

УДК 616-095

DOI: 10.14427/jipai.2019.4.61

Хроническая инфекция дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом: обмен железа и его значение

А.В. Козлов

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Самара

Chronic respiratory tract infection in patients with cystic fibrosis: iron metabolism and its significance

A.V. Kozlov

Samara state medical University, Ministry of health of Russia, Samara

Аннотация

На сегодняшний день муковисцидоз является одним из самых распространенных наследственных заболеваний. В данном обзоре представлены этиологические причины и патогенез развития инфекционно-воспалительных осложнений в респираторном тракте у пациентов с муковисцидозом, а именно – инфицирование неферментирующими грамотрицательными бактериями, в первую очередь *Burkholderia cepacia* complex. Также описана роль железа как эссенциального фактора метаболизма бактерий и механизмы его приобретения микробными клетками из окружающей среды, в том числе дыхательных путей пациентов с муковисцидозом. Приведены данные о значении сидерофоров *Burkholderia cepacia* complex в процессах связывания и транспорта железа в бактериальные клетки. Результатом сложных взаимодействий бактерий и макроорганизма при муковисцидозе может стать развитие тяжелых обострений, в том числе и «цепация-синдрома», которые с учетом приведенных данных необходимо рассматривать не только как прямое повреждение бактериями тканей легкого, но и как последствия работы механизмов по приобретению необходимого им металла.

Ключевые слова

Муковисцидоз, железо, бактерии, воспаление, инфекционный процесс

Введение

Последние десятилетия в мире активно развиваются методы диагностики и лечения муковисцидоза (МВ), что ожидается приводит к увеличению продолжительности жизни пациентов и улучшению их качества жизни, сохраняя проблему одного из самых распространенных

Summary

Today, cystic fibrosis is one of the most common hereditary diseases. This review presents the etiological causes and pathogenesis of infectious and inflammatory complications in the respiratory tract in patients with cystic fibrosis, namely infection with non-fermenting gram-negative bacteria, primarily *Burkholderia cepacia* complex. The role of iron as an essential factor in bacterial metabolism and the mechanisms of its acquisition by microbial cells from the environment, including the respiratory tract of patients with cystic fibrosis, are also described. Data on the significance of *Burkholderia cepacia* complex siderophores in the processes of binding and transport of iron into bacterial cells are presented. The result of complex interactions between bacteria and macroorganism in cystic fibrosis can be the development of severe exacerbations, including "cepacia syndrome", which, taking into account the above data, should be considered not only as direct damage to lung tissues by bacteria, but also as the consequences of the mechanisms for the acquisition of the metal they need.

Keywords

Cystic fibrosis, iron, bacteria, inflammation, infectious process

генетических заболеваний актуальной и социально значимой. Муковисцидоз или кистозный фиброз значительно распространен в странах Западной Европы и Северной Америки, где частота встречаемости заболевания составляет в среднем 1 случай на 3000 новорожденных. В Российской Федерации распространенность патологии

ниже, чем в Европе и ориентировочно составляет 1:10000 новорожденных. При этом диагностика муковисцидоза включена в Национальную программу по неонатальному скринингу в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития РФ от 22.03.2006 г №185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания», что способствует активному выявлению патологии во всех субъектах страны.

Этиопатогенез муковисцидоза и его инфекционных осложнений

Муковисцидоз передается по аутосомно-рецессивному типу наследования, в этиологии заболевания лежит мутация гена Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR), ответственного за синтез одноименного белка-регулятора ионных каналов: хлорного и натриевого [1]. Белок CFTR локализуется в апикальной части мембраны эпителиальных клеток, выстилающих выводные протоки желез внешней секреции, и регулирует транспорт электролитов между этими клетками и межклеточной жидкостью. При нарушении их прохождения через клеточную мембрану увеличивается реабсорбция натрия железистыми клетками, что вызывает изменение электролитного состава и дегидратацию секрета желез внешней секреции. В результате выделяемый секрет становится чрезмерно густым и вязким. При этом наблюдаются нарушения работы поджелудочной железы, печени, репродуктивной функции у мальчиков и регулярные осложнения инфекционно-воспалительного характера в легких.

Безусловно, патогенетические особенности течения муковисцидоза – образование вязкой мокроты с нарушением работы мукоцилиарного клиренса [2] – создают благоприятные условия для колонизации дыхательных путей пациентов различной микрофлорой. Пациенты с МВ в течение всей своей жизни подвержены различным бактериальным инфекциям, большинство из которых вызваны «классическими» возбудителями (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и т.д.), а часть – условно-патогенными микроорганизмами. Однако одними из наиболее угрожающих для их жизни патогенов остаются бактерии группы *Burkholderia cepacia* complex, фитопатогены, о клиническом значении которых впервые заговорили в середине прошлого столетия. Данные микроорганизмы не представляют опасности для здоровых людей, но являются одной из основных причин смертности в группе пациентов с МВ, вследствие развития «цепация-синдрома», сопро-

вождающегося некротизирующей пневмонией, лихорадкой, сепсисом. Ситуация также усугубляется сложностью эрадикации этих микроорганизмов из дыхательных путей пациентов с МВ вследствие их высокой вирулентности, природной и приобретенной антибиотикорезистентности и патофизиологическими особенностями течения самого заболевания.

***Burkholderia cepacia* и ее значение для пациентов с муковисцидозом**

Особенностью бактерий *B.cepacia* complex является необычайно большой геном, превышающий геном других грамотрицательных бактерий в 2-4 раза и составляющий 8,056 Megabase [3] (для сравнения: геном кишечной палочки составляет 4,6 Mb). Дополнительно у некоторых штаммов *B.cepacia* complex обнаружена способность синтезировать плазмиды – замкнутые в кольцо нуклеиновые кислоты, обладающие возможностью независимой репликации. Быстрое приобретение резистентности к антибиотикам связывают с передачей плазмидной ДНК между разными штаммами *B.cepacia* complex и даже между разными родами бактерий – от *Pseudomonas spp.* Такая сложная и вариабельная совокупность генетического материала дает возможность бактериям *B.cepacia* complex выживать и размножаться в различных условиях окружающей их среды, выделяя различные факторы патогенности и вирулентности, создавая, таким образом явление «рывков» – стремительных переходов от сапрофитного существования в природных резервуарах до вспышек внутрибольничных инфекций (в первую очередь для пациентов с МВ) [4]. Таким образом, можно наблюдать быструю и радикальную адаптацию данных микроорганизмов при смене экологических ниш: впервые *B.cepacia* были выделены в 1949 году из гниющего лука и описаны как фитопатоген, а уже в 1977 году были высеяны из мокроты от пациентов с МВ. Как мы видим – на приобретение патогенного потенциала этим бактериям потребовалось менее 30 лет и на сегодняшний день они имеют ключевое значение, так как, инфицируя пациентов с МВ, могут приводить к развитию «цепация-синдрома» и летальному исходу [5].

Железо и железосвязывающие белки в мокроте как возможные маркеры инфекционных осложнений при муковисцидозе

Практически с самого рождения пациенты с МВ должны регулярно проходить микробиологи-

ческое обследование для выявления возможных патогенов и назначения корректной антибиотикотерапии. Несомненно, бактериологический посев мокроты дает возможность выделить и идентифицировать возбудителя, определить его количество и оценить чувствительность к антибактериальным препаратам, однако данный вид исследования не дает возможности оценить общее состояние пациента и тяжесть течения инфекционно-воспалительного процесса в нижних дыхательных путях. Ввиду этого некоторые зарубежные ученые стали оценивать возможность использования биохимического метода исследования мокроты и поиска возможных маркеров осложнения инфицирования. В результате были получены данные, показывающие значительное увеличение количества железа и железосвязывающих белков (ферритин, трансферрин, лактоферрин) в мокроте у пациентов с МВ, при этом большинство из них были контаминированы неферментирующими грамотрицательными бактериями (НФГОБ) – *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* complex. По сравнению с пациентами с другими нозологиями (пневмония, ХОБЛ) у пациентов с МВ уровень данных метаболитов в мокроте был выше 2-4 раза, а в некоторых случаях – в 20 раз [6, 7]. Также отмечена зависимость уровня железа и ферритина в мокроте от течения инфекционно-воспалительного процесса в респираторном тракте: повышение этих показателей во время обострения или развития «цепания-синдрома» и тенденция к их снижению после проведения терапия [8, 9]. Конечно, данный факт можно рассматривать как результат длительного воспаления, характерного для пациентов с МВ, с периодическими обострениями и осложнениями в виде кровотечений, сопровождающихся выходом гемоглобина, трансферрина и железа в ткани. Однако у большей части пациентов кровотечений не отмечалось, к тому же в мокроте были выявлены высокие уровни именно железа и ферритина – внутриклеточного белка [10,11]. Именно поэтому на передний план выходит другая возможная причина повышения этих показателей в мокроте – потребность бактерий.

Роль железа в метаболизме *V.cepacia*

Железо является одним из основных и жизненно важных микроэлементов для живых организмов и микроорганизмы здесь не исключение. Метаболизм бактерий *V.cepacia* complex неразрывно связан с железом, функционирование целого ряда важных ферментов и белков обеспечивается его наличием, а способность

железа легко менять свою валентность делает этот металл необходимым компонентом в окислительно-восстановительных реакциях живой клетки. Как пример известно, что железо является кофактором рибонуклеотидредуктаз I класса, катализирующих конверсию рибонуклеотидов, а соответственно имеющих ключевое значение в синтезе нуклеиновых кислот и делении микробной клетки. Альтернативный пример значимости железа в метаболизме бактерий – постоянная работа железосодержащих белков – цитохромов и ферредоксинов, обеспечивающих синтез энергии с участием кислорода. Другая жизненно важная для бактерий функция железа – защитная. Каталаза и супероксиддисмутаза защищают микроорганизм от активных форм кислорода и других видов окислительных стрессов, а отложение ферригемов на наружной мембране предохраняет бактериальную клетку от перекиси водорода, вырабатываемой нейтрофилами в воспаленной ткани [11, 12]. Таким образом мы видим, что для поддержания своей жизнедеятельности *V.cepacia* необходим постоянный источник железа. Однако, попадая в организм человека, в частности в респираторный тракт, микроорганизм сталкивается с дефицитом необходимого микроэлемента, так как его основная часть находится в секвестрированном с различными белками в тканях состоянии, а поверхность эпителиальных тканей является скудной на наличие свободного железа средой. Соответственно, для сохранения своей жизнеспособности микроорганизмам необходимо развивать способы и механизмы его получения, и, зачастую, эти механизмы являются дополнительными факторами патогенности, усугубляющими воспалительный процесс.

Механизмы получения железа из окружающей среды у бактерий *V.cepacia* complex

При инфицировании дыхательных путей пациентов с муковисцидозом *V.cepacia* в ряде случаев провоцируют воспаление, активируя факторы патогенности, в первую очередь липополисахариды (эндотоксин) и специфические O-антигены. Но помимо «классических» факторов патогенности бактерии комплекса *V.cepacia* зачастую продуцируют целый ряд ферментов, разрушающих клеточные структуры, что облегчает получение недоступного внутриклеточного железа для бактерии. Муцин-сульфатазы, выделяемые *V.cepacia* разрушают фактор защиты муцин на поверхности эпителиоцитов респираторного тракта, гидролизирова этот белок до углеводов

и аминокислот, используемых в метаболизме бактериальной клетки. Далее высвобождаются лецитиназы – внеклеточные ферменты из группы липаз, гидролизующие эфирные связи лецитинов (фосфотидилхолинов и серинфосфатидов) – важных компонентов фосфолипидов мембран. В результате воздействия лецитиназы С (холин-специфическая фосфолипаза С) разрушаются липиды мембран и высвобождаются жирные кислоты, в то время как активность лецитиназы А приводит к образованию α -лизокефалина, обладающего высокой гемолитической активностью [13]. Кроме этого наблюдается активный синтез протеолитических ферментов: эластаза и желатиназа (внеклеточная цинк-содержащая протеиназа) – так же воздействуют на ткани, разрушая эластин и коллаген человека I, IV и V типов [14]. Вся эта ферментативная активность способствует высвобождению основного внутриклеточного пула железа – ферритина. Структурно ферритин представляет собой крупную белковую молекулу (440 кДа), апопротеин которой является внешней оболочкой, покрывающей ядро из гидроксифосфата железа. Такое строение позволяет белку предотвращать возможное образование свободных радикалов, обеспечивая помимо депонирования железа еще и антиоксидантную функцию ферритина. В свою очередь бактерии, продуцируя сериновые протеиназы, повреждают структуру этого металлопротеина, что приводит к единовременному высвобождению большого количества атомов железа, усугубляя воспаление тканей оксидативным стрессом [15]. Далее начинают работать специальные механизмы по захвату железа из окружающей среды – сидерофоры.

Сидерофоры представляют собой высокоафинные небольшие хелатирующие молекулы, синтез которых возрастает когда бактерия попадает в железodefицитные условия. Они обычно классифицируются как сидерофоры катехолатного типа, которые связывают трехвалентное железо через гидроксильные группы, сидерофоры гидроксаматного типа, которые хелатируют трехвалентное железо через карбонильную группу с соседним азотом, и сидерофоры смешанного типа, которые имеют катехол- и гидроксаматсвязывающие фрагменты [10]. Бактерии из *V.serasia* complex способны продуцировать до четырех сидерофоров: орнибактин (основной, наиболее значимый сидерофор), цепацахелин, пиохелин и цепабактин. После захвата железа сидерофоры связываются со специфическими пептидными рецепторами на поверхности бактерии, которые, при взаимодействии с сидерофорами, меняют

свою конформацию, превращаясь в β -бочки (порины), обеспечивая тем самым поступление металла в периплазматическое пространство, который в дальнейшем и используется для нужд бактериальной клетки. В дополнение к своей роли в получении железа, сидерофоры также могут играть роль в повреждении тканей. Было показано, что железо, связанное с пиохелином, является эффективным катализатором образования гидроксильных радикалов и увеличивает повреждение эпителиальных и эндотелиальных клеток в результате воздействия супероксида и пероксида водорода [16]. Также интересен факт конкуренции за железо с помощью сидерофоров между разными видами микроорганизмов. Например, сидерофор синегнойной палочки пиовердин увеличивает экспрессию генов синтеза орнибактина *Burkholderia cenocepacia*, что стимулирует последнюю к более агрессивному поведению в борьбе за железо с сопутствующей стагнацией роста и развития *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Другой вариант межвидового взаимодействия представляет собой некое подобие паразитизма или, скорее, микробиологического «читинга» (от англ. *cheating* – мошенничество, обман) – когда патоген в погоне за получением железа использует чужие сидерофоры другого микроорганизма.

Железо и механизмы его получения – одни из ключевых звеньев патогенеза инфекционных осложнений при муковисцидозе

Исходя из вышеизложенного мы видим, что бактерии приспособились добывать столь необходимый им металл из окружающей среды, используя для этого целый ряд разнообразных механизмов, что также свидетельствует о необходимости постоянного наличия этого микроэлемента в окружающей среде, так как в случае дефицита железа патогены могут терять вою жизнеспособность. И, хотя получение железа само по себе не является фактором вирулентности, системы, используемые для получения железа в контексте взаимодействия с хозяином, в конечном итоге носят деструктивный характер: протеолитические и липолитические ферменты, гемолизины, сидерофоры, появление свободного железа, провоцирующего оксидативный стресс – все эти факторы несомненно имеют первостепенную роль в воспалении тканей респираторного тракта у пациентов с МВ. И можно предложить гипотезу о том, что длительное воспаление в дыхательных путях, периодически обостряющееся и

осложняющееся таким опасным состоянием для пациентов с МВ как «цепация-синдром» – все это последствия работы механизмов, обеспечивающих бактерии необходимым микроэлементом. Далее возникает закономерный вопрос: возможно ли использовать информацию о механизмах приобретения и использования железа неферментирующими грамотрицательными бактериями с целью эрадикации столь опасных для жизни пациентов с МВ бактерий? Зарубежными исследователями был проведен поиск биологически активных соединений, ингибирующих пиовердин. Было идентифицировано соединение флуцитозин – антимикотик, который, как оказалось, ингибирует промотор генов вирулентности синегнойной палочки, включая гены синтеза пиовердина (PvdS), и в поставленных опытах флуцитозин уменьшал патогенность *P. aeruginosa* на мышинной модели [18]. Другие авторы использовали в своих исследованиях сидеромицин способный имитировать сидерофоры, связываться со специфическими рецепторами мембраны бактериальной клетки и свободно проникать внутрь. Кроме этого, сидеромицин способен образовывать своего рода конъюгат, связываясь с другими антибактериальными препаратами и доставлять их внутрь микроорганизма. Этот механизм, известный по литературным обзорам как «тройной конь» ученые предлагают использовать с целью доставки внутрь патогена

антибиотиков в малых концентрациях, что теоретически имеет ряд преимуществ: «маскируясь» под сидерофоры, сидеромицин свободно обходит барьеры проницаемости (мембрана, клеточная стенка бактерии), не воздействует на клетки макроорганизма и снижает вероятность развития резистентности к антимикробным препаратам [19, 20, 21].

Заключение

Таким образом, приобретение железа микроорганизмами является многогранным и динамичным процессом, необходимым для колонизации и жизнедеятельности патогенных микроорганизмов, в конкурентной среде дыхательных путей пациентов с МВ. Сидерофор-опосредованное усвоение железа является важным компонентом этого процесса, причем свойственным наиболее значимым возбудителям инфекционно-воспалительных процессов в легких у пациентов с МВ – *V. cecropia* complex и *P. aeruginosa*, способных к обширному синтезу сидерофоров. Тем не менее, необходимость борьбы с устойчивыми к антибиотикам возбудителями инфекций легких привела к тому, что новые подходы к этой проблеме вновь стали уделять особое внимание, и информация о механизмах получения железа становится весьма актуальной.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Литература

- Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Биохимические и молекулярно-генетические основы патогенеза муковисцидоза. СПб.: Интермедика, 2002, 256 с.
- Rubin B.K. Mucus, phlegm, and sputum in cystic fibrosis. *Respiratory Care*. 2009; 54(6): 726-732
- Hunt T.A., Kooi C., Sokol P.A., Valvano M.A. Identification of Burkholderia cenocepacia genes required for bacterial survival in vivo. *Infection and immunity*. 2004; 72(7): 4010-4022. doi:10.1128/IAI.72.7.4010-4022.
- Baldwin A., Sokol P.A., Parkhill J., Mahenthalingam E. The Burkholderia cecropia epidemic strain marker is part of a novel genomic island encoding both virulence and metabolism-associated genes in Burkholderia cenocepacia. *Infection and immunity*. 2004; 72(3): 1537-1547. doi:10.1128/iai.72.3.1537-1547.
- Gilchrist F.J., Webb A. K., Bright-Thomas R.J., Jones A.M. Successful treatment of cepacia syndrome with a combination of intravenous cyclosporin, antibiotics and oral corticosteroids. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2012; 11(5): 458-460. doi: 10.1016/j.jcf.2012.04.002
- Tyrrell J., Whelan N., Wright C. et al. Investigation of the multifaceted iron acquisition strategies of Burkholderia cenocepacia. *BioMetals*. 2015; 28(2): 367-380.
- Hunter R.C., Asfour F., Dingemans J. et al. Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. *mBio*. 2013; 4(4). pii: e00557-13. doi:10.1128/mBio.00557-13
- Gifford A.H., Moulton L.A., Dorman D.B. et al. Iron homeostasis during cystic fibrosis pulmonary exacerbation. *Clinical and Translational Science*. 2012; 5(4):368-373.
- Stites S.W., Walters B., O'Brien-Ladner A.R. et al. Increased iron and ferritin content of sputum from patients with cystic fibrosis or chronic bronchitis. *Chest*. 1998; 114(3): 814-819.
- Tyrrell J., Callaghan M. Iron acquisition in the cystic fibrosis lung and potential for novel therapeutic strategies. *Microbiology*. 2016; 162(2):191-205. doi:10.1099/mic.0.000220
- Sanvisens N., Bañó M.C., Huang M., Puig S. Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency. *Molecular Cell*. 2011; 44(5):759-769. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.021
- Butt A.T., Thomas M.S. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of Burkholderia Species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017; 7:460. doi:10.3389/fcimb.2017.00460
- Willsey G.G., Wargo M.J. Extracellular Lipase and Protease Production from a Model Drinking Water Bacterial Community Is Functionally Robust to Absence of Individual Members. *PLoS One*. 2015; 10(11):e0143617. doi:10.1371/journal.pone.0143617
- Malešević M., Vasiljević Z., Sovtić A., et al. Virulence traits associated with Burkholderia cenocepacia ST856 epidemic strain

isolated from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2017; 6:57. doi:10.1186/s13756-017-0215-y

15. Whitby P. W., Vanwagoner T. M., Springer J. M. et al. *Burkholderia cenocepacia* utilizes ferritin as an iron source. *Journal of Medical Microbiology*. 2006; 55: 661–668. doi:10.1099/jmm.0.46199-0

16. Darling P., Chan M., Cox A.D., Sokol P.A. Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and Immunity*. 1998; 66(2):874–877.

17. Nairz M., Schroll A., Sonnweber T. et al. The struggle for iron – a metal at the host–pathogen interface. *Cellular Microbiology*. 2010; 12: 1691–1702. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x

18. Imperi F., Massai F., Facchini M., et al. Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas*

aeruginosa pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110(18):7458–7463. doi:10.1073/pnas.1222706110

19. de Carvalho C.C., Fernandes P. Siderophores as "Trojan Horses": tackling multidrug resistance?. *Frontiers in Microbiology*. 2014; 5:290. doi:10.3389/fmicb.2014.00290

20. Zeng Y, Kulkarni A, Yang Z, et al. Biosynthesis of albomycin $\delta 2$ provides a template for assembling siderophore and aminoacyl-tRNA synthetase inhibitor conjugates. *ACS Chemical Biology*. 2012; 7(9):1565–1575. doi:10.1021/cb300173x

21. Górska A., Sloderbach A., Marszałł M.P. Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the "Trojan horse" strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2014; 35(9): 442–449. doi.org/10.1016/j.tips.2014.06.007.

Сведения об авторе:

Андрей Владимирович Козлов. ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Самара.
Тел. +79050199757, e-mail: kozlov.biochemistry@yandex.ru

Поступила 6.11.2019 г.