

Роль воспаления при холестазах: клинические и фундаментальные аспекты

В норме образование желчи опосредуется координированной функцией ряда мембранных транспортеров, расположенных в пределах мембран гепатоцитов, холангиоцитов и энтероцитов. Эти транспортеры работают вместе с целью обеспечения входа в клетку и выхода из нее различных молекул, составляющих желчь. Ведущую роль в образовании желчи играет постоянное движение желчных кислот (ЖК) – основного растворенного компонента желчи. Холестаз развивается вследствие нарушения как ЖК-зависимых, так и ЖК-независимых механизмов тока желчи.

Фундаментальные аспекты воспаления при холестазах

Функционирование гепатобилиарных транспортеров находится в прямой взаимосвязи с количеством и составом желчи и регулируется на различных уровнях начиная с транскрипции рибонуклеиновых кислот (РНК) в ядре до локализации микродоменов в мембране. Транскрипция в ядре регулируется множеством факторов, в частности членами суперсемейства ядерных рецепторов и другими ключевыми компонентами транскрипционного комплекса. После синтеза и трансляции РНК функционирование и правильную локализацию гепатобилиарных транспортеров обеспечивают интактные внутриклеточные транспортные пути и цитоскелет, а также сигнальные регуляторы, которые посттранскрипционно модифицируют активность, расположение и стабильность белков. Последние играют ключевую роль в гомеостазе всего организма и в поддержании здоровья самой печени путем связывания потенциально опасных и биологически активных малых молекул, поэтому неудивительно, что клетки, принимающие участие в движении желчи, изменяют экспрессию и функции своих основных молекулярных компонентов в ответ на повреждения и действие стрессоров. Эти изменения проявляются, в частности, в случае, когда печень резко снижает выработку желчи при инфекционно-воспалительных заболеваниях. Таким образом, холестаз, индуцированный воспалением, является центральным звеном сложного ответа печени на провоспалительные сигналы как часть отрицательного острофазного ответа.

Холестаз, сопровождающий воспаление, как правило, вызывается липополисахаридами (ЛПС) – эндотоксинами, которые высвобождаются из грамотрицательных бактерий, однако грамположительные бактерии и другие микроорганизмы также могут быть причиной холестаза. Циркулирующие ЛПС элиминируются преимущественно печенью, где резидентные мононуклеарные клетки (клетки Купфера) отвечают повышением выработки провоспалительных секретрируемых молекул – цитокинов. В свою очередь, локально продуцируемые цитокины активируют мембранные рецепторы гепатоцитов и холангиоцитов, преобразуя внутриклеточные сигналы, что приводит к нарушению экспрессии и функционирования транспортеров. В гепатоцитах понижающая регуляция печеночных транспортных систем, вовлеченных в захват и секрецию ЖК, а также понижающая регуляция систем I и II фаз детоксификации вызывают нарушение образования желчи и накопление ЖК и токсинов в печени и сыворотке.

Среди провоспалительных ЛПС-индуцированных цитокинов, принимающих участие в данном процессе, важнейшими являются вовлеченные в печеночный острофазный ответ – фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкин-1 бета (IL-1 β) и интерлейкин-6 (IL-6). Эти и другие секретрируемые молекулы высвобождаются ЛПС-активированными клетками Купфера и синусоидальными эндотелиальными клетками, а также гепатоцитами и холангиоцитами.

Сепсис индуцирует высвобождение и других малых молекул, в частности оксида азота (NO), продукция которого индуцируется вследствие повышения активности эндотелиальной и индуцибельной NO-синтаз в клетках Купфера и эндотелиоцитах. NO оказывает двойкий эффект на печень: низкие уровни являются гепатопротекторными (вызывают вазодилатацию, поддерживают сердечный выброс, предотвращают

апоптоз, стимулируют ток желчи), а высокие – повреждающими (в больших концентрациях NO вступает в реакцию с супероксидами с последующей продукцией радикалов и развитием повреждения; вызывает тяжелую гипотензию, коллапс сосудов и холестаз). ЛПС также индуцируют выработку простагландинов клетками Купфера; простагландин E играет защитную роль, оказывая понижающий регуляторный эффект на выработку провоспалительных цитокинов.

Воспалительную реакцию печени в ответ на ЛПС формируют не только клетки Купфера, но и другие клетки. Показано, что гепатоциты могут продуцировать цитокины и белки острой фазы воспаления. Холангиоциты вырабатывают цитокин IL-8 и хемокин MCP-1, а под действием ЛПС увеличивают секрецию IL-12 и TNF α . Ответ резидентных мононуклеарных клеток на ЛПС и другие продукты жизнедеятельности микроорганизмов, а также способность клеток-мишени распознавать эти продукты и секретрируемые белки определяют степень изменений в функции транспортеров, а следовательно – выраженность и длительность холестаза.

Внутриклеточная передача сигналов

Влияние ЛПС на экспрессию генов в печени опосредуется несколькими параллельными и пересекающимися механизмами передачи сигналов. В крови ЛПС связываются с ЛПС-связывающим белком, который формирует комплекс с CD14 и MD2 с целью прикрепления к toll-подобному рецептору-4 (TLR-4), экспрессируемому на плазматической мембране различных типов клеток печени. При этом активируются многие понижающие регуляторные механизмы, включая митогенактивируемую протеинкиназу (МАРК) и ядерный фактор каппа В (NF κ B), направленные на регуляцию активности и локализации транспортеров, а также на экспрессию их генов.

Основное действие ЛПС на клетки Купфера состоит в повышении продукции цитокинов путем активации NF κ B и AP-1 в ядре. После высвобождения этих цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-6 связываются с соответствующими рецепторами на гепатоцитах. Этот общий принцип (ЛПС → цитокины → активация рецепторов цитокинов на мембранах клеток печени → внутриклеточные каскады передачи сигналов → изменение ядерных факторов транскрипции → снижение экспрессии РНК гена транспортера) был продемонстрирован практически во всех экспериментальных исследованиях на животных, что позволяет говорить о нем как о стереотипном эссенциальном биологическом ответе на воспаление.

В гепатоцитах воспалительные сигналы (ЛПС прямо или опосредованно через эффекторные цитокины) снижают экспрессию гепатоцеллюлярных транспортеров на уровне генов и белков. Исследования на грызунах показали, что ЛПС и различные цитокины снижают экспрессию главных транспортеров ЖК – полипептида, котранспортирующего таурохолат натрия (NTCP, Slc10a1), и помпы, выводящей соли ЖК (BSEP, Abcb11), расположенных соответственно на базолатеральной и канальцевой мембранах. Снижение функции и связывающей способности ядерных рецепторов, регулирующих эти транспортеры, вероятно, играет ведущую роль в вышеописанном снижении экспрессии генов. В особенности это относится к ядерным рецепторам II класса (образующим гетероизомеры с ретиноидным X-рецептором альфа – RXR α), гепатоцитарному ядерному фактору-1 (HNF-1) и HNF-4 α . Большинство

других транспортеров, участвующих в образовании желчи, также подавляются воспалением и регулируются вышеуказанными факторами транскрипции. В регуляции этих транспортеров существуют межвидовые различия; большую часть накопленных данных предоставили исследования на грызунах, у которых изучали NTCP, BSEP и протеин 2 типа, ассоциированный с множественной лекарственной резистентностью (MRP-2, Abcc2).

Исследования с внутриперитонеальным введением TNF α , IL-1 β и IL-6 показали, что эти цитокины оказывают одинаковые эффекты на экспрессию мРНК NTCP. В то же время работы, в которых использовались антитела против IL-1 β , свидетельствуют о том, что IL-1 β является главным регулятором экспрессии NTCP *in vivo* при воспалении. В исследованиях *in vitro* культивирование человеческой клеточной линии HepG2 с TNF α и IL-1 β приводило к снижению промоторной активности NTCP. Помимо NTCP, снижение экспрессии HNF-1, PXR и CAR при воспалении вызывает понижающую регуляцию других базолатеральных транспортеров, участвующих в захвате ЖК, – транспортеров органических анионов OATP-1, 2 и 4. Снижение экспрессии NTCP и OATP-2 наблюдалось в биоптатах печени, полученных от пациентов с холестазом, индуцированным воспалением.

Воспаление оказывает эффекты на уровне не только синусоидов (снижение экспрессии и функции генов NTCP и OATP), но и канальцев, на что указывает снижение экспрессии BSEP и MRP-2 – двух главных транспортеров, отвечающих соответственно за ЖК-зависимый и ЖК-независимый ток желчи. Быстрое и глубокое снижение экспрессии генов этих мембранных транспортеров приводит к холестазу. Существует также регуляция на посттрансляционном уровне, однако ее роль в секреции желчи, по-видимому, менее значительна. Координированное снижение экспрессии канальцевых транспортеров ассоциируется с низким содержанием и нарушением функции ключевых факторов транскрипции, большинство из которых является членами суперсемейства ядерных рецепторов: HNF-4 α , FXR, RAR, PXR, CAR и RXR α . Каскады передачи воспалительных сигналов воздействуют на эти факторы путем ковалентной модификации (например, фосфорилирования) либо присоединения к транскрипционному комплексу новых факторов (например, фосфо-c-Jun, интерферонрегулирующего фактора-3 – IRF-3).

Из множества внутриклеточных механизмов передачи сигналов, активируемых ЛПС и IL-1 β , в гепатоцитах JNK-опосредованная фосфорилиция (JNK-1 или JNK-2) служит связующим звеном в посттрансляционных модификациях RXR α , что приводит к снижению ядерного RXR α . Так как последний является необходимым партнером в процессе гетеродимеризации для FXR, RAR, PXR, CAR и других ядерных рецепторов, снижение его функции при ЛПС-индуцированном холестазе приводит к быстрому и согласованному подавлению экспрессии генов печеночных транспортеров. Помимо снижения уровней белка RXR α и его связывания, передача сигналов посредством ЛПС, TNF α и IL-1 β вызывает значительное снижение уровней РНК партнеров RXR α (FXR, CAR, PXR) и может также приводить к их посттрансляционной модификации. Как и в случае NTCP, главным регулятором экспрессии MRP-2 при ЛПС-индуцированном воспалении,

Продолжение на стр. 50.

Роль воспаления при холестазах: клинические и фундаментальные аспекты

А. Костерс, С. Дж. Карпен, отделение педиатрии, Техасский детский гепатологический центр, г. Хьюстон, США

Продолжение. Начало на стр. 49.

по-видимому, также является IL-1 β , поскольку предварительное введение антител к этому цитокину позволяло сохранить экспрессию РНК MRP-2.

В экспериментальных исследованиях холестаза, вызываемый путем обструкции желчных протоков или приема пищи с высоким содержанием ЖК, приводил к индукции дополнительных синусоидальных базолатеральных транспортеров, таких как MRP-3, MRP-4 и OST α /OST β , направленной на выведение накопленного избытка ЖК. Интересно, что воспаление может подавлять этот защитный механизм, предположительно, вследствие ослабления адаптивного ответа и усугубления холестаза, причем эти эффекты могут быть видоспецифичными.

Клинические проявления и взаимосвязь между воспалением и холестазами

Существует множество клинически значимых ситуаций, при которых воспаление либо непосредственно вызывает холестатические болезни печени, либо вносит вклад в их развитие. Одни из них имеют четкую связь с воспалением (например, первичный склерозирующий холангит, аутоиммунный гепатит, сепсис), другие, вероятно, вызваны непрямыми эффектами (например, лекарственноиндуцированный гепатит, отторжение трансплантата, полное парентеральное питание — ППП, а также системные заболевания, такие как ревматоидный артрит). Кроме того, недавно проведенные исследования показали, что ЖК сами по себе могут выступать как противовоспалительные молекулы, связываясь с ядерными рецепторами, схожими с рецепторами глюкокортикоидов. Учитывая центральную роль печени в работе врожденного иммунитета — первой линии защиты против микроорганизмов и ксенобиотиков, неудивительно, что этот орган сам способен отвечать на воспаление сложной и взаимосвязанной реакцией. Часть этого ответа представляет собой участие печени в острофазном ответе, во время которого в системный кровоток секретируется множество противомикробных, антиоксидантных и протекторных соединений и белков. Следовательно, клиническое течение и прогноз у пациентов с патологией печени зависят от адекватности секреторной, местной и внутриклеточной реакции печени в ответ на воспаление и холестаза.

Холестаз, ассоциированный с сепсисом

У пациентов с различными внепеченочными инфекциями может развиваться холестаз. В 1901 г. в классической книге *The Principles and Practice of Medicine* («Начала и практика медицины») Ослер указывает, что «пневмония может приводить к желтухе, при которой обструкция пассажа желчи отсутствует, однако желтуха ассоциируется с токсическими состояниями крови, обусловленными различными ядами, действующими непосредственно в кровотоке или, реже, внутри клеток печени».

Нередко у пациентов с различными инфекционными заболеваниями, как правило, имеющими кишечное происхождение (вызванными грамотрицательными микроорганизмами), но также и при вирусных инфекциях, обнаруживаются повышенные уровни конъюгированного билирубина. У младенцев, особенно у новорожденных, первым проявлением сепсиса может быть усугубление желтухи. Желтуха, ассоциированная с сепсисом, со значительной частотой встречается и у взрослых. Например, в исследовании Moseley и соавт. (2008) ведущими причинами желтухи у пациентов, госпитализированных в одну из больниц скорой помощи юго-восточного Уэльса (Великобритания), были злокачественные новообразования, сепсис и цирроз печени.

На сегодня получено достаточно доказательств того, что «различные яды», о которых упоминал Ослер, связанные с инфекционными заболеваниями и холестазами, являются либо цитокинами (преимущественно

TNF α , IL-1 β , IL-6), либо бактериальными агонистами TLR-2 и TLR-4. Мишенями этих молекул в печени выступают прежде всего гепатоциты, но также клетки Купфера, холангиоциты, эндотелиальные и звездчатые клетки. Прямых исследований тока желчи у пациентов, которым бы вводили эндотоксины, не проводилось, однако косвенные данные свидетельствуют о связи эндотоксинов и эндотоксининдуцированных цитокинов с холестазами. При явном сепсисе, включая септический шок, гипербилирубинемия, как правило, является главным клиническим признаком, по выраженности часто не пропорциональным легкому повышению активности сывороточных трансаминаз. У пациентов, на протяжении длительного времени получавших инфузии TNF α , наблюдалась выраженная гипербилирубинемия. Кроме того, однократное введение рекомбинантного человеческого TNF α приводило к повышению уровней конъюгированного билирубина в крови, что является еще одним доказательством существования тесной взаимосвязи между цитокинами и холестазами.

Повышение конъюгированного билирубина является наиболее типичным клиническим признаком сепсиса, поскольку определение уровней билирубина всегда входит в стандартное лабораторное исследование. Однако при сепсисе также увеличиваются сывороточные уровни ЖК; это, вероятно, обусловлено повышением экспрессии транспортеров ЖК, что наблюдалось в моделях холестаза у животных. Систематическое изучение тока желчи у человека пока не проводилось.

ППП-ассоциированный холестаз

ППП-ассоциированный холестаз является одной из наиболее грозных клинических ситуаций, при которой холестаз развивается очень быстро и сопровождается высокой ранней летальностью. Недоношенные дети, которым была проведена резекция кишечника, нуждаются в ППП для роста; у таких пациентов часто развивается холестаз, быстро прогрессирующий в фиброз, цирроз и портальную гипертензию, обычно до 6 мес жизни. Выраженность холестаза и вероятность выживания таких детей зависит от количества септических эпизодов, которые, по-видимому, развиваются вследствие бактериальной транслокации через слизистую кишечника. Внутривенные питательные смеси сами по себе оказывают холестатический эффект, однако считается, что основная роль в нарушении функции печени принадлежит септическим медиаторам. В этой связи интересен клинический случай, описанный Forrest и соавт. (2002): у пациента с болезнью Крона холестаз, развившийся на фоне ППП, полностью разрешился после внутривенного введения инфликсимаба (моноклонального антитела против TNF α).

Холестаз у младенцев

Желтуха развивается у 20-30% новорожденных с сепсисом, вероятно, вследствие незрелости иммунитета и функции печени. В некоторых случаях может наблюдаться очень быстрое появление видимой желтухи, когда сепсисассоциированное повышение конъюгированного билирубина происходит на фоне предрасполагающего физиологического повышения неконъюгированного билирубина и желтухи, ассоциированной с кормлением грудным молоком. Независимо от предрасполагающего фактора холестаза в этой возрастной группе чаще развивается в ответ на сепсис. На сегодня проведено несколько исследований, направленных на оценку выраженности и продолжительности незрелости гепатобилиарной функции у младенцев. «Физиологический холестаз», как правило, наблюдается в первые месяцы жизни и ассоциируется с повышением уровней ЖК в крови и снижением пула ЖК. Таким образом, в младенческом возрасте инфекционные заболевания сильнее подавляют ток желчи, что приводит к повышенной частоте развития холестаза, ассоциированного с сепсисом.

Воспалительные заболевания печени у взрослых

В ряде исследований проводилось изучение регуляции генов транспортеров в воспалительных холестатических заболеваниях у человека, таких как первичный билиарный цирроз (ПБЦ) и первичный склерозирующий холангит (ПСХ). При холестазах, индуцированных воспалением (как правило, вследствие потребления алкоголя), подавляется экспрессия генов BSEP, NTCP и OATP-2; в то же время снижается концентрация белка MRP-2, однако уровни РНК MRP-2 не изменяются. Интересным является тот факт, что по мере прогрессирования ПБЦ развиваются различные изменения, являющиеся, по-видимому, адаптационным механизмом, помогающим печени освобождаться от избытка ЖК. На поздних стадиях ПБЦ наблюдается повышающая регуляция РНК OST α и OST β , вероятно, в результате накопления ЖК и FXR-опосредованной индукции транскрипции. Способность ЖК повышать экспрессию BSEP сохраняется даже на поздних стадиях ПБЦ. У пациентов с ПСХ имеет место снижение уровней OATP-2 и MRP-2.

Влияние холестаза на течение системных воспалительных заболеваний

Помимо роли сепсиса в патогенезе холестаза, существует еще одна интересная и недавно обнаруженная зависимость, указывающая на то, что холестаз снижает воспаление. На протяжении более 100 лет клиницисты отмечали, что симптоматика определенных хронических системных воспалительных заболеваний облегчается во время эпизодов гепатита. В 1897 г. Стилл заметил, что у пациентов с ревматоидным артритом обострение гепатита сопровождалось ремиссией суставного синдрома. В 1938 г. Хэнч сообщил результаты наблюдения 19 пациентов, у которых улучшение суставного синдрома коррелировало с инфекционными заболеваниями, ассоциированными с желтухой. Эти и другие авторы предполагали, что желчь содержит противовоспалительный компонент, возможно, ЖК, и пытались воспроизвести данный феномен путем инфузий ЖК или инфицированных сывороток. Ни в одном из подобных исследований не были получены убедительные результаты, хотя у некоторых больных происходило временное улучшение суставных симптомов. Недавно проведенные исследования с использованием культуры человеческих моноцитов продемонстрировали, что инкубация клеток с ЖК приводит к снижению экспрессии цитокинов. Уровень, до которого ЖК подавляют воспаление при заболеваниях печени у человека, еще предстоит определить.

Терапевтические вмешательства

Эффективная терапия с назначением соответствующих антибиотиков, воздействующих на причину повреждения печени при сепсисе, в большинстве случаев приводит к разрешению гепатобилиарных нарушений, в том числе холестаза. Продолжение полного парентерального питания у младенцев с ППП-ассоциированным холестазами обычно сопровождается нормализацией уровней конъюгированного билирубина и ЖК в сыворотке в течение нескольких недель. В случаях, когда холестаз был прямым следствием введения провоспалительных цитокинов, он разрешился вскоре после отмены инфузий. В то же время при хронических воспалительных заболеваниях печени (ПБЦ, ПСХ) холестаз прогрессирует, в первую очередь вследствие отсутствия эффективных методов лечения. Доказано, что при этих двух заболеваниях, как и при атрезии желчных протоков, традиционные противовоспалительные препараты (глюкокортикоиды) не эффективны. Таким образом, необходим поиск новых мишеней для терапии и создание препаратов, которые бы воздействовали на эти мишени.

Список литературы находится в редакции. *Seminars in Liver Diseases* 2010; 30 (2): 186-194

Перевел с англ. Алексей Терещенко