

22. Slamon D.J., Godolphin W. Studies of the HER2-n proto-oncogene in human breast and ovarian cancer // Science. 1989. V.244. P.707.
23. Slamon D.J., Leyland-Jones B., Shak S. et al. Use of chemotherapy plus monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer // N. Engl. J. Med. 2001. V.344. P.783-792.
24. Tournigand C., Cervantes A., Figer A. et al. OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-go fashion in advanced colorectal cancer-a GERCOR study // J. Clin. Oncol. 2006. V.24. P.394-400.
25. Ueda S., Hironaka S., Yasui H. et al. Randomized phase III study of irinotecan (CPT-11) versus weekly paclitaxel (wPTX) for advanced gastric cancer (AGC) refractory to combination chemotherapy (CT) of fluoropyrimidine plus platinum (FP): WJOG4007 trial // J. Clin. Oncol. 2012. V.30. P.4002.
26. Van Cutsem E., Moiseyenko V.M., Tjulandin S. et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group // J. Clin. Oncol. 2006. V.24. P.4991-4997.
27. Waddell T., Chau I., Barbachano Y. et al. A randomized multicenter trial of epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine (EOC) plus panitumumab in advanced esophagogastric cancer (REAL3) // J. Clin. Oncol. 2012. V.30. P.40-48.
28. Wagner A.D., Unverzagt S., Grothe W. et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer // www.cohrane database syst. rev:CD004064.

## РОЛЬ ЭНДОТОКСИНА В РАЗВИТИИ ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И МЕТОДЫ ЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ В КРОВИ

**Е.В. Русанова<sup>1</sup>, А.Г. Ниязатов<sup>2</sup>, И.М. Протас<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ)

<sup>2</sup>ООО «НПФ "Рохат"», Москва

<sup>3</sup>ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи», Москва

Тяжесть и длительность гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации напрямую зависят от концентрации липополисахаридов (эндотоксина) в крови. Определение этой величины и ее динамики в процессе терапии позволяет уточнять тактику лечения и проводить его своевременную коррекцию. Выявление уровня эндотоксина в биологических жидкостях является необходимой составляющей диагностики в лечебно-профилактических учреждениях. В настоящее время получили распространение высокочувствительные методы: LAL-тест в различных его модификациях и МАЧ-тест.

**Ключевые слова:** эндотоксин, липополисахарид, гнойно-воспалительные заболевания, эндотоксинемия, грамотрицательные микроорганизмы.

### THE ROLE OF ENDOTOXIN IN DEVELOPMENT OF SUPPURATIVE-SEPTIC DISEASES AND METHODS OF ENDOTOXIN LEVEL DETERMINATION IN BLOOD

**E.V. Rusanova<sup>1</sup>, A.G. Niyazmatov<sup>2</sup>, I.M. Protas<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>M.F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical and Research Institute (MONIKI)

<sup>2</sup>"Rohat" Scientific-and-Production Co., Ltd., Moscow

<sup>3</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a. N.F. Gamalei, Moscow

The severity and duration of suppurative inflammation of different locations is directly dependent on the level of lipopolysaccharides (endotoxin) in blood. Detection of this value and its dynamics during therapy enables determination of the treatment tactics and its correction. Examination of endotoxin level in biological fluids is a necessary diagnostic component in the therapeutic-and-prophylactic institutions. Today, highly sensitive methods such as LAL-test in different modifications and MAP-test (method of activated particles) are widely practised.

**Key words:** endotoxin, lipopolysaccharide, suppurative inflammation, endotoxemia, gram-negative microorganisms.

В последнее десятилетие значительно увеличилась роль грамотрицательных микроорганизмов в развитии гнойно-воспалительных заболеваний различной локализации. Наши наблюдения свидетельствуют о том, что за последние 5 лет возросла частота выделения грамотрицательных бактерий у пациентов, находящихся в отделении интенсивной терапии (ОРИТ) МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского: на слизистой трахеи – на 50%, в крови – на 20% [4]. Доля грамотрицательных инфекций в ОРИТ России составляет в среднем 62% [7]. Из числа инфекций, которые были зарегистрированы у больных сепсисом, более 50% вызваны грамотрицательной микрофлорой.

Бактериальный эндотоксин является постоянным структурным компонентом наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий. По структуре это липополисахарид (ЛПС), состоящий из липида А (базисной части или ядра) и О-специфической цепи полисахарида, образованной повторяющимися идентичными полисахаридными последовательностями. В отличие от экзотоксинов, ЛПС выделяется во внешнюю среду в основном при разрушении бактериальных клеток.

Человек находится в постоянном контакте с эндотоксином, т.к. в кишечнике обитает довольно большое количество грамотрицательных бактерий. В норме у человека проникновение малых доз эндотоксина приводит к развитию системной эндотоксинемии, которая обеспечивает поддержание всех частей иммунной системы в состоянии физиологического тонуса и адаптацию макроорганизма к изменяющимся условиям [2, 7, 12]. В 1 мл плазмы крови содержится примерно 3-10 пкг эндотоксина [7]. У здоровых людей имеются резервы связывания эндотоксина лейкоцитами<sup>1</sup> [5].

В зависимости от концентрации эндотоксин может вызывать активацию лейкоцитов и макрофагов, стимуляцию продукции эндогенного пирогена. Бактериальные эндотоксины являются исключительно сильными пирогенами: для развития лихорадочного приступа достаточно присутствия в инфузионном растворе бактериальных эндотоксинов в концентрации 1 нг/мл. Возможна активация антагонистов глюкокортикоидов, интерферона, интерлейкинов, фактора некроза опухоли (кахексина) и других медиаторов, а также синтеза белков острой фазы (в том числе амилоидного), миелопоза, системы комплемента. Происходит поликлональная активация В-клеток. Могут также появляться индукция развития провирусов, митогенный эффект, подавление тканевого дыхания, гиперлипидемия, диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови, эндотоксический шок и

острая полиорганная недостаточность [10]. Перечисленные процессы являются основными элементами таких клинически значимых состояний организма, как гнойно-септические заболевания брюшной полости, синдром системного воспалительного ответа, сепсис и септический шок.

Несмотря на давние (начиная с 40-х годов XX в.) и разносторонние исследования, эндотоксин до сих пор остается объектом пристального внимания, в том числе и в связи со сложностью и многоликостью его физиологического и патологического воздействия на организм человека [11]. Определение естественного физиологического уровня эндотоксина в условиях функционирования иммунитета организма и начального порога, после которого начинается его патологическое воздействие вплоть до смертельного исхода, остаётся трудноразрешимой задачей [1, 6].

Следует подчеркнуть, что выявление эндотоксина в крови внесено в номенклатуру медицинских услуг под кодом А09.05.107 (приказ Минздравсоцразвития России от 27.12.2011 №1664н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг», приказ Минюста России от 24.01.2012 №23010). Услуга «Исследование эндотоксина в крови» включена в стандарты медицинской помощи. Несмотря на очевидную необходимость диагностики эндотоксинемии при различных видах патологии, в лечебно-профилактических учреждениях данное исследование, к сожалению, проводится крайне редко.

В настоящее время существует ряд иммунологических и биохимических методов, позволяющих определять содержание ЛПС в биологических жидкостях. Для определения содержания эндотоксина в лекарственных препаратах и изделиях медицинского назначения на протяжении более 30 лет успешно используется ЛАЛ-тест (LAL – Limulus amoebocyte lysate) в различных модификациях. Для сертификации фармацевтической и медицинской продукции на пирогенность ЛАЛ-тест включён в арсенал лабораторных методов многих стран. Этот тест основан на способности ЛПС вызывать коагуляцию белков, содержащихся в лизате амебоцитов мечехвоста. Постановка ЛАЛ-теста занимает 30-60 минут в зависимости от конкретной модификации. Впервые этот тест был включён в Фармакопею США 20-го издания в 1980 г. и получил название «Определение бактериальных токсинов».

ЛАЛ-тест обладает высокой чувствительностью: 1 пг/мл [8]. Некоторые компоненты анализируемой крови способны ингибировать или активировать реакцию ЛПС с лизатом амебоцита, а его молекулы связываются с различными компонентами крови, что оказывает влияние на результат теста. Молекулы ЛПС разных бактерий способны в разной степени активировать ЛАЛ-реакцию [9], поэтому активация иммунной системы различными видами ЛПС не всегда коррелирует с

<sup>1</sup> Патент РФ №2088936, 1997. Способ оценки антиэндотоксинового иммунитета относительно грамотрицательных бактерий (ЛПС-тест-ИФА).

чувствительностью ЛАЛ-теста. Этот тест неспецифичен к виду ЛПС, поэтому не позволяет идентифицировать вид патогена для диагностики грамотрицательных инфекций.

В 2011 г. на основе синтетического аналога реакции ЛАЛ для обнаружения ЛПС в жидких образцах разработаны наборы реагентов, получившие название EndoLISA™ (Hyglos GmbH, Германия). Принцип метода, лежащего в основе этих наборов, схож с принципом гетерофазного ИФА (ELISA). Это позволяет исключить проблему ингибирующего и активирующего влияния компонентов анализируемого образца на протекание реакции ЛАЛ за счёт гетерофазного выделения молекул ЛПС из анализируемого образца, поскольку его контакт с ферментом исключён и ферментативная реакция протекает при оптимальных стандартных условиях. Кроме того, специально разработанный фермент в отличие от ЛАЛ-теста исключает активацию каскада реакций с бета-глюканами. Метод показал хорошую корреляцию с ЛАЛ-тестом при анализе содержания различных ЛПС в растворах ( $R^2=0,98$ ). Недостатком метода является длительное время проведения теста: 3 часа 20 минут. Кроме того, EndoLISA™ сохраняет другие особенности, присущие ЛАЛ-тесту, например, отсутствие специфичности к виду ЛПС. Исследователи, подвергавшие анализу результаты применения ЛАЛ-теста в клинике, делают заключение о необходимости осторожной интерпретации данных, полученных при помощи этого теста, так как нет строгой корреляции между содержанием эндотоксина в крови и тяжестью клинических явлений, а также прогнозом дальнейшего развития заболевания.

Метод определения ЛПС в крови может быть основан на обнаружении специфических биохимических маркеров и их уникальных компонентов, например, кетодезоксиоктулозоновой кислоты. Хотя такие способы и наиболее точны, они пока не нашли своего применения в медицинской практике, поскольку предполагают использование таких трудоёмких и дорогостоящих методов, как хроматография высокого разрешения и масс-спектрометрия [15].

Разработаны методы, основанные на способности молекул ЛПС активировать специализированные клетки крови посредством взаимодействия со специфическими рецепторами, причём для этой цели могут быть использованы как специальные линии клеток, так и клетки крови диагностируемого пациента.

В наборе реагентов «НЕК-Blue™ комплект обнаружения ЛПС» (LPS Detection Kit, InvivoGen, США) используется линия клеток, специально разработанная для обеспечения чувствительности к малым количествам ЛПС. НЕК-Blue™ основан на способности TLR4-рецептора клетки «различать» липид А грамотрицательных бактерий как наиболее токсичную часть ЛПС. Были специально сконструированы клетки, чрезвы-

чайно чувствительные к ЛПС, названные «НЕК-Blue™-4 клетки». Они стали основной частью этого комплекта. Присутствие низких концентраций ЛПС, начиная с 30 пг/мл, обнаруживается клетками НЕК-Blue™-4 и приводит к активации фактора NF-κB. При использовании набора происходит окрашивание реакционной смеси, которое можно регистрировать как визуально, так и спектрофотометрически. Этот тест довольно прост, однако требует условий культивирования клеточных культур. При этом он не предполагает быстрого получения результата, поскольку в ходе проведения анализа необходима инкубация клеток с анализируемым образцом в течение 18-24 часов. Кроме того, чувствительность набора (30 пг/мл) недостаточна для его применения в клинической лабораторной диагностике, поэтому он предназначен только для научных исследований.

При использовании диагностического набора реагентов ЕАА™ (анализ активности эндотоксина – Endotoxin Activity Assay, Spectral Diagnostics Inc., Канада) в реакции участвуют собственные нейтрофилы анализируемого образца крови. Этот диагностический тест основан на реакции ЛПС со специфическими антителами. Опсонизированный комплементарными белками комплекс «антитело–ЛПС» усиливает респираторный взрыв нейтрофилов в присутствии фермента зимозана. Оксиданты, продуцируемые нейтрофилами, вызывают окисление люминала и последующую эмиссию света, то есть люминолзависимую хемилюминесценцию.

Набор реагентов ЕАА одобрен в США для диагностического использования в медицинской практике. Его применение не занимает много времени: анализ одного образца – около 30 минут. При этом ЕАА относительно прост в применении и неспецифичен к виду молекул ЛПС. Для проведения анализа требуется хемилюминометр. В медицинской практике ЕАА используется в основном для контроля за экстракорпоральной гемоперфузией при очистке крови от эндотоксина, поскольку даёт количественную оценку его уровня в крови.

В России зарегистрированы диагностические наборы по определению эндотоксина в биологических жидкостях. Это реагенты метода активированных частиц (МАЧ) для определения общего, родового и видового ЛПС в сыворотке крови человека (ООО «НПФ “Рохат”», Россия). В основе исследования лежит МАЧ, основанный на иммобилизации специфических моноклональных антител IgG различных субклассов на полимерных химических микросферах. Микросферы представляют собой латексные частицы типа «ядро–оболочка», где ядро – полистирольный латекс, а оболочка – сополимер латекса и метакрилата цинка при массовом соотношении звеньев 1:0,8 – 1:0,4.

Молекулы ЛПС, присутствующие в исследуемой сыворотке крови, при взаимодействии с антителами

активируют полимерные частицы, вызывая их агрегацию, визуально наблюдаемую как створаживание. Учет результатов реакции выполняется визуально по одной из четырех степеней активирования частиц диагностикума. Постановка реакции не требует ни специального обучения персонала, ни специализированного оборудования, и проводится в течение 10 минут. Чувствительность наборов составляет 7,5 пг/мл ЛПС, специфичность – более 98,7%. Метод даёт количественную оценку концентрации эндотоксина в крови в диапазоне 7,5-500 пг/мл.

Диагностические наборы в количестве 17 штук позволяют определять в сыворотке крови пациентов не только общий эндотоксин грамотрицательных бактерий, но и эндотоксин рода и видов *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia*, а также контролировать эффективность и целесообразность проводимой антибактериальной терапии. Тройное последовательное определение общего эндотоксина, его рода и вида повышает достоверность получаемого результата.

Особенностью МАЧ-теста является то, что анализ может быть проведён только на свежей сыворотке крови, т.е. её необходимо использовать в течение двух часов после взятия крови, при этом учитывается физиологический уровень эндотоксина (в среднем около 5 пг/мл). Поэтому МАЧ-тест позволяет выявлять скрытые формы инфекций (в частности, очагов воспалений), вызванных грамотрицательными бактериями.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика эндотоксинемии имеет большое значение для определения тактики лечения больных с гнойно-септическими заболеваниями и ее своевременной и адекватной коррекции. Об этом свидетельствует и внесение «Исследования эндотоксинов в крови» в номенклатуру медицинских услуг. Крайне редкое определение эндотоксинемии снижает эффективность диагностики и последующего лечения больных с гнойно-септическими заболеваниями, затягивая их выздоровление и создавая угрозу жизни. Этот пробел нашего здравоохранения необходимо восполнить, тем более что в распоряжении лабораторий в настоящее время имеются недорогие и эффективные методы: LAL-тест импортного производства и МАЧ-тест – отечественного.

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Аниховская И.А., Опарина О.Н., Яковлева М.М.* Кишечный эндотоксин как универсальный фактор адаптации и патогенеза общего адаптационного синдрома // Физиол. человека. 2006. №2. С.57-62.
2. *Бондаренко В.М., Лиходед В.Г., Яковлев М.Ю.* Определение эндотоксина грамотрицательных бактерий в крови человека // Микробиология. 2002. №2. С.83-89.
3. *Лиходед В.Г., Аниховская И.А., Аполлонин А.В. и др.* Fc-зависимое связывание эндотоксинов грамотрицательных бактерий полиморфноядерными лейкоцитами крови человека // Журн. микробиол. 1996. №6. С.76-79.
4. *Русанова Е.В., Лопатин А.Ф.* Микробиологические аспекты диагностики сепсиса // Клин. лаб. диагн. 2013. №9. С.59.
5. *Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л.* ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. М., 1997. 96 с.
6. *Таболин В.А., Яковлев М.Ю., Ильина А.А. и др.* Патогенетические механизмы и клинические аспекты действия термостабильного эндотоксина кишечной микрофлоры (обзор): [http://www.rmj.ru/articles\\_524.htm](http://www.rmj.ru/articles_524.htm).
7. *Яковлев М.Ю.* Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека // Физиол. человека. 2003. №4. С.154-165.
8. *Cohen J.* The detection and interpretation of endotoxemia. *Intens Care Med.* 2000. V.26 (Suppl. 1). P.51-56.
9. *Dehus O., Hartung T., Hermann C.J.* Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with Limulus amebocyte lysate assay // *Endotoxin Res.* 2006. V.12, No.3. P.171-180.
10. *Fink M.P., Mythen M.G.* The role of gut-derived endotoxin in the pathogenesis of multiple organ dysfunction // *Endotoxin in Health and Disease* / ed. H. Brade et al. N.Y. – Basel, 1999. P.855-864.
11. *Hurley J.C.* Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates // *Clin. Microbiol. Rev.* 1995. No.8. P.268-292.
12. *Ketchum P.A., Parsonnet J., Stotts L.S. et al.* Utilization of a chromogenic Limulus amebocyte lysate blood assay in a multicenter study of sepsis // *J. Endotox. Res.* 1997. No.4. P.9-16.
13. *Novitsky T.J.* Limulus amebocyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood // *J. Endotox. Res.* 1994. No.1. P.253-263.
14. *Pedron T., Girard R., Kosma P. et al.* Preparation and binding specificity of a monoclonal antibody recognizing-3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) in lipopolysaccharides of *Re chemotype* // *Hibridoma.* 1992. No.11. P.765-777.
15. *Rybka J., Gamian A.* Determination of endotoxin by the measurement of the acetylated methyl glycoside derivative of KDO with gas-liquid chromatography-mass spectrometry // *J. Microbiol. Methods.* 2006. V.64, No.2. P.171-184.