

ИММУНИТЕТ К ЭНДОТОКСИНУ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Представлены результаты обследования 29 онкологических больных с раком различной локализации и стадии распространения. Проведена оценка состояния эндотоксин-антиэндотоксиновой системы у данной категории больных; показано, что эндотоксиновая агрессия является одним из факторов, отягощающих течение заболевания. Показана необходимость разработки антиэндотоксинового направления в лечении и реабилитации онкологических больных с целью улучшения качества и продления жизни. Полученные результаты свидетельствуют о том, что среди приоритетных задач комплексной терапии онкологических больных одно из важных мест должны занимать антиэндотоксиновые мероприятия.

Эндотоксин (ЭТ) или липополисахарид (ЛПС) грамотрицательных бактерий является одним из наиболее изученных объектов живой природы; известны его структура, биологические свойства и молекулярные механизмы действия. Общий для ЭТ любого происхождения фрагмент – Re-гликолипид – ответственен за весь широкий спектр общих патогенных свойств ЛПС [1], одним из которых является «эксклюзивная способность эндотоксина вызывать лейкоцитоз или лейкопению, активировать перекисное окисление липидов и продукцию протеаз» [2]. До недавнего времени возможность участия ЛПС в патогенезе синдромов рассматривалась исключительно в контексте инфекционных заболеваний, бактериемии и сепсиса, этиологически обусловленных грамотрицательными бактериями. Понимание роли кишечного ЭТ в патогенезе заболеваний неинфекционного генеза, его роли в общей патологии и тем более участие в процессах адаптации стало возможным благодаря появлению новой философии медицины и биологии – эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека и животных профессора М. Ю. Яковлева. Появлению этой теории предшествовал поиск новых «методических зондов» (диагностических эндотоксин-тест-систем), с помощью которых были получены научные данные, являющиеся фундаментом для создания лечебно-диагностической технологии, получившей название «СОИС-технологии», основанной на скрининговой оценке иммунного статуса человека и включающей определение концентрации ЛПС в сыворотке крови, активности гуморального и гранулоцитарного звеньев антиэндотоксинового иммунитета (АЭИ).

В настоящее время известно, что наиболее частой причиной смерти онкологических больных является эндогенная интоксикация или раковая кахексия. Природа кахектина верифицирована не так давно, им оказался фактор некроза опухоли, который является одним из ключевых медиаторов (цитокинов) действия эндотоксина.

Эндотоксиновая агрессия (ЭА) кишечного происхождения может быть причиной развития самых разнообразных синдромов и заболеваний, которая реализуется в ту или иную нозологическую форму под воздействием двух факторов: наличия генетической предрасположенности к заболеванию и(или) сенсibiliзирующему действию на орган-мишень различных патогенных

факторов (онковирусов и др.) [3]. Одной из главных причин развития ЭА является нарушение кишечного барьера и наличие дисбактериоза [4], который может обуславливать как повышенную продукцию бактериальных ЛПС, так и повреждать слизистую толстого кишечника.

В связи с этим нам представилось интересным изучить динамику концентрации эндотоксина в системном кровотоке и роль эндотоксиновой агрессии в патогенезе нарастающей раковой кахексии при прогрессировании онкологического процесса различной локализации.

Материал и методы исследования

Проведено изучение состояния эндотоксин-антиэндотоксиновой системы у 29 больных онкохирургического профиля, среди них 18 мужчин и 11 женщин. Средний возраст больных составил $58,7 \pm 1,7$ (от 45 до 79) лет. По локализации опухоли больные были распределены по следующим группам: рак желудочно-кишечного тракта – у 13 (рак желудка – 7, рак толстой кишки – 6); рак легкого – у 6; рак мочеполовой системы – у 6 (рак почки – 3, рак простаты – 2, рак мочевого пузыря – 1); рак молочной железы – у 4; меланома кожи голени – у 1 больной. У 8 пациентов была диагностирована I–II стадии, а у 21 – III–IV стадии ракового процесса.

Концентрацию ЭТ в системном кровотоке определяли по активности плазмы крови в ЛАЛ-тесте (реакция с лизатом амебоцитов краба *Limulus polyphemus*), который проводили с применением препарата E-toxate фирмы Sigma (США) в авторской модификации Института общей и клинической патологии Клинико-диагностического общества (г. Москва) [5]. Показатели ЛАЛ-теста выражали в единицах активности (ЕУ/мл).

Антиэндотоксиновые антитела определяли в плазме крови иммуноферментным методом на полистироловых планшетах, лунки которых были сенсibilизированы гликолипидом хемотипа Re *Salmonella minnesota* R 595 (Sigma, США). Антитела, связавшиеся с гликолипидом на полистироловых планшетах, выявляли при помощи реагирующего с IgG протеина A *Staphylococcus aureus* Cowan, конъюгированного пероксидазой хрена. Содержание антител определяли после добавления субстрата по цветной реакции при длине волны 492 нм и выражали в условных единицах оптической плотности (у.е.О.П.) [6].

Показатели гуморального антибактериального иммунитета оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа по концентрации (в мкг/мл) антител (АТ) к антигенам некоторых условно патогенных бактерий, которые могут быть причиной дисбактериоза и эндотоксиновой агрессии: *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*, *Bacteroides*, *Klebsiella*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, а также *Candida* (как маркер иммунодефицита).

Оценку гранулоцитарного звена АЭИ проводили по идентификации лейкоцитов, связавших эндотоксин, и резервы связывания ЭТ полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПЯЛ) иммуноферментным методом (ЛПС-тест-ИФА) [7]. От каждого испытуемого готовили два тонких мазка крови, один мазок после фиксации 96° спиртом обрабатывали конъюгатом антител к Ре-гликолипиду с пероксидазой хрена. Второй мазок предварительно обрабатывали Ре-гликолипидом, а затем конъюгатом антител с пероксидазой хрена. Для выявления ядер клеток мазки окрашивали толуидиновым синим. При микро-

скопировании в мазках хорошо видны клетки, несущие на своей поверхности эндотоксин и связавшие конъюгат антител с пероксидазой. Сами клетки окрашены в желтый цвет, в клетках видны ядра, окрашенные в синий цвет. При этом в мазке без нагрузки Re-ГЛП определяли ПЯЛ, связавшие эндотоксин *in vivo*, а после нагрузки с Re-ГЛП – ПЯЛ, связавшие эндотоксин *in vivo* + *in vitro*. Разница между связыванием ЭТ лейкоцитами *in vivo* и *in vivo* + *in vitro* указывает на резервы связывания эндотоксина ПЯЛ. Установлено, что в физиологических условиях около 3,5% лейкоцитов связывают ЭТ грамотрицательных бактерий при помощи Fc-зависимого механизма. Кроме того, около 4,9% лейкоцитов могут дополнительно связывать ЛПС *in vivo* + *in vitro*.

Результаты и их обсуждение

До лечения у 8 пациентов была выявлена I–II стадии опухолевого процесса. Среди них у 4 пациенток с раком молочной железы Па и Пб стадии средние концентрации ЭТ в плазме крови составили $1,32 \pm 0,06$ EU/мл (при индивидуальном разбросе показателей от 1,25 до 2 EU/мл). У 1 больной с меланомой кожи голени концентрация ЭТ была 2,0 EU/мл. У 3 больных с раком почки средние концентрации ЭТ в плазме крови составили $2,15 \pm 0,28$ EU/мл (при индивидуальном разбросе показателей от 2,5 до 3,0 EU/мл). У 21 больного была выявлена III–IV стадия ракового процесса. Среди них у 12 больных с раком желудочно-кишечного тракта средние показатели концентрации ЭТ в плазме крови составляли $7,31 \pm 1,95$ EU/мл (при индивидуальном разбросе показателей от 2,9 до 25,0 EU/мл), у 6 пациентов с раком легких $5,42 \pm 1,24$ EU/мл (при индивидуальном разбросе показателей от 2,5 до 12,5 EU/мл). У 3 больных с раком мочеполовой системы средние показатели концентрации ЭТ в плазме крови составили $3,16 \pm 0,38$ EU/мл (при индивидуальном разбросе показателей от 2,5 до 5,0 EU/мл). Следовательно, концентрация ЭТ в системном кровотоке зависит от локализации, степени распространенности опухолевого процесса, с увеличением стадии заболевания нарастает концентрация ЭТ в общем кровотоке.

После оперативного лечения отмечены следующие особенности. У 7 больных с раком желудочно-кишечного тракта и легких после паллиативной или пробной лапаро- или торакотомии динамика концентрации ЭТ в плазме крови отсутствовала, в одном случае через одни сутки после операции наступил летальный исход на фоне высоких показателей концентрации ЭТ в плазме крови – 5,0 EU/мл. У 22 больных после радикального лечения концентрация ЭТ в плазме крови снижалась индивидуально на 50%.

При анализе антиэндотоксинового иммунитета было установлено, что у больных с раком легкого и мочеполовой системы титры антигликолипидных антител были снижены в 10 раз (по сравнению с показателями нормы) на фоне высоких титров антиэшерихиозных антител как до, так и после лечения. У этих же больных отмечали значимое снижение концентрации АТ к антигенам условно патогенных грамотрицательных бактерий и бифидумбактерий. Противоположные изменения выявлены у пациентов с раком желудочно-кишечного тракта: титры антигликолипидных АТ были умеренно снижены (на 25% по сравнению с показателями нормы); титры антиэшерихиозных АТ повышены в 3–4 раза; концентрации АТ к антигенам условно патогенных бактерий повышены у каждого второго больного, а у остальных отмечали незначимое снижение.

При определении гранулоцитарного звена антиэндотоксинового иммунитета у всех больных независимо от локализации и стадии опухолевого процесса до и после лечения резервы связывания ЭТ гранулоцитами отсутствовали.

Высокие концентрации ЭТ в системном кровотоке, резкий дисбаланс антиэндотоксинового и антибактериального иммунитета в сторону истощения и отсутствия резервов связывания ЭТ гранулоцитами указывают на наличие эндотоксिनотической агрессии. Серологические признаки ЭА выявляются только у больных с локализацией рака в желудочно-кишечном тракте. Этиологическими факторами ЭА явились синегнойная палочка, протей, в единичных случаях – бактероиды на фоне повышенных (по сравнению с показателями нормы) концентраций АТ к бифидумбактериям у каждого второго пациента с III–IV стадией опухолевого заболевания. У онкологических больных (преимущественно III–IV клинической стадии) имеет место выраженный вторичный иммунодефицит и дисбактериоз кишечника, на фоне которых развивается недостаточность АЭИ и антибактериального иммунитета, т.е. ЭА, которая может быть непосредственной причиной развития синдрома раковой кахексии.

Таким образом, проведенное исследование показало, что независимо от локализации онкологического процесса и его стадии у больных имеет место ЭА, выраженность которой нарастает по мере прогрессирования заболевания. В связи с этим использование в комплексной терапии и профилактике онкологических заболеваний антиэндотоксिनотических мероприятий, которые включают применение энтеросорбентов, эубиотиков и гепатопротекторов, найдут широкое применение. Индивидуализация курса терапии определяется показателями скрининговых диагностических эндотоксин-тест-систем и иных общепринятых методов исследования. Дальнейшая разработка этого направления представляется перспективной.

Список литературы

1. **Westphal, O.** Bacterial Endotoxins / O. Westphal // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* – 1975. – V. 49. – P. 1.
2. **Yakovlev, M. Yu.** Elements of endotoxin theory of human physiology and pathology: systemic endotoxemia, endotoxin aggression and endotoxin insufficiency / M. Yu. Yakovlev // *J. Endotoxin Research.* – 2000. – V. 6. – P. 120.
3. **Яковлев, М. Ю.** Системная эндотоксемия в физиологии и патологии человека : автореф. дис. ... доктор мед. наук / М. Ю. Яковлев. – М., 1993. – 55 с.
4. **Яковлев, М. Ю.** Роль кишечной микрофлоры и недостаточность барьерной функции печени в развитии эндотоксемии и воспаления / М. Ю. Яковлев // *Казан. мед. жур.* – 1988. – № 5. – С. 127–128.
5. **Бондаренко, В. М.** Определение эндотоксина грамотрицательных бактерий в крови человека / В. М. Бондаренко, В. Г. Лиходед, М. Ю. Яковлев // *Микробиология.* – 2002. – № 2. – С. 83–89.
6. **Аниховская, И. А.** Выявление групп риска, выбор тактики обследования и оценка эффективности лечения различных заболеваний по показателям антиэндотоксिनотического иммунитета : автореф. ... канд. мед. наук. / И. А. Аниховская. – М., 2001. – 19 с.
7. Пат. 2088936 Российская Федерация, ЛПС-Тест-ИФА. Способ оценки состояния антиэндотоксिनотического иммунитета в отношении грамотрицательных бактерий / Лиходед В. Г., Яковлев М. Ю., Аполлонин А. В. [и др.] ; приорит от 18 апреля 1994. – 1996.