



Глумчер Ф.С., Чоляк В.В.\*,  
Федоров В.Ю.\*

## СЕПСИС: ПАТОГЕНЕЗ, ІМУНОДІАГНОСТИКА ТА ІМУНОТЕРАПІЯ

(ОГЛЯД ТА ВЛАСНІ СПОСТЕРЕЖЕННЯ)

Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця

\*Національний Львівський медичний університет ім. Д.Галицького

В огляді звертається увага на порушення імунологічної функції при сепсисі, причини та механізми таких порушень та можливість імунокорекції як елементу терапії сепсису. Для імунокорекції важливо виявляти фазу реакції імунної системи організму на інфекцію, бо ті ж самі засоби можуть в різні фази імунної реакції бути як корисними, так і шкідливими, для цього необхідно розробити та впровадити специфічні маркери. Також наводяться результати власних досліджень функції імунної системи людини при сепсисі.

**Ключові слова:** сепсис, апоптоз, імунорегуляція, імунокорекція.

Сепсис є складною клінічною проблемою, яка включає шкідливу або навіть руйнівну реакцію організму на інфекцію. Результати лікування сепсису залишаються незадовільними, летальність все ще тривожно висока, незважаючи на постійну розробку й впровадження нових методик лікування.

Стагнація в розробці нових антибіотиків, широке розповсюдження резистентних до антибіотиків інфекційних патогенів та невдачі клінічних досліджень щодо корекції прозапальної фази сепсису є основними чинниками, які стимулюють дослідників в області сепсису розробляти та впроваджувати в клінічну практику застосування імуномодуляторів, які, перш за все, направлені на зменшення імуносупресії під час сепсису.

**Метою цього огляду** є зосередженість на імунопатогенезі і особливо на методах імуномодуляції сепсису.

### ІМУНОПАТОГЕНЕЗ СЕПСИСУ

Історичною є думка, що сепсис складається з початкової гіперзапальної фази (синдром системної запальної відповіді – SIRS), з наступною протизапальною або імуносупресивною фазою (компенсаторний протизапальний синдром – CARS)[1; 2].

Імунна відповідь при сепсисі визначається багатьма чинниками, а саме: нутритивним статусом, загартуванням, супутньою патологією (цукровий діабет, захворювання серця, злоякісний процес), а також вірулентністю причинних патогенів септичного процесу. Хоча і про- й протизапальні механізми активуються одночасно вже на початку сепсису, під час перших кількох діб в клінічній картині часто домінує гіперзапальна реакція. Гіперзапальну фазу назвали “цитокіновим штормом”, який зумовлений підвищеними рівнями в плазмі прозапальних цитокинів TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  та IL-6. Але швидко відбувається виснаження вроджених й адаптивних імуноцитів внаслідок їх апоптозу, що знижує активність прозапальної реакції й призводить до імуносупресії (А). На цьому етапі для корекції імунного гомеостазу можливе застосування протизапальних засобів. Але паралельно або пізніше у пацієнтів може виникати неконтрольована протизапальна реакція з трансформацією в гіпозапальну фазу (В). Якщо гіпозапальна фаза триває певний час може виникнути клітинне виснаження; клітинний фенотип характеризується зниженою функцією Т-лимфоцитів, збільшенням активності експресії PD-1 та зменшенням експресії

IL-7R на Т лимфоцитах. У цій фазі несприятливий результат лікування має місце у пацієнтів з неадекватною імунною відповіддю, зростає ризик вторинної інфекції, яку часто викликають умовно-патогенні збудники (рис. 1).

Наведена вище біфазна парадигма була заснована на багатьох дослідженнях, але на даний час очевидно, що прозапальна та протизапальна фази можуть зустрічатися одночасно вже в ранній стадії сепсису.

**ПРОЗАПАЛЬНА РЕАКЦІЯ:  
ЦИТОКІНОВИЙ «ШТОРМ»**

Початкове імунне розпізнавання інфекційних патогенів пов'язане з молекулярними структурами (PAMPs), які виділяються з бактеріальних або грибкових організмів та раньового вмісту, що зв'язуються з рецепторами розпізнавання, які експресуються на активованих імунних клітинах [4; 5]. Активація паттерна рецепторів розпізнавання призводить до продукції численних прозапальних молекул, включаючи TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  та протизапальних цитокінів, які викликають активацію та гальмування клітинних реакцій. Ці реакції не обмежені посиленою фагоцитарною активністю і включають пошкодження судинного ендотелію з капілярною неспроможністю, синтез печінкою білків гострої фази, хемотаксис лейкоцитів до місця інфекції/запалення та активацію системи коагуляції [6; 7].

Спершу прозапальна реакція, як вважають, була основною причиною летальності при

сепсисі і, значною мірою, об'єктом для терапевтичних інтервенцій. Інтенсивність гіперзапальної початкової фази змінюється в залежності від багатьох чинників, які включають початковий фізичний стан хворого, його супутню патологію, вірулентність патогенів, патогенне навантаження й генетичні фактори. Результуючим ефектом запальної реакції, яка включає вроджений і адаптивний імунітет, є багаторазова циклічність цих фаз протягом сепсису [2]. Така біфазна уява, можливо, є спрощеним поясненням складної хвороби, але все ж забезпечує раціональне пояснення змінення функцій імунної системи під час сепсису.

**АДАПТИВНИЙ ІМУНІТЕТ**

На рисунку 2 наведено спрощений набір різних клітин адаптивної імунної системи. Т-лімфоцити відіграють важливу роль в елімінації інфекційних патогенів [8].

CD4+ Т-клітини хелперів-помічників, які активуються внаслідок презентації антигену антигенпрезентуючими клітинами. Активовані CD4+ Т клітини розповсюджуються внаслідок клональної експанзії з утворенням клітин пам'яті CD4+ Т та ефекторних CD4+ Т клітин. Ефекторні CD4+ Т клітини сприяють активації В клітин, CD8 Т клітин та навіть макрофагів, які приймають участь в елімінації патогенів. Сепсис порушує функцію, як антигенпрезентуючих клітин, так і клітин системи адаптивного імунітету. (CD4+ Т лімфоцитів, В лимфоцитів, CD8+ Т лімфоцитів та Мф – Макрофаги).

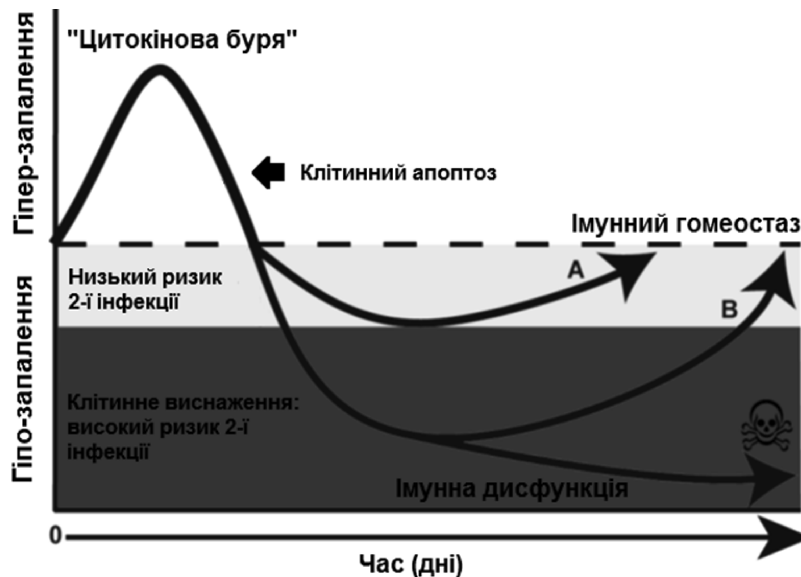


Рис.1. Імунна відповідь при сепсисі [3].

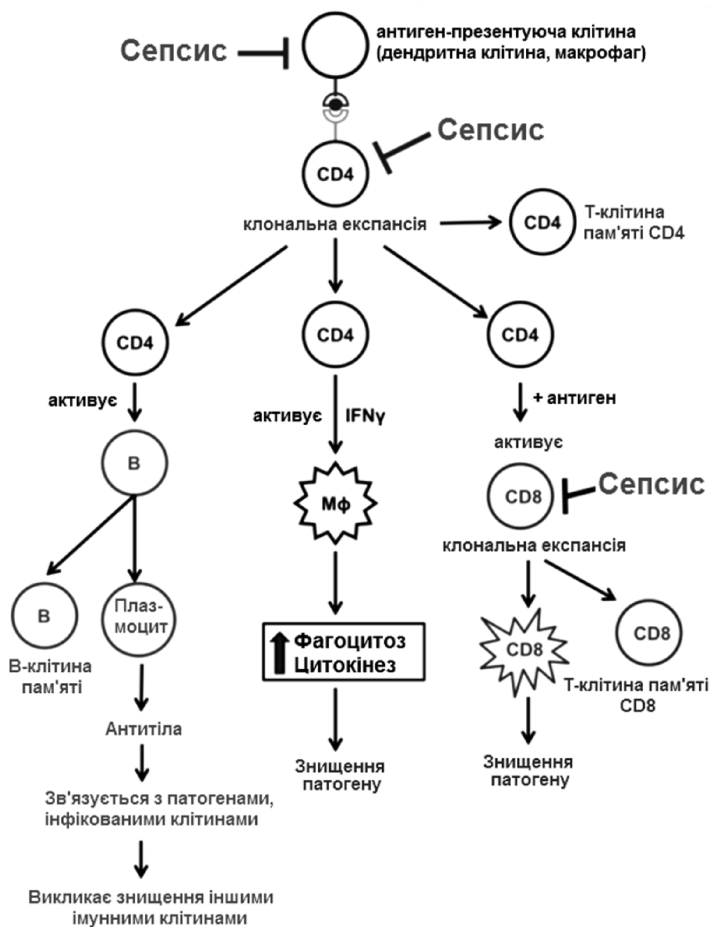


Рис. 2. Схематичне відображення адаптивного імунітету [8].

Вроджені імуніцити – це дендритні клітини, макрофаги і моноцити, які активують наївні Т-лімфоцити у відповідь на антигенну стимуляцію, піддаються їх клональному розширенню. Вони пізніше продукують цитокіни, специфічні для антигена [9]. За умови позитивного перебігу інфекції, гине більшість ефекторних Т-лімфоцитів (фаза скорочення), і ті Т-лімфоцити, які вижили, перетворюються на Т-лімфоцити пам'яті, котрі важливі для ініціації реакції-відповіді в майбутньому на певні антигени після попереднього контакту з подібними антигенами. У зумовленій антитілами відповіді, яку підтримують В-лімфоцити, приймають участь CD4+ Т-лімфоцити [10]. Антитіла (імуноглобуліни), які були продуковані В-лімфоцитами, є специфічними для певного антигена. Взаємодія імуноглобуліна та антигена призводить до багатьох ефектів, включаючи: інактивацію вірусів чи мікробних токсинів, блокування їх взаємодії з клітинами господаря, маркування інфекційних агентів для деструкції їх фагоцитами. Тому і Т, і В-лімфоцити відіграють

критичну роль в захисті хазяїна проти небезпечних для життя інфекцій. Послаблення таких критичних захисних механізмів призводить до нездатності знешкодити основні інфекційні вогнища, що призводить до підвищеної чутливості до вторинних інфекцій під час сепсису [3].

Вважали, що гіперзапальна реакція, яка характеризується надмірною продукцією прозапальних медіаторів, таких як ФНО- $\alpha$  та інтерлейкін-1 була ознакою сепсису і самою життєздатною терапевтичною метою численних преклінічних і клінічних досліджень [1]. Клінічні дослідження включали застосування антагоністів TNF та IL-1 $\beta$ , блокаторів Толл-подібних рецепторів (TLR), інгібіторів тромбоцит-активуючого фактору (Xigris 12-14), антикоагулянтів, антагоністів ендотоксину, гемофільтрацію з метою видалити розчинні ендотоксини та цитокіни. Всі вони в кінцевому результаті не виявили ефективності, а в деяких випадках погіршували результат лікування сепсису [3; 11; 12]. Клінічні дослідження, в яких використовували блока-

тори прозапальних медіаторів, таких як антиендотоксиніві антитіла до ліпополісахариду (ЛПС), прозапальні цитокини (ФНО $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ ) та антагоністи TLR, показали невтішні результати [13; 14].

Таким чином, можливості поточного лікування сепсису є обмежені. Вони, головним чином, включають антибіотикотерапію, відновлення об'єму рідини й підтримку органних систем. Така стратегія зменшила ранні смертельні випадки серед септичних пацієнтів та покращила загальне виживання [15]. Але незважаючи на ці успіхи, летальність при септичному шоці все ще перевищує 30% [16].

#### **ГІПОЗАПАЛЬНА РЕАКЦІЯ: ІМУННИЙ «ПАРАЛІЧ»**

Після запеклих дебатів було досягнуто угоди – сепсис може розвиватися в дві фази: перша – гіперзапалення (цитокіновий «шторм») і друга – гіпозапалення (імунний «параліч»), що видно з рисунку 1. [2; 17]. Багато доказових досліджень та краще розуміння імунологічних альтерацій під час сепсису протягом останнього десятиріччя довели роль імуносупресії в патогенезі сепсису [18; 19]. Останнім часом імуносупресія, яка виникає при сепсисі, є темою інтенсивних досліджень численних авторів у всьому світі. Дійсно, різні дослідження доводять, що пацієнти, які переживають початкову запальну фазу сепсису, дуже чутливі до шпитальних інфекцій, які викликаються умовно-патогенними організмами, і серед хворих, які початково вижили після сепсису, спостерігають пізні смертельні випадки [20; 21]. Хоча сучасні стратегії лікування призводили до короткострокового покращення стану септичних пацієнтів, вони всі однаково супроводжувались більш тривалою зміною на імуносупресивний фенотип, який збільшує кількість відтермінованих смертей. Фактично, багато летальних випадків стаються після 3 діб від початку сепсису, а значна частина виникає протягом кількох тижнів від початку сепсису [22]. На думку ряду вчених, імунотерапевтичні стратегії, направлені на стимуляцію імунної системи, мають значний потенціал, який здатний змінити викликану сепсисом імуносупресію та покращити стан пацієнта.

Пацієнти відповідають на сепсис гетерогеним чином: продукцією прозапальних та протизапальних цитокинів в ранньому періоді

після початку сепсису, у декотрих з наступною зниженою секрецією цитокинів або одною тільки протизапальною реакцією [2]. Стало очевидно, що у багатьох септичних хворих, які пережили гіперзапальну початкову фазу – цитокіновий «шторм», розвивається відтермінована і потенційно тривала компенсаторна протизапальна відповідь, так званий синдром компенсаторної протизапальної відповіді (CARS) [2; 22]. Хоча деякі хворі все ще помирають під час початкової фази сепсису, нові протоколи лікування сприяють рятуванню більшості пацієнтів у цій фазі, після якої виникає стан імуносупресії [15]. Ця імунна дисфункція призводить до підвищеної чутливості організму до вторинних бактеріальних інфекцій, наприклад, вентилятор-асоційованої пневмонії (VAP), інфекції, які викликані, взагалі, авірулентними або умовно-патогенними організмами. При цьому зростає ризик розвитку CARS [23].

Численні дослідження показали, що в результаті багатьох імунних порушень гіпозапалення призводить до дисфункції адаптивної імунної відповіді [24–28].

Адаптивна імунна система складається із спеціалізованих антиген-специфічних клітин, важливих для генерування клітин-пам'яті при повторних реакціях на антигени. CD4 + і CD8 + є головними субпопуляціями Т-лімфоцитів. CD4 + Т-лімфоцити відомі як Т-хелпери, і вони відіграють значну роль в оркеструванні численних реакцій вродженої та адаптивної імунних систем [10]. CD8 + Т-лімфоцити кілери, також відомі як цитотоксичні Т-лімфоцити, важливі для знищення пухлинних або інфікованих клітин [29]. Специфічні для конкретного антигену Т-лімфоцити необхідні для стимуляції продукції антитіл проти внутрішньоклітинних (Th1) або позаклітинних патогенів (Th2) за участю розчинних медіаторів-цитокінів. Продукцію всіх антитіл, які відносяться до гуморального імунітету, забезпечують В-лімфоцити при допомозі Т-лімфоцитів. Специфічне для антигена антитіло може нейтралізувати токсини, фіксувати комплемент та визначати поверхню для фагоцитарного поглинання інфекційних патогенів моноцитами/макрофагами. Антигенпрезентуючі клітини, які включають моноцити/макрофаги та дендритні клітини аналізують середовище і презентують антигени Т-лімфоцитам для ініціації імунної відповіді або індукції толерантності адаптивного імунітету.

Збільшується кількість даних, які підтримують гіпотезу, що імуносупресія відіграє важливу роль в летальності, обумовленій сепсисом [3]. Імуносупресія під час сепсису підтверджується тим, що септичні хворі дуже чутливі до вторинних інфекцій: *Pseudomonas*, *Candida*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, а також високою частотою реактивації персистуючих вірусів, таких як цитомегаловірус, вірус простого герпесу, Епштейн-Барр вірус [30–32].

Цікаві клінічні спостереження, а також імунологічні та молекулярно-генетичні дослідження були проведені львівською школою хірургів в 2013-2016 роках у 129 хворих з абдомінальним сепсисом [33; 34]. Вони показали розвиток швидкої імуносупресії у септичних хворих, особливо з тяжким абдомінальним сепсисом, на основі аналізу кількості активованих Т-лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), регуляторних лімфоцитів (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>br</sup>CD 127<sup>neg</sup>) та імуnoreгуляторних молекул мікро-РНК 146a та 155 вродженого та адаптивного імунітету. Так, в таблиці 1 показано порівняльну характеристику показників активованих Т-лімфоцитів та їх регуляторної субпопуляції у хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини з абдомінальним сепсисом (ГХЗОЧП + АС) та тяжким абдомінальним сепсисом (АС).

Отже, у досліджуваних хворих з тяжким абдомінальним сепсисом виявлено вірогідно меншу відносну кількість активованих лімфоцитів порівняно з хворими на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини з а тяжким абдомінальним сепсисом ( $p < 0,05$ ) та збільшення у них відносної кількості регуляторних лімфоцитів ( $p < 0,05$ ). Отримані нами дані свідчать про наростання імуносупресії у хворих з тяжким абдомі-

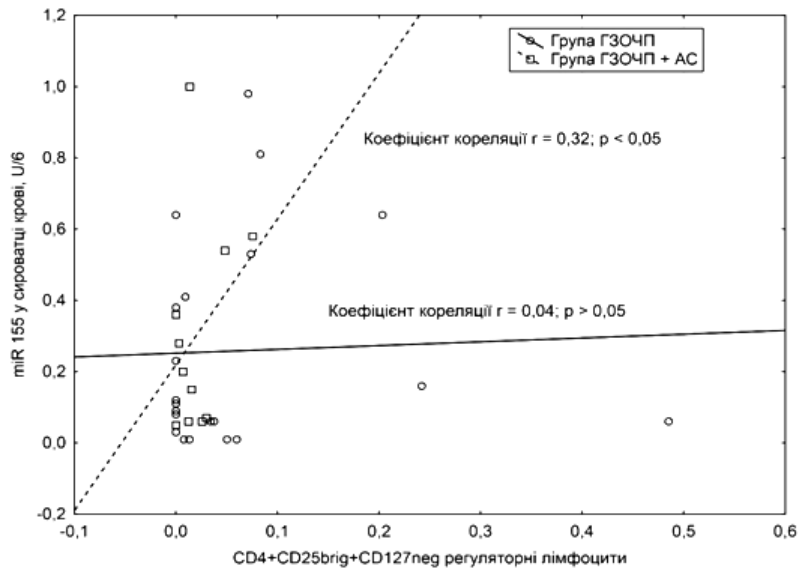
нальним сепсисом, що відповідає доказовим дослідженням [19]. Крім того, було встановлено взаємозв'язок між рівнем експресії miR155 в сироватці крові (це прозапальний епігенетичний біомаркер, який впливає на активність адаптивної клітинної відповіді імунного системи) та кількістю регуляторних Т-лімфоцитів у периферичній крові, який показав пряму кореляцію між наростанням стимулюючого фактора імунної лімфоцитарної активності та клітинної імуносупресії ( $r = 0,32$ ) у всіх хворих з абдомінальним сепсисом, та відсутність взаємозв'язку в хворих без сепсису, що видно з рисунку 3. Це свідчить про ранній розвиток імуносупресивної фази сепсису.

На рисунках 4, 5, 6 показано взаємозв'язок між відносною кількістю лімфоцитів периферичної крові та експресією miR155 у цільній крові, сироватці крові та перитонеальній рідині у досліджуваних хворих. Як бачимо, в хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини, що не були ускладнені абдомінальним сепсисом, були виявлені незначні обернені зв'язки між кількістю лімфоцитів периферичної крові та експресією miR155. Водночас у септичних пацієнтів були встановлені виражені обернені взаємозв'язки між відносною кількістю лімфоцитів периферичної крові та експресією miR155 в біологічних середовищах:  $r = -0,44$  – у цільній крові;  $r = -0,56$  ( $p < 0,05$ ) – у сироватці крові та  $r = -0,51$  – перитонеальній рідині. [35] Отримані результати дають основи говорити про паралельність процесів імуностимуляції та імуносупресії.

У таблиці 2 наведено порівняльну характеристику показників активованих лімфоцитів та їх регуляторної субпопуляції у хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини, що ускладнені абдомінальним сепсисом, які вижили, та хворих, що померли.

**Таблиця 1.** Порівняльна характеристика показники активованих лімфоцитів та їх регуляторної субпопуляції у хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини з абдомінальним сепсисом та тяжким абдомінальним сепсисом

Показники		ГХЗОЧП+ АС n=44 M±m, %	Тяжкий АС n=18 M±m, %	p
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	%	9,74±1,71	6,16±1,27	<0,05
	Г/л	0,29±0,10	0,12±0,08	>0,05
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>br</sup> CD 127 <sup>neg</sup>	%	3,57±0,55	6,01±1,53	<0,05
	Г/л	0,07±0,01	0,09±0,02	>0,05



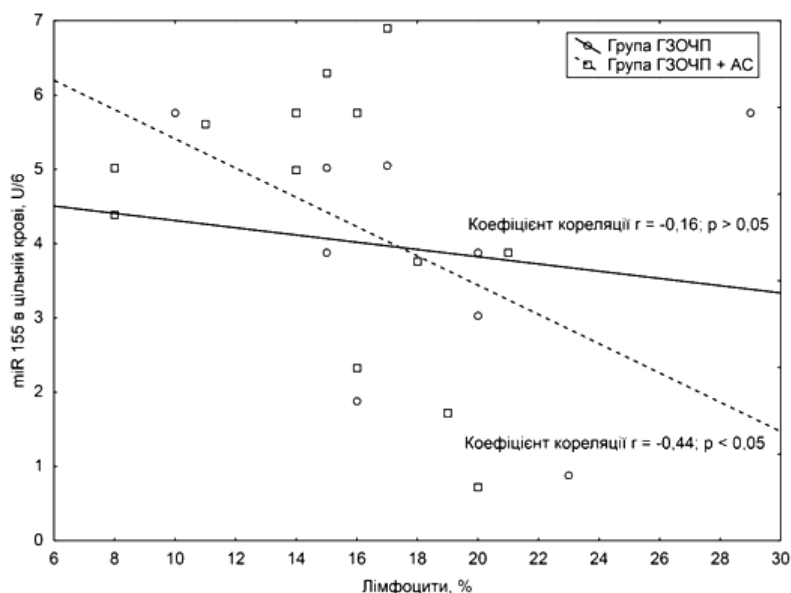
**Рис. 3.** Взаємозв'язок між відносною кількістю CD4+CD25br+CD 127neg в периферичній крові та експресією молекули miR155 у сироватці крові хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини з та без абдомінального сепсису

Як видно з таблиці 2, відносна кількість активованих лімфоцитів у пацієнтів, що померли в результаті септичних ускладнень була істотно нижчою порівняно з септичними пацієнтами, що вижили ( $p < 0,05$ ). У померлих хворих відзначено істотне підвищення абсолютної та відносної кількості регуляторних лімфоцитів порівняно з тими пацієнтами, що вижили ( $p < 0,05$ ). Поясненням цьому може бути значна депресія клітинно-залежної та гуморальної імунної відповіді з

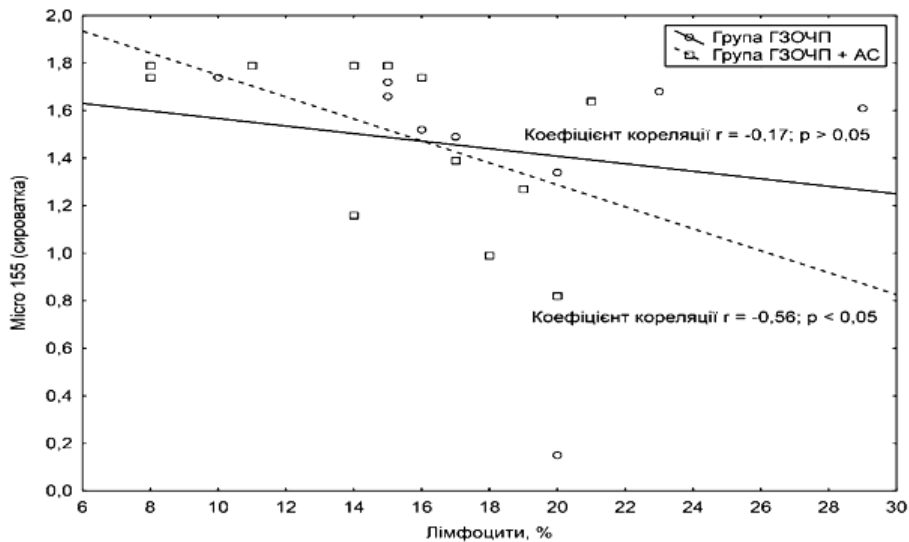
формуванням набутого імунодефіцитного порушення, пов'язаного з сепсисом. [36].

Аналогічно, за допомогою методу логістичної регресії, нами було виокремлено також 7 факторів, які при поєднаній дії мають вірогідний вплив на розвиток важкого сепсису. Значення коефіцієнтів регресії для даних факторів наведено у таблиці 3.

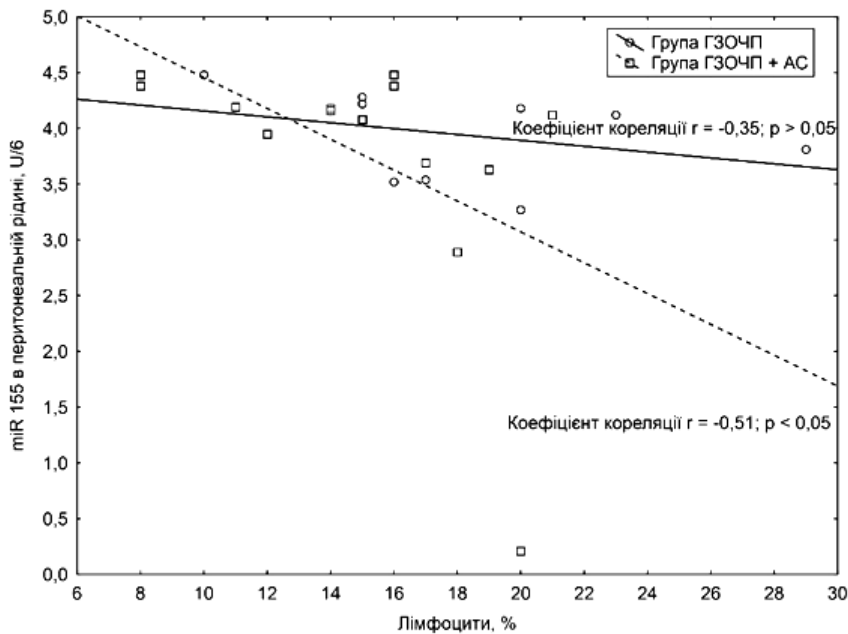
Підставивши у формулу результати, отримані за методом логістичної регресії,



**Рис. 4.** Взаємозв'язок між відносною кількістю лімфоцитів периферійної крові та експресією miR155 у цільній крові хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини з та без абдомінального сепсису



**Рис. 5.** Взаємозв'язок між відносною кількістю лімфоцитів периферичної крові та експресією міR155 у сироватці крові хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини з та без абдомінального сепсису



**Рис. 6.** Взаємозв'язок між відносною кількістю лімфоцитів периферійної крові та експресією міR155 у перитонеальній рідині хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини з та без абдомінального сепсису

**Таблиця 2.** Порівняльна характеристика показників активованих лімфоцитів та їх регуляторної субпопуляції у хворих на гострі хірургічні захворювання черевної порожнини, що ускладнені абдомінальним сепсисом, що вижили, та хворих, що померли

Показники		ГХЗОЧП+АС (вижили) n=54 M±m, %	ГХЗОЧП+АС (померли) n=5 M±m, %	p
CD3+HLA-DR+	%	9,41±1,02	5,14±0,61	<0,05
	Г/л	0,18±0,03	0,13±0,02	>0,05
CD4+CD25brig+CD 127neg	%	2,44±0,91	8,01±1,59	<0,05
	Г/л	0,05±0,01	0,11±0,03	<0,05

нами було отримано значення  $Z$  для визначення вірогідності розвитку тяжкого сепсису:

$$Z = 12,129 \cdot A - 1,347 \cdot B + 30,922 \cdot C + 1,036 \cdot D + 20,333 \cdot E + 88,830 \cdot F - 0,116 \cdot G - 13,050$$

(6.2), де:

A – прокальцитонін у сироватці крові;

B – miR 146a у перитонеальній рідині – епігенетичний фактор активації природженого імунітету;

C – miR 155 сироватці крові – епігенетичний фактор активації адаптивного імунітету;

D – сума показників синдрому системної запальної відповіді

E – ОБМ стимульований *E.coli* – оксидантний «вибух» стимульованих *E.coli* моноцитів

F – CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>127<sup>-</sup> – регуляторні Т-лімфоцити

G – лімфоцити

Відтак превентивними чинниками щодо розвитку тяжкого сепсису є концентрація miR 146a в перитонеальній рідині та кількість лімфоцитів в крові. Всі інші ознаки – провокуючі. Також була проведена ретроспективна перевірка отриманої моделі на основі даних дослідження. Отримані результати засвідчують, що точність регресійного рівняння щодо прогнозування тяжкого сепсису становить 98,8%. [37]. Отже, проведене дослідження, що поряд із запальною фазою, яку характеризує синдром системної запальної відповіді (SIRS), розвивається імуносупресивна фаза сепсису – компенсаторний проти-запальний синдром (CARS).

**ІМУНОСУПРЕСІЯ ПРИ СЕПСИСІ**

Головними механізмами, які призводять до імуносупресії при сепсисі є погіршення функції адаптивної імунної системи, що включає: 1) прискорений апоптоз, який

призводить до виснаження клітин; 2) погіршення реактивності наслідок посиленої регуляції інгібуючих рецепторів або низькорівневої регуляції есенціальних ко-стимулюючих рецепторів на поверхні клітин; 3) зниження реакції цитокінів [31; 38].

**СЕПСИС-ІНДУКОВАНИЙ АПОПТОЗ КЛІТИН АДАПТИВНОГО ІМУНІТЕТУ**

Апоптоз також відомий як «програмована смерть» клітин, є одним із шляхів, за допомогою яких імунна система підтримує гомеостаз, ліквідуючи активовані та відпрацьовані клітини. Цей термін почав використовуватися в історичній роботі Kerr J. та ін. в 1972 р., в роботі було описано різні форми некрозу клітин [39]. Апоптоз – фізіологічний процес, який присутній під час нормального росту та розвитку клітин, але може набути шкідливих наслідків для виживання організму при багатьох патологічних станах, включаючи сепсис [40; 41].

Центральними регуляторами апоптозу є каспази – цистеїнові протеази. Вони сприяють деградації клітинних білків та ядерного фактору NFκB – транскрипційного фактору, який активує транскрипцію обох генів – і проапоптотичного і анитиапоптотичного. Гіперзапальна реакція при сепсисі для продукції прозапальних цитокінів потребує активації NFκB та каспаз, при цьому і NFκB, і каспази одночасно викликають апоптоз адаптивних імунних клітин [42; 43]. Апоптоз я при сепсисі, як показали вчені, виникає паралельно з прозапальною реакцією. У моделях сепсису на мишах, так як і у хворих з тяжким сепсисом, виникає значна деплеція Т, В і дендритних клітин [44–47].

**Таблиця 3. Результати коефіцієнтів регресії щодо виникнення тяжкого сепсису за методом логістичної регресії**

Фактори	Умовне позначення	Коефіцієнт регресії (βi)
Прокальцитонін в сироватці крові (нг/мл)	A	12,129
miR 146a в перитонеальній рідині (U/6)	B	-1,347
miR 155 в сироватці (U/6)	C	30,922
Сума показників ССЗВ	D	1,036
ОБМ стимульований <i>E.coli</i> , (%)	E	20,333
CD4 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup> 127 <sup>-</sup> (%)	F	88,83
Лімфоцити (%)	G	-0,116
Константа		-113,05



У межах перших 24 годин після початку сепсису у хворих виникає лімфопенія, яка розвивається внаслідок рекрутування лімфоцитів з кровообігу в вогнища запалення / інфекцій та апоптичної деплеції CD4- та CD8-лімфоцитів у крові [44]. Посмертний аналіз селезінок та лімфатичних вузлів у людей, які вмерли від сепсису, підтвердили дуже значну втрату CD4- та CD8-лімфоцитів [45]. Клітини пам'яті та CD8-лімфоцити дуже чутливі до апоптозу за умов системного запалення, таких як септичний шок. Вони швидко виснажуються за цих умов [48].

Результати досліджень вказують, що **виснаження адаптивних імуніцитів – головний патологічний компонент сепсису з потенційними несприятливими ефектами для імунної системи організму.**

Апоптоз – значно виражений патологічний процес при сепсисі. Так в дослідженні Wang S. та ін., ін'єкція грамнегативних бактерій мишам призводила до апоптозу CD4 + та CD8 + клітин в тимусі [49]. В 1990-х роках в інших дослідженнях було визначено потужний апоптоз лімфоцитів в різних органах, включаючи селезінку, тимус, товсту кишку, тонку кишку, легені та скелетні м'язи при сепсисі, який був викликаний перев'язкою та пункцією сліпої кишки (CLP) у мишей [50]. У іншому дослідженні визначили апоптоз B22+ клітин в кістковому мозку та незрілих T-лімфоцитів у тимусі [51]. Після цього численні преклінічні дослідження представили точні підтвердження того, що сепсис призводить до значної, викликаного апоптозом, втрати CD4 + та CD8 + лімфоцитів [52–55]. Значне виснаження T-лімфоцитів в селезінці та лімфатичних вузлах також знайшли при системній інфекції *Pseudomonas* під час масивних опіків [56]. Хоча деплеція адаптивних імуніцитів визнана важливим компонентом патогенезу сепсису, механізми, відповідальні за це, неповністю зрозумілі [57; 58]. На рисунку 7 наведені головні шляхи апоптозу.

Зовнішній шлях апоптозу реалізується через взаємодію головних «смертельних» лігандів, таких як Fas (FasL або CD95L) та фактор некрозу пухлин (TNF $\alpha$ ) з відповідними рецепторами «смерті», такими як рецептор Fas (FasR або CD95R) й рецептор TNF (TNFR), відповідно, на поверхні клітин. Взаємодія Fas/FasR призводить до закріплення білків адаптерів FADD та TRADD, з

наступною дією FADD з рецептором взаємодіючого білка (RIP).

Внутрішній шлях апоптозу включає порушення цілосності мембрани мітохондрій під впливом різноманітних стимулів, таких як бактеріальні токсини, радіація та ін. Токсичні стимули порушують цілісність мембран мітохондрій, що призводить до відкриття мітохондриальних пор проникності (MPT), втраті мембранного потенціалу та виходу мітохондриального цитохрому в клітинну цитоплазму, що в кінцевому рахунку призводить до активації каспази-9, котра розщиплює каспазу-3, призводячи до реалізації апоптозу та некрозу клітин.[59–61]

Регуляторні T-лімфоцити спроможні пригнічувати проліферацію T-лімфоцитів, секрецію цитокинів і, знову ж таки, можуть сприяти апоптозу T-лімфоцитів [62]. Відсоток таких клітин збільшується у септичних пацієнтів в результаті їх стійкості до апоптозу та зменшенню кількості активованих T клітин, що є ще одним потенційним механізмом імунної дисфункції. Експресія цих інгібуючих рецепторів/лігандів на T-лімфоцитах, антигенпрезентуючих клітин та тканинах є середовищем, яке сприяє виснаженню T-лімфоцитів і анергії імунітету в септичних пацієнтів [63; 64]. Однак, кінцевим виконавцем всіх апоптичних шляхів є активація каспази-3, яка викликає фрагментацію ДНК та розпад цитоскелетних, а також ядерних білків, що призводить до некрозу клітин [65; 66].

Одним з головних білків, які контролюють мітохондріальний шлях апоптозу, є родина Bcl-2 білків, що керують вивільненням цитохрому шляхом регуляції мітохондріальної мембранної проникності. Декотрі з антиапоптичних білків належать до родини Bcl-2, до якої включені наступні молекули: Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG. До проапоптичних білків належать: Bcl-10, Bax, Bid, Bim, Bik, Bad, і Blk- молекули. Ці білки через різні механізми викликають апоптоз. Так, нефосфорильована форма Bad може переміститися в мітохондрії та викликати вивільнення цитохрому, і також може зв'язуватися з Bcl-XL та Bcl-2 білками, таким чином інгібувати їх захисні ефекти [67; 68]. Хоча механізми цього процесу не зовсім зрозумілі, Bcl-2 і Bcl-XL інгібують апоптоз, регулюючи активацію каспаз [69]. Мітохондріальне пошкодження, зустрічається при Fas-залежному зовнішньому шляху апоптозу через розпад Bid, який активується каспазою-8. Він може переміститися в

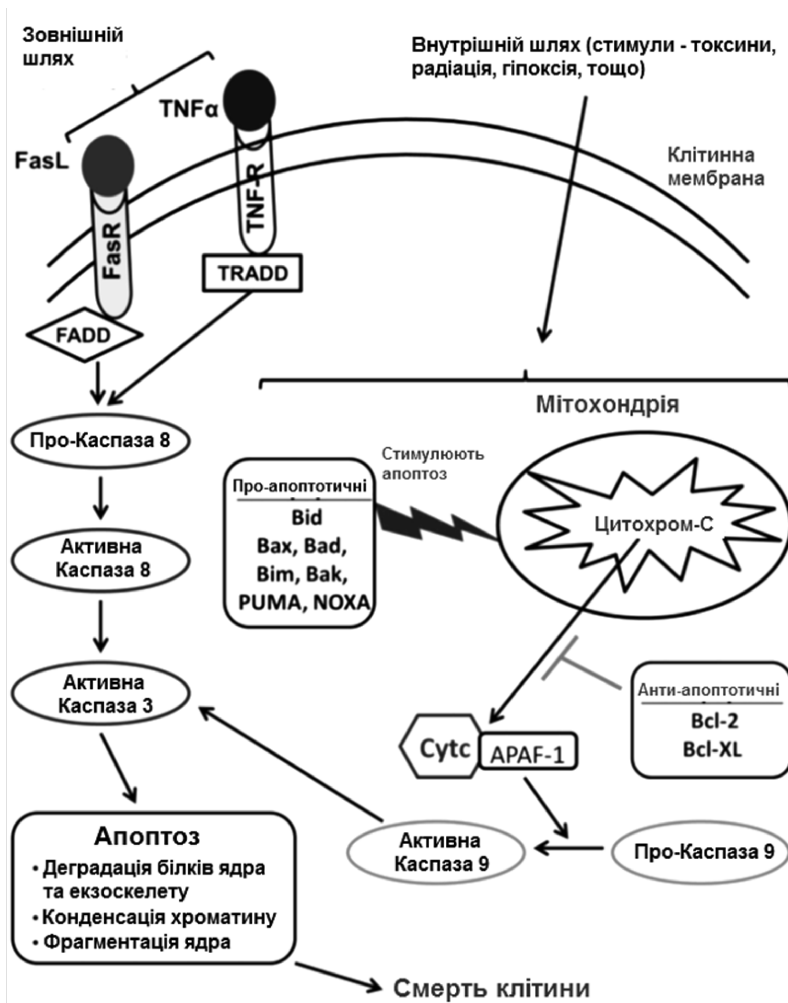


Рис.7. Основні шляхи апоптозу

мітохондрії, де зв'язується з Вах/Вак, що теж призводить до апоптозу [70]. Цей механізм – один з відомих ланцюгів інтеракції між двома класичними шляхами апоптозу [71]. Для обох (і внутрішнього, і зовнішнього) шляхів апоптозу, активація каспази-3 оркеструє заключний етап апоптозу з некрозом клітин.

Втрата лімфоцитів визначається балансом про- та протизапальних механізмів. У посмертному дослідженні сепсису було зареєстровано зменшення експресії CD28 на Т лімфоцитах у септичних пацієнтів в порівнянні з пацієнтами контрольної групи [45]. Ко-стимулююча молекула CD28, якщо вона зв'язується з молекулами B7 на антигенпрезентуючих клітинах, потребує продукції IL-2 та експресії Bcl-XL. Ці два фактори свідчать про антиапоптичний ефект та виживання Т-клітин [72]. Антигенпрезентуючі клітини, включаючи дендритні клітини та макрофаги, виділені або з селезінки, або з легень септичних хворих, мали низьку експресію молекул B7(B7-1/CD80 и B7-2/CD86), що

потенційно обмежувало здатність Т-лімфоцитів до ко-стимуляції. Без необхідної поєданої стимуляції через CD28/B7, коли рецептори Т-лімфоцитів залучають антиген, Т-лімфоцити піддаються процесу, котрий називають «відсутність функціональної активності» (анергія).

Недавні дослідження також вказали, що Т-лімфоцити позитивно регулюють поверхневі рецептори, котрі інгібують функції Т-лімфоцитів. Було ідентифіковано збільшення експресії програмованого рецептора «смерті» 1(PD-1), CTLA-4, В-атенуатора (BTLA) на Т-лімфоцитах, котрі були виділені посмертно з селезінки та легень, а також з крові через 7 днів після постановки діагнозу сепсису. Крім того, було визначено збільшення експресії програмованих лігандів смерті -1 та -2 (PD-L1 и PD-L2) на антигенпрезентуючих клітинах, виділених з крові через 7 днів після постановки діагнозу сепсису [44; 45]. Експресія PD-L на антигенпрезентуючих та ендотеліальних клітинах була пов'язана з індукцією імунної толерантності [73; 74]. Збільшення експресії

молекул PD-1, CTLA-4 або BTLA ( всі члени суперродини CD28-рецепторів), викликає апоптоз Т-лімфоцитів або клітинну толерантність, що сприяє нормалізації імунного гомеостазу. PD-1 та CTLA-4 молекули, так як і члени родини ліганда TNFR та Fas-ліганд (CD95L), експресуються на спеціалізованому типі CD4<sup>+</sup>-лімфоцитах, які вже самі експресують транскрипційний фактор FoxP3 та поверхневу CD25- молекулу (IL-2R $\alpha$ ). Ці клітини було названо регулюючими Т-лімфоцитами (Treg) [75].

Було доведено, що інгібування апоптозу з використанням специфічних інгібіторів каспаз, зокрема каспази-3 у мишей, або збільшена експресія антиапоптотичного білка Bcl-2 значно зменшували апоптоз Т-лімфоцитів і покращували виживання тварин у моделі CLP сепсису [76; 77].

Інше важливе спостереження полягало в тому, що у Т і В-лімфоцито-дефіцитних мишей (Rag-/-knockout) спостерігали підвищену летальність при сепсисі порівнянні з диким типом мишей [76]. Інгібітори каспаз не надавали переваг для виживання при сепсисі, що було підставою вважати, що адаптивна імунна відповідь важлива для виживання при сепсисі. Подібні результати преклінічного дослідження також було підтверджено в клінічних дослідженнях септичних пацієнтів.

### ВИСНАЖЕННЯ Т КЛІТИН

Виснаження Т-лімфоцитів – це патологічний стан, який часто характеризується такими особливостями, як втрата ефекторних функцій, збільшена регуляція числених інгібуючих рецепторів на поверхні клітин, низькорівнева регуляція ко-стимулюючих рецепторів, зміна експресії ключових транскрипційних факторів та метаболічні розлади. Таке виснаження спостерігається у хворих з ВІЛ інфекцією, вірусом гепатиту С і у хворих на рак [78]. Ці процеси були описані у мишей з хронічними вірусними інфекціями [79]. У виснажених Т-лімфоцитів знижена функціональна здатність зі зниженою продукцією цитокінів (гама- інтерферону, інтерлейкіну-2, гранзиму-В, TNF- $\alpha$ ), в них порушена проліферація, вони більш схильні до апоптозу. Головні інгібуючі рецептори на поверхні Т-лімфоцитів включають: програмовані рецептори смерті 1 (PD-1), атенуатори Т- і В- лімфоцитів (BTLA або CD272), цитотоксичний-Т-лімфоцит-асоційований білок- 4 (CTLA-4 або CD152), білок мембрани Т-лімфоцитів 3 (TIM-3), та лімфоцит активований-ген-3 (LAG-3). Ліганди для цих гальмуючих рецепторів як правило присутні на антигенпре-

зентуючих клітинах, таких як дендритні клітини, макрофаги і моноцити, а на цільових клітинах безпосередньо. PD-1 взаємодіють з програмованими лігандами смерті-1 і -2 (PD-L1, PD-L2), BTLA взаємодіють з HVEM (медіатор розвитку вірусу герпеса), TIM-3 з CEACAM-1 (карцино-ембріональна пов'язана з антигеном адгезивна молекула -1) або з галактин-9, LAG-3 взаємодіє з молекулою антигена класу основного комплексу гістосумісності (MHC), молекула CTLA-4 взаємодіє з CD80/CD86 на антигенпрезентуючих клітинах [60]. Ко-стимулюючі сигнальні молекули CD28 на поверхні клітин є поряд з рецептором Т-лімфоцитів (TCR), і вони потрібні для оптимальної функції Т-лімфоцитів, включаючи проліферацію, виживання клітин та продукцію IFN $\gamma$ , інтерлейкіна 2, які є важливими для боротьби з інфекціями [80].

**У доповнення до апоптозу виснаження Т-лімфоцитів, яке веде до зниження реактивності, відіграє ключову роль в патофізіології імуносупресії, викликаній сепсисом [2; 81].**

Виснаження Т-лімфоцитів часто розвивається при персистуючій присутності антигена та/або запаленні [82]. Високе антигенне навантаження та запалення, викликане інфекцією, є характерними особливостями сепсису [83]. Саме тому, у Т-лімфоцитів є пролонгована здатність реагувати на персистуючі стимули, котрі можуть призвести до збільшеної експресії на поверхні клітин інгібуючих рецепторів. Це ще раз підкреслює необхідність адекватної санації інфекційного вогнища.

PD-L1 є одним з головних лігандів, які взаємодіють з інгібуючими рецепторами під час сепсису. PD-1 звичайно позитивно регулюються на поверхні CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> Т-лімфоцитів у відповідь на стимуляцію, щоб попередити надмірну активацію Т-лімфоцитів [82; 84]. Низькорівневі сигнали PD-1, котрі призводять до дизфункції Т-лімфоцитів, включають внутрішньоклітинний імунний рецептор тирозин-залежний тригер (ITSM) та імунний рецептор, який оснований на тирозин-пригнічуючих властивостях (ITIM) і рекрутує тирозин-білкові фосфатази SHP1 та/або SHP2 (відповідність SRC 2 області, яка містить фосфатази). Численні преклінічні дослідження показали тривале збільшення експресії PD-1 і PD-L1 під час сепсису. У моделях на тваринах сепсис викликав збільшену експресію PD-1 на Т-лімфоцитах та PD-L1 експресію на моноцитах, яка пов'язана зі збільшеним апоптозом Т-лімфоцитів та вищою

смертністю в моделі CLP на мишах. У посмертнудослідженні Т-лімфоцити показали збільшену експресію PD-1 та зменшення експресії рецепторів IL-7 (IL-7R або CD127) та CD28 на лімфоцитах [45].

Проліферація Т-лімфоцитів також погіршується при сепсисі [53; 85]. Недавні дослідження показують, що експресія PD-1 суттєво збільшується в периферичній крові на CD4 + і CD8 + -лімфоцитах під час виділеної з крові інфекції *Candida*, пов'язаної з активацією CD8 + Т-лімфоцитів (збільшена експресія CD69), зменшення ко-стимулюючої експресії CD28 та IL-7R [86]. У іншому проспективному клінічному дослідженні показали, що в умовах прогресування сепсису, Т лімфоцити збільшували експресію TIM-3, LAG-3, CTLA-4 та зменшували експресію IL-7R і секрецію IFN- $\gamma$  при *ex vivo* симуляції поряд зі збільшенням експресії PD-L1 на дендритних клітинах [87]. Це дослідження доводить, що експресія інгібуючих рецепторів була порівняно низькою на початку сепсису, але суттєво збільшувалась протягом часу, якщо сепсис прогресував [88].

Shubin N. та ін. показали, що експресія BTLA була суттєво збільшена на циркулюючих CD4 + Т-лімфоцитах та В-лімфоцитах у септичних мишей, що було пов'язано зі зниженням кількості цих клітин [89]. Крім того, у пацієнтів в критичному стані з сепсисом також збільшена експресія BTLA на циркулюючих CD4 + Т-лімфоцитах (> 80%) корелювала зі збільшеною чутливістю до госпітальних інфекцій [89]. Вентилятор-асоційована пневмонія, як відомо, є однією з найбільш розповсюджених госпітальних інфекцій при сепсисі. Дослідження Boomer та ін. показало збільшення експресії PD-L1 та HVEM (HVEM – ліганд для BTLA), в легенях септичних хворих посмертне порівняно з контрольною групою [45]. Ці данні підтверджують гіпотезу, згідно якої у септичних пацієнтів збільшена чутливість до вторинних інфекцій частково внаслідок збільшеної експресії інгібуючих лігандів на паренхімі легень, котрі забезпечують низькорівневу регуляцію функції Т-лімфоцитів [3].

Виснаження Т-лімфоцитів може також бути підсилено розчинними медіаторами, такими як інтерлейкін 10 (IL-10) та трансформуючий фактор росту –  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [90]. Високе співвідношення IL-10 до ФНО- $\alpha$ , як показали дослідження, корелювало із зростанням летальності у пацієнтів з сепсисом та індукцією IL-10 в ранній стадії

сепсису [91; 92]. IL-10 інгібував продукцію прозапальних цитокінів, таких як TNF  $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ , и GM-CSF (моноцит-гранулоцит колоніестимулюючий фактор) і негативно впливав на відповідь імунітетів [93]. Численні клінічні дослідження показали загальну депресію продукції цитокінів під час сепсису, хоча функціональна важливість цього спостереження залишається не визначеною [94–96].

IL-10 може продукуватися великою кількістю типів клітин, серед яких основні продуценти регулюючі Т-лімфоцити (Tregs). Tregs визначаються за допомогою цитофлуометрії як з фенотипом CD4+CD25+FoxP3 + так і з фенотипом CD4+CD25+CD127. Кількість їх збільшується під час підгострої фази сепсису. Зростання кількості Tregs під час сепсису корелює з виснаженням CD4 + Т лімфоцитів [97]. Tregs можуть погіршувати функції ефektorних Т-лімфоцитів, викликаючи супресію клітинної проліферації, секреції цитокінів та індукувати апоптоз [98]. Проведені дослідження також демонструють взаємодію між Tregs та PD-1, тому що одночасне виснаження Tregs та блокада PD-1 викликали синергічне покращення вірусного контролю і реверсування виснаження CD8 + Т-лімфоцитів [99].

TGF- $\beta$  є другим протизапальним цитокіном, який погіршує функції Т-лімфоцитів, щодо продукції IL-2 та проліферації клітин і викликає розвиток Tregs [100; 101]. Рівні TGF- $\beta$  в сироватці крові були збільшені у пацієнтів в ранній стадії сепсису [102; 103]. Преклінічні дослідження також демонструють підвищення рівня TGF- $\beta$  під час експериментального сепсису [104; 105]. TGF- $\beta$  негативно впливав на проліферацію Т-лімфоцитів та погіршував викликану Т-клітинами імунну відповідь в легенях [106]. Ayala A. та ін. показали, що збільшення рівня TGF- $\beta$  корелювало з пригніченням функцій спленоцитів (продукція інтерлейкіна 2) в моделі CLP сепсису, а лікування моноклональними антитілами проти TGF- $\beta$  зменшувала дисфункцію спленоцитів [104]. Саме тому, **протизапальні цитокіни, такі як IL-10 та TGF- $\beta$ , можуть сприяти індукованому погіршенню функції Т-лімфоцитів при сепсисі.** Як було обговорено вище, збільшена експресія інгібуючих рецепторів на Т-лімфоцитах, збільшувала число Treg та загальну депресію цитокінів з трансформацією в протизапальний фенотип та схилила баланс на користь імуносупресії при сепсисі [3; 38].

*Продовження статті в наступному номері журналу.*