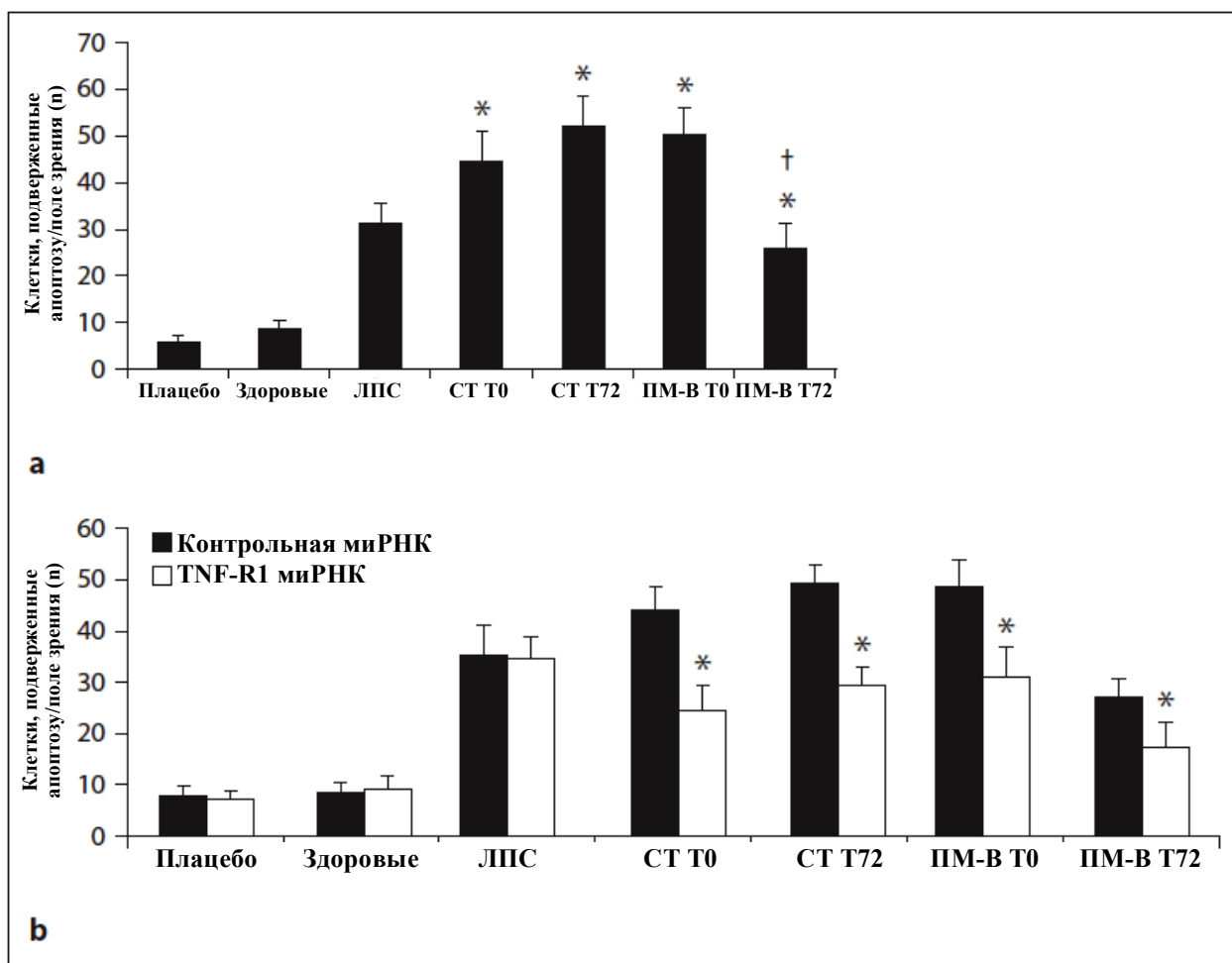


Рис. 1. а) Апоптоз канальцевых клеток (метод TUNEL), индуцированный плазмой больных сепсисом, которые получали только стандартную терапию (группа СТ) или стандартную терапию в сочетании с ПМ-В (группа ПМ-В). Все пробы плазмы, взятой у пациентов из групп СТ и ПМ-В, характеризовались значительным усилением апоптоза канальцевых клеток (* $p < 0,05$). Обработка клеток плазмой, взятой на 72 часу у больных из группы ПМ-В, способствовала значительному подавлению апоптоза по сравнению с плазмой ПМ-В, взятой исходно (T0) († $p < 0,05$). **б)** Оценка апоптоза канальцевых клеток (метод TUNEL) с применением малой интерферирующей РНК (миРНК) TNF-R1. По сравнению с контрольной миРНК, в миРНК TNF-R1 канальцевых клеток, обработанных плазмой СИ или ПМ-В, наблюдалось значительное подавление апоптоза (* $p < 0,05$).

Активность каспазы

В большинстве случаев развитие апоптоза обусловлено активацией каспаз, которые расщепляют ДНК и в конечном счете вызывают гибель клетки. Как и предполагалось, использование плазмы, исходно взятой у пациентов из группы традиционной терапии и у больных из группы терапии ПМ-В, сопровождалось усилением активности каспазы-3, каспазы-8 и каспазы-9. Следовательно, апоптоз почечных клеток, связанный с воздействием плазмы крови больных сепсисом, является каспаза-зависимым [19]. Более того, согласно результатам оценки, выполненной с помощью метода TUNEL, плазма, взятая через 72 часа после начала исследования у пациентов, которые получали стандартную терапию, индуцировала такой же уровень активности каспаз, что и плазма,

взятая исходно. В то же время, плазма, полученная от пациентов из группы терапии ПМ-В, вызывала значительно меньшую активность всех трех каспаз, по сравнению с плазмой, взятой у представителей этой группы исходно, или плазмой пациентов, которые получали традиционную терапию [19]. Хотя каспаза-3 участвует в индукции апоптоза как по внешнему, так и по внутреннему пути, тот факт, что терапия ПМ-В уменьшала активность как каспазы-8, активируемой рецепторами смерти, так и каспазы-9, которая активируется митохондриальным цитохромом С, свидетельствует, что данный метод лечения действует на оба пути развития апоптоза.

Внешний путь

Гемоперфузионная терапия с ПМ-В подавляла активность каспазы-8 у больных сепсисом. Судя по всему, этот метод лечения препятствует развитию апоптоза благодаря преимущественному воздействию на внешний путь. Как уже упоминалось в этой главе, каспаза-8 расщепляется и активируется апоптозными рецепторами смерти, а именно TNF-R1 и Fas [8]. Наша работа показала, что при весьма вероятном участии как TNF-R1, так и Fas, защитный эффект, присущий гемоперфузионной терапии с ПМ-В, вероятнее всего, обусловлен влиянием проводимого лечения на Fas-опосредованный механизм. Этот вывод основан на том наблюдении, что при блокировании TNF-R1 путем применения малой интерферирующей РНК (миРНК) наблюдалось не только значительное уменьшение проапоптозного влияния плазмы больных сепсисом, взятой исходно, но и существенное подавление апоптоза при воздействии на клетки плазмой больных, получавших терапию ПМ-В [19]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что терапия ПМ-В подавляет TNF-R1-индуцированный апоптоз, но полностью не блокирует путь передачи соответствующих сигналов. В то же время, высокий уровень экспрессии Fas на канальцевых клетках, зарегистрированный после воздействия плазмой больных сепсисом, существенно снижался, когда тестировалась плазма пациентов, получавших гемоперфузионную терапию на основе ПМ-В [19]. Это говорит о более значимой роли Fas-опосредованной передачи сигнала в реализации механизмов, с которыми связан защитный эффект терапии ПМ-В.

Внутренний путь

Хотя ЛПС играют большую роль в активации внешнего пути формирования апоптоза, изменения активности каспазы-9, зарегистрированные у больных сепсисом на фоне гемоперфузионной терапии с ПМ-В, свидетельствуют о дополнительном значении этого вида лечения для внутреннего пути [8]. Поскольку активация апоптоза по внутреннему пути зависит от баланса проапоптозных и антиапоптозных представителей семейства Bcl, в рамках нашего исследования было определено соотношение проапоптозного белка Bax к антиапоптозному белку Bcl-2 [19]. Результаты анализа свидетельствуют, что тогда как плазма больных сепсисом, получавших традиционную терапию, способствовала увеличению соотношения Bax/Bcl-2 за 72-часовой период, плазма пациентов, которые получали гемоперфузионную терапию с ПМ-В, характеризовалась значительно меньшим соотношением Bax/Bcl-2 [19]. Это наблюдение свидетельствует о связи ПМ-В-опосредованного увеличения жизнеспособности клеток с внутренним путем развития апоптоза.

Дополнительные механизмы, не связанные с апоптозом

Улучшение исхода сепсиса на фоне гемоперфузионной терапии с ПМ-В может быть связано с дополнительными клеточными механизмами, помимо влияния на процесс апоптоза, например, с нарушением ориентации клеток, улучшением реабсорбционной способности, уменьшением воспаления и проницаемости [19, 24-26].

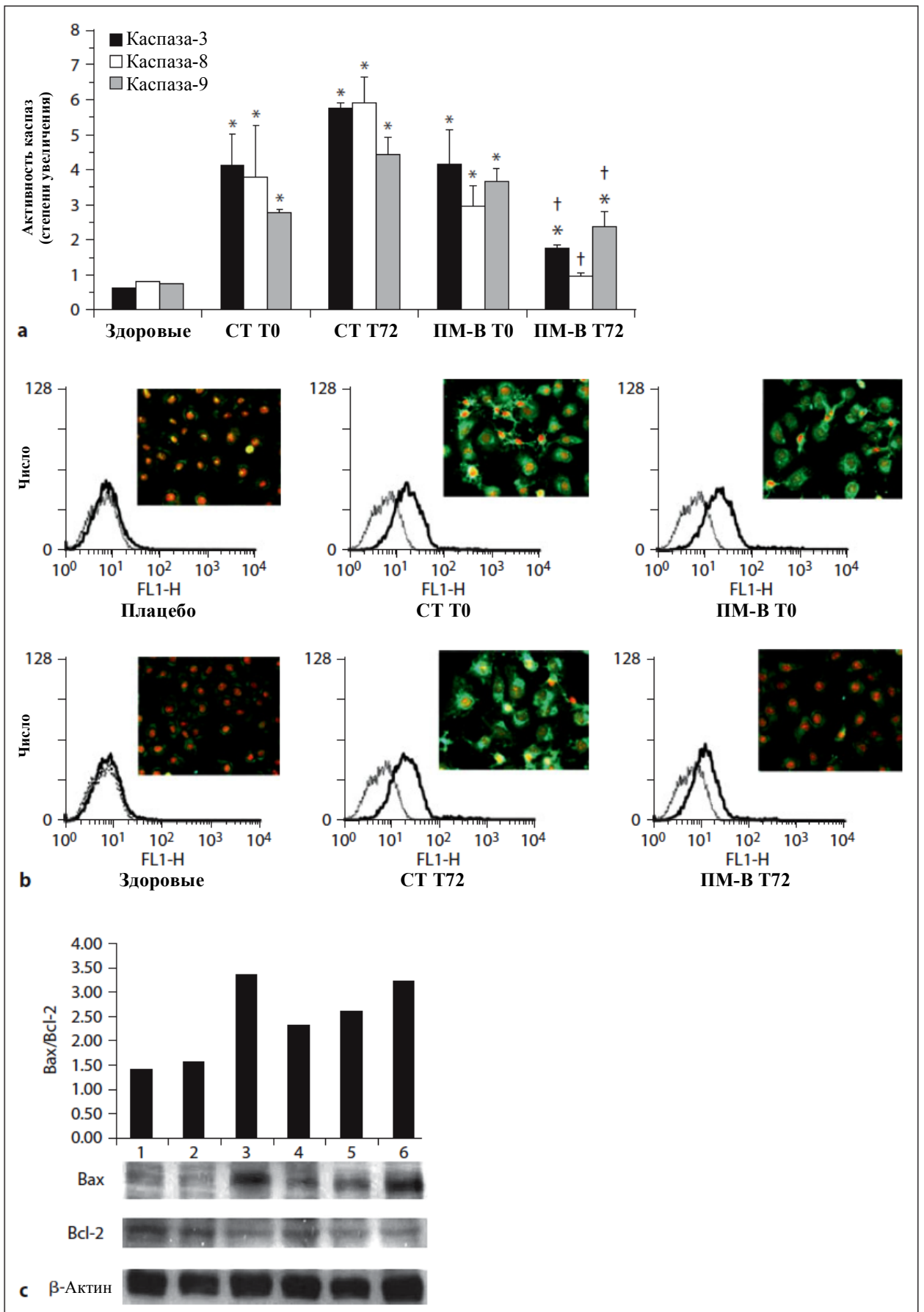
Правильная структура почечных канальцев основана на правильной базально-апикальной ориентации соответствующих клеток. В результате обработки канальцевых клеток

плазмой больных сепсисом, эти клетки изменяли свою ориентацию, что нарушало структуру почечных канальцев. Тем не менее, при обработке плазмой больных, получавших гемоперфузионную терапию ПМ-В, клетки почек соединялись с матриксом, а это, в свою очередь, приводило к восстановлению структуры почечных канальцев [19].

Важная функция канальцевых клеток состоит в реабсорбции фильтрованных клубочками низкомолекулярных белков и молекул, что предупреждает их выведение с мочой. Мегалин - это один из транспортных рецепторов, который был обнаружен на внутренней поверхности проксимальных почечных канальцев [25]. Согласно результатам нашего исследования, обработка канальцевых клеток плазмой больных сепсисом приводила к значительному подавлению экспрессии мегалина. В то же время, после воздействия плазмой крови больных, получавших гемоперфузионную терапию с ПМ-В, уровень мегалина был таким же, как при использовании плазмы здоровых добровольцев [19], что говорит о полном устранении нарушений процесса реабсорбции.

В целом, повреждение почечных клеток зачастую характеризуется воспалением и увеличением проницаемости клеточной стенки [24, 26]. Нарушения экспрессии CD40, ICAM-1, V7-1 и нефрина, а также различия в показателях резистентности и проницаемости для альбумина были зарегистрированы как в канальцевых клетках, так и в гломерулярных подоцитах после воздействия на них плазмой больных сепсисом [19]. Обработка почечных клеток плазмой больных, получавших терапию ПМ-В, сопровождалась значительно меньшим воспалением и менее выраженным увеличением проницаемости [19]. Таким образом, лучшие исходы сепсиса, зарегистрированные у больных, которые получали гемоперфузионную терапию с ПМ-В, могут быть связаны с влиянием этого вида лечения на вышеописанные механизмы.

Рис. 2. а) Оценка влияния каспазы-3, каспазы-8 и каспазы-9 на канальцевые клетки, культивированные в присутствии плазмы больных сепсисом, которые получали только стандартную терапию (группа СТ) или стандартную терапию в сочетании с ПМ-В (группа ПМ-В), выполненная при помощи метода твердофазного иммуноферментного анализа (англ. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*). Плазма, взятая у пациентов из групп СТ и ПМ-В, индуцировала увеличение активности всех каспаз (* $p < 0,05$, в сравнении с плазмой здоровых добровольцев). По сравнению с плазмой ПМ-В T0, при использовании плазмы ПМ-В T72 было зарегистрировано значительное снижение активности всех каспаз ($^{\dagger} p < 0,05$, ПМ-В T72 в сравнении с ПМ-В T0). Тем не менее, активность каспазы-3 и каспазы-9 оставалась при таких условиях существенно повышенной по сравнению с активностью, зарегистрированной при обработке клеток плазмой здоровых людей (* $p < 0,05$, ПМ-В T72 в сравнении с плазмой здоровых добровольцев). **б)** Изображения, отражающие экспрессию Fas (CD95) на канальцевых клетках, полученные методом атомно-флуоресцентной спектроскопии и иммунофлуоресценции. Обработка клеток плазмой ПМ-В T0, СТ T0 и СТ T72 характеризовалась выраженной активацией Fas. Тем не менее, активация Fas существенно уменьшалась в присутствии плазмы ПМ-В T72. Увеличение: 400 \times . **в)** Репрезентативный иммуноблоттинг митохондриальных белков Bax и Bcl-2 в канальцевых клетках, и соответствующий денситометрический анализ, результаты которого выражены соотношением Bax/Bcl-2. Плазма ПМ-В T0, СТ T0 и СТ T72 способствовала значительному увеличению соотношения Bax/Bcl2. Тем не менее, это соотношение снижалось в присутствии плазмы ПМ-В T72 (1 столбец - плацебо; 2 столбец - здоровые добровольцы; 3 столбец - ПМ-В T0; 4 столбец - ПМ-В T72; 5 столбец - СТ T0; 6 столбец - СТ T72).



Вспомогательные данные, зарегистрированные в рамках экспериментов, выполненных с участием лабораторных животных

Результаты недавно завершеного исследования, в основе которого лежала модель лигирования и перфорации слепой кишки крыс линии Sprague-Dawley, подтверждают способность гемоперфузии с ПМ-В уменьшать проапоптотное влияние на ткань почек [27]. В рамках этого исследования крысам перевязали и перфорировали слепую кишку для того чтобы вызвать сепсис. Спустя 24 часа после лигирования слепой кишки крыс подвергли сеансу гемоперфузии с ПМ-В, продолжительность которого составила 1 час [27]. Через час после завершения сеанса экстракорпоральной терапии животные были умерщвлены. Затем при помощи метода TUNEL оценивалась выраженность апоптоза в ткани легких, печени и почек [27]. Результаты анализа свидетельствуют, что у крыс, которые получили терапию ПМ-В, выраженность апоптоза в клетках почечных канальцев была значительно ниже, чем у животных из контрольной группы [27]. В то же время, гемоперфузионная терапия с ПМ-В не сопровождалась выраженным влиянием на процесс апоптоза в ткани легких или печени [27]. Это может быть связано с временем выполнения оценки или с тем фактом, что терапия ПМ-В не использовалась в течение первых 24 часов после лигирования и перфорации слепой кишки. Таким образом, результаты этого исследования отчетливо демонстрируют влияние терапии ПМ-В на апоптоз почечных клеток, однако нельзя исключить, что этот метод лечения также способен воздействовать на процесс апоптоза в других органах.

Общие выводы

Апоптоз играет важную роль в развитии полиорганной недостаточности и, в частности, острой почечной недостаточности у больных сепсисом. При сепсисе ЛПС циркулирующей крови способны активировать процесс программированного умирания клеток. Следовательно, удаление ЛПС путем гемоперфузии с ПМ-В может оказывать положительное влияние на функцию почек и общий исход благодаря подавлению системной проапоптотной активности. Последние экспериментальные исследования, наряду с результатами оценки канальцевых клеток и гломерулярных подоцитов, подтверждают роль апоптоза в комплексе клеточных механизмов, которые изменяются под действием терапии ПМ-В, что, в свою очередь, приводит к уменьшению вероятности развития острой почечной недостаточности. Благодаря пониманию механизмов, определяющих положительное влияние гемоперфузионной терапии с ПМ-В, мы можем расширить клиническое применение этого метода, в частности, для лечения больных из группы риска.

Ссылки

1. Dremsizov TT, Kellum JA, Angus DC: Incidence and definition of sepsis and associated organ dysfunction. *Int J Artif Organs* 2004;27:352-359.
2. Schrier RW, Wang W: Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004;351:159-169.
3. Cunningham PN, Wang Y, Guo R, He G, Quigg RJ: Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. *J Immunol* 2004;172:2629-2635.
4. Salomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes ML, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O: TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock* 2008;30(Suppl 1):73-77.
5. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, Foltran F, Brienza N, Donati A, Malcangi V, Petrini F, Volta G, Bobbio Pallavicini FM, Rottoli F, Giunta F, Ronco C: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301:2445-2452.
6. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, de Cal M, Polanco N, Corradi V, Lentini P, Nalesso F, Ueno T, Ranieri VM, Ronco C: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care* 2007;11:R47.
7. Nakamura T, Kawagoe Y, Matsuda T, Ueda Y, Koide H: Effects of polymyxin B immobilized fiber on urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in patients with severe sepsis. *ASAIO J* 2004;50:563-567.

8. Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A: The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 2007;8:493-500.
9. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999;27:1230-1251.
10. Sheikh MS, Huang Y: Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle* 2003;2:550-552.
11. Strasser A, Jost PJ, Nagata S: The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009;30:180-192.
12. Kim I, Xu W, Reed JC: Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:1013-1030.
13. Hotchkiss RS, Nicholson DW: Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006;6:813-822.
14. Papathanassoglou ED, Moynihan JA, Ackerman MH: Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? a review and a theoretical framework. *Crit Care Med* 2000;28:537-549.
15. Taguchi T, Uchida H, Kiyokawa N, Mori T, Sato N, Horie H, Takeda T, Fujimoto J: Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived cells. *Kidney Int* 1998;53:1681-1688.
16. Ueda N, Kaushal GP, Shah SV: Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am J Med* 2000;108:403-415.
17. Mariano F, Cantaluppi V, Stella M, Romanazzi GM, Assenzio B, Cairo M, Biancone L, Triolo G, Ranieri VM, Camussi G: Circulating plasma factors induce tubular and glomerular alterations in septic burns patients. *Crit Care* 2008;12:R42.
18. Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J: Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1999;55:2322-2337.
19. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D, Romanazzi GM, Pacitti A, Lanfranco G, Puntorieri V, Martin EL, Mascia L, Monti G, Casella G, Segoloni GP, Camussi G, Ranieri VM: Polymyxin-B hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. *Intensive Care Med* 2008;34:1638-1645.
20. Mitra D, Kim J, MacLow C, Karsan A, Laurence J: Role of caspases 1 and 3 and Bcl-2-related molecules in endothelial cell apoptosis associated with thrombotic microangiopathies. *Am J Hematol* 1998;59: 279-287.
21. Guo R, Wang Y, Minto AW, Quigg RJ, Cunningham PN: Acute renal failure in endotoxemia is dependent on caspase activation. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3093-3102.
22. Wang W, Faubel S, Ljubanovic D, Mitra A, Falk SA, Kim J, Tao Y, Soloviev A, Reznikov LL, Dinarello CA, Schrier RW, Edelstein CL: Endotoxemic acute renal failure is attenuated in caspase-1-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F997-F1004.
23. Ortiz-Arduan A, Danoff TM, Kalluri R, Gonzalez-Cuadrado S, Karp SL, Elkon K, Egido J, Neilson EG: Regulation of Fas and Fas ligand expression in cultured murine renal cells and in the kidney during endotoxemia. *Am J Physiol* 1996;271:F1193-F1201.
24. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi MP, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H, Kalluri R, Sharpe AH, Kreidberg JA, Mundel P: Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 2004;113:1390-1397.
25. Christensen EI, Birn H: Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F562-F573.
26. De Gaudio AR, Adembri C, Grechi S, Novelli GP: Microalbuminuria as an early index of impairment of glomerular permeability in postoperative septic patients. *Intensive Care Med* 2000;26:1364-1368.
27. Ito M, Kase H, Shimoyama O, Takahashi T: Effects of polymyxin B-immobilized fiber using a rat cecal ligation and perforation model. *ASAIO J* 2009;55:246-250.

Эрика Л. Мартин

Dipartimento di Anestesiologia e Rianimazione, Università di Torino

Ospedale S. Giovanni Battista-Molinette

Corso A. M. Дольотти 14, IT-10126, г. Турин (Италия)

Телефон: +39 011 633 4005. Факс: +39 011 696 0448.

Электронная почта: ericaleanne.martin@unito.it

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 77-82

Гемоперфузия с полимиксином В и удаление эндотоксина: обзор литературы

Динна Н. Круз^{а,в} · Массимо де Каль^{а,в} · Паскаль Пиччинни^б · Клаудио Ронко^{а,в}

^а Отделение нефрологии, диализа и трансплантации, больница Сан-Бортоло, г. Виченца, Италия

^б Отделение анестезиологии и интенсивной терапии, больница Сан-Бортоло, г. Виченца, Италия

^в Международный научно-исследовательский институт нефрологии, г. Виченца, Италия

Реферат

При сепсисе наблюдается сложное взаимодействие между бактериальными токсинами и иммунной системой организма хозяина. Эндотоксин - это компонент наружной оболочки грамотрицательных бактерий, который участвует в патогенезе сепсиса. Он стимулирует выработку провоспалительных цитокинов и активирует систему комплемента. Таким образом, эндотоксин является идеальной мишенью для терапевтического вмешательства при сепсисе. Прямая гемоперфузия с применением полимиксина В, иммобилизованного на волокнах сорбционной колонки (PMX-F), обеспечивает связывание и нейтрализацию эндотоксина как *in vitro*, так и *in vivo*. Следовательно, экстракорпоральная терапия PMX-F может прервать биологический каскад при сепсисе. Систематический обзор научной литературы подтвердил положительное влияние PMX-F на уровень артериального давления, объем вводимого допамина и добутамина, соотношение PaO₂/FiO₂, удаление эндотоксина и показатели смертности. Тем не менее, необходимо отметить, что качество многих исследований не было оптимальным, поэтому нельзя исключить некоторое преувеличение описанных эффектов. После выполнения данного мета-анализа были опубликованы другие исследования, в том числе многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование септического шока при абдоминальной инфекции. В этом исследовании было показано, что использование PMX-F в дополнение к традиционной терапии оказывало существенное положительное влияние на гемодинамику и функцию отдельных органов, а также способствовало снижению 28-дневной смертности в целевой популяции. В настоящее время существует отчетливое биологическое основание для удаления эндотоксина при тяжелом сепсисе и септическом шоке. Литературные данные служат дополнительным подтверждением целесообразности клинического применения этого метода, а также создают основу для проведения дальнейших исследований в этой области.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Сепсис характеризуется чрезмерным системным воспалительным ответом и вторичной дисфункцией иммунной системы. Это заболевание является основной причиной смерти больных в отделениях интенсивной терапии. Распространенность сепсиса в Соединенных Штатах Америки достигает 750000 случаев в год при уровне смертности от 25 до 80% [1]. При сепсисе наблюдается сложное взаимодействие между бактериальными токсинами и иммунной системой организма хозяина. В патогенезе сепсиса участвует эндотоксин, который является компонентом наружной оболочки грамотрицательных бактерий. Он стимулирует выработку провоспалительных цитокинов, включая TNF-α и IL-1, которые

выполняют роль медиаторов при воспалительном ответе и повреждении органов [2, 3]. Кроме того, эндотоксин активирует систему комплемента и факторы свертывания крови, поэтому его можно рассматривать как идеальную мишень для терапевтического вмешательства при септическом шоке [2]. Учитывая недостаточную клиническую пользу антиэндотоксиновой и антицитокиновой терапии, интерес ученых переключился на экстракорпоральные методы лечения сепсиса, которые позволяют уменьшить уровень медиаторов септического процесса в системном кровотоке.

Полимиксин В (ПМ-В или PMX) - это катионный циклический полипептидный антибиотик, который обладает высокой степенью сродства к эндотоксину. ПМ-В способен связываться с эндотоксином и нейтрализовать его эффекты. Однако, этому антибактериальному препарату свойственны выраженное нефротоксическое и нейротоксическое действие, что исключает его системное применение. В связи с этим, был разработан адсорбирующий картридж, в котором ПМ-В ковалентно связан с полистироловыми волокнами (PMX-F) [4]. Это устройство эффективно использует способность ПМ-В нейтрализовать эндотоксины, тогда как системная токсичность препарата сводится к минимуму. Прямая гемоперфузия с помощью колонки PMX-F обеспечивает связывание и нейтрализацию эндотоксина как *in vitro*, так и *in vivo* [4]. Следовательно, экстракорпоральная терапия с применением PMX-F может уменьшить концентрацию эндотоксина в системном кровотоке, и, возможно, прервать биологический каскад сепсиса. С 1994 года колонка PMX-F применяется в клинических условиях в Японии для лечения пациентов с эндотоксемией, больных с подозрением на инфекционный процесс, вызванный грамотрицательными микроорганизмами, при условии соответствия критериям синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), а также пациентов с септическим шоком, которым необходимо введение вазопрессоров. Производителем колонки PMX-F заявлено, что с 1994 года специфическое лечение прошли более 70000 больных [Торэй Индастриз, неопубликованные данные].

Систематический обзор литературы

В рамках нескольких исследований было продемонстрировано эффективное удаление эндотоксина при помощи колонки PMX-F, наряду с угнетением выработки TNF- α . Тем не менее, несмотря на подтвержденную способность снижать уровень эндотоксина в крови, влияние этого вида терапии на клинические показатели до сих пор точно не определено. Результаты ранних исследований свидетельствуют о том, что терапия с помощью колонки PMX-F характеризуется эффективным снижением уровня эндотоксина, а также оказывает некоторое положительное влияние на уровень артериального давления, объем вводимых вазопрессоров, газообмен и краткосрочную смертность. Однако, многие исследования были небольшими и обладали недостаточной мощностью, поэтому их результаты не позволяют сделать окончательные выводы. В 2007 году мы выполнили систематический обзор доступной клинической литературы и собрали сведения об эффективности PMX-F при сепсисе [5, 6]. Выполненный мета-анализ охватил 9 рандомизированных контролируемых исследований, а также 19 обсервационных исследований, в которых приняли участие более 1400 пациентов, получавших лечение в 7 странах. Результаты этого мета-анализа, а также результаты отдельных исследований кратко представлены далее.

По данным 9 рандомизированных контролируемых исследований и 10 обсервационных исследований, на фоне терапии с помощью PMX-F уровень эндотоксина в кровотоке больных снижался на 33-80% по сравнению с исходными показателями [6]. В результате терапии PMX-F, помимо уменьшения концентрации эндотоксина, наблюдалось снижение уровня некоторых других медиаторов, таких как IL-6 [7-9], IL-10 [8, 9], IL-18 [10], TNF- α [9, 11], металлопротеиназа-9 [12], ингибитор активатора плазминогена-1 [9, 11, 13, 14], нейтрофил-эластаза [13, 14], тромбоцитарный фактор-4 [15], β -тромбоглобулин [15],

растворимый Р-селектин [15], а также эндогенных каннабиноидов, например, анандамида [16].

Влияние терапии РМХ-Ф на функцию легких было изучено в рамках объединенного анализа результатов 7 исследований [6]. В целом, после гемоперфузии с помощью РМХ-Ф соотношение PaO_2/FiO_2 возрастало на 32 единицы (95% доверительный интервал [ДИ]: 23-41 единица), что свидетельствует об улучшении функции легких. Это наблюдение подтвердилось и в последующих исследованиях. Терапия РМХ-Ф оказывала положительное влияние на соотношение PaO_2/FiO_2 больных с острым легочным повреждением и острым респираторным дистресс синдромом на фоне сепсиса [17]. Судя по всему, этот эффект был связан с уменьшением концентрации нейтрофил-эластазы и IL-8 в крови [13].

Что касается влияния специфической терапии на гемодинамические показатели, то уровень среднего артериального давления после терапии РМХ-Ф возрастал в среднем на 26% (диапазон: от 14 до 42%) [6]. Средняя взвешенная разница достигала 19 мм рт. ст. (95% ДИ: 15-22 мм рт. ст.). Выраженность положительного влияния на уровень среднего артериального давления зависела от тяжести гипотензии. У пациентов с меньшим исходным уровнем артериального давления, на фоне терапии РМХ-Ф наблюдалось более выраженное увеличение среднего артериального давления [6]. Более того, в рамках нескольких исследований было продемонстрировано снижение дозы допамина и добутамина после терапии РМХ-Ф [7, 18-20].

Уровень смертности в объединенной группе пациентов, получавших традиционную терапию, достигал 61,5%, тогда как в группе больных, которые прошли курс терапии РМХ-Ф, этот показатель соответствовал 33,5% [6]. По данным объединенной оценки, терапия ПМ-В способствовала значительному снижению уровня смертности по сравнению с традиционными методами лечения сепсиса (относительный риск [ОР]: 0,53; 95% ДИ: 0,43-0,65). Результаты рандомизированных контролируемых исследований (ОР: 0,50; ДИ: 0,37-0,68) и нерандомизированных контролируемых исследований (ОР: 0,55; 95% ДИ: 0,38-0,81) оказались сходными. Тем не менее, необходимо отметить, что дизайн очень немногих исследований, включенных в анализ, предполагал специфическую оценку показателей смертности.

Таким образом, данный систематический обзор научной литературы выявил положительное влияние терапии РМХ-Ф на уровень артериального давления, объем применения допамина (добутамина), соотношение PaO_2/FiO_2 , удаление эндотоксина и уровень смертности больных [6]. Необходимо особо отметить, что многие исследования, включенные в данный обзор, характеризовались недостаточным качеством, поэтому нельзя исключить некоторое преувеличение описанных эффектов.

После систематического обзора

После публикации результатов мета-анализа, в литературе появились сведения о дополнительных исследованиях гемоперфузии с РМХ-Ф. Некоторые из этих исследований подтверждают гемодинамические эффекты, описанные в мета-анализе, указывая на улучшение показателей артериального давления и (или) уменьшение дозы вазопрессоров [21-23]. Далее коротко описываются результаты четырех таких исследований.

В 2007 году Santaluppi и соавт. [21] изучили потенциальную способность гемоперфузии с РМХ-Ф предупреждать или уменьшать выраженность острой почечной недостаточности, осложнившей течение сепсиса. Шестнадцать больных граматрицательным сепсисом были в случайном порядке распределены в группы только традиционной терапии сепсиса (согласно рекомендациям кампании по борьбе с сепсисом; англ. *surviving sepsis campaign*) или стандартной терапии в сочетании с РМХ-Ф. В рамках этого небольшого исследования была выполнена оценка жизнеспособности клеток, выраженности апоптоза, полярности,

морфогенеза и целостности эпителиальных структур. В оценку были включены канальцевые клетки и гломерулярные подоциты, культивированные в присутствии плазмы крови больных из обеих групп. Результаты исследования свидетельствуют, что терапия PMX-F способствует снижению проапоптозной активности плазмы больных сепсисом за счет модулирования активности Fas и каспазы, а также регуляции соотношения Вах/Vcl-2. Кроме того, плазма больных, которые прошли терапию PMX-F, противодействовала нарушениям полярности и проницаемости клеточных структур, индуцированным септической плазмой. Выраженность протеинурии и уровень канальцевых ферментов в моче также значительно снижались после терапии PMX-F, тогда как традиционная терапия сепсиса не обладала подобным влиянием. Эти интригующие результаты подготовили почву для исследования роли эндотоксина в остром повреждении почек при сепсисе.

При помощи иммуноцитохимического метода и электронной микроскопии в своем недавнем исследовании Nishibori и соавт. [24] продемонстрировали удаление активированных моноцитов из периферической крови больных сепсисом при помощи колонки PMX-F. Картридж PMX-F способен связывать не только свободный липополисахарид плазмы крови, но и моноциты, иммунореактивные по отношению к CD14 и CD68. Эти клетки ответственны за активацию сигнальной функции толл-подобных рецепторов 4 типа с последующим высвобождением медиаторов воспаления. Авторы полагают, что удаление активированных моноцитов из кровотока больных сепсисом может оказывать положительное влияние благодаря уменьшению взаимодействия между моноцитами и функционально связанными с ними клетками, включая клетки эндотелия.

Результаты исследования EUPHAS (англ. *Early Use of Polymyxin B Hemoperfusion in Abdominal Septic Shock*; раннее применение гемоперфузии с полимиксином В при абдоминальном септическом шоке) также были опубликованы недавно [22]. Они подробно обсуждаются Antonelli и соавт. (см. стр. 77-84). Исследование EUPHAS уникально тем, что в нем участвовали пациенты с предположительно высоким уровнем эндотоксина в крови, у которых была возможна эффективная хирургическая ликвидация очага инфекции. Шестьдесят четыре хирургических пациента с тяжелым абдоминальным сепсисом или септическим шоком были в случайном порядке распределены в группы только традиционной терапии или традиционной терапии в сочетании с двумя сеансами гемоперфузии с PMX-F. Помимо положительного влияния на гемодинамические показатели, судя по всему, терапия PMX-F также способствовала уменьшению органной дисфункции (согласно шкале последовательной оценки органной недостаточности; англ. *Sequential Organ Failure Assessment, SOFA*) и уменьшению уровня 28-дневной смертности (некорригированное отношение рисков [ОР]: 0,43, 95% ДИ: 0,20-0,94; корригированное ОР: 0,36, 95% ДИ: 0,16-0,80). Авторы рекомендовали выполнить дополнительные многоцентровые исследования для того, чтобы подтвердить эти многообещающие результаты.

Пациенты, которые перенесли трансплантацию органов, представляют собой интересный объект для исследований в связи с нарушенной функцией иммунной системы и повышенным риском развития инфекции, особенно в течение первых месяцев после трансплантации. Распространенность септического шока среди больных, перенесших трансплантацию паренхиматозного органа, составляет 14%, а смертность, связанная с этим состоянием, достигает 54% [25]. Ruberto и соавт. [23] изучили клинические эффекты прямой гемоперфузии с ПМ-В в популяции пациентов, у которых после трансплантации паренхиматозного органа развился сепсис или септический шок. Пятнадцать пациентов, у которых спустя некоторое время после трансплантации почки или печени появились признаки тяжелого грамтрицательного сепсиса или септического шока, прошли 3 сеанса терапии PMX-F. Подобно результатам, представленным в систематическом обзоре, в

данном исследовании у пациентов, получивших три сеанса гемоперфузии, наблюдался рост уровня среднего артериального давления по сравнению с исходными показателями ($с\ 63 \pm 5$ до 83 ± 4 мм рт. ст.), тогда как доза добутамина (от $7,5 \pm 3$ до 3 ± 2 мкг/кг/мин) и норадреналина (от $1,3 \pm 0,45$ до $0,05 \pm 0,02$ мкг/кг/мин) снизилась. Соотношение PaO_2/FiO_2 возросло (от $234 \pm 38,47$ до $290 \pm 107,48$ мм рт. ст.). Авторы пришли к заключению, что применение РМХ-F в сочетании с традиционными методами терапии может служить серьезным подспорьем при лечении сепсиса, развившегося на фоне перенесенной трансплантации паренхиматозного органа.

Резюме

В настоящее время существует отчетливое биологическое основание для удаления эндотоксина при тяжелом сепсисе и септическом шоке. Современные литературные данные служат дополнительным подтверждением целесообразности клинического применения этого метода, а также создают основу для проведения дальнейших исследований в этой области. При проведении дальнейших исследований планируется использовать методы определения активности эндотоксина, которые помогут с выбором пациентов и формированием популяции.

Ссылки

1. Angus D, Wax R: Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29:S109-S116.
2. Manocha S, Feinstein D, Kumar A, Kumar A: Novel therapies for sepsis: antiendotoxin therapies. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:1795-1812.
3. Kim JH, Kim SJ, Lee IS, Lee MS, Uematsu S, Akira S, Oh KI: Bacterial endotoxin induces the release of high mobility group box 1 via the IFN- β signaling pathway. *J Immunol* 2009;182:2458-2466.
4. Shoji H: Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin) *Ther Apher Dial* 2003;7:108-114.
5. Cruz DN, Bellomo R, Ronco C: Clinical effects of polymyxin B-immobilized fiber column in septic patients. *Contrib Nephrol* 2007;156:444-451.
6. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, de Cal M, Polanco N, Corradi V, Lentini P, Nalesso F, Ueno T, Ranieri VM, Ronco C: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Critical Care* 2007;11:R47.
7. Suzuki H, Nemoto H, Nakamoto H, Okada H, Sugahara S, Kanno Y, Moriwaki K: Continuous hemodiafiltration with polymyxin B immobilized fiber is effective in patients with sepsis syndrome and acute renal failure. *Ther Apher* 2002;6:234-240.
8. Ono S, Tsujinamoto H, Matsumoto A, Ikuta S, Kinoshita M, Michizuki H: Modulation of human leukocyte antigen-DR on monocytes and CD16 on granulocytes in patients with polymyxin B immobilized fiber. *Am J Surg* 2004;188:150-156.
9. Tani T, Hanasawa K, Kodama M, Imaizumi H, Yonekawa M, Saito M, Ikeda T, Yagi Y, Takayama K, Amano I: Correlation between plasma endotoxin, plasma cytokines, and plasminogen activator inhibitor-1 in septic patients. *World J Surg* 2001;25:660-668.
10. Nakamura T, Ebihara I, Shoji H, Ushiyama C, Suzuki S, Koide H: Treatment with polymyxin B-immobilized fiber reduces platelet activation in septic shock patients: decrease in plasma levels of soluble P-selectin, platelet factor-4 and betathromboglobulin. *Inflamm Res* 1999;48:171-175.
11. Ikeda T, Ikeda K, Nagura M, Taniuchi H, Matsushita M, Kiuchi S, Kuroki Y, Suzuki K, Matsuno N: Clinical evaluation of PMX-DHP for hypercytokinemia caused by septic multiple organ failure. *Ther Apher Dial* 2004;8:293-298.
12. Nakamura X Kawagoe Y, Matsuda X Shoji H, Ueda Y, Tamura N, Ebihara I, Koide H: Effect of polymyxin B-immobilized fiber on blood metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in acute respiratory distress syndrome patients. *Blood Purif* 2004;22:256-260.
13. Kushi H, Miki T, Okamoto K, Nakahara J, Saito T, Tanjoh K: Early haemoperfusion with an immobilized polymyxin B fiber column eliminates humoral mediators and improves pulmonary oxygenation. *Critical Care* 2005;9:R653-R661.

14. Kushi H, Nakahara J, Miki T, Okamoto K, Saito T, Tanjo K: Hemoperfusion with an immobilized polymyxin B fiber column inhibits activation of vascular endothelial cells. *Ther Apher Dial* 2005;9:303-307.
15. Nemoto H, Nakamoto H, Okada H, Sugahara S, Moriwaki K, Arai M, Kanno Y, Suzuki H: Newly developed polymyxin B-immobilized fibers improve the survival of patients with sepsis. *Blood Purif* 2001;19:361-369.
16. Wang Y, Liu Y, Sarker KP, Nakashima M, Serizawa T, Kishida A, Akashi M, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I: Polymyxin B binds to anandamide and inhibits its cytotoxic effect. *FEBS Lett* 2000;470:151-155.
17. Suyama H, Kawasaki Y, Morikawa S, Kaneko K, Yamanoue T: Hiroshima: Early induction of PMX-DHP improves oxygenation in severe sepsis patients with acute lung injury. *J Med Sci* 2008;57:79-84.
18. Tojimbara T, Sato S, Nakajima I, Fuchinoue S, Akiba T, Teraoka S: Polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion after emergency surgery in patients with chronic renal failure. *Ther Apher Dial* 2004;8:286-292.
19. Uriu K, Osajima A, Kamochi M, Watanabe H, Aibara K, Kaizu K: Endotoxin removal by direct hemoperfusion with an adsorbent column using polymyxin B-immobilized fiber ameliorates systemic circulatory disturbance in patients with septic shock. *Am J Kidney Dis* 2002;39:937-947.
20. Kojika M, Sato N, Yaegashi Y, Suzuki Y, Suzuki K, Nakae H, Sigeatu Endo S: Endotoxin adsorption therapy for septic shock using polymyxin B-immobilized fibers (PMX): evaluation by high-sensitivity endotoxin assay and measurement of the cytokine production capacity. *Ther Apher Dial* 2006;10:12-18.
21. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D, et al: Polymyxin-B hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. *Intensive Care Med* 2008;34:1638-1645.
22. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301: 2445-2452.
23. Ruberto F, Pugliese F, D'Alio A, et al: Clinical effects of direct hemoperfusion using a polymyxin-B immobilized column in solid organ transplanted patients with signs of severe sepsis and septic shock. A pilot study. *Int J Artif Organs* 2007;30:915-922.
24. Nishibori M, Takahashi HK, Katayama H, et al: Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin B-immobilized filter column. *Acta Med Okayama* 2009;63:65-69.
25. Candel FJ, Grima E, Matesanz M, et al: Bacteremia and septic shock after solid organ transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:4097-4099.

Динна Н. Круз, доктор медицины, магистр здравоохранения
 Отделение нефрологии, диализа и трансплантации, больница Сан-Бортоло
 Виале Родольфи 37
 IT-36100, г. Виченца (Италия)
 Телефон: +39 0 444993869. Факс: +39 0 444993949.
 Электронная почта: dinnacruzmd@yahoo.com

Удаление эндотоксина при септическом шоке в клинических условиях

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 83-90

Удаление эндотоксина в клинической практике при помощи полимиксина В: результаты исследования EUPHAS

Массимо Антонелли^а · Роберто Фумагалли^б · Динна Н. Круз^{в,г} · Никола Бриенза^д · Франческо Гьюнта^е от лица исследовательской группы EUPHAS

^а Отделение интенсивной терапии и анестезиологии, Католический университет Пресвятого Сердца, г. Рим, Италия

^б Отделение анестезиологии и интенсивной терапии, Университет Милано-Бикокка, больница Св. Герардо, г. Монца, Италия

^в Отделение нефрологии, диализа и трансплантации, больница Сан-Бортоло, г. Виченца, Италия

^г Международный научно-исследовательский институт нефрологии, г. Виченца, Италия

^д Отдел неотложной помощи и трансплантации органов, Отделение анестезиологии и интенсивной терапии, Университет г. Бари, г. Бари, Италия

^е Отделение хирургии, Университет г. Пиза, г. Пиза, Италия

Исследовательская группа EUPHAS: Динна Н. Круз, магистр здравоохранения; Массимо Антонелли, доктор медицины; Роберто Фумагалли, доктор медицины; Франческа Фолтран, доктор медицины; Никола Бриенза, доктор медицины, доктор наук; Абеле Донати, доктор медицины; Винченцо Малканги, доктор медицины; Флавиа Петрини, доктор медицины; Гида Вольта, доктор медицины; Франко М. Боббио Паллавичини, доктор медицины; Федерика Роттоли, доктор медицины; Франческо Гьюнта, доктор медицины; Клаудио Ронко, доктор медицины.

Реферат

Картридж с полимиксином В - это медицинское устройство, предназначенное для уменьшения концентрации эндотоксина в крови больных сепсисом. Абдоминальный сепсис, вызванный грамотрицательными микроорганизмами, характеризуется высоким содержанием эндотоксина в системном кровотоке. В июне 2009 года в журнале Американской медицинской ассоциации (англ. *Journal of the American Medical Association, JAMA*) были опубликованы результаты исследования EUPHAS (англ. *Early Use of Polymyxin B Hemoperfusion in Abdominal Septic Shock*; раннее применение гемоперфузии с полимиксином В при абдоминальном септическом шоке). В этом исследовании приняли участие 64 пациента с тяжелым сепсисом или септическим шоком, которые в период с декабря 2004 года по декабрь 2007 года перенесли экстренное оперативное вмешательство по поводу внутрибрюшной инфекции. Эти пациенты были в случайном порядке распределены в группы только традиционной терапии (n = 30) или традиционной терапии в сочетании с двумя сеансами гемоперфузии с полимиксином В (n = 34). Основными критериями оценки служили изменения уровня среднего артериального давления (АД_{ср}) и потребности в вазопрессорах, тогда как в роли дополнительных критериев выступали соотношение PaO₂/FiO₂ (фракционная концентрация кислорода во вдыхаемом воздухе), выраженность органной дисфункции (согласно шкале последовательной оценки органной недостаточности; англ. *Sequential Organ Failure Assessment, SOFA*) и уровень 28-дневной смертности. В течение 72 часов в группе терапии полимиксином В наблюдалось увеличение уровня среднего артериального давления (от 76 до 84 мм рт. ст.; p = 0,001) и снижение потребности в вазопрессорах (инотропный коэффициент [англ. *inotropic score*]: от 29,9 до 6,8; p = 0,001), тогда как в группе традиционной терапии подобные изменения

отсутствовали (AD_{cp} : от 74 до 77 мм рт. ст.; $p = 0,37$; инотропный коэффициент: от 28,6 до 22,4; $p = 0,14$). Соотношение PaO_2/FiO_2 несколько увеличилось в группе терапии полимиксином В (от 235 до 264; $p = 0,049$), но осталось неизменным в группе стандартной терапии сепсиса (от 217 до 228; $p = 0,79$). Оценка по шкале SOFA улучшилась в группе терапии полимиксином В, но в группе традиционной терапии этот показатель существенно не изменился (изменения оценки по шкале SOFA: -3,4 в сравнении с -0,1; $p = 0,001$). Уровень 28-дневной смертности достигал 32% (11 из 34 пациентов) в группе терапии полимиксином В и 53% (16 из 30 пациентов) в группе стандартной терапии сепсиса (некорригированное отношение рисков [OR]: 0,43, 95% ДИ: 0,20-0,94; корригированное OR: 0,36, 95% ДИ: 0,16-0,80). Результаты исследования свидетельствуют, что гемоперфузия с полимиксином В, дополняющая традиционную терапию, оказывала значительное положительное влияние на гемодинамику и функцию органов, а также способствовала снижению уровня 28-дневной смертности в популяции больных с тяжелым сепсисом или септическим шоком, осложнившимся внутрибрюшную инфекцию, вызванную грамотрицательными микроорганизмами.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Эндотоксин - один из основных компонентов наружной оболочки грамотрицательных бактерий, играет ключевую роль в патогенезе сепсиса и септического шока. Высокий уровень активности эндотоксина коррелирует с худшими клиническими исходами [1]. Тем не менее, эффективность антиэндотоксиновой терапии по-прежнему является предметом для научных дискуссий [2, 3]. Еще в 1970-х гг. было установлено, что полимиксин В (ПМ-В) обладает защитным влиянием при эндотоксин-индуцированном гемодинамическом шоке. В то же время, оказалось, что это соединение чрезвычайно токсично для почек и центральной нервной системы. Поскольку для новых антиэндотоксиновых препаратов не подтвердилось благоприятное влияние на исход септического шока, компания Торэй Индастриз разработала устройство для гемоперфузионной терапии, на волокнах которого фиксирован полимиксин В. Это устройство способно эффективно связывать эндотоксин как *in vitro*, так и *in vivo*, и, тем самым, прерывать биологический каскад при сепсисе [4]. По данным нового систематического обзора, выполненного Cruz и соавт. [5], прямая гемоперфузия с ПМ-В оказывала благоприятное влияние на уровень среднего артериального давления, потребность в использовании вазопрессоров, соотношение PaO_2/FiO_2 и уровень смертности больных сепсисом. Тем не менее, описанные результаты вызывали большие сомнения в связи с разнородностью и методологическими ограничениями предшествующих исследований.

Септический шок, развивающийся на фоне внутрибрюшной инфекции, в большинстве случаев вызван грамотрицательной или смешанной флорой, а также связан с высоким содержанием эндотоксина в системном кровотоке. Следовательно, септический шок - это то состояние, при котором антиэндотоксиновая терапия может оказаться особенно полезной [3]. 17 июня 2009 года в JAMA были опубликованы результаты исследования EUPHAS - рандомизированного контролируемого исследования, которое было выполнено в популяции больных с септическим шоком, развившимся на фоне внутрибрюшной инфекции. Ранее все участники этого исследования перенесли неотложное абдоминальное хирургическое вмешательство [6]. Гипотеза исследования EUPHAS состояла в том, что гемоперфузия с ПМ-В должна оказывать более выраженное положительное влияние на гемодинамику, показатели оксигенации, функцию органов и выживаемость, по сравнению с традиционной терапией сепсиса и септического шока.

Методы

Исследование EUPHAS - это проспективное многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование, которое проводилось на базе десяти высокоспециализированных отделений интенсивной терапии (ОИТ) на территории Италии. Пациенты с тяжелым сепсисом и септическим шоком, которые ранее перенесли неотложное хирургическое вмешательство по поводу внутрибрюшной инфекции, были в случайном порядке распределены в группы только стандартной терапии или стандартной терапии в сочетании с двумя сеансами гемоперфузии с ПМ-В. Одним из основных критериев оценки было улучшение показателей среднего артериального давления (АД_{ср}) и потребности в вазопрессорах через 72 часа после завершения гемоперфузионной терапии. В качестве показателей, отражающих состояние гемодинамики, использовались инотропный коэффициент (как показатель потребления катехоламина и допамина) и коэффициент зависимости от вазопрессоров (КЗВ) (выражение взаимозависимости доза-отклик между вазопрессорами и АД_{ср}). Для оценки влияния терапии на исход использовались такие критерии, как увеличение PaO₂/FiO₂, уменьшение выраженности органной дисфункции (согласно шкале последовательной оценки органной недостаточности; англ. *Sequential Organ Failure Assessment, SOFA*) через 72 часа после завершения гемоперфузии, и улучшение показателей 28-дневной смертности. Многофакторный анализ показателей смертности был выполнен с помощью регрессионной модели пропорционального риска Кокса с поправкой на исходную оценку по шкале SOFA.

Результаты

В исследовании приняли участие 64 пациента (34 пациента были включены в группу терапии ПМ-В, 30 пациентов - в группу традиционной терапии сепсиса). Первоначально, существенная разница между двумя группами отсутствовала. У пациентов были идентифицированы как грамположительные, так и грамотрицательные микроорганизмы. У семи участников микробиологическими методами были идентифицированы два и более очага инфекции. Для 34% популяции исследования подтвердился инфекционный процесс смешанной этиологии.

Физиологические показатели

На 72 часу в группе терапии ПМ-В наблюдалось значительное снижение уровня АД_{ср} и инотропного коэффициента, тогда как в группе традиционной терапии подобные изменения отсутствовали (таблица 1). КЗВ также существенно снизился в группе ПМ-В, но не в группе пациентов, получавших только стандартную терапию сепсиса. Кроме того, в группе терапии ПМ-В было отмечено пограничное значительное улучшение соотношения PaO₂/FiO₂, тогда как в группе традиционной терапии этот показатель не изменился.

Таблица 1. Физиологические показатели, зарегистрированные исходно (T0) и на 72 часу (T72).

	ПМ-В		p	СТ		p
	T0	T72		T0	T72	
Пациенты, n	34	34		30	27 ^a	
АД _{ср} (мм рт. ст.)	76 (72-80)	84 (80-88)	0,001	74 (70-78)	77 (72-82)	0,37
Инотропный коэффициент	29,9 (20,4-39,4)	6,8 (2,9-10,7)	<0,001	28,6 (16,6-40,7)	22,4 (9,3-35,5)	0,14
КЗВ (мм рт. ст. ⁻¹)	4,3 (2,7-5,9)	0,9 (0,3-1,5)	<0,001	4,1 (2,3-6,0)	3,3 (1,3-5,3)	0,26
PaO ₂ /FiO ₂	235	264	0,049	217	228	0,79

	(206-265)	(236-292)	(188-247)	(199-258)
Дельта SOFA (почки)		-0,3 (от -0,7 до 0,1)		0,6 (от 0,1 до 1,1)*

Показатели представлены средними значениями (95% ДИ).

* $p = 0,01$.

^a Три пациента умерли до истечения 72 часов.

Дельта оценки по шкале SOFA (разница между максимальной и исходной оценкой по шкале SOFA) указывала на существенное улучшение функции органов в группе терапии ПМ-В (рис. 1). На 72 часу в группе терапии ПМ-В наблюдалось более выраженное уменьшение общей оценки по шкале SOFA, а также оценки функции сердечно-сосудистой системы и почек по этой шкале, по сравнению с группой традиционной терапии. Дельта оценки функции дыхательной системы по шкале SOFA была одинаковой в обеих терапевтических группах.

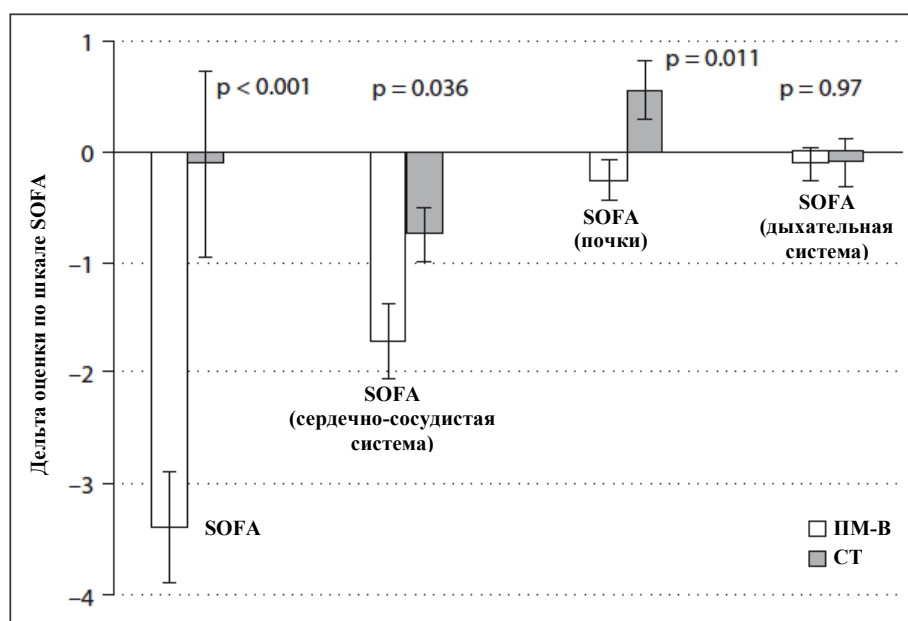


Рис. 1. Изменения дельта оценки по шкале SOFA (72 часа). Отрицательные показатели дельта оценки по шкале SOFA указывают на улучшение функции органов, а положительные показатели - на ухудшение функции органов.

Показатели смертности

Уровень 28-дневной смертности достигал 32% (11/34) в группе терапии ПМ-В и 53% (16/30) в группе традиционной терапии (рис. 2). С поправкой на балльную оценку по шкале SOFA, в группе терапии ПМ-В было зарегистрировано выраженное снижение 28-дневной смертности (корректированное ОР: 0,36, 95% ДИ: 0,16-0,80, $p = 0,012$). В группе традиционной терапии сепсиса уровень внутрибольничной смертности достигал 67% (20/30), а в группе терапии ПМ-В - 41% (14/34). С поправкой на оценку по шкале SOFA, в группе терапии ПМ-В наблюдалось существенное снижение уровня госпитальной смертности (корректированное ОР: 0,43, 95% ДИ: 0,21-0,90, $p = 0,026$).

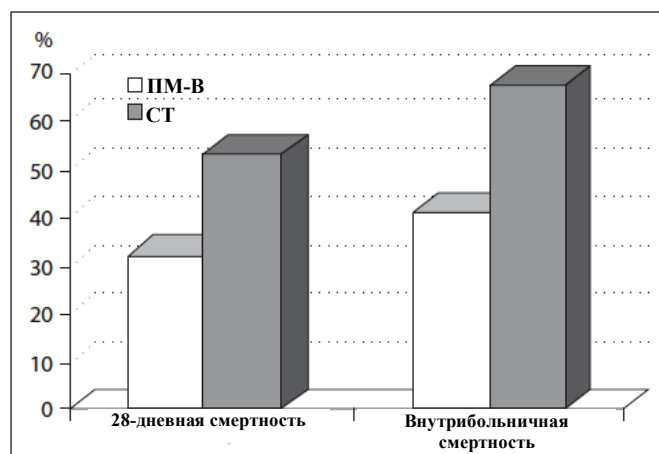


Рис. 2. Показатели смертности в группе терапии ПМ-В и в группе традиционной терапии.

Обсуждение

Исследование EUPHAS - это первое исследование, которое было выполнено в высокоспецифичной популяции больных с тяжелым сепсисом и септическим шоком, осложнившим течение абдоминального сепсиса. Все участники исследования были пациентами ОИТ. Данное исследование отчетливо подтверждает результаты предшествующих исследований, выполненных в разнородной популяции пациентов ОИТ. Эти результаты обсуждаются в мета-анализе Cruz и соавт. [5].

При сравнении с контрольной группой, группа терапии ПМ-В характеризуется скорректированным ОР 0,36 и 0,43, соответственно, для 28-дневной и внутрибольничной смертности. Дельта оценки по шкале SOFA была значительно выше в группе терапии ПМ-В (рис. 1), что свидетельствует о положительном влиянии на функцию органов [7, 8].

Анализ показателей дельта SOFA свидетельствует, что улучшение функции органов, зарегистрированное на фоне терапии ПМ-В, в основном касалось сердечно-сосудистой системы и почек. Рост уровня артериального давления и уменьшение потребности в вазопрессорах также были продемонстрированы в других исследованиях [9, 10]. Согласно результатам данного исследования, через 72 часа после завершения сеанса гемоперфузии с ПМ-В в соответствующей группе больных было зарегистрировано снижение дозы вазопрессоров (о чем свидетельствует инотропный коэффициент) при значительном росте уровня среднего артериального давления (таблица 1).

Соответственно, КЗВ существенно снизился в группе терапии ПМ-В, тогда как в группе традиционной терапии подобные изменения отсутствовали. Полученные данные согласуются с результатами предшествующего европейского поискового исследования, в рамках которого Vincent и соавт. [11] показали, что у пациентов, получавших гемоперфузионную терапию с ПМ-В, наблюдалось значительное увеличение сердечного индекса, индекса работы левого желудочка при однократном сокращении, а также индекса объемной скорости доставки кислорода, по сравнению с представителями контрольной группы.

Оценка по шкале SOFA, избирательно характеризующая нарушения функции почек, через 72 часа после проведения сеанса гемоперфузии была более благоприятной в группе терапии ПМ-В (рис. 1), что говорит об уменьшении выраженности почечной недостаточности в этой группе. Процент пациентов, получавших заместительную почечную терапию, был одинаковым в обеих группах. Предшествующие исследования также свидетельствуют о положительном влиянии гемоперфузионной терапии с ПМ-В на функцию почек [12, 13].

Исследование EURHAS проводилось в очень однородной популяции тяжелобольных пациентов, у которых было весьма вероятно высокое содержание эндотоксина в крови, а также была возможна эффективная хирургическая ликвидация очага инфекции. В отличие от вышеупомянутого европейского поискового исследования [11], из исследования EURHAS были исключены случаи планового абдоминального хирургического вмешательства. Кроме того, в данном исследовании участники получали по два сеанса гемоперфузии с ПМ-В вместо одного, поскольку использование схемы терапии с двумя сеансами больше согласуется с обширным опытом применения картриджа с иммобилизованным ПМ-В в Японии.

Экстраполировать результаты этого исследования на клиническую популяцию больных сепсисом нужно с осторожностью. Необходимо особо отметить, что гемоперфузионная терапия с ПМ-В способствует снижению уровня эндотоксина в крови, и, следовательно, этот метод лечения способен модулировать патологический каскад при сепсисе, однако он не оказывает непосредственного влияния на основную причину сепсиса, то есть на инфекцию. Следовательно, гемоперфузионная терапия с ПМ-В не должна служить основным методом лечения тяжелого сепсиса, но ее можно использовать в качестве дополнения к своевременной и эффективной антибактериальной терапии, и другим формам лечения этого заболевания.

Для подтверждения этих многообещающих результатов необходимо провести дополнительные крупные многоцентровые исследования в других популяциях пациентов. Новые исследования также помогут оценить применимость современных способов оценки активности эндотоксина как для отбора пациентов, так и для определения оптимального количества сеансов гемоперфузии.

Исследование EURHAS имеет ряд ограничений. Во-первых, популяция исследования чрезвычайно специфична. Благодаря этому, исследование обладает достаточной мощностью, но накопление материала протекало довольно медленно. Всего 64 пациента были включены в популяцию исследования в период с декабря 2004 года по декабрь 2007 года. Во-вторых, учитывая характер исследуемой терапии, от врачей невозможно было скрыть принадлежность пациентов к той или иной группе, хотя лица, которые выполняли анализ данных, не обладали подобной информацией. В-третьих, исследование было прекращено на основании результатов промежуточного анализа, после того как подтвердилось соответствие критериям прекращения [14-16]. Несмотря на тот факт, что размер выборки был умеренным, мы полагаем, что полученные результаты заслуживают внимания и согласуются с результатами мета-анализа, выполненного для разнородной популяции больных [5].

Как правило, небольшие исследования характеризуются тенденцией к переоценке истинной выраженности клинического эффекта, однако в нашем исследовании полезный эффект гемоперфузионной терапии с ПМ-В имел отчетливое биологическое подтверждение. Мы полагаем, что относительное снижение 28-дневной смертности на 20%, о чем свидетельствует высшее значение 95% ДИ, является клинически значимым, учитывая высокий уровень смертности больных сепсисом. Кроме того, мы понимаем, что это исследование не может предоставить окончательные сведения об эффектах продолжительности и количества сеансов гемоперфузионной терапии с ПМ-В. И наконец, как упоминалось выше, мы изучили эффекты гемоперфузионной терапии с ПМ-В в популяции больных абдоминальным сепсисом, у которых была возможна эффективная хирургическая ликвидация очага инфекции.

Таким образом, данное предварительное рандомизированное контролируемое исследование показало, что гемоперфузионная терапия с ПМ-В, дополняющая традиционные методы лечения, оказывала существенное положительное влияние на показатели 28-дневной и внутрибольничной смертности, на уровень артериального

давления, потребность в вазопрессорах, а также на выраженность органной недостаточности в целевой популяции больных с тяжелым сепсисом и септическим шоком, обусловленным внутрибрюшной инфекцией.

Нежелательные явления, связанные с гемоперфузионной терапией с ПМ-В, были выражены в минимальной степени. Они соответствовали нежелательным явлениям, которые ожидаются при любых методах экстракорпоральной терапии в условиях ОИТ. Результаты нашего исследования согласуются с результатами других исследований, выполненных в разнородных популяциях больных. Эти исследования описаны в недавно опубликованном мета-анализе. Справедливо заметить, что несколько специалистов мирового масштаба в области сепсиса обсудили исследование EUPHAS [17-20] и указали на его ограничения. Авторы приняли соответствующие критические замечания, но акцентировали внимание на том, что в рамках исследования EUPHAS изучалась популяция, которая была сформирована специально для того, чтобы максимально увеличить соотношение полезной информации к несущественным сведениям [21]. Мы убеждены в том, что исследование EUPHAS дополнило общее представление о лечении сепсиса немногочисленными, но важными сведениями. На выполнение этой работы нас вдохновила идея, высказанная Гиппократом в 400 году до нашей эры: "Лечить нужно больного, а не болезнь".

Ссылки

1. Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004;190: 527-534.
2. Opal SM, Glick T: Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003;31(Suppl 1): S57-S64.
3. Kellum JA: A targeted extracorporeal therapy for endotoxemia: the time has come. *Crit Care* 2007;11:137.
4. Shoji H, Tani T, Hanasawa K, Kodama M: Extracorporeal endotoxin removal by polymyxin B immobilized fiber cartridge: designing and antiendotoxin efficacy in the clinical application. *Ther Apher* 1998;2:3-12.
5. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, de Cal M, Polanco N, Corradi V, Lentini P, Nalesso F, Ueno T, Ranieri VM, Ronco C: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care* 2007;11:R47.
6. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301:2445-2452.
7. Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure: on behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996;22:707-710.
8. Jones AE, Trzeciak S, Kline JA: The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. *Crit Care Med* 2009;37:1649-1654.
9. Perego AF, Morabito S, Graziani G, Casella GP, Parodi O: Polymyxin-B direct hemoperfusion (PMX-DHP) in gram negative sepsis (in Italian). *G Ital Nefrol* 2006;23(Suppl 36):S94-S102.
10. Ruberto F, Pugliese F, D'Alio A, et al: Clinical effects of direct hemoperfusion using a polymyxin-B immobilized column in solid organ transplanted patients with signs of severe sepsis and septic shock: a pilot study. *Int J Artif Organs* 2007;30:915-922.
11. Vincent JL, Laterre PF, Cohen J, et al: A pilot controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. *Shock* 2005;23:400-405.
12. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D, et al: Polymyxin- B hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. *Intensive Care Med* 2008;34:1638-1645.
13. Nakamura T, Kawagoe Y, Matsuda T, Ueda Y, Koide H: Effects of polymyxin B-immobilized fiber on urinary N-acetyl-B-glucosaminidase in patients with severe sepsis. *ASAIO J* 2004;50:563-567.
14. Esteban A, Frutos-Vivar F, Ferguson ND, et al: Noninvasive positive-pressure ventilation for respiratory failure after extubation. *N Engl J Med* 2004;350:2452-2460.

15. Lau WY, Leung TW, Ho SK, et al: Adjuvant intraarterial iodine-131-labelled lipiodol for resectable hepatocellular carcinoma: a prospective randomised trial. *Lancet* 1999;353:797-801.
16. Pocock SJ: *Clinical Trials: A Practical Approach*. Chichester, Wiley, 1983.
17. Kellum JA, Uchino S: International differences in the treatment of sepsis: are they justified? *JAMA* 2009;301:2496-2497.
18. Vincent JL: Polymyxin B hemoperfusion and mortality in abdominal septic shock. *JAMA* 2009;302:1968.
19. Amaral AC: Polymyxin B hemoperfusion and mortality in abdominal septic shock. *JAMA* 2009;302:1968-1969.
20. Kida Y: Polymyxin B hemoperfusion and mortality in abdominal septic shock. *JAMA* 2009;302:1969.
21. Antonelli M, Giunta F, Ronco C: Polymyxin B hemoperfusion and mortality in abdominal septic shock — reply. *JAMA* 2009;302:1969-1970.

Массимо Антонелли, доктор медицины
Отделение интенсивной терапии и анестезиологии, Католический университет Пресвятого Сердца
Ларго А. Гемелли, 8
IT-00168, г. Рим (Италия)
Телефон: +39 0 630154386. Факс: +39 0 63013450.
Электронная почта: m.antonelli@rm.unicatt.it

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 91-101

Раннее лечение эндотоксемии с использованием теста на активность эндотоксина и гемоперфузии с полимиксином В

Г. Новелли^а · Г. Ферретти^б · Ф. Руберто^в · В. Морабито^а · Ф. Пуглиезе^в

^а Dipartimento 'P. Stefanini' Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo

^б Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali

^в Dipartimento di Scienza Anestesiologiche, Medicina Critica e del Dolore, La Sapienza Università di Roma, г. Рим, Италия

Реферат

Общие сведения. Мы определили возможность использования теста на активность эндотоксина (АЭ) для оценки необходимости раннего применения гемоперфузии с полимиксином В (ПМ-В) с целью лечения эндотоксемии у больных сепсисом. **Методы.** В исследовании приняли участие 24 пациента. У одиннадцати пациентов был обнаружен высокий уровень АЭ ($\geq 0,6$). Они получали сеансы гемоперфузии с ПМ-В каждые 24 часа вплоть до снижения уровня АЭ ($< 0,4$). У остальных 13 пациентов уровень АЭ был низким ($< 0,6$), и они получали только традиционную терапию сепсиса. **Результаты.** Два сеанса гемоперфузии с ПМ-В получили четыре пациента, три сеанса - 6 пациентов, а четыре сеанса - один пациент. На фоне проводимой терапии наблюдалось увеличение уровня среднего артериального давления (от 69,45 до 84,09 мм рт. ст.; $p < 0,01$), уменьшение частоты сердечных сокращений (от 111,73 до 77,91 удара в минуту; $p < 0,01$), уменьшение количества лейкоцитов (от 18380 до 9550 клеток/мм³; $p < 0,01$), уменьшение процентного содержания полиморфноядерных лейкоцитов (от 88,45 до 67,82%; $p < 0,01$), а также увеличение соотношения PaO₂/FiO₂ (от 275 до 308,09; $p < 0,01$). Все 24 участника были живы на момент контрольного обследования, выполненного на 24 день. **Вывод.** Тест на активность эндотоксина позволяет идентифицировать пациентов, которым показана гемоперфузия с ПМ-В, и определить необходимость дальнейшего лечения.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Патогенез сепсиса обусловлен синдромом системного воспалительного ответа (ССВО), который предполагает наличие нарушений гемодинамики, функции дыхания и обмена веществ, наряду с иммунологическими расстройствами. ССВО широко распространен среди больных хирургического профиля и пациентов из отделений интенсивной терапии (ОИТ). В одной трети случаев ССВО переходит в сепсис, который у 50% больных протекает в тяжелой форме. Кроме того, в 25% случаев тяжелый сепсис осложняется шоком [1]. Прогноз таких пациентов зависит от характера сопутствующей патологии и от выраженности воспалительного ответа, который может осложниться шоком, а также дисфункцией или недостаточностью различных органов. Судя по всему, интервал времени, определяющий прогрессирование ССВО с развитием сепсиса, тяжелого сепсиса и септического шока, обратно коррелирует с числом критериев ССВО, которым удовлетворяет соответствующий пациент [2]. С другой стороны, поскольку тяжесть

заболевания характеризуется постепенным переходом от ССВО к сепсису, тяжелому сепсису и септическому шоку, уровень 28-дневной смертности также возрастает от 10 до 60%. Наличие или отсутствие инфекции не оказывает влияния на исход, чего не скажешь об источнике инфекции [1].

Исход болезни также зависит от быстроты и правильности постановки диагноза и назначения терапии в первые часы после развития синдрома. Непосредственно после диагностирования сепсиса необходимо начать эффективную коррекцию водного баланса и назначить соответствующую антибактериальную терапию. Первоначальная антибактериальная терапия зачастую корректируется на основании результатов бактериологического исследования и клинических данных. Более того, бактериальные токсины также играют ключевую роль в развитии ССВО, поскольку они способны увеличивать проницаемость капилляров и активировать нейтрофилы, индуцирующие тканевое повреждение. Известно, что некоторые компоненты бактериальных клеток, такие как эндотоксин (липополисахарид, ЛПС), пептидогликан, пептидогликан-ассоциированный липопротеин, липотейхоевая кислота и другие мембранные белки, могут активировать воспалительные каскады посредством толл-подобных рецепторов, расположенных на поверхности иммунокомпетентных клеток, например, макрофагов, дендритных клеток или нейтрофилов [3].

Результаты нескольких исследований описывают эффекты эндотоксина как ключевого фактора, определяющего исход сепсиса. В частности, для пациентов с эндотоксемией, подтвержденной на момент поступления в ОИТ, характерна бóльшая тяжесть заболевания и меньшая выживаемость по сравнению с пациентами без эндотоксемии [4-6].

Основной задачей нашего исследования была ранняя диагностика критической эндотоксемии у пациентов, которые перенесли хирургическое вмешательство на органах брюшной полости и удовлетворяли двум или более критериям ССВО. В результате была идентифицирована субпопуляция с высоким риском прогрессирования септического каскада.

Недавно был разработан новый метод, позволяющий быстро определить активность эндотоксина (АЭ) в цельной крови. Исследования, в рамках которых применялся этот новый метод, свидетельствуют о том, что уровень АЭ в значительной мере коррелировал с тяжестью заболевания у пациентов ОИТ, а также позволил определить риск развития тяжелого сепсиса и септического шока. Предопределенный предельный уровень АЭ соответствует 0,60 единицам. С этим уровнем связан повышенный риск неблагоприятных исходов [7].

Значение эндотоксемии подтверждено многочисленными исследованиями, выполненными на территории Японии, а также недавно опубликованными результатами многоцентрового рандомизированного контролируемого исследования EUPHAS, которое проводилось в Италии. В рамках этих исследований оценивалась эффективность гемоперфузии с полимиксином В (ПМ-В) при тяжелом сепсисе и септическом шоке. Такая терапия назначалась преимущественно пациентам с подозреваемой грамотрицательной инфекцией или эндотоксемией (заподозренной на основании внутрибрюшного источника). Опубликованные результаты свидетельствуют, что эффективное удаление эндотоксина оказывает существенное влияние на гемодинамику, оксигенацию, функцию почек и выживаемость [8-11]. Таким образом, клинический опыт подтверждает гипотезу, согласно которой удаление эндотоксина предупреждает прогрессирование сепсиса с развитием септического шока, полиорганной недостаточности и смерти.

Следовательно, как подсказывают недавние исследования, использование специальных диагностических методов должно обеспечить своевременную идентификацию пациентов с клинически значимой эндотоксемией, а также предоставить полезную информацию, способствующую оптимизации целенаправленных терапевтических вмешательств.

Дополнительная задача нашего исследования заключалась в оценке способности теста на АЭ эффективно использовать селективное удаление эндотоксина у пациентов из группы высокого риска, предупреждая прогрессирование биологического каскада при сепсисе.

Материалы и методы

Отбор пациентов

В этом исследовании приняли участие пациенты с подтвержденным сепсисом, которые перенесли хирургическое вмешательство. Формирование популяции осуществлялось с апреля 2008 года по апрель 2009 года. Критериями включения служили следующие показатели, зарегистрированные в течение предшествующих 24 часов: два или более признака ССВО, включая лихорадку или гипотермию (температура тела >38 или $<36^{\circ}\text{C}$, соответственно), тахикардия (>90 ударов в минуту), тахипноэ (>20 дыхательных движений в минуту), парциальное давление углекислоты в артериальной крови <32 мм рт. ст., количество лейкоцитов $>12,0 \times 10^9/\text{л}$ или $<4,0 \times 10^9/\text{л}$, или более 10% незрелых форм нейтрофилов. Кроме того, выполнялась оценка выраженности органной дисфункции [12, 13]. Все участники исследования получали стандартное интенсивное лечение, включая коррекцию водного баланса и антибактериальную терапию.

Тест на активность эндотоксина

Определение АЭ в цельной крови выполнялось по схеме, описанной Romaschin и соавт. [14]. Для этого использовался хемилюминесцентный метод (корпорация Спектрал Диагностикс, г. Торонто, Онтарио, Канада). Согласно рекомендациям производителя, активность эндотоксина можно классифицировать как низкую ($<0,4$), умеренную (от 0,4 до $<0,6$) и высокую ($\geq 0,6$).

АЭ оценивалась в течение 24 часов после появления симптомов сепсиса (T0). При АЭ $\geq 0,6$ (T0 \equiv T1A) пациенту назначали антиэндотоксиновую терапию (гемоперфузия с ПМ-В). Если уровень ЭА был $<0,60$, то через 24 часа выполнялось контрольное тестирование. Если результат повторного тестирования по-прежнему был ниже порогового значения, пациенту назначалась только традиционная терапия сепсиса.

Гемоперфузия с ПМ-В

Гемоперфузия с ПМ-В выполнялась при помощи колонки с полистироловыми волокнами, на которых был ковалентно фиксирован ПМ-В [15-17]. Сосудистый доступ обеспечивался установкой двухпросветных венозных катетеров. Каждый сеанс терапии продолжался 2 часа при скорости потока 100 мл/мин.

Если уровень АЭ оставался повышенным и у пациентов сохранялись симптомы ССВО, гемоперфузия с ПМ-В выполнялась каждые 24 часа. Гемоперфузионную терапию прекращали при достижении уровня АЭ $<0,4$. Уровень АЭ измерялся через 1 час после каждой гемоперфузии для определения эффекта терапии, а также непосредственно перед началом каждого последующего сеанса гемоперфузионной терапии.

Участники исследования получали антикоагулянтную терапию, которая назначалась лечащим врачом в зависимости от показателей свертывающей системы крови (количество тромбоцитов, протромбиновое время [ПТВ]).

Клинические показатели

Клинические данные регистрировались на следующих временных отметках: T0 (включение в исследование - T1A), T1B (после первого сеанса терапии), T2A (перед вторым сеансом терапии), T2B (после второго сеанса терапии), T3A (перед третьим сеансом терапии), T3B (после третьего сеанса терапии), T4A (перед четвертым сеансом терапии) и T4B (после четвертого сеанса терапии).

На каждой временной отметке производилась регистрация следующих клинических показателей: температура тела, уровень среднего артериального давления (мм рт. ст.), частота сердечных сокращений (удары в минуту), соотношение PaO_2/FiO_2 , количество лейкоцитов в крови (клетки/ mm^3), процент нейтрофилов в лейкоформуле и диурез (мл/сутки). Для сравнения использовались клинические параметры, зарегистрированные на момент включения в исследование (распределение в терапевтические группы) и после заключительного сеанса гемоперфузии с ПМ-В. Для диагностики инфекционного процесса использовались микробиологические данные. Микробиологический контроль выполнялся от момента включения в исследование и продолжался 72 часа.

Статистический анализ

Данные представлены средними значениями (стандартное отклонение) нормально распределенных переменных, или медианами (диапазон) ненормально распределенных переменных. Все данные были обработаны с использованием знаково-рангового теста Вилкоксона для парных наблюдений. Статистической значимости соответствовал $p < 0,01$.

Результаты

Тест на АЭ был выполнен для 24 прооперированных пациентов с клиническими проявлениями сепсиса (таблица 1). Гемоперфузионная терапия с ПМ-В проводилась при высоком уровне АЭ ($>0,60$ единиц).

Таблица 1. Исходные данные пациентов, для которых выполнялась оценка АЭ.

Возраст	57,8 года (диапазон от 40 до 70 лет)
Пол (мужчины/женщины)	10/14
Причина хирургического вмешательства	Новообразования женских половых органов (3) Расширенное хирургическое вмешательство на органах брюшной полости (10) Трансплантация печени (7) Трансплантация почки (3) Трансплантация легкого (1)

У 14 пациентов (58%) при первоначальном обследовании был зарегистрирован низкий или умеренный уровень АЭ (медиана = 0,32 при диапазоне от 0,16 до 0,53). Спустя 24 часа этот уровень существенно не изменился. Исключение составляет один пациент. У этого пациента через 24 часа АЭ составила 0,62 и он был переведен в терапевтическую группу. Согласно результатам микробиологического исследования, у 7 из 13 пациентов с низким или умеренным уровнем АЭ была подтверждена грамположительная инфекция. В остальных шести случаях возбудителями инфекции были грибы.

Для десяти пациентов (42%) при первом исследовании подтвердился высокий уровень АЭ (медиана = 0,74 при диапазоне от 0,62 до 1,25). В общей сложности, в группу гемоперфузионной терапии с ПМ-В были включены 11 пациентов. В таблице 2 представлена краткая клиническая характеристика этих пациентов. Ни у одного из них не было признаков септического шока и поддержка функции внешнего дыхания достигалась неинвазивными методами.

Таблица 2. Характеристика пациентов, получавших антиэндотоксиновую терапию.

Причина хирургического вмешательства	Новообразования женских половых органов (2) Расширенное хирургическое вмешательство на органах брюшной полости (4) Трансплантация печени (3) Трансплантация почки (2)
Температура тела ($^{\circ}C$)	$39,3 \pm 0,3$

Уровень среднего артериального давления (мм рт. ст.)	69,45 ± 1,86
Частота сердечных сокращений (удары/мин)	111,73 ± 13,08
PaO ₂ /FiO ₂	275 ± 12,04
Лейкоциты (клетки/мм ³)	18380 ± 2510
Нейтрофилы (%)	88,45 ± 3,72
Тромбоциты (клетки/мм ³)	208,45 ± 48,47
МНО	0,79 ± 0,19
Возбудители инфекции	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (1) Enterobacter (2) <i>Escherichia coli</i> (4) <i>Klebsiella oxytoca</i> (1) <i>Proteus mirabilis</i> (1)

МНО - международное нормализованное отношение.

По два сеанса гемоперфузии с ПМ-В получили 4 пациента (медиана АЭ = 0,64 при диапазоне от 0,62 до 0,73), по три сеанса - 6 пациентов (медиана АЭ = 0,85 при диапазоне от 0,74 до 0,95), и четыре сеанса получил один пациент (АЭ = 1,25). Уровень АЭ последнего пациента соответствовал верхней границе определения теста АЭ. При проведении 28 сеансов гемоперфузионной терапии не было обнаружено ни одного нежелательного явления.

Динамика уровня АЭ, зарегистрированная в рамках каждого курса терапии, представлена на рисунке 1. В конце курса антиэндотоксиновой терапии медиана уровня АЭ соответствовала 0,29 (диапазон от 0,22 до 0,38). Каждый сеанс гемоперфузии с ПМ-В обеспечивал снижение уровня АЭ на 20-40%. У пациентов с исходным уровнем АЭ >1,0 активность эндотоксина снижалась более чем на 20%.

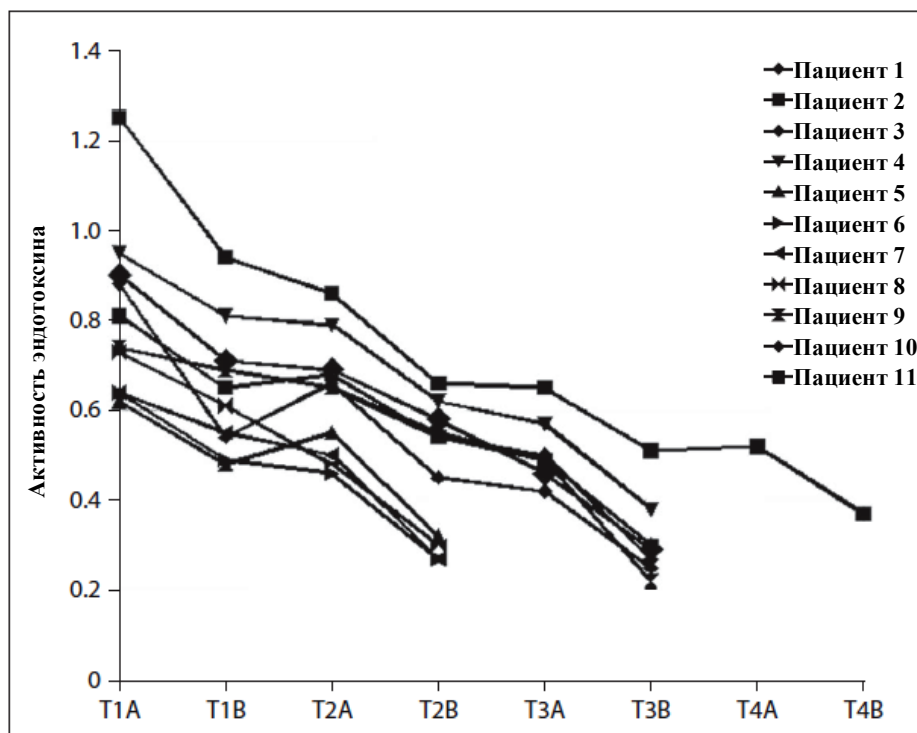


Рис. 1. Динамика уровня активности эндотоксина всех пациентов в течение антиэндотоксиновой терапии. Буквы А и В обозначают уровень АЭ, соответственно, до сеанса гемоперфузии с ПМ-В и через 1 час после сеанса.

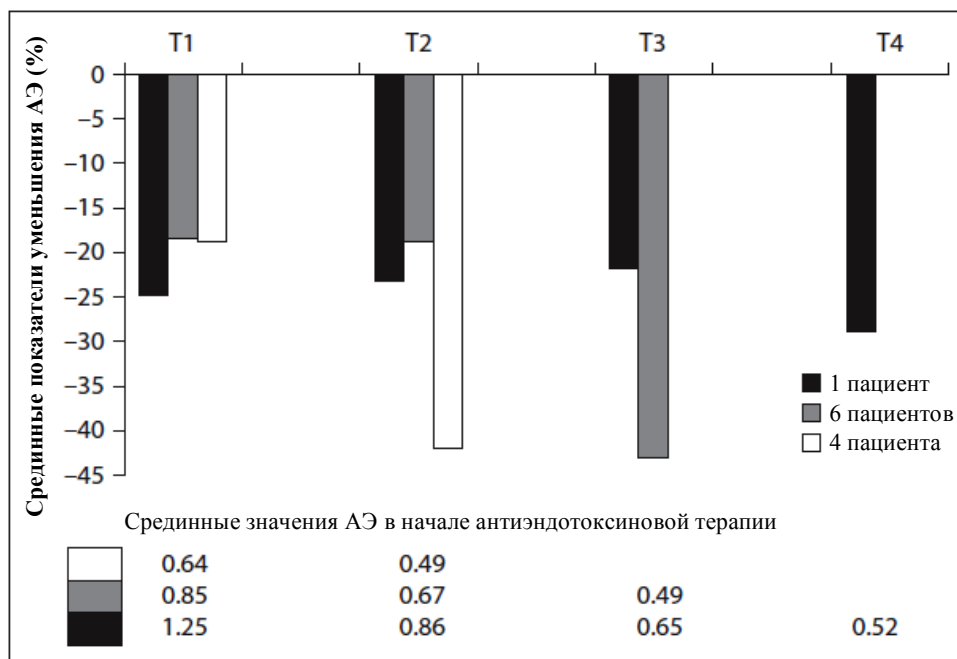


Рис. 2. Процентное снижение уровня АЭ после каждого сеанса антиэндотоксиновой терапии. Столбцы серого цвета соответствуют пациентам, получившим 2, 3 или 4 сеанса гемоперфузии. Дополнительно указаны срединные значения АЭ, зарегистрированные исходно.

После заключительного сеанса гемоперфузионной терапии с ПМ-В, когда уровень АЭ был $<0,4$, наблюдалось статистически существенное улучшение гемодинамических показателей. Показатели среднего артериального давления и частоты сердечных сокращений изменились, соответственно, от $69,45 \pm 1,86$ мм рт. ст. и $111,73 \pm 13,08$ ударов/мин исходно, до $84,09 \pm 3,75$ мм рт. ст. ($p < 0,01$) и $77,91 \pm 6,59$ ударов/мин ($p < 0,01$) в конце терапии.

Количество лейкоцитов и процентное содержание нейтрофилов изменились, соответственно, от 18380 ± 2510 клеток/ мм^3 и $88,45 \pm 3,72\%$ исходно, до 9550 ± 1050 клеток/ мм^3 и $67,82 \pm 8,36\%$ после завершения лечения ($p < 0,01$). После проведения гемоперфузионной терапии с ПМ-В соотношение $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ увеличилось от $275 \pm 12,04$ до $308,09 \pm 8,32$ ($p < 0,01$).

К концу терапии были достигнуты удовлетворительные показатели диуреза при среднем значении >1200 мл. Исключение составляет один пациент, у которого исходный диурез, составивший 600 мл, через 3 дня терапии возрос ориентировочно до 1000 мл/сутки.

Анализ показателей функции печени троих пациентов, которые перенесли трансплантацию печени, показал увеличение концентрации билирубина ($7 \pm 2,1$ мг/дл), аспартат-аминотрансферазы (АсАт) (950 ± 31 мг/дл), аланин-аминотрансферазы (АлАт) ($789 \pm 55,4$ мг/дл) и щелочной фосфатазы ($356 \pm 42,5$). Все эти показатели достигли нормальных значений в течение 5 дней после прекращения терапии.

Микробиологическое исследование подтвердило наличие грамотрицательной инфекции у 9 из 11 пациентов в течение 72 часов после включения в популяцию. Для остальных двоих

пациентов был получен отрицательный результат бактериологического исследования крови.

Все 24 пациента дожили до контрольного обследования, выполненного на 28 день.

Обсуждение

Наличие эндотоксемии у больных тяжелым сепсисом и септическим шоком было подтверждено несколькими исследованиями, результаты которых опубликованы в научной литературе. Oral и соавт. [6] в 1999 году описали 253 случая сепсиса. В 80% из них была подтверждена эндотоксемия. Среди пациентов с выраженной эндотоксемией уровень 28-дневной смертности был существенно выше, чем среди больных с незначительной эндотоксемией. Тем не менее, естественная динамика эндотоксемии при сепсисе полностью не выяснена, поскольку сообщения о влиянии эндотоксемии на состояние пациентов различного возраста, с разной сопутствующей патологией и разной выраженностью органной дисфункции носят противоречивый характер. Отчасти это может быть обусловлено вариабельностью взаимодействия циркулирующего в крови эндотоксина с иммунной системой хозяина, а не с абсолютным содержанием эндотоксина в кровотоке.

Новый метод определения активности эндотоксина в крови, который носит название теста на активность эндотоксина (АЭ), учитывает индивидуальные вариации, связанные с окислительным "взрывом" нейтрофилов в присутствии комплекса ЛПС-антитело [14, 18]. Marshall и соавт. [7] в 2004 году продемонстрировали существенную корреляцию между уровнем АЭ и усугублением клинических показателей, таких как оценка по шкале APACHE II, оценка по шкале SOFA, соотношение PaO_2/FiO_2 и количество лейкоцитов. В этом же исследовании было обнаружено трехкратное увеличение риска тяжелого сепсиса у больных с высоким уровнем АЭ ($АЭ > 0,6$), по сравнению с пациентами с низким уровнем АЭ ($АЭ < 0,4$). Более того, для больных с эндотоксемией был характерен повышенный уровень смертности в ОИТ и повышенный уровень внутрибольничной смертности.

Недавно Valenza и соавт. [19] изучили распространенность эндотоксемии в популяции из 102 пациентов, поступивших в ОИТ после планового хирургического вмешательства. Несмотря на низкий уровень физиологических нарушений, зарегистрированных на момент госпитализации (средняя оценка по шкале APACHE - 8,3), у 17% пациентов был обнаружен высокий уровень АЭ. Общая продолжительность пребывания в ОИТ у пациентов с высоким уровнем АЭ была больше (5,2 дня), чем у больных с низкой или умеренной АЭ (соответственно, 1,9 и 1,8 дня). Более того, для пациентов, которые перенесли хирургические вмешательства на органах брюшной или грудной полости, регистрировался более высокий уровень АЭ при поступлении в ОИТ, и значительно более продолжительный срок пребывания в ОИТ, по сравнению с больными, перенесшими другие операции.

При септическом шоке уровень АЭ коррелировал с тяжестью заболевания [20]. Несмотря на небольшое число наблюдений, было обнаружено, что у больных септическим шоком с низкой АЭ уровень смертности составлял 0%, чего не скажешь о больных с умеренным (уровень смертности - 17%) и высоким (уровень смертности - 37,5%) уровнем АЭ.

В целом, зарегистрированные данные свидетельствуют о том, что наличие эндотоксина в крови ухудшает прогноз пациентов ОИТ, а риск нежелательного исхода связан с эндотоксемией, обусловленной или способствующей тяжелому сепсису и септическому шоку.

В нашем исследовании была выполнена оценка уровня АЭ у 24 больных сепсисом, которые перенесли хирургическое вмешательство. Высокий уровень АЭ ($> 0,6$) подтвердился для 42% пациентов на раннем этапе, то есть в течение 24 часов после

появления клинических симптомов сепсиса. В связи с этим, мы предположили, что раннее вмешательство, направленное на удаление эндотоксина, может улучшить предполагаемый исход сепсиса.

Гемоперфузия с ПМ-В характеризовалась способностью селективно удалять эндотоксин из кровотока, а также обладала благоприятным влиянием на исход болезни. Эти наблюдения подтверждаются опубликованными результатами исследований, выполненных на территории Японии и Европы [9].

Недавно в популяции больных септическим шоком, которые перенесли неотложные хирургические вмешательства по поводу внутрибрюшной инфекции, было выполнено рандомизированное контролируемое исследование. В рамках этого исследования было продемонстрировано более выраженное снижение общей оценки по шкале SOFA на 72 часу в группе гемоперфузии с ПМ-В, по сравнению с группой традиционной терапии (соответственно, -3,4 в сравнении с -0,1). Cruz и соавт. [8] также сообщили о снижении 28-дневной смертности в группе пациентов, получавших сеансы гемоперфузии с ПМ-В (32% в сравнении с 53% в группе традиционной терапии).

Monti и соавт. [21] выполнили ретроспективный анализ в группе больных септическим шоком с АЭ >0,6. Хотя это исследование охватывало лишь небольшое число пациентов, для больных из группы гемоперфузионной терапии с ПМ-В было характерно значительно меньшее время пребывания в ОИТ (21,5 дня), по сравнению с пациентами, которые получали только традиционную терапию (53,6 дня). Разница показателей смертности, зарегистрированная между двумя группами, была клинически значимой, но статистически несущественной (45% в группе традиционной терапии против 16% в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В).

В данном исследовании пациенты хирургического профиля с признаками сепсиса и эндотоксемией (подтвержденной уровнем АЭ >0,6) получали гемоперфузионную терапию с ПМ-В, направленную на снижение АЭ. Терапевтическая задача гемоперфузионной терапии состояла в снижении уровня АЭ ниже отметки 0,4. Схема гемоперфузионной терапии (количество сеансов) зависела от уровня АЭ после каждого сеанса, а также от клинического состояния пациента. После каждого сеанса гемоперфузионной терапии с ПМ-В уровень АЭ снижался. Процентное снижение было более выраженным (приблизительно 40%) при исходном уровне АЭ ниже 0,6, чем при исходном уровне АЭ больше 0,6 (приблизительно 20%).

Такую тенденцию можно объяснить особенностями метода тестирования и метода гемоперфузии с ПМ-В. Тест на АЭ характеризуется нелинейной кривой доза-отклик [22], а количество ЛПС, которое можно удалить при каждом сеансе гемоперфузии с ПМ-В, фиксировано и определяется числом доступных участков связывания ПМ-В в каждом картридже [15].

Антиэндотоксиновая гемоперфузионная терапия с ПМ-В обеспечивала немедленное и выраженное улучшение гемодинамических показателей. Кроме того, на фоне проводимой терапии наблюдалось существенное подавление воспалительной реакции организма, о чем свидетельствует снижение количества лейкоцитов и процентного содержания нейтрофилов. Влияние гемоперфузионной терапии с ПМ-В на воспалительный процесс описано многочисленными авторами в аспекте выработки цитокинов и активации клеток эндотелия [23-25]. Совсем недавно Nishibori и соавт. [26] продемонстрировали, что гемоперфузия с ПМ-В обеспечивает селективное удаление моноцитов из кровотока. Этот эффект может быть положительным, поскольку в подобных условиях уменьшается взаимодействие между моноцитами к клетками эндотелия.

В этом исследовании все пациенты с повышенным уровнем эндотоксина в крови получали гемоперфузионную терапию с ПМ-В. Все они дожили до контрольного обследования,

выполненного на 28 день, несмотря на высокий риск неблагоприятного исхода, связанный с высоким уровнем АЭ.

Данное исследование дает интересное представление о раннем лечении эндотоксемии при сепсисе. Во-первых, тест на АЭ позволяет идентифицировать пациентов, которым показана терапия, направленная на удаление эндотоксина. Во-вторых, тест на АЭ дает возможность эффективно определить эффект гемоперфузии с ПМ-В, что облегчает дозирование этого вида терапии. В-третьих, эндотоксемия была также подтверждена в случаях, когда отсутствовало бактериологическое подтверждение грамотрицательной инфекции, что указывает на роль транслокации возбудителя (как источника эндотоксина) из желудочно-кишечного тракта.

В настоящее время существует необходимость в проведении дополнительных исследований, в которых примет участие большее число пациентов с более тяжелой патологией. Кроме того, необходимо изучить группы повышенного риска эндотоксемии, включая пациентов с травмами и легочной инфекцией. Тест на АЭ также можно использовать для уточнения роли транслокации эндотоксина на ранних этапах развития септических состояний.

Благодарности

Мы хотим поблагодарить доктора М. Буфи, доктора А. Морелли и доктора Г. Тритапепе из La Sapienza Università di Roma за то, что они предоставили нам возможность обследовать некоторых своих пациентов.

Ссылки

1. Brun-Buisson C: The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000;26:S64-S74.
2. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP: The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995;273:117-123.
3. Shimizu T, Endo Y, Tsuchihashi H, Akabori H, Yamamoto H, Tani T: Endotoxin apheresis for sepsis. *Transfus Apher Sci* 2006;35:271-282.
4. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE: Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99:169-175.
5. Hurley JC: Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:268-292.
6. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999;180:1584-1589.
7. Marshall J, Foster D, Vincent J, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004;190:527-534.
8. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, Foltran F, Brienza N, Donati A, Malcangi V, Petrini F, Volta G, Bobbio Pallavicini FM, Rottoli F, Giunta F, Ronco C: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301:2445-2452.
9. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, de Cal M, Polanco N, Corradi V, Lentini P, Nalesso F, Ueno T, Ranieri VM, Ronco C: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care* 2007;11:R47.
10. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D, Romanazzi GM, Pacitti A, Lanfranco G, Puntorieri V, Martin EL, Mascia L, Monti G, Casella G, Segoloni GP, Camussi G, Ranieri VM: Polymyxin-B hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. *Intensive Care Med* 2008;34:1638-1645.
11. Ruberto F, Pugliese F, D'Alio A, Martelli S, Bruno K, Marcellino V, Summonti D, Celli P, Perrella S, Cappannoli A, Pietropaoli C, Tosi A, Diana B, Novelli G, Rossi M, Ginanni-Corradini S, Ferretti G, Berloco PB, Pietropaoli P: Clinical effects of direct hemoperfusion using a polymyxin-B immobilized column in solid organ transplanted patients with signs of severe sepsis and septic shock. A pilot study. *Int J Artif Organs* 2007;30:915-922.

12. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, et al: Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997;278: 234-240.
13. Bone RC, Fisher CJ, Clemmer TP, et al: Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989;17:389-393.
14. Romaschin AD, Harris DM, Ribeiro MB, et al: A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil-dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods* 1998;212:169-185.
15. Shoji H: Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther Apher Dial* 2003;7:108-114.
16. Vesentini S, Soncini M, Zaupa A, Silvestri V, Fiore GB, Redaelli A: Multi-scale analysis of the Toraymyxin adsorption cartridge. Part I: molecular interaction of Polymyxin-B with endotoxins. *Int J Artif Organs* 2006;29:239-250.
17. Fiore GB, Soncini M, Vesentini S, Penati A, Visconti G, Redaelli A: Multi-scale analysis of the Toraymyxin adsorption cartridge. Part II: computational fluid-dynamic study. *Int J Artif Organs* 2006;29:251-260.
18. Marshall JC, Walker PM, Foster DM, Harris D, Ribeiro M, Paice J, Romaschin AD, Derzko AN: Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Critical Care* 2002;6:342-348.
19. Valenza F, Fagnani L, Coppola S, Froio S, Sacconi F, Tedesco C, Maffioletti M, Pizzocri MM, Salice V, Ranzi ML, Marenghi C, Gattinoni L: Prevalence of endotoxemia after surgery and its association with ICU length of stay. *Critical Care* 2009;13:R102.
20. Monti G, Colombo S, Mininni M, Terzi V, Ortisi GM, Vesconi S, Casella G: Why measure endotoxin in septic shock patients? *Critical Care* 2008;12:S74-S75.
21. Monti G, Terzi V, Mininni M, Colombo S, Vesconi S, Casella G: Polymyxin B hemoperfusion in high endotoxin activity level septic shock patients. *Critical Care* 2008;12:P458.
22. Foster D, Derzko A, Romaschin A: A novel method for the rapid detection of human endotoxaemia. *Clin Lab Int* 2004;4:10-12.
23. Kushi H, Miki T, Nakahara J, Okamoto K, Saito T, Tanjoh K: Hemoperfusion with immobilized polymyxin-B column reduces the blood level of neutrophil elastase. *Blood Purif* 2006;24:212-217.
24. Nakamura T, Matsuda T, Suzuki Y, Shoji H, Koide H: Polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion in patients with sepsis. *Dial Transplant* 2003;32:602-607.
25. Tani T, Hanasawa K, Kodama M, et al: Correlation between plasma endotoxin, plasma cytokines, and plasminogen activator inhibitor-1 activities in septic patients. *World J Surg* 2001;25:660-668.
26. Nishibori M, Takahashi HK, Katayama H, Mori S, Saito S, Iwagaki H, Tanaka N, Morita K, Ohtsuka A: Specific removal of monocytes from peripheral blood of septic patients by polymyxin B-immobilized filter column. *Acta Medica Okayama* 2009;63:65-69.

Гилнардо Новелли, профессор
 Dipartimento 'P. Stefanini' Chirurgia Generale e Trapianti d'Organo
 Università di Roma 'La Sapienza', Viale дель Поликлинико, 155
 IT-00161, г. Рим (Италия)
 Телефон: +39 0649970401. Факс: +39 0649970401.
 Электронная почта: novelligilnardo@virgilio.it

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 102-110

Уровень активности эндотоксина и септический шок: потенциальное значение для специфической антиэндотоксиновой терапии

Жанпаола Монти^а · Маурицио Боттироли^а · Гиацинто Пиццилли^а · Мария Миннини^а · Валерия Терци^а · Ирен Веччи^а · Джованни Гезу^б · Паоло Бриоши^а · Серджио Вескони^а · Жанпаоло Каселла^а

^а Отделение анестезиологии и интенсивной терапии, больница Нигуарда, г. Милан, Италия

^б Отделение микробиологии, больница Нигуарда, г. Милан, Италия

Реферат

Активность эндотоксина (АЭ) играет важную роль в патогенезе сепсиса. Существует значительная заинтересованность в определении и снижении уровня АЭ с целью прогнозирования и улучшения показателей заболеваемости и смертности больных сепсисом. Мы выполнили проспективное исследование, задача которого состояла в оценке АЭ у тяжелобольных пациентов, а также в определении связи АЭ с органной дисфункцией и исходами, в частности при септическом шоке. АЭ (ЕАА™) оценивалась в пределах 24 часов от начала рефрактерного септического шока в условиях отделения интенсивной терапии (ОИТ). Наше исследование показало, что уровень АЭ не зависит от типа или источника инфекции, но отражает тяжесть заболевания у тяжелобольных пациентов с септическим шоком. Кроме того, в ОИТ был изучен метод экстракорпорального удаления эндотоксина (гемоперфузия с полимиксином В). Судя по всему, гемоперфузия с полимиксином В оказывает положительное влияние на исход заболевания, однако для подтверждения этой гипотезы необходимы дополнительные исследования.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Эндотоксин, или липополисахарид (ЛПС), является неотъемлемым компонентом наружной оболочки грамотрицательных бактерий. Это фактор, который в значительной мере определяет летальность при сепсисе [1]. Хотя ЛПС играет ключевую роль в реализации физиологических функций клеточной оболочки бактерий, одновременно эндотоксин действует как мощный медиатор, предупреждающий и, в большей мере, активирующий систему врожденного иммунитета на ранних этапах внедрения бактерий во внутреннюю среду организма [2]. Эти свойства подчеркивают "двойственную" природу эндотоксина. Он является не только сигнальной молекулой, предупреждающей организм хозяина о внедрении возбудителя, но и триггерной молекулой про- и противовоспалительного каскада, которая контролирует эффективную противомикробную защиту и удаление возбудителя из организма. По не совсем ясным причинам, в некоторых случаях, нерегулируемая и чрезмерная реакция организма хозяина на ЛПС, или высвобождение большого количества ЛПС, могут индуцировать или поддерживать септический каскад. При недостаточном контроле эти эффекты приводят к развитию полиорганной недостаточности и фатального септического шока [3].

Хотя уникальная молекула ЛПС является биомаркером сепсиса и основным медиатором септического каскада, одновременно она может быть полезным средством диагностики и мониторинга, а также важной целью для терапевтического вмешательства [4, 5].

Для чего определять активность эндотоксина? Эндотоксин как биомаркер сепсиса

Новый и надежный тест на активность эндотоксина (англ. *endotoxin activity assay*, *ЕАА*[™]), подробно описанный в предшествующих публикациях, недавно был апробирован в клинических условиях [6]. Коротко говоря, ЕАА[™] основан на оценке степени активации популяции нейтрофилов циркулирующей крови эндотоксином. Практически, цельная кровь больного культивируется с анти-ЛПС антителами, а затем стимулируется опсонизированным зимозаном. Последующий окислительный "взрыв" лейкоцитов, индуцированный присутствием эндотоксина, оценивается методом хемилюминесценции, который позволяет выполнить количественную оценку активности эндотоксина (ЕАА[™]) [7]. Уровень активности эндотоксина (АЭ) выражается в единицах шкалы от 0 до 1: низкая активность (АЭ <0,4 единицы), умеренная активность (0,4 < АЭ < 0,6 единицы), высокая активность (АЭ >0,6 единицы).

В недавнем исследовании Marshall и соавт. [8] сообщили о том, что эндотоксемия широко распространена в гетерогенной популяции тяжелобольных пациентов в день поступления в ОИТ. Более чем у 50% таких пациентов наблюдается умеренный или высокий уровень АЭ по сравнению со здоровыми добровольцами. Тем не менее, согласно критериям Центров контроля и профилактики заболеваемости (англ. *Centers for disease control and prevention*, *CDC*), только у 4% представителей этой обширной популяции подтверждается грамотрицательная инфекция. Более того, распространенность грамотрицательной инфекции в подгруппах с умеренным и высоким уровнем АЭ не была значительно выше, а достигала, соответственно, 4,8 и 6,9%. Такое расхождение свидетельствует о том, что: во-первых, тест на АЭ не является специфичным методом для диагностики грамотрицательной инфекции и, следовательно, для выбора эмпирической антибактериальной терапии до получения результатов бактериологического исследования; и, во-вторых, эндотоксемия может быть обусловлена не только экзогенной грамотрицательной инфекцией [9]. В действительности, выявление эндотоксемии может указывать на транслокацию жизнеспособных грамотрицательных бактерий или самого эндотоксина из желудочно-кишечного тракта при нарушении барьерной функции кишечника как следствие патологической перфузии [10]. В подтверждение этому, в том же исследовании было продемонстрировано, что распространенность шока была в два раза выше у тяжелобольных пациентов с умеренным или высоким уровнем АЭ.

Учитывая вышесказанное, значительный интерес вызвала возможность определения АЭ изолированно или в сочетании с другими маркерами, способными прогнозировать исход больных сепсисом. Литературные данные свидетельствуют, что эндотоксемия (или, правильнее будет сказать, положительный результат теста, основанного на применении лизата амебоцитов мечехвоста) определяется едва ли не у 20-40% пациентов, страдающих сепсисом [9, 11]. Кроме того, Casey и соавт. [12] ранее показали, что для тяжелобольных септических пациентов с высокой ЛПС-цитокиновой оценкой характерен значительно больший риск смерти по сравнению с пациентами у которых эта оценка ниже. Тем не менее, эти результаты базируются на определении активности эндотоксина с помощью метода, который основан на использовании лизата амебоцитов мечехвоста и характеризуется определенными ограничениями (недостаточная точность, воспроизводимость и специфичность) [9, 13].

В рамках более современного исследования MEDIC, в основе которого лежал хемилюминесцентный метод определения АЭ, была зарегистрирована существенная взаимосвязь между уровнем АЭ у тяжелобольных пациентов и тяжестью заболевания, что отражается в более высоких оценках по шкалам APACHE II и SOFA у больных с высоким

уровнем АЭ в день поступления в ОИТ. В этой подгруппе пациентов также наблюдалась более выраженная органная дисфункция, о чем свидетельствуют повышенная распространенность шока и гипоксемии [8]. Кроме того, по данным этого исследования, возрастающий уровень АЭ на момент поступления коррелировал с повышенной смертностью в ОИТ. К сожалению, в этом исследовании участвовало небольшое число больных сепсисом. Объектом исследования была гетерогенная популяция тяжелобольных пациентов, поэтому вопрос о возможной связи между АЭ и прогнозом сепсиса остается открытым.

В связи с этим, мы выполнили проспективное исследование, основная задача которого состояла в оценке распространенности эндотоксемии в популяции тяжелобольных пациентов с септическим шоком, а также в определении связи между выраженностью эндотоксемии и исходом заболевания. Дополнительные задачи заключались в изучении взаимосвязи между АЭ и органной дисфункцией, а также в оценке прогностических показателей при септическом шоке. В этом исследовании приняли участие 80 больных с тяжелым септическим шоком, которые находились на лечении в нашем восьмикоечном ОИТ общего профиля в период с января 2007 года по декабрь 2009 года. Определение АЭ методом ЕАА™ выполнялось для всех пациентов ОИТ не позднее 24 часов от момента развития септического шока в соответствии с рекомендациями кампании по борьбе с сепсисом (англ. *surviving sepsis campaign, SSC*). Во всех случаях септического шока проводилась механическая вентиляция легких и поддержка гемодинамики при помощи вазопрессоров. 25% таких пациентов получали пролонгированную заместительную почечную терапию по поводу почечной недостаточности с анурией. Все участники исследования получали традиционную терапию согласно рекомендациям SSC.

Распределение пациентов на группы в зависимости от уровня АЭ показало, что более чем у 80% больных с септическим шоком уровень АЭ был умеренным ($АЭ > 0,4$) или высоким ($> 0,6$). Эти наблюдения подтверждают роль эндотоксина как ключевого фактора, запускающего септический каскад. Низкий уровень АЭ ($< 0,4$) был зарегистрирован только у 17% популяции. Между этими двумя группами не наблюдалось существенной разницы в соотношении показателей распространенности подтвержденной грамположительной и грамотрицательной инфекции (данные не представлены).

Еще больший интерес вызывает то, что полученные нами результаты указывают на положительную корреляцию между уровнем АЭ и тяжестью сепсиса. В действительности, больным с высоким уровнем АЭ на фоне септического шока была необходима значительно бóльшая доза норадреналина + адреналина (НОР+АДР) по сравнению с представителями групп умеренной или низкой АЭ (* $p < 0,05$; таблица 1). Более того, в нашем исследовании возрастающий уровень АЭ у больных септическим шоком сочетался с повышенной внутрибольничной смертностью, хотя статистически существенная разница между группами отсутствовала (14, 20 и 32%, соответственно, в группах низкой, умеренной и высокой АЭ). В группе высокой АЭ показатель смертности основан только на данных пациентов, получавших традиционную терапию согласно рекомендациям SSC ($n = 28$), тогда как пациенты, которым дополнительно проводилась антиэндотоксиновая терапия ($n = 13$), исключены, о чем свидетельствует следующий раздел.

Таблица 1. Уровень АЭ и тяжесть заболевания у больных септическим шоком (* $p < 0,05$).

	ЕАА™ < 0,4	0,4 < ЕАА™ < 0,6	ЕАА™ > 0,6
Пациенты	14 (17%)	25 (31%)	41 (52%)
Уровень ЕАА™, единицы	0,28 ± 0,05	0,49 ± 0,06	0,78 ± 0,14
АД _{ср} , мм. рт. ст.	79,8 ± 16	79,7 ± 10,2	80,3 ± 13,0
Сердечный индекс	3,99 ± 1,02	3,61 ± 1,01	3,72 ± 1,54
Индекс системного	1540 ± 343	1686 ± 703	1704 ± 790

сосудистого сопротивления			
НОР+АДР, мкг/кг/мин	0,32 ± 0,23	0,34 ± 0,29	0,67 ± 0,56*
Лактат, ммоль/л	4,52 ± 5,71	3,27 ± 2,64	6,15 ± 4,76
Оценка по шкале SOFA, баллы	9,42 ± 4,68	9,68 ± 3,56	11,31 ± 3,79

В целом, эндотоксемия сама по себе не позволяет идентифицировать больных септическим шоком с подтвержденной грамотрицательной бактериальной инфекцией. Как упоминалось ранее, в нашем исследовании присутствие высокой концентрации эндотоксина в кровотоке явно не зависело от возбудителя сепсиса (данные не представлены) [14].

Результаты исследования, хотя и являются предварительными, подтверждают точку зрения, согласно которой высокий уровень АЭ у больных с септическим шоком коррелирует с тяжестью заболевания, и, в частности, с гемодинамическими нарушениями. При тяжелом сепсисе эндотоксемия гипотетически может быть результатом нарушений спланхического кровотока. Таким образом, она может указывать на необходимость усиления реанимационных мероприятий. Роль других механизмов, участвующих в патогенезе эндотоксемии, требует дальнейшего изучения.

Судя по всему, эндотоксемия позволяет определить группу высокого риска даже среди больных с септическим шоком. Об этом говорит тенденция к увеличению смертности при возрастании уровня АЭ в данной популяции пациентов. Это наблюдение подтверждает гипотезу, согласно которой наличие эндотоксемии дает возможность определить популяцию больных с септическим шоком, для которых следует ожидать положительный эффект специфической антиэндотоксиновой терапии.

Эндотоксин как медиатор сепсиса: мишень для антиэндотоксиновой терапии?

Бактериальный эндотоксин представляет собой одну из наиболее мощных сигнальных молекул. Согласно результатам экспериментальных исследований, а также исследований, выполненных в человеческой популяции, ЛПС способен индуцировать выраженный системный воспалительный ответ. При этом он способствует генерализованному воспалению, оказывает прокоагулянтное и проапоптозное действие, вызывает повреждение ткани и приводит к развитию септического шока [15].

Для того чтобы лучше понять, как организм реагирует на эндотоксин, а также обосновать применение анти-ЛПС терапии, необходимо учитывать некоторые факторы. Во-первых, потенциально летальные последствия, приписываемые эндотоксину, обусловлены скорее сложным откликом организма хозяина на присутствие ЛПС, чем внутренними свойствами самого ЛПС [3, 16]. Во-вторых, существует благоприятный гомеостаз ЛПС (флора желудочно-кишечного тракта) и естественного иммунитета. В действительности, ЛПС выполняет защитную функцию, поскольку он поддерживает способность иммунной системы противостоять инфекции. С этой точки зрения, полная нейтрализация ЛПС может быть как полезной, так и потенциально вредоносной или бесполезной.

Концепция максимально раннего удаления фактора, запускающего септический каскад, во избежание чрезмерной активации естественного иммунного ответа и массивного высвобождения про- и противовоспалительных медиаторов была признана рациональным и, возможно, оптимальным терапевтическим подходом при сепсисе. В связи с этим, эндотоксемия была объектом предшествующих клинических исследований, которые оценивали потенциальные преимущества нейтрализации или связывания эндотоксина с целью улучшения клинического прогноза пациентов с предполагаемой грамотрицательной инфекцией [17, 18]. К сожалению, предпринятые попытки (включая использование антиэндотоксиновых антител НА-1А и Е5mAb) до сих пор не увенчались

успехом: преимущества изученных форм антиэндотоксиновой терапии пока не подтвердились [19].

Мы полагаем, что среди многочисленных методов лечения эндотоксического шока, в настоящий момент наиболее привлекательным является метод гемоперфузии с полимиксином В (ПМ-В). Полимиксин В - антибиотик, для которого характерен высокий уровень сродства к эндотоксину, был иммобилизован на полистироловых волокнах гемоперфузионного устройства. Как показали исследования, выполненные *in vitro* и *in vivo*, гемоперфузия с ПМ-В обеспечивает эффективное связывание и нейтрализацию эндотоксина, и, таким образом, способствует снижению "летальной" концентрации эндотоксина в плазме крови [20]. Этот эффект обеспечивает прерывание септического каскада, что подтверждается пониженной проапоптозной активностью плазмы крови у больных септическим шоком, получавших гемоперфузионную терапию с ПМ-В [21].

В рамках систематического обзора Cruz и соавт. [22] сообщили, что гемоперфузия с ПМ-В обладает благоприятным влиянием на функцию органов и показатели смертности больных с септическим шоком (преимущественно грамтрицательной этиологии). Результаты недавнего рандомизированного контролируемого исследования EUPHASE свидетельствуют, что гемоперфузионная терапия с ПМ-В, дополняющая традиционную терапию, обеспечивает существенное улучшение гемодинамических показателей, а также улучшение показателей функции внутренних органов при значительном снижении 28-дневной смертности больных септическим шоком, осложнившимся внутрибрюшную грамтрицательную инфекцию [23].

К сожалению, до настоящего времени отсутствовал клинический опыт оценки АЭ при септическом шоке и проведении специфической антиэндотоксиновой терапии (гемоперфузия с ПМ-В). Учитывая более высокие показатели смертности и большую тяжесть заболевания, зарегистрированные у пациентов с высоким уровнем АЭ на фоне септического шока, по сравнению с группами умеренного и низкого уровня АЭ, мы сосредоточили свое внимание на первой группе, в которой можно ожидать "потенциальный и гипотетический" положительный эффект антиэндотоксиновой терапии. Мы выполнили ретроспективный анализ клинических показателей и исходов, зарегистрированных для пациентов, которые получали лечение по одной из двух схем (традиционная терапия в сравнении традиционной терапией, дополненной гемоперфузией с ПМ-В). В исследовании принимали участие только больные с септическим шоком и высоким уровнем АЭ, которые проходили лечение в ОИТ в период с января 2007 года по декабрь 2009 года.

Согласно нашим протоколам работы в ОИТ, гемоперфузионная терапия с ПМ-В всегда использовалась при рефрактерном септическом шоке с гемодинамической нестабильностью (быстрое возрастание дозы вазопрессоров/инотропных препаратов - более чем на 50% по сравнению со стартовой дозой за 6 часов), недостаточности трех органов и (или) механической вентиляции легких. Гемоперфузионная терапия с ПМ-В всегда проводилась на фоне полноценной терапии, основанной на рекомендациях SSC. Таким образом, гемоперфузионная терапия с ПМ-В использовалась по усмотрению лечащего врача (на основании вышеупомянутых критериев) в качестве вспомогательной терапии, дополняющей традиционную схему лечения, независимо от уровня АЭ.

Мы собирали клинические данные, а также сведения о развитии и исходе септического шока у 41 пациента из группы высокой АЭ. Двадцать восемь из них получали только традиционную терапию, а тринадцать - традиционную терапию в сочетании с ПМ-В. Во второй группе гемоперфузия с ПМ-В выполнялась в течение 24 часов от момента диагностирования септического шока. Два сеанса гемоперфузионной терапии проводились с интервалом в 24 часа.

Регистрация клинических данных осуществлялась исходно (T0) и на 48 часе (T2). Между двумя группами отсутствовала существенная разница в соотношении показателей распространенности подтвержденной грамположительной и грамотрицательной инфекции (данные не представлены). Учитывая наши протоколы лечения в ОИТ, исходно группа гемоперфузионной терапии с ПМ-В характеризовалась более тяжелыми клиническими проявлениями шока, что отражается в большей потребности в вазопрессорах, в более высоком уровне лактата в сыворотке крови и в более высокой исходной балльной оценке по шкале SOFA (таблица 2). На временной отметке T2, несмотря выраженную тяжесть заболевания, для группы гемоперфузионной терапии с ПМ-В было характерно значительное и быстрое снижение потребности в вазопрессорах ($p < 0,01$; рис. 1), чего не наблюдалось в группе традиционной терапии. Кроме того, в отличие от группы стандартной терапии (данные не уточняются), на этой временной отметке в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В регистрировалось существенное улучшение функции органов, о чем свидетельствует снижение концентрации лактата в крови (с $7,13 \pm 4,50$ до $4,53 \pm 4,14$ ммоль/л, $p = 0,001$) и балльной оценки по шкале SOFA (с $13,23 \pm 2,17$ до $10,97 \pm 3,63$ балла, $p < 0,05$; рис. 2).

Таблица 2. Исходные данные больных септическим шоком с высоким уровнем АЭ, представленные в зависимости от стратегии лечения (группа только традиционной терапии и группа традиционной терапии, дополненной гемоперфузией с ПМ-В).

	Традиционная терапия	Гемоперфузионная терапия с ПМ-В	p
Пациенты, n	28	13	
Уровень ЕАА TM , единицы	$0,73 \pm 0,10$	$0,89 \pm 0,18$	0,001
Возраст, годы	$58,3 \pm 14$	$59,9 \pm 13,7$	0,76
АД _{ср} , мм. рт. ст.	$80,7 \pm 9,6$	$79,69 \pm 18,7$	0,81
Оценка по шкале SOFA, баллы	$10,32 \pm 4,08$	$13,23 \pm 2,17^*$	0,02
НОР+АДР, мкг/кг/мин	$0,45 \pm 0,48$	$1,15 \pm 0,51^*$	0,001
Лактат, ммоль/л	$4,42 \pm 4,70$	$7,13 \pm 4,50$	0,09
PaO ₂ /FiO ₂	255 ± 105	237 ± 118	0,64
Пролонгированная заместительная почечная терапия, %	28	23	0,72
Продолжительность пребывания в ОИТ	$20,62 \pm 18,11$	$41,1 \pm 54,2$	0,09

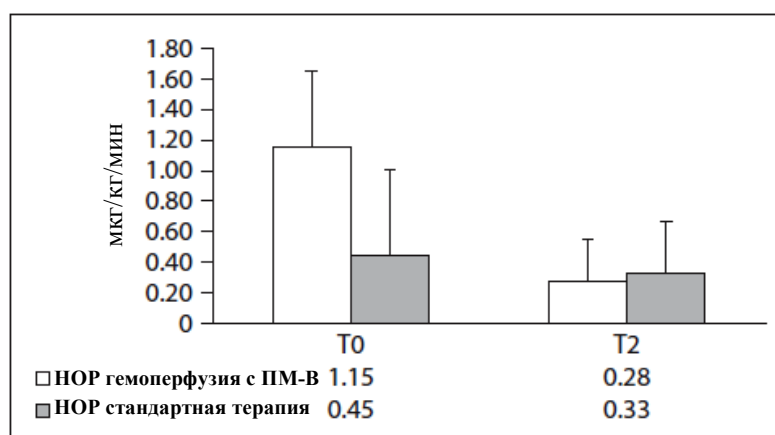


Рис. 1. Динамика дозы НОР+АДР за 48 часов у пациентов с септическим шоком и высоким уровнем АЭ из группы только традиционной терапии и группы традиционной терапии, дополненной гемоперфузией с ПМ-В. Существенное снижение дозы было зарегистрировано только в группе гемоперфузии с ПМ-В ($p < 0,001$).

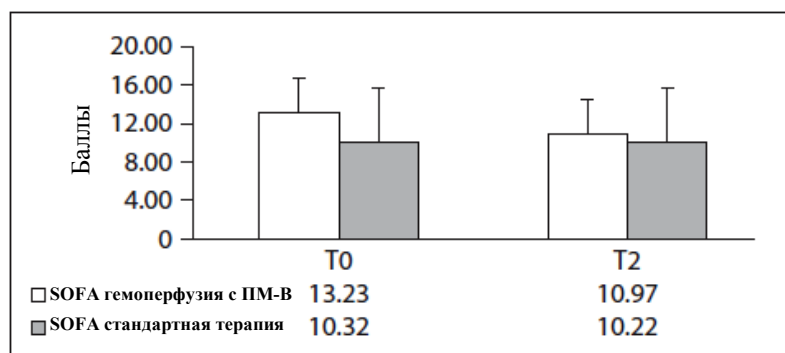


Рис. 2. Динамика балльной оценки по шкале SOFA за 48 часов у пациентов с септическим шоком и высоким уровнем АЭ из группы только традиционной терапии и группы традиционной терапии, дополненной гемоперфузией с ПМ-В. Существенное снижение дозы было зарегистрировано только в группе гемоперфузии с ПМ-В ($p < 0,05$).

Клиническое улучшение, зафиксированное в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В, было связано со снижением уровня АЭ (данные не представлены; $n = 7$, в связи с ретроспективным характером исследования). Распространенность пролонгированной заместительной почечной терапии была одинаковой в обеих группах. То же самое можно сказать о гормональной терапии и применении активированного протеина С. Осложнения, связанные с гемоперфузионной терапией, отсутствовали. Уровень общей смертности достигал 15% в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В и 32% в группе традиционной терапии ($p = 0,614$, χ^2 критерий). Принимая во внимание ограничения ретроспективного анализа, небольшой размер выборки и несбалансированное лечение, эти клинические данные указывают на целесообразность экстракорпорального удаления эндотоксина при рефрактерном септическом шоке с полиорганной недостаточностью. Мы намеренно не акцентировали внимание на заметной разнице в показателях смертности, которая представляет собой интерес, но, в то же время, может вводить в заблуждение.

В целом, наши результаты согласуются с данными, представленными в научной литературе. Гемоперфузионная терапия с ПМ-В, дополняющая традиционную схему лечения, обеспечивала существенное улучшение показателей гемодинамики и функции органов, а также, судя по всему, способствовала снижению показателя внутрибольничной смертности в "целевой" популяции больных септическим шоком. В отличие от предшествующих исследований, данный ретроспективный анализ изучал возможную связь между уровнем АЭ и специфической антиэндотоксиновой терапией (гемоперфузия с ПМ-В). Теперь известно, что высокий уровень АЭ позволяет идентифицировать популяцию высокого риска, представленную больными с септическим шоком. На этом основании мы можем рассуждать о возможности проведения целенаправленного вмешательства, задача которого состоит в удалении эндотоксина из организма больного. Учитывая данное обстоятельство, результаты нашего исследования, в рамках которого было выполнено сравнение (вне зависимости от типа инфекции) двух стратегий лечения больных с септическим шоком при высоком уровне АЭ (только традиционная терапия в сравнении с традиционной терапией, дополненной гемоперфузией с ПМ-В), подтверждают положительный эффект антиэндотоксиновой терапии, о чем свидетельствует быстрое и существенное улучшение функции органов у пациентов с тяжелым септическим шоком. Насколько нам известно, это первый опыт целенаправленного использования гемоперфузии с ПМ-В в популяции больных с выраженным септическим шоком (исходная потребность в НОР+АДР = $1,15 \pm 0,51$ мкг/кг/мин) и полиорганной недостаточностью. Для подтверждения этих многообещающих данных в популяции больных с менее тяжелой патологией, необходимо выполнить более крупные проспективные рандомизированные исследования.

Обнадеживающие данные, связанные с уменьшением уровня АЭ после гемоперфузионной терапии с ПМ-В, требуют подтверждения путем анализа динамики уровня АЭ у всех больных с высоким уровнем АЭ на фоне септического шока.

Выводы

Соответственно данным, представленным в научной литературе, наше исследование показало, что уровень АЭ не зависит от характера или источника инфекции, но отражает тяжесть заболевания в популяции тяжелобольных пациентов с септическим шоком. Уровень АЭ можно использовать как маркер для стратификации больных с септическим шоком из группы высокого риска, или для прогнозирования благоприятного развития сепсиса. Определение популяции высокого риска, представленной пациентами с септическим шоком, по высокому уровню АЭ открывает два новых пути для дальнейшей научной работы.

- Может ли диагноз "септический шок" в будущем характеризоваться как "состояние с высоким или низким уровнем ЕАА™"? Кроме того, должна ли оценка активности эндотоксина быть частью стандартного клинического обследования больных с септическим шоком?
- Целесообразно ли удаление эндотоксина при септическом шоке с высоким уровнем АЭ? Зависит или не зависит целесообразность применения антиэндотоксиновой терапии от характера инфекции?

Для того чтобы получить ответы на эти вопросы, необходимо провести дополнительные исследования.

Ссылки

1. Ulevitch RJ, Tobias PS: Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999;11:19-22.
2. Rietschel ET, Brade H, Holst O, et al: Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;216:39-81.
3. Opal SM: The host response to endotoxin, anti-LPS strategies and the management of severe sepsis. *Int J Med Microbiol* 2007;297: 365-377.
4. Balk RA: Endotoxemia in critically ill patients: why a reliable test could be beneficial. *Crit Care* 2002;6:289-290.
5. Klein DJ, Derzko A, Seely A, Foster D, Marshall J: Marker or mediator? Changes in endotoxin activity as a predictor of adverse outcomes in critical illness. *Crit Care* 2005;9(Suppl 1):161-165.
6. Marshall JC, Walker PM, Foster DM, et al: Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care* 2002;6:342-348.
7. Romaskin AD, Harris DM, Ribeiro MB, et al: Rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil-dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods* 1998;212:169-185.
8. Marshall JC, Forster D, Vincent JL, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004;190:527-534.
9. Cohen J: The detection and interpretation of endotoxemia. *Intensive Care Med* 2000;26(Suppl 1):s51-s56.
10. Fink MP, Aranow JS: Gut barrier dysfunction and sepsis; in Fein A(ed): *Sepsis and Multiorgan Failure*. Baltimore, William & Wilkins, 1997, pp 383-407.
11. Guidet B, Barakett V, Vassal T, Petit JC, Offenstadt G: Endotoxemia and bacteremia in patients with sepsis syndrome in the intensive care unit. *Chest* 1994;106:1194-1201.
12. Casey LC, Balk RA, Bone RC: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993;119:771-778.
13. Cohen J, McConnell JS: Observations on the measurement and evaluation of endotoxemia by a quantitative Limulus lysate microassay. *J Infect Dis* 1984;150:916-924.

14. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999;180:1584-1589.
15. Zhao B, Bowden RAS, Stavchansky SA, Bowmann PD: Human endothelial cell response to Gram-negative LPS assessed with cDNA microarrays. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C1587-C1595.
16. van der Poll T, Opal SM: Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:32-43.
17. Opal SM, Glück T: Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003;31(Suppl):57-64.
18. Kellum JA: A targeted extracorporeal therapy for endotoxemia: the time has come. *Crit Care* 2007;11:137.
19. McCloskey RV, Straube RC, Sanders C, Smith SM, Smith CR: Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESSTrial Study Group. *Ann Intern Med* 1994;121:1-5.
20. Shoji H: Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther Apher Dial* 2003;7:108-114.
21. Cantaluppi V, Assenzio B, Pasero D, et al: Polymyxin B-hemoperfusion inactivates circulating proapoptotic factors. *Intensive Care Med* 2008;34:1638-1645.
22. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, et al: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care* 2007;11:R47.
23. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B-hemoperfusion in abdominal septic shock. *JAMA* 2009;301: 2445-2452.

Жанпаола Монти, доктор медицины
Отделение интенсивной терапии, больница Нигуарда
Пиацца Оспедале Маггиоре 3
IT-20100, г. Милан (Италия)
Электронная почта: Gianpaola.monti@ospedaleniguarda.it

Удаление эндотоксина: накопление достоверных сведений

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 111-118

Удаление эндотоксина: что необходимо для окончательного подтверждения обоснованности метода? На смену исследованию EUPHAS приходит исследование EUPHRATES

Жан-Себастьян Рашуан^а · Дебра Фостер^б · Р. Филип Деллинджер^а

^а Медицинская школа Роберта Вуд Джонсона, Университет медицины и стоматологии штата Нью-Джерси, отдел медицины, отделение реанимации, Университетская клиника Купер, г. Камден, штат Нью-Джерси, США

^б Корпорация Спектрал Диагностикс, г. Торонто, Онтарио, Канада

Реферат

К настоящему моменту накоплено достаточное количество данных из Японии и Европы, свидетельствующих в пользу безопасности гемоперфузии с полимиксином В (ПМ-В) при лечении септического шока. Кроме того, существуют сведения, указывающие на потенциальную эффективность этого метода, хотя соответствующие рандомизированные контролируемые исследования немногочисленны и характеризуются противоречивыми результатами. Гемоперфузия с ПМ-В представляет собой новый перспективный метод лечения, который способен оказать существенное положительное влияние на выживаемость. Предшествующие клинические исследования были подвергнуты критике в связи методологическими недостатками, такими как неиспользование слепого метода, оценка суррогатных исходов и отсутствие анализа показателей отдаленной смертности. К другим недостаткам можно отнести непостоянство количества использованных картриджей, выбор участников на основании вероятной эндотоксемии без определения уровня активности эндотоксина, а также малые размеры выборок преимущественно в одноцентровых исследованиях. Новое исследование EUPHRATES (англ. *Evaluating Use of Polymyxin Hemoperfusion in a Randomized Controlled Trial of Adults treated for Endotoxemia and Septic Shock*; оценка применения гемоперфузии с полимиксином В в рамках рандомизированного контролируемого исследования в популяции взрослых больных с эндотоксемией и септическим шоком) лишено многих методологических недостатков предшествующих исследований. Это исследование создает благоприятные условия для изучения клинической эффективности антиэндотоксиновой терапии в популяции тяжелобольных пациентов, страдающих сепсисом.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Сепсис представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. В Соединенных Штатах Америки ежегодно регистрируются более 750000 случаев сепсиса. 200000 из них заканчиваются летальным исходом [1]. Хотя за последние два десятилетия уровень смертности, обусловленной септическим шоком, существенно снизился, эта патология по-прежнему является наиболее распространенной причиной смерти пациентов, пребывающих на лечении в отделениях интенсивной терапии [2]. В рамках североамериканской кампании по борьбе с сепсисом (англ. *surviving sepsis campaign, SSC*)

был достигнут значительный прогресс в сфере лечения этого заболевания. Этот прогресс обусловлен использованием практических рекомендаций, основанных на принципах доказательной медицины, и, что еще более важно, внедрением формальной программы совершенствования практической работы в сфере лечения сепсиса (групповые рекомендации SSC по лечению сепсиса). Недавно опубликованные данные указывают на то, что эта программа способствует значительному снижению уровня смертности [3]. Тем не менее, смертность остается очень высокой. Средняя стоимость лечения одного больного с тяжелым сепсисом составляет, по меньшей мере, 50000 долларов США, а ежегодные затраты на лечение этого заболевания в Соединенных Штатах достигают 17 миллиардов долларов [1]. Таким образом, использование новых эффективных методов лечения в популяции больных, для которых весьма вероятен положительный отклик, может улучшить клинический исход сепсиса и снизить затраты на оказание медицинской помощи.

Лечение сепсиса: значение целенаправленной антиэндотоксиновой терапии

Эндотоксин - это липополисахарид клеточной стенки грамотрицательных бактерий, который стимулирует иммунный ответ посредством связывания с толл-подобными рецепторами 4 типа. Доподлинно известно, что эндотоксин является одним из наиболее существенных факторов, запускающих воспалительный каскад при сепсисе [4].

Внутривенное введение эндотоксина здоровому человеку неизменно провоцирует развитие системного воспалительного ответа, который, в свою очередь, может отягощаться миокардиальной недостаточностью, снижением артериального давления, а в дальнейшем - полиорганной недостаточностью и смертью [5, 6]. Известно, что у тяжелобольных пациентов повышенный уровень эндотоксина коррелирует с повышенным риском смерти [7, 8].

Приблизительно у 80% больных тяжелым сепсисом определяется повышенное содержание эндотоксина в крови. Очень высокий уровень эндотоксина регистрируется, по меньшей мере, у 30% таких пациентов [7]. Повышенный уровень эндотоксина можно обнаружить при бактериологически подтвержденной грамотрицательной инфекции, при грамположительной инфекции, грибковой инфекции, а также в других случаях септического шока, когда источник инфекции не установлен микробиологическими методами [7, 9, 10]. В таких случаях предполагается, что эндотоксемия обусловлена проникновением эндотоксина через слизистую оболочку кишечника в системный кровоток в условиях шока, гипоксемии и нарушений спланхического кровотока [4, 11].

Целенаправленная антиэндотоксиновая терапия является привлекательным методом лечения пациентов с высоким уровнем эндотоксина в крови. Этот метод может помочь снизить смертность в соответствующей популяции больных в Соединенных Штатах [12]. В настоящее время на территории США доступен экспресс-метод определения активности эндотоксина [7], а в Японии для удаления эндотоксина активно используется гемоперфузионный картридж с иммобилизованным полимиксином В (ПМ-В). Таким образом, существует возможность объединить эти две технологии для определения эффекта антиэндотоксиновой терапии у больных с септическим шоком и высоким уровнем активности эндотоксина.

Опыт применения гемоперфузии с ПМ-В в Японии

ПМ-В - это мощный антибиотик, который способен связываться с липидом А эндотоксина [13]. Внутривенное применение ПМ-В сопряжено с риском нейротоксичности и нефротоксичности [14]. Тем не менее, эти нежелательные эффекты не проявляются, когда ПМ-В иммобилизован и функционирует в качестве лиганда в гемоперфузионной колонке, заполненной адсорбентом. В колонке ПМ-В экстракорпорально связывает эндотоксин и удаляет его из кровотока [15].

От момента опубликования первого отчета о клиническом применении гемоперфузии с ПМ-В в 1994 году [16], были опубликованы более 50 статей, в которых описано использование данного метода для лечения свыше 1400 тяжелобольных пациентов. Метод гемоперфузии с ПМ-В официально разрешен в Японии с 1993 года, а в Европе - с 1998 года. За последние 15 лет более 70000 больных получили сеансы гемоперфузии с ПМ-В на территории Японии и Италии.

Известно, что гемоперфузионная терапия с ПМ-В обеспечивает снижение концентрации эндотоксина в крови больных с септическим шоком. Кроме того, по данным исследований, выполненных в человеческой популяции, удаление эндотоксина регулирует воспалительный ответ за счет снижения уровня цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (англ. *tumor necrosis factor, TNF*) и интерлейкин-6 (англ. *interleukin-6, IL-6*) [17].

В 2003 году Nakamura и соавт. [18] опубликовали результаты самого крупного на сегодняшний день исследования, посвященного гемоперфузионной терапии с ПМ-В. В этом открытом контролируемом исследовании приняли участие 314 больных тяжелым сепсисом. Из них, 206 пациентам была показана гемоперфузионная терапия с ПМ-В. Основанием для ее применения служила бактериологически подтвержденная инфекция или повышенная концентрация эндотоксина в крови, наряду с недостаточностью одного органа. Представители группы гемоперфузионной терапии получили два сеанса гемоперфузии за 24 часа. Уровень 28-дневной смертности в этой группе достигал 32%, тогда как в группе пациентов, получавших традиционную терапию, данный показатель составил 67% ($p < 0,01$). После гемоперфузии, у больных сепсисом наблюдалось значительное улучшение таких показателей, как уровень артериального давления, частота сердечных сокращений, температура тела и соотношение PO_2/FiO_2 ($p < 0,05$). Кроме того, у таких пациентов регистрировалось существенное снижение уровня эндотоксина и медиаторов воспаления в крови (IL-6, TNF, эндотелин-1, растворимые рецепторы IL-2 и тромбоцитарный фактор-4) ($p < 0,05$ для всех медиаторов).

В рамках одноцентрового исследования, выполненного в Японии, Nemoto и соавт. [19] в случайном порядке распределили 98 пациентов в группы гемоперфузионной терапии с ПМ-В ($n = 54$) и традиционной терапии ($n = 44$). Общий 28-дневный уровень выживаемости достигал 41% в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В, тогда как в группе стандартной терапии этот показатель составил 11% ($p < 0,002$). Между группами отсутствовала существенная разница в средней оценке по шкале APACHE II. Тем не менее, подгрупповой анализ смертности, основанный на пограничной балльной оценке по шкале APACHE II, составляющей 30 баллов, показал, что в подгруппе больных с оценкой >30 баллов гемоперфузионная терапия с ПМ-В не оказывала существенного положительного влияния на показатели выживаемости (7 против 0%; $p = 0,59$). Однако, в этом исследовании гемоперфузия с ПМ-В способствовала значительному снижению уровня эндотоксина в крови всех пациентов (с $38,6 \pm 5,7$ до $21,4 \pm 2,0$ пг/мл; $p = 0,006$), а также выраженному улучшению показателей среднего артериального давления у пациентов с балльной оценкой по шкале APACHE II <30 . В популяции больных с оценкой по шкале APACHE II <30 баллов регистрировались более благоприятные исходы, чем в популяции пациентов с оценкой >30 баллов. Следовательно, у пациентов с выраженными нарушениями положительные эффекты терапии могут не проявиться. К недостаткам этого исследования можно отнести небольшое число наблюдений, а также значительное количество факторов, способных повлиять на результаты исследования.

Stuz и соавт. [17] выполнили систематический обзор исследований, посвященных оценке эффектов гемоперфузионной терапии с ПМ-В в популяции больных сепсисом. Мета-анализ охватывает 28 работ, опубликованных в период с 1998 года по 2006 год. Общий размер выборки составил 1425 пациентов. 978 из них получали гемоперфузионную терапию с ПМ-В, а 447 - только традиционную терапию. Основным наблюдением было то, что гемоперфузионная терапия с ПМ-В характеризовалась значительно меньшим

уровнем внутрибольничной смертности (61,5% в группе традиционной терапии против 33,5% в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В; относительный риск: 0,53, 95% доверительный интервал (ДИ): 0,43-0,65, $p < 0,001$). Столь выраженное снижение смертности сопровождалось существенным улучшением гемодинамических показателей, в частности увеличением уровня среднего артериального давления на 19 мм рт. ст. (95% ДИ: 15-22, $p < 0,001$) и уменьшением дозы вазопрессоров на 1,8 мкг/кг/мин (95% ДИ: 0,4-3,3, $p = 0,01$) после гемоперфузии. Кроме того, средний показатель соотношения PO_2/FiO_2 возрос на 32 единицы (95% ДИ: 23-41, $p < 0,001$). Объединенная оценка показала, что после гемоперфузионной терапии с ПМ-В уровень эндотоксина в крови снизился на 21,2 пг/мл (95% ДИ: 17,5-24,9), что соответствует уменьшению на 33-80% по сравнению с исходным уровнем. Этот обзор научных публикаций позволил сделать вывод, что ПМ-В, судя по всему, обладает положительным влиянием на основные физиологические показатели, а также на показатели смертности.

Опыт применения гемоперфузии с ПМ-В в Европе

Европейское пилотное исследование гемоперфузионной терапии с ПМ-В при сепсисе с внутрибрюшной инфекцией

Результаты европейского многоцентрового рандомизированного исследования гемоперфузионной терапии с ПМ-В при абдоминальном сепсисе свидетельствуют о том, что эта форма экстракорпоральной терапии способствует улучшению физиологических показателей, но не оказывает влияния на уровень смертности [20]. Семнадцати (из 36) пациентам с абдоминальным сепсисом в послеоперационном периоде была назначена гемоперфузионная терапия с ПМ-В. В рамках этого исследования пациенты получили только по одному сеансу гемоперфузионной терапии с ПМ-В. Уровень эндотоксина не использовался в качестве критерия включения. По данным теста, основанного на применении лизата амёбоцитов мечехвоста, существенного снижения концентрации эндотоксина в крови пациентов не наблюдалось. Не у всех пациентов концентрация эндотоксина была повышена исходно. Кроме того, уровень эндотоксина варьировал между группами в широких пределах на всех временных отметках.

Для всех пациентов, получивших сеанс гемоперфузионной терапии с ПМ-В, на второй день было зарегистрировано увеличение среднего артериального давления на $6 \pm 13,6$ мм рт. ст. по сравнению с исходным уровнем ($p = 0,006$). Уровень смертности достигал 28% (5/18) в контрольной группе, и 29% (5/17) в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В.

Авторы пришли к заключению, что гемоперфузия с ПМ-В была безопасна, не сопровождалась развитием серьезных нежелательных явлений, а также характеризовалась улучшением гемодинамических показателей и функции сердца. Ограничением этого исследования является использование одного сеанса гемоперфузии для каждого пациента, чего могло быть недостаточно для оптимального удаления эндотоксина из кровотока больных. При отсутствии первичного контроля содержания эндотоксина, у некоторых пациентов, получивших сеанс гемоперфузии с ПМ-В, концентрация эндотоксина в крови была невысокой.

Раннее применение гемоперфузии с полимиксином В при абдоминальном септическом шоке - исследование EUPHAS

Недавно опубликованные результаты многоцентрового рандомизированного клинического исследования (название: раннее применение гемоперфузии с полимиксином В при абдоминальном септическом шоке [англ. *Early Use of Polymyxin B Hemoperfusion in Abdominal Septic Shock, EUPHAS*], идентификационный номер на ClinicalTrials.gov: NCT00629382) свидетельствуют, что в популяции из 64 пациентов с тяжелым сепсисом и септическим шоком на фоне внутрибрюшной инфекции гемоперфузионная терапия с ПМ-В, дополняющая традиционную схему лечения, способствовала клинически значимому

уменьшению уровня 28-дневной смертности (32% в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В против 53% в группе традиционной терапии; некорригированное отношение рисков [OR]: 0,42, 95% ДИ: 0,20-0,94; корригированное OR: 0,36, 95% ДИ: 0,16-0,80; $p = 0,012$) [21]. Кроме того, на 72 часу в группе пациентов, получавших гемоперфузионную терапию с ПМ-В, было обнаружено статистически существенное улучшение балльной комплексной оценки выраженности органной недостаточности (дельта оценки по шкале SOFA [разница между максимальной и исходной оценкой по шкале SOFA] достигала -3,4 [95% ДИ: от -4,4 до -2,4]) по сравнению с группой традиционной терапии (-0,1 [95% ДИ: от -1,7 до 1,5]; $p < 0,001$). У пациентов, получавших ПМ-В, наблюдалось клинически и статистически существенное увеличение уровня среднего артериального давления (76-84 мм рт. ст., $p = 0,001$), тогда как потребность в вазопрессорах значительно снизилась.

Популяция пациентов с внутрибрюшным источником сепсиса была избрана в связи с тем, что для ее представителей наиболее вероятно повышенная концентрация эндотоксина в крови. Тем не менее, уровень активности эндотоксина не определялся.

Исходно предполагалось, что общий размер выборки в данном исследовании будет насчитывать 120 пациентов (60 представителей терапевтической группы и 60 представителей контрольной группы).

В период с декабря 2004 года по декабрь 2007 года в исследовании приняли участие 64 пациента из 10 клиник Италии. Тем не менее, на основании результатов запланированного промежуточного анализа исследование было преждевременно прекращено. На тот момент в каждую группу были включены 30 пациентов. Наблюдение за этими пациентами осуществлялось вплоть до выписки. Руководитель клинического комитета по этике ведущего исследовательского центра заявил, что будет неэтично продолжать данное исследование, учитывая потенциальную пользу терапии для больных из группы высокого риска. Это решение не оспаривалось.

Согласно результатам данного исследования, уровень 28-дневной смертности достигал 32% (11/34) в группе гемоперфузионной терапии с ПМ-В, и 53% в группе традиционной терапии (16/30). После поправки на балльную оценку по шкале SOFA, было установлено, что в группе гемоперфузионной терапии существенно снизился уровень 28-дневной смертности (корригированное OR: 0,36, 95% ДИ: 0,16-0,80, $p = 0,012$). Положительное влияние терапии на показатели смертности поддерживалось от 28 дня до выписки.

Это было наиболее крупное исследование гемоперфузионной терапии с ПМ-В, выполненное за пределами Японии в популяции больных с септическим шоком. Для пациентов, получавших специфическую антиэндотоксиновую терапию, было зарегистрировано абсолютное снижение риска смерти в стационаре на 21% (относительное снижение риска: 39,6%). Эти данные согласуются с результатами других исследований, которые были выполнены в разнообразных популяциях пациентов и описаны в вышеупомянутом мета-анализе Cruz и соавт. [17].

Опыт предшествующих исследований и перспективные направления

Исследование EUPHRATES (англ. *Evaluating Use of Polymyxin Hemoperfusion in a Randomized Controlled Trial of Adults treated for Endotoxemia and Septic Shock*; оценка применения гемоперфузии с полимиксином В в рамках рандомизированного контролируемого исследования в популяции взрослых больных с эндотоксемией и септическим шоком) - это рандомизированное контролируемое исследование, которое запланировано для изучения безопасности и эффективности гемоперфузионной терапии с ПМ-В. Это исследование должно отреагировать на предшествующие критические замечания, связанные с целесообразностью клинического применения гемоперфузии с ПМ-В при септическом шоке.

Одним из основных методологических недостатков предшествующих исследований было отсутствие слепого метода. В связи с тем, что все эти исследования носили характер открытых, существовал риск погрешности, "искусственно пролонгирующей" выживаемость пациентов, которые получали соответствующую терапию. В прошлом, использование слепого метода представляло собой проблему. Причиной тому служили этические аспекты, связанные с использованием ложного контроля. Тем не менее, в рамках исследования EUPHRATES будет предпринята попытка внедрить слепой метод для лиц, принимающих руководящие решения, с помощью современной методики, не требующей использования ложного контроля. Другим важным недостатком исследования EUPHAS и прочих предшествующих исследований гемоперфузионной терапии с ПМ-В является краткосрочная оценка смертности и других суррогатных показателей. Из числа более чем 50 опубликованных исследований, только в двух использовался показатель смертности за период, превышающий 30 дней [22-23] (60 дней). В действительности, в большинстве исследований применялись суррогатные показатели, такие как улучшение гемодинамики и положительное влияние на функцию органов. Хотя основным показателем исхода в исследовании EUPHRATES будет уровень 28-дневной смертности, дополнительно должна оцениваться смертность за период до 1 года.

В предшествующих исследованиях использовалось различное количество сеансов гемоперфузии. Хотя основная часть доклинических данных, наряду с результатами исследований, проведенных на территории Японии, описывает применение двух сеансов гемоперфузии, в рамках европейского пилотного исследования, выполненного Vincent и соавт. [20], использовался только один сеанс гемоперфузионной терапии. Подобно исследованию EUPHAS, в исследовании EUPHRATES планируется проводить два сеанса гемоперфузии для каждого пациента.

Одна из клинических трудностей, препятствовавших подтверждению успешного проведения антиэндотоксиновой терапии, заключалась в диагностике эндотоксемии у пациентов, которые принимали участие в исследованиях нейтрализации или удаления эндотоксина [24]. Ни в одном из предыдущих исследований не выполнялось определение уровня эндотоксина в крови в качестве критерия включения или мониторинга, поскольку соответствующий метод не был широко доступен на момент проведения этих исследований. Исследование EUPHAS и европейское пилотное исследование были спроектированы таким образом, чтобы обогатить исследуемую популяцию больными с вероятной эндотоксемией. В связи с этим, для участия в данных исследованиях были отобраны больные сепсисом, развившимся после абдоминального хирургического вмешательства, и пациенты с высокой вероятностью грамотрицательной инфекции. Тем не менее, предпринятые усилия не привели к формированию гомогенной популяции в аспекте эндотоксемии, о чем свидетельствуют результаты европейского пилотного исследования, в рамках которого положительное влияние терапии на показатели смертности могло исказиться в связи с участием больных без эндотоксемии.

В 2003 году Управление по контролю качества пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США (англ. *Food and Drug Administration, FDA*) санкционировало использование теста на активность эндотоксина (англ. *Endotoxin Activity Assay, EAA™*) (K021885). До этого времени отсутствовали утвержденные FDA методы определения активности эндотоксина у больных. В настоящее время, этот метод можно использовать для идентификации высокого уровня эндотоксина в крови пациентов, страдающих сепсисом. EAA™ использовался в рамках крупного многоцентрового наблюдательного исследования эндотоксемии у тяжелобольных пациентов [7]. Было установлено, что высокий уровень эндотоксина можно обнаружить у больных с подтвержденной грамотрицательной и грамположительной инфекцией, а также у пациентов с отрицательным результатом бактериологического исследования. В последнем случае,

эндотоксемия может быть связана с транслокацией эндотоксина из желудочно-кишечного тракта.

Поскольку предполагается, что гемоперфузия с ПМ-В улучшает исход болезни благодаря удалению эндотоксина из системного кровотока, пациенты с без эндотоксина или больные с низким уровнем эндотоксина в крови не подлежат включению в исследование EUPHRATES. Для того чтобы обеспечить эффективное формирование популяции этого исследования, планируется использовать двухэтапную процедуру отбора участников. Все пациенты, удовлетворяющие предопределенным критериям септического шока, пройдут тест на активность эндотоксина (ЕАА™). В процесс рандомизации будут включены только те пациенты, для которых подтвердится высокий уровень эндотоксина в крови.

И наконец, для того чтобы избежать недостатков, связанных с малым числом участников на базе отдельных исследовательских центров, исследование EUPHRATES запланировано как крупнейшее многоцентровое исследование экстракорпоральной терапии в популяции больных сепсисом.

Выводы

Гемоперфузия с ПМ-В является перспективным методом лечения больных с септическим шоком и подтвержденной высокой активностью эндотоксина. Результаты предшествующих исследований свидетельствуют о возможной значительной клинической пользе этого вида терапии. Тем не менее, проведенные исследования характеризуются некоторыми ограничениями, например, отсутствием слепого метода, использованием суррогатных и краткосрочных показателей, непостоянным числом сеансов гемоперфузии, а также отсутствием измерений активности эндотоксина перед рандомизированием. В протоколе исследования EUPHRATES учтены недостатки предшествующих исследований. Формирование популяции для этого исследования планируется начать во втором или третьем квартале 2010 года.

Ссылки

1. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-1554.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310.
3. Castellanos-Ortega A, Suberviola B, Garcia-Astudillo LA, et al: Impact of the surviving sepsis campaign protocols on hospital length of stay and mortality in septic shock patients: results of a 3-year follow-up quasi-experimental study. *Crit Care Med* 2010, E-pub ahead of print.
4. Cinel I, Dellinger RP: Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:345-352.
5. Taveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, Lambert DR, Suffredini AF, Danner RL: Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *N Engl J Med* 1993;328:1457-1460.
6. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, et al: The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989;321:280-287.
7. Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004;190:527-534.
8. Casey LC, Balk RA, Bone RC: Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993;119:771-778.
9. Opal SM, Gluck T: Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med* 2003;31(Suppl 1): S57-S64.
10. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE: Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99:169-175.

11. Clark JA, Coopersmith CM: Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the 'motor' of critical illness. *Shock* 2007;28:384-393.
12. Kellum JA: A targeted extracorporeal therapy for endotoxemia: the time has come. *Crit Care* 2007;11:137.
13. Bhor VM, Thomas CJ, Surolia N, Surolia A: Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol Biosyst* 2005;1:213-222.
14. Danner RL, Joiner KA, Rubin M, et al: Purification, toxicity, and antiendotoxin activity of polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33: 1428-1434.
15. Shoji H: Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin). *Ther Apher Dial* 2003;7:108-114.
16. Aoki H, Kodama M, Tani T, Hanasawa K: Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B-immobilized fiber. *Am J Surg* 1994;167:412-417.
17. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, et al: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care*. 2007;11:R47.
18. Nakamura T, Matsuda T, Suzuki Y, Shoji H, Koide H: Polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion in patients with sepsis. *Dial Transplant* 2003;32:602-607.
19. Nemoto H, Nakamoto H, Okada H, et al: Newly developed immobilized polymyxin B fibers improve the survival of patients with sepsis. *Blood Purif* 2001;19:361-368, discussion 368-369.
20. Vincent JL, Laterre PF, Cohen J, et al: A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intraabdominal infection. *Shock* 2005;23:400-405.
21. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301:2445-2452.
22. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki Y, et al: Combination therapy with polymyxin B-immobilized fibre haemoperfusion and teicoplanin for sepsis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2003;53:58-63.
23. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki Y, et al: Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber in septic patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-associated glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract* 2003;94:c33-c39.
24. Marshall JC: Sepsis: rethinking the approach to clinical research. *J Leukoc Biol* 2008;83: 471-482.

Р. Филип Деллинджер, доктор медицины
 Заведующий отделением реанимации, Университетская клиника Купер
 Уан Купер Плаза, 393 Дорранс
 г. Камден, штат Нью-Джерси, 08103 (США)
 Телефон: +1 856 342 2567. Факс: +1 856 968 8306.
 Электронная почта: dellinger-phil@cooperhealth.edu

Удаление эндотоксина: накопление достоверных сведений

Библиографическая ссылка: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH (eds): Endotoxemia and Endotoxin Shock: Disease, Diagnosis and Therapy. Contrib Nephrol. Basel, Karger, 2010, vol 167, pp 119-125

Удаление эндотоксина: что необходимо для окончательного подтверждения обоснованности метода? Проект EUPHAS 2

Эрика Л. Мартин^а · Динна Н. Круз^{б,в} · Жанпаола Монти^г · Жанпаоло Каселла^г · Серджио Вескони^г · В. Марко Раньери^а · Клаудио Ронко^{б,в} · Массимо Антонелли^д

^а Отделение анестезиологии и реанимации, Университет г. Турин, Ospedale S. Giovanni Battista-Molinette, г. Турин, Италия

^б Отделение нефрологии, диализа и трансплантации, больница Сан-Бортоло, г. Виченца, Италия

^в Международный научно-исследовательский институт нефрологии, г. Виченца, Италия

^г Отделение интенсивной терапии "Г. Боцца", Ospedale Niguarda Ca'Granda, г. Милан, Италия

^д Отделение интенсивной терапии и анестезиологии, Католический университет Пресвятого Сердца, г. Рим, Италия

Реферат

С 1994 года для экстракорпоральной гемоперфузии используется картридж, структура которого представлена полистироловыми волокнами с иммобилизованным полимиксином В. Этот картридж предназначен для абсорбции и удаления липополисахарида из кровотока больных сепсисом. Как следствие, нейтрализуются эффекты эндотоксина. Гемоперфузионная терапия с полимиксином В постепенно внедряется в клиническую практику. Вслед за первоначальными небольшими клиническими исследованиями был выполнен тщательный систематический обзор. Затем на территории Италии было проведено многоцентровое рандомизированное клиническое исследование под названием EUPHAS (англ. *Early Use of Polymyxin B Hemoperfusion in Abdominal Septic Shock*; раннее применение гемоперфузии с полимиксином В при абдоминальном септическом шоке). Хотя выводы, сделанные на основании результатов этого рандомизированного контролируемого исследования, согласуются с данными предшествующих исследований, исследование EUPHAS характеризовалось некоторыми существенными ограничениями, такими как низкий коэффициент прироста выборки (в период с 2004 по 2007 год в исследовании приняли участие всего 64 пациента), невозможность реализации слепого метода для лечащих врачей, а также преждевременное прекращение исследования на основании результатов запланированного промежуточного анализа. В связи с этими ограничениями, окончательный размер выборки был умеренным, что могло послужить причиной переоценки истинной выраженности клинического эффекта. Помимо Японии, в настоящее время гемоперфузия с полимиксином В преимущественно используется в Италии для лечения больных сепсисом. В этой стране ежегодно расходуются приблизительно 600 картриджей. Тем не менее, структурированный сбор данных о клиническом применении этого метода лечения не выполнялся, что указывает на необходимость изучения эффектов гемоперфузии с полимиксином В в крупной и разнообразной выборке. В связи с этим, исследователи из Италии вместе с клиницистами, активно использующими эту форму терапии, совместно спроектировали новое проспективное многоцентровое исследование, которое получило название EUPHAS 2. Задача исследования EUPHAS 2 состоит в формировании обширной

базы данных, посвященных гемоперфузионной терапии с полимиксином В. Приобретение соответствующих сведений позволит лучше оценить эффективность и биологическую значимость удаления эндотоксина в клинической практике. Кроме того, это исследование нацелено на проверку воспроизводимости данных, представленных в научной литературе, на оценку выбранной популяции больных, а также на идентификацию субпопуляций пациентов, для которых эта форма лечения может оказаться наиболее эффективной.

Авторские права © (2010 год) принадлежат S. Karger AG, г. Базель

Под термином "эндотоксемия" подразумевается присутствие эндотоксинов или токсических структурных компонентов определенных бактерий в крови, которое может повлечь за собой нарушение функции органов, шок и смерть пациента. Эндотоксемия может быть вызвана непосредственно грамотрицательной инфекцией или обусловлена нарушением барьерной функции кишечника. Эндотоксемия чрезвычайно распространена среди больных с тяжелой соматической патологией и травмами [1]. Липополисахарид (ЛПС) - это самый распространенный вид эндотоксина, который в крови здорового человека определяется в минимальном количестве [2]. При сепсисе содержание ЛПС в крови может увеличиваться в 1000 раз даже при отсутствии подтвержденной грамотрицательной инфекции [3]. Кроме того, при повышенном содержании ЛПС в крови наблюдается усугубление клинического исхода [4].

Полимиксин В - это антибиотик, который используется для лечения грамотрицательной инфекции. Он способен с высоким аффинитетом связываться с ЛПС клеточной стенки бактерий, повышая ее проницаемость, что, в свою очередь, приводит к гибели возбудителя. Благодаря способности прочно связываться с ЛПС, полимиксин В первоначально было предложено использовать в качестве средства для удаления эндотоксина из кровотока. Тем не менее, вскоре было установлено, что системное применение полимиксина В характеризуется выраженными нейротоксическими и нефротоксическими эффектами. В связи с этим, в последние годы фармацевтические компании попытались разработать новые молекулы, имитирующие аффинитет полимиксина В к ЛПС, которые были бы лишены неблагоприятных эффектов. К сожалению, по данным клинических исследований многие виды антиэндотоксиновой терапии, включая моноклональные антитела и ЛПС-нейтрализующие белки, оказались лишены существенных биологических преимуществ [5].

Японская компания Торэй Медикал лимитед, лидирующая на рынке фильтров для экстракорпорального диализа, впервые успешно реализовала уникальные полезные свойства полимиксина В. Специалисты компании иммобилизовали полимиксин В на полистироловых волокнах картриджа для экстракорпоральной гемоперфузии. В процессе гемоперфузии полимиксин В абсорбирует ЛПС и удаляет его из системного кровотока. Таким путем достигается нейтрализация неблагоприятных эффектов эндотоксина. Этот метод лечения используется в Японии с 1994 года. Постепенно он приобрел популярность в Европе и Северной Америке. Признание гемоперфузии с полимиксином В растет, поскольку постепенно накапливается опыт клинического применения этого метода. Вслед за первоначальными небольшими клиническими исследованиями был выполнен тщательный систематический обзор, опубликованный в 2007 году [6].

Исследование EUPHAS

Желание приобрести дополнительный опыт использования гемоперфузии с полимиксином В в клинических условиях, послужило причиной для проведения многоцентрового рандомизированного клинического исследования EUPHAS (англ. *Early Use of Polymyxin B Hemoperfusion in Abdominal Septic Shock*; раннее применение гемоперфузии с полимиксином В при абдоминальном септическом шоке). Результаты

этого исследования были опубликованы в июне 2009 года в журнале Американской медицинской ассоциации (англ. *Journal of the American Medical Association, JAMA*) [7]. Исследование EUPHAS проводилось на базе 10 итальянских отделений интенсивной терапии (ОИТ). На сегодняшний день, это самое крупное многоцентровое рандомизированное контролируемое исследование, посвященное изучению прямой гемоперфузии с полимиксином В в популяции больных с абдоминальным септическим шоком. Cruz и соавт. [7] сформулировали критерии включения таким образом, чтобы создать очень однородную популяцию тяжелобольных пациентов с предположительно высоким уровнем эндотоксина из определенного хирургического источника.

Основные результаты исследования свидетельствуют, что в течение 72 часов в группе терапии полимиксином В наблюдалось увеличение уровня среднего артериального давления (от 76 до 84 мм рт. ст.; $p = 0,001$) и снижение потребности в вазопрессорах (инотропный коэффициент [англ. *inotropic score*]: от 29,9 до 6,8; $p = 0,001$), тогда как в группе традиционной терапии подобные изменения отсутствовали (АД_{ср.}: от 74 до 77 мм рт. ст.; $p = 0,37$; инотропный коэффициент: от 28,6 до 22,4; $p = 0,14$). Соотношение PaO_2/FiO_2 несколько увеличилось в группе терапии полимиксином В (от 235 до 264; $p = 0,049$), но осталось неизменным в группе стандартной терапии сепсиса (от 217 до 228; $p = 0,79$). Оценка по шкале SOFA улучшилась в группе терапии полимиксином В, но в группе традиционной терапии этот показатель существенно не изменился (изменения оценки по шкале SOFA: -3,4 в сравнении с -0,1; $p = 0,001$). Уровень 28-дневной смертности достигал 32% (11 из 34 пациентов) в группе терапии полимиксином В и 53% (16 из 30 пациентов) в группе стандартной терапии сепсиса (некорригированное отношение рисков [OR]: 0,43, 95% ДИ: 0,20-0,94; корригированное OR: 0,36, 95% ДИ: 0,16-0,80).

Таким образом, результаты исследования EUPHAS согласуются с информацией, представленной в систематическом обзоре Cruz и соавт. [6]. Это исследование дополнительно подтверждает быстрое улучшение функции органов и систем, а особенно сердечно-сосудистой системы, на фоне гемоперфузионной терапии с полимиксином В. Тем не менее, исследование EUPHAS характеризуется определенными ограничениями (эти ограничения описаны авторами), которые необходимо принимать во внимание. Прежде всего, в данном исследовании использовалась высокоспецифичная популяция пациентов. С одной стороны, этот фактор является преимуществом. С другой стороны, высокая специфичность контингента послужила причиной очень медленного формирования выборки (в период с 2004 по 2007 год в популяцию были включены только 64 пациента). Во-вторых, учитывая характер терапевтического вмешательства, от врачей невозможно было скрыть принадлежность пациентов к той или иной группе, хотя лица, которые выполняли анализ данных, не обладали подобной информацией. В-третьих, исследование было прекращено преждевременно на основании результатов запланированного промежуточного анализа, после того как подтвердилось соответствие предопределенным критериям прекращения. В связи с этими ограничениями, окончательный размер выборки был умеренным, что могло послужить причиной переоценки истинной выраженности клинического эффекта. Кроме того, в своей редакционной статье John Kellum [8] заявил, что исследование EUPHAS не планировалось как исследование, сконцентрированное на определенной категории пациентов. Задача исследования состояла в том, чтобы определить, способна ли гемоперфузия с полимиксином В улучшить показатели среднего артериального давления, а также снизить потребность в вазопрессорах у больных септическим шоком, который предположительно развился на фоне абдоминальной инфекции.

Исследование EUPHAS 2

С тех пор, как в 1994 году японская система страхования здоровья санкционировала применение гемоперфузионной терапии с полимиксином В, в клинических условиях были

использованы 75000 картриджей. Клинические испытания и разнообразные системы эксплуатационного надзора не выявили заслуживающих внимания нежелательных явлений или побочных эффектов. Тем не менее, международное научное сообщество по-прежнему скептически относится к эффективности экстракорпорального удаления эндотоксина в клинической практике.

Помимо Японии, в настоящее время гемоперфузия с полимиксином В преимущественно используется в Италии для лечения больных сепсисом. В этой стране ежегодно расходуются приблизительно 600 картриджей (данные ESTOR S.p.A. и Торэй Медикал лимитед). Тем не менее, структурированный сбор данных о клиническом применении этого метода лечения не выполнялся, что указывает на необходимость изучения эффектов гемоперфузии с полимиксином В в крупной и разнообразной выборке. В связи с этим, исследователи из Италии вместе с клиницистами, активно использующими эту форму терапии, совместно спроектировали новое проспективное многоцентровое открытое исследование, которое получило название EUPHAS 2.

Исследование EUPHAS 2 будет координироваться научным руководящим комитетом. Этот комитет представлен четырьмя членами, а именно двумя исследователями из оригинального исследования EUPHAS и двумя другими лицами, которые имеют опыт применения гемоперфузии с полимиксином В, но не принимали участия в предшествующем исследовании EUPHAS.

Новый проект предполагает создание совместной базы данных в интернет, при помощи которой каждый зарегистрированный пользователь сможет вносить и анализировать сведения о больных, получавших лечение в соответствующем исследовательском центре. Результаты статистического анализа общей базы данных будут обновляться ежедневно через интернет. Доступ к общей базе данных имеет только научный руководящий комитет. Тем не менее, в рамках ежегодной встречи EUPHAS 2 результаты исследования планируется предоставлять всем зарегистрированным пользователям. Такие встречи позволят определить, как использовать и распространять собранные сведения о гемоперфузионной терапии с полимиксином В.

Задача исследования EUPHAS 2 состоит в формировании обширной базы данных, посвященных гемоперфузионной терапии с полимиксином В. Приобретение соответствующих сведений позволит лучше оценить эффективность и биологическую значимость удаления эндотоксина в клинической практике. Кроме того, это исследование нацелено на проверку воспроизводимости данных, представленных в научной литературе, на оценку выбранной популяции больных, а также на идентификацию субпопуляций пациентов, для которых эта форма лечения может оказаться наиболее эффективной.

Для решения поставленных задач популяция данного исследования будет сформирована из больных с тяжелым сепсисом или септическим шоком любого происхождения, с дисфункцией одного или более органов, а также с высокой степенью активности эндотоксина по данным теста на активность эндотоксина (англ. *Endotoxin Activity Assay*, *ЕАА™*), которая подтверждается показателем ЕАА™ выше 0,6 [4, 9]. Благодаря этому можно будет выполнить анализ возможной корреляции между характером и локализацией первичного очага инфекции, продолжительностью терапии и эффективностью гемоперфузии с полимиксином В.

Исследование EUPHAS 2 будет разделено на два этапа. Первый этап представляет собой ретроспективный сбор сведений о больных тяжелым сепсисом или септическим шоком, которые получали гемоперфузионную терапию с полимиксином В на базе итальянских ОИТ в течение последних трех лет. Цель этого этапа состоит в том, чтобы собрать сведения, по меньшей мере, о 250 больных. Предполагается, что на сбор предварительных данных потребуется 6 месяцев. Затем научный руководящий комитет выполнит анализ

собранных данных для определения условий дальнейшего проспективного сбора данных (второй этап).

Второй этап будет представлен проспективным многоцентровым открытым исследованием. Задача этого исследования состоит в сборе сведений о всех пациентах, получавших гемоперфузионную терапию с полимиксином В в условиях итальянских и европейских ОИТ. Результатом исследования будет опубликованная в интернете база данных. Все участники исследования должны получать лечение в соответствии со стандартными протоколами соответствующих ОИТ. Традиционная схема лечения предполагает инфузионную терапию, использование вазопрессоров, механическую вентиляцию легких, противомикробную терапию, а также поддержание функции почек (например, пролонгированная заместительная почечная терапия и (или) гемодиализ). Включение пациентов в базу данных ни при каких обстоятельствах не повлияет на схему лечения. В течение 29 дней после включения в исследование (с 0 дня по 28 день) за каждым пациентом будет осуществляться наблюдение.

Благодаря особой структуре, база данных позволит без труда собирать необходимые сведения. Для сбора данных предполагается использовать индивидуальные регистрационные карты, которые будут включать следующую информацию:

- данные, зарегистрированные на момент включения в исследование - демографические сведения, дата диагностирования септического шока и первоначальный уровень активности эндотоксина, результаты бактериологического исследования, сведения об основной патологии, основной терапии и сопутствующей терапии, балльная оценка тяжести состояния пациента;
- данные, зарегистрированные до начала терапии, после терапии, а также в течение периода контрольного наблюдения - показатели функции жизненно важных органов, сведения об использовании вазоактивных препаратов, диурез, балльная оценка по шкале SOFA, гемодинамические показатели, результаты анализа газового состава крови, сведения о нежелательных явлениях, информация о сопутствующей терапии (механическая вентиляция легких, пролонгированная заместительная почечная терапия, антибактериальная терапия), длительности пребывания в ОИТ, и исходе болезни.

Только на территории Италии за год расходуются более 600 картриджей с полимиксином В, а на одного пациента обычно приходится два сеанса гемоперфузии. Мы рассчитали, что наша база данных охватит приблизительно одну треть этих случаев. Следовательно, размер выборки должен составить приблизительно 100 пациентов в год.

Статистический анализ базы данных

Некоторые данные будут обрабатываться непрерывно. Результаты анализа таких сведений планируется предоставлять всем пользователям базы данных в реальном времени. Соответствующая информация включает: количество зарегистрированных исследовательских центров, количество обследованных пациентов, статистические данные о характере участников исследования в зависимости от тяжести, возраста, пола и диагноза. Отдельные исследовательские центры будут сохранять за собой право собственности и управления всеми зарегистрированными данными. То есть, каждый исследовательский центр может визуализировать, анализировать или модифицировать свои данные в любое время.

Собранные предварительные данные будут ежегодно анализироваться научным руководящим комитетом с целью контроля использования гемоперфузионной терапии с полимиксином В в клинической практике. Особый акцент предполагается сделать на колебаниях эффективности терапии в зависимости от:

- времени вмешательства;
- тяжести состояния пациента на момент проведения первого сеанса гемоперфузионной терапии с полимиксином В;
- основной патологии;
- оценки уровня активности эндотоксина при помощи ЕАА™.

Эффективность терапии будет оцениваться с помощью тех же критериев, которые использовались в рамках оригинального исследования EUPHAS, а именно:

- снижение коэффициента зависимости от вазопрессоров на 20% за 72 часа;
- снижение дельта оценки по шкале SOFA на 3,5 балла за 72 часа;
- функция почек: существенное улучшение показателей диуреза и (или) частоты проведения пролонгированной почечной заместительной терапии;
- функция дыхания: значительное улучшение обмена кислорода, показателей газового состава крови и (или) увеличение количества дней спонтанного дыхания (без механической вентиляции легких);
- улучшение показателей длительности пребывания в ОИТ и (или) увеличение числа дней стационарного лечения вне ОИТ (этот показатель указывает на истинную потребность в интенсивной терапии);
- прогноз пациента.

Анализируемые данные будут представлены всем участникам проекта в рамках ежегодного собрания. После согласования с научным руководящим комитетом эти данные планируется представить для публикации.

Веб-сайт и база данных проекта EUPHAS 2 будут созданы как на итальянском, так и на английском языке. Благодаря этому, можно будет осуществлять сбор данных не только в Италии, но и в других европейских странах, на территории которых внедряется гемоперфузионная терапия с полимиксином В. Новые исследовательские центры должны включаться в исследование после одобрения научным руководящим комитетом.

Выводы

Хотя при лечении больных сепсисом гемоперфузионная терапия с полимиксином В характеризуется ранним терапевтическим эффектом, для подтверждения многообещающих результатов исследования EUPHAS в других популяциях пациентов необходимо проведение более крупных многоцентровых исследований [6]. Новое исследование EUPHAS 2, дизайн которого предполагает проспективный сбор информации, должно предоставить больше сведений о клиническом применении гемоперфузии с полимиксином В. В ходе этого исследования будет собрано большое количество данных из различных исследовательских центров. Объектом исследования EUPHAS 2 является разнообразная популяция больных с септическим шоком, характеризующихся высоким уровнем активности эндотоксина. Наша задача состоит в том, чтобы на основании результатов исследования EUPHAS 2 сформулировать окончательное заключение относительно использования гемоперфузионной терапии с полимиксином В для лечения эндотоксического септического шока, создать основание для проведения рандомизированного контролируемого исследования на территории США, а также окончательно определить роль гемоперфузии с полимиксином В в комплексной терапии сепсиса.

Ссылки

1. Kellum JA: A targeted extracorporeal therapy for endotoxemia: the time has come. Crit Care 2007;11:137.

2. Klein DJ, Derzko A, Seeley A, et al: Marker or mediator? Changes in endotoxin activity as a predictor of adverse outcomes in critical illness. *Crit Care* 2005;9(Suppl 1):161.
3. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, et al: Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999;180:1584-1589.
4. Marshall JC, Foster D, Vincent JL, et al: Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis* 2004;190:527-534.
5. Manocha S, Feinstein D, Kumar A: Novel therapies for sepsis: antiendotoxin therapies. *Expert Opin Investig Drugs* 2002;11:1795-1812.
6. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, et al: Effectiveness of polymyxin B-immobilized fiber column in sepsis: a systematic review. *Crit Care* 2007;11:R47.
7. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, et al: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009;301:2445-2452.
8. Kellum JA, Uchino S: International differences in the treatment of sepsis: are they justified? *JAMA* 2009;301:2496-2497.
9. Valenza F, Fagnani L, Coppola S, et al: Prevalence of endotoxemia after surgery and its association with ICU length of stay. *Crit Care* 2009;13:R102.

Эрика Л. Мартин
Dipartimento di Anestesiologia e Rianimazione, Università di Torino
Ospedale S. Giovanni Battista-Molinette
Корсо А. М. Дольотти 14, IT-10126, г. Турин (Италия)
Телефон: +39 011 633 4005. Факс: +39 011 696 0448.
Электронная почта: ericaleanne.martin@unito.it

Список авторов

Антонелли М. (Antonelli M.) 77, 112
Боттироли М. (Bottiroli M.) 95
Бриенза Н. (Brienza N.) 77
Бриоши П. (Brioschi P.) 95
Весентини С. (Vesentini S.) 41, 50
Вескони С. (Vesconi S.) 95, 112
Веччи И. (Vecchi I.) 95
Гезу Д. (Gesù G.) 95
Гуаданьи Г. (Guadagni G.) 32
Гьюнта Ф. (Giunta F.) 77
де Каль М. (de Cal M.) 71
Деллинджер Р. Ф. (Dellinger R. P.) 104
Каселла Ж. (Casella G.) 95, 112
Круз Д. Н. (Cruz D. N.) 71, 77, 112
Кэллум Д. (Kellum J.) 23
Мартин Э. Л. (Martin E. L.) 60, 112
Маршалл Д. К. (Marshall J. C.) 1
Миннини М. (Minnini M.) 95
Монти Ж. (Monti G.) 95, 112
Морабито В. (Morabito V.) 85
Новелли Г. (Novelli G.) 85
Оупэл С. М. (Opal S. M.) 13
Перега А. (Perego A.) 32
Пиццилли Г. (Pizzilli G.) 95
Пиччинни П. (Piccinni P.) VII, 23, 71
Пуглиезе Ф. (Pugliese F.) 85
Раньери В. М. (Ranieri V. M.) 60, 112
Рашуан Ж. С. (Rachoin J. S.) 104
Ределли А. (Redaelli A.) 41, 50
Рознер М. Г. (Rosner M. H.) VII
Ронко К. (Ronco C.) VII, 23, 71, 112
Руберто Ф. (Ruberto F.) 85
Сончини М. (Soncini M.) 41, 50
Терци В. (Terzi V.) 95
Тэни Т. (Tani T.) 32
Ферретти Г. (Ferretti G.) 85
Фиоре Д. Б. (Fiore G. B.) 41, 50
Фостер Д. (Foster D.) 104
Фумагалли Р. (Fumagalli R.) 77
Шоджи Х. (Shoji H.) 32

Предметный указатель

CD14, антигенраспознающие свойства 20

Тогаумухин

- адсорбционная способность устройства 36
- активность эндотоксина и тяжесть заболевания 98-102
- гидродинамический анализ сорбционных свойств устройства
 - вычислительная гидродинамика 51, 52, 54, 55, 56
 - микромасштабный анализ 51, 53-55
 - общие сведения 50, 51
 - среднемасштабный анализ 53, 56
- европейский опыт 107, 108, 115
- механизм действия 37, 38
- обзор литературы 71-75
- оценка безопасности 35
- преимущества 38, 39
- разработка 40, 51, 72
- раннее лечение эндотоксемии 85-93
- угнетение апоптоза, *см.* Апоптоз
- уменьшение эндотоксиновой нагрузки 35
- устройство 34, 35, 42
- японские исследования и опыт применения устройства на территории Японии 105-106

Апоптоз

- влияние на функцию тканей и органов 62, 63
- индукция липополисахаридом 63
- механизмы 61, 62
- эффекты гемоперфузии с полимиксином В
 - внешний путь 66
 - внутренний путь 66
 - исследования с участием лабораторных животных 69
 - метод TUNEL 64, 65
 - обзор 63, 64
 - определение активности каспазы 65, 66
 - токсическое действие на клетки почек 64

Бактерицидный белок, повышающий проницаемость
исследования при сепсисе 38
функция 16

Влияние на экономику, сепсис 104, 105

Вычислительная гидродинамика, гидродинамический анализ сорбционных свойств
устройства Тогаумухин 51, 52, 54, 55, 56

Гены вирулентности, сепсис 16

Гидродинамический анализ, *см.* Тогаумухин

Гиппократ 2, 83

Исследование EUPHAS

- недостатки 82
- нежелательные эффекты 83
- общие сведения 74, 78, 79, 99, 107, 108, 113, 114
- показатели
 - смертность 80, 81
 - физиологические показатели 79, 80

Исследование EUPHAS 2

- общие сведения 115, 116
- статистический анализ базы данных 116, 117

Исследование EUPHRATES 108, 109

Исследование MEDIC 96

Кампания по борьбе с сепсисом 104

Каспаза, эффекты гемоперфузии с полимиксином В 65, 66

Коэффициент зависимости от вазопрессоров, показатель в исследовании EUPHAS 79

Легкое

- влияние гемоперфузии с полимиксином В на функцию легких 73
- реакция при сепсисе 25

Липополисахарид, *также см.* Эндотоксемия

- активация коагуляции 18
- взаимодействие с толл-подобными рецепторами 6, 7, 16, 17, 61
- индукция апоптоза, *см.* Апоптоз
- исследования нейтрализации антител 29, 38
- обоснование применения гемоперфузии с полимиксином В при сепсисе 105
- рецепторы 17
- связывающие белки 17
- структура 16, 42, 43
- толерантность и индуцированная сепсисом иммуносупрессия 19
- уровень в плазме крови 26, 27
- чувствительность отдельных видов 15, 16
- экстракорпоральное удаление, *см.* Полимиксин В, Toraymixin

Липополисахарид-связывающий белок

- обзор функции 16
- уровень в плазме крови 26, 27

Манноза-связывающий лектин, антигенраспознающие свойства 20

Полимиксин В

- взаимодействие с липополисахаридами
 - имитация молекулярного взаимодействия 44-48
 - общие сведения 33, 34, 42
- волоконный картридж с иммобилизованным полимиксином В, *см.* Toraymixin

исследования гемоперфузии при сепсисе, *также см.* Исследование EUPHAS,
Исследование EUPHAS 2, Тогамухн
активность эндотоксина и тяжесть заболевания 98-102
обзор литературы 71-75
общие сведения 29-30
полярность клеток 68
раннее лечение эндотоксемии 85-93
эффекты апоптоза 63-68
структура 42

Последовательная оценка органной недостаточности, исследование EUPHAS 79-83

Почечная недостаточность, *см.* Почка

Почка

влияние гемоперфузии с полимиксином В на цитотоксичность 64, 67-69
реакция при сепсисе 25, 61

Пфайфер Рихард 4

Сепсис

возбудители 14
воспаление 85, 86
история вопроса 2-6
определение 1
происхождение терминов 4-6, 14
реакция легких 25
реакция почек 25
реакция сердечно-сосудистой системы 24, 25
роль эндотоксемии 8-10, 97
суперантигены 20
толерантность к эндотоксину и иммуносупрессия, индуцированная сепсисом 19

Синдром системного воспалительного ответа, патогенез сепсиса 85, 86

Смертность

влияние гемоперфузии с полимиксином В 73
показатель исследования EUPHAS 80, 81
септический шок 14, 26, 27, 71, 104

Среднее артериальное давление, эффекты гемоперфузии с полимиксином В 73, 114

Суперантиген, роль при сепсисе 20

Тест на активность эндотоксина

корреляция с тяжестью сепсиса 96-102
общие сведения 28, 96
раннее лечение эндотоксемии 85-93
санкция FDA 109

Толл-подобные рецепторы

активация 8

взаимодействие с эндотоксином 7, 8, 16, 17, 61
сигнализация 7, 8
типы и лиганды 6, 14, 15, 19, 20

Трансплантация органов, гемоперфузия с полимиксином В и исходы 74, 75, 90

Хеликазы, подобные гену 1 типа, индуцируемому ретиноевой кислотой,
антигенраспознающие свойства 20

Эндотоксемия

диагностическое и прогностическое значение 27, 28

значение при сепсисе

общие сведения 9, 10, 23, 24, 97

смертность 26

раннее лечение 85-93

характерные состояния 8, 9

экстракорпоральное удаление, см Полимиксин В, Тораутухин

Эндотоксин, см. Липополисахарид

Название публикации: Научный вклад в нефрологию. Том 167. Эндотоксемия и
эндотоксический шок.

Перевод выполнен с разрешения S. Karger AG.