

РОЛЬ ИНГИБИТОРА ТКАНЕВОГО ФАКТОРА, ПЛАЗМЕННОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ADAMTS-13 И ЕЕ ИНГИБИТОРА В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА ПРИ ГРИППЕ А/Н1N1

Е. В. Пруткина¹, А. В. Малярчиков², Н. Н. Цыбиков¹,
К. Г. Шаповалов², Н. В. Исакова¹

ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия Росздрава,

¹ Кафедра патологической физиологии,

² Кафедра анестезиологии и реаниматологии

Role of a Tissue Factor Pathway Inhibitor, the Plasma Proteinase ADAMTS-13, and its Inhibitor in the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome in A/H1N1 Influenza

E. V. Prutkina¹, A. V. Malyarchikov², N. N. Tsybikov¹, K. G. Shapovalov², N. V. Isakova¹

¹ Department of Pathological Physiology, Chita State Medical Academy, Russian Agency for Health Care;

² Department of Anesthesiology and Reanimatology, Chita State Medical Academy, Russian Agency for Health Care

Цель исследования — изучить роль ингибитора тканевого фактора (TFPI), металлопротеиназы ADAMTS-13 и ее ингибитора в патогенезе респираторного дистресс-синдрома при гриппе А/Н1N1. **Материал и методы.** В исследование были включены 52 больных обоего пола, в возрасте от 19 до 40 лет с различными клиническими формами гриппа А/Н1N1, у 14 из которых на фоне пневмонии развился острый респираторный дистресс-синдром I–II стадий. Методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию TFPI, ADAMTS-13 и ее ингибитора — антител класса IgG. **Результаты.** Уровень TFPI увеличивался параллельно нарастанию тяжести заболевания, самая высокая его концентрация обнаружена у пациентов с гриппозной пневмонией, осложненной ОРДС. При пневмонии средней степени тяжести обнаружена более высокая относительная активность ADAMTS-13, а у пациентов с пневмонией, осложненной ОРДС — относительная недостаточность этого фермента. **Заключение.** Одним из механизмов, запускающих развитие острого респираторного дистресс-синдрома при тяжелых формах пневмонии на фоне гриппа А/Н1N1, является относительный дефицит ADAMTS-13. Высокий уровень TFPI при пневмонии на фоне гриппозной инфекции может быть предиктором развития респираторного дистресс-синдрома. **Ключевые слова:** грипп А/Н1N1, респираторный дистресс-синдром, TFPI, ADAMTS-13.

Objective: to study the role of a tissue factor pathway inhibitor (TFPI), the metalloproteinase ADAMTS-13, and its inhibitor in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in A/H1N1 influenza. **Subjects and methods.** The study enrolled 52 patients of both sexes aged 19 to 40 years with different clinical forms of A/H1N1 influenza, of whom 14 patients developed Stages I-II ARDS in the presence of pneumonia. An enzyme immunoassay was used to estimate the concentrations of TFPI, ADAMTS-13, and its inhibitor, the antibodies of the IgG class. **Results.** The level of TFPI increased in parallel with the progression of the disease, its highest concentration was found in patients with ARDS-complicated influenza pneumonia. There was a higher relative activity of ADAMTS-13 in patients with moderate pneumonia while this enzyme was relatively deficient in those with ARDS-complicated pneumonia. **Conclusion.** Relative ADAMTS-13 deficiency is one of the triggers of ARDS in severe forms of pneumonia in the presence of A/H1N1 influenza. The high level of TFPI may predict the development of respiratory distress syndrome in pneumonia in the presence of influenza infection. **Key words:** A/H1N1 influenza, respiratory distress syndrome, tissue factor pathway inhibitor, ADAMTS-13.

Эпидемическая ситуация по заболеваемости гриппом А/Н1N1 и ОРВИ, сложившаяся в Забайкальском крае осенью 2009 года, была расценена Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека как тяжелая (третья) степень

развития пандемии [1]. За период эпидемии переболело 11,5% от совокупного населения края. Заболевания высокопатогенным гриппом протекали преимущественно в средне-тяжелой форме (66,3%), удельный вес тяжелых процессов составил 23,3%. В крае было зарегистрировано 57 летальных исходов от гриппа А/Н1N1, при этом показатель летальности составил 6,8% [2].

Во время эпидемии подавляющее большинство пациентов стационаров края составили больные пневмониями. Заболевание имело свои отличительные чер-

Адрес для корреспонденции (Correspondence to):

Пруткина Елена Владимировна
E-mail: lenar75@mail.ru

ты: большой процент тотального либо субтотального поражения легких, а также необычно частое развитие острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС).

Ключевыми звеньями развития ОРДС при пневмонии являются поражение структур аэрогема- тического барьера, повышение проницаемости сосу- дов гемомикроциркуляторного русла, развитие дис- семинированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС), некардиогенного отека легких [3–5]. Большинство медиаторов воспаления, провоспалительные цитокины способны активировать систему гемостаза путем воздействия как на тромбоциты, так и эндотелий (с продукцией тканевого фактора), запу- ская внешний путь коагуляции [4, 6, 7]. В свою оче- редь, одной из важнейших нереспираторных функций легких является их участие в регуляции системы ге- мостаза. Легочная паренхима содержит компоненты свертывающей системы крови, кроме того, легкие спо- собны аккумулировать тромбоциты и выступать в ка- честве их резервуара. При развитии ОРДС происхо- дит не только активация коагуляционного звена гемостаза, но и развивается задержка в легких пула активированных тромбоцитов с высоким адгезивно- агрегационным потенциалом, что ведет к усилению микроциркуляторных нарушений в органе [3, 8]. В свою очередь, при агрегации из кровяных пластинок высвобождаются вазоактивные вещества (серотонин, гистамин, метаболиты арахидоновой кислоты и др.), которые обладают как вазо-, так и бронхоконстри- торными эффектами [6, 8, 9]. Под их воздействием по- вышается легочное сосудистое сопротивление и дав- ление в легочной артерии, спазмируются бронхиолы, что приводит к снижению податливости легких и уве- личению шунтирования крови [8].

Известно, что инициация ДВС возможна не только при активации каскада свертывания, но также при дефиците уровня естественных антикоагулянтов и нарушениях механизмов дезагрегации тромбоцитов [4, 6, 7]. Одним из основных узлов равновесия в систе- ме гемокоагуляции при активации внешнего каскада является баланс между тканевым фактором (ТФ) и ин- гибитором пути тканевого фактора (ТФПИ). При появ- лении тромбина ТФПИ выделяется из эндотелиоцитов, при этом один из его доменов связывается с Ха факто- ром, а другой реагирует с активным центром VII фак- тора, связанным с ТФ. Образуется полностью неактив- ный тетрамолекулярный комплекс, формирующий отрицательную обратную связь в системе [7, 9].

ADAMTS-13 — металлопротеиназа, предохраняю- щая организм от неоправданной агрегации тромбоци- тов в зоне микроциркуляции. Эндотелиальные клетки секретируют в кровь не только гемостатически актив- ные молекулы фактора Виллебранда, но и его необычно большие мультимеры (ULVWF). Последние заякорива- ются на поверхности эндотелия, и к ним адгезируются тромбоциты. При действии на этот комплекс напряже- ния сдвига экспонируются места расщепления для ADAMTS-13. Образовавшиеся молекулы фактора Вил-

лебранда меньшего размера сохраняют гемостатичес- кий потенциал, но имеют меньшую адгезивно-агрегаци- онную активность. Деятельность самой ADAMTS-13 ограничивается путем синтеза аутоантител-ингибито- ров класса IgG [9].

Механизмы активации свертывающей системы крови при развитии ОРДС достаточно изучены, вклад же некоторых естественных антикоагулянтов, тромбо- цитарного звена гемостаза в патогенез этих состояний требует уточнения [3, 8].

Цель исследования — изучить роль TFPI, ADAMTS-13 и ее ингибитора в патогенезе респиратор- ного дистресс-синдрома на фоне гриппа А/Н1N1.

Материал и методы

В исследование были включены 52 больных, находивших- ся на лечении в МУЗ «Городская клиническая больница № 1» и ГУЗ «Краевая инфекционная больница» г. Читы во время эпидемии гриппа, обоего пола, в возрасте от 19 до 40 лет. Диа- гноз пандемического гриппа А/Н1N1 был верифицирован пу- тем обнаружения вируса в назофарингеальных мазках (мето- дом полимеразной цепной реакции) либо в случае нарастания в сыворотке крови титра антител к антигенам вируса (опреде- лялось реакцией непрямой гемагглютинации). Основную группу составили больные гриппом, осложненным тяжелой пневмонией, приведшей к развитию ОРДС ($n=14$). ОРДС диа- гностировали в соответствии с критериями, рекомендованны- ми Американско-Европейской Согласительной Конференцией. Оценку повреждения легких осуществляли по J. F. Murray (1988) [3, 10–13]. У 13-и из 14-и больных группы наступил лет- альный исход от нарастающей острой дыхательной недоста- точности, у всех умерших диагноз был подтвержден морфоло- гическим исследованием.

Для сравнения исследовали: 2-я группа — больные гриппом тяжелого течения без осложнений ($n=18$); 3-я — больные гриппом, осложненным внебольничной полисег- ментарной пневмонией средней степени тяжести ($n=20$). В качестве контроля использовали кровь доноров соответст- вующего возраста ($n=15$).

Всем больным проводили бактериологическое исследова- ние мокроты, а пациентам, находившимся на ИВЛ, — смывов из бронхов. У всех умерших проводилось постмортальное вы- явление возбудителя пневмонии в ткани легких. Бактериоло- гические посевы мокроты в 22% роста микрофлоры не выяви- ли; в 24% регистрировались ассоциации *Candida albicans* со *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, либо со *S.aureus*, *S.haemolyticus*, *Streptococcus pneumoniae*; в 17% — изоли- рованный рост *Streptococcus mitis*; кратно реже — рост *S.aureus* — 4%; *Streptococcus sanguis* — 3%; *Streptococcus pyogenes* — 3%; *Citrobacter freundii* — 3% и др. Микробиологическое исследова- ние смывов из бронхов показало следующие результаты: рост отсутствовал в 24% случаев, в 23,8% регистрировался *S.mitis*, в 9,5% — *Pseudomonas aeruginosa* (при посевах мокроты этот воз- будитель не выявлялся вообще), ассоциации *C.albicans* высевали- лись лишь в 4,7%, с такой же частотой были получены изоли- рованные колонии *S.aureus*, *S.epidermidis*, *Staphylococcus coagulase negative*, *Escherichia coli* и др.

В ходе посмертных микробиологических исследова- ний легких в большинстве случаев (75%) роста микрофлоры не обнаруживалось, в 12% получен рост *S.aureus*, в 7% — ассо- циации *C.albicans*, в 3,5% — изолированный рост *C.albicans*.

Объектом исследования служила плазма крови. Кровь за- бирали утром натощак, в первые 2–3 суток нахождения в ста- ционаре (в среднем на 2–5-е сутки болезни). Определение TFPI проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) наборами фирмы «American diagnostic» (Stanford,

Таблица 1

Уровень ТФРІ при различных формах гриппа А/Н1N1 [Ме (25-й; 75-й)]

Показатель	Значения показателей в группах			
	здоровые (n=15)	грипп без осложнений (n=18)	пневмония ср. ст. тяж. (n=20)	тяжелая пневмония, осложненная ОРДС I–II стадий (n=14)
ТФРІ (нг/мл)	134 (126; 142)	232 (211; 288,5) Z=3,4; p=0,000	188 (172; 188) Z=2,6; p=0,009 Z=1,7; p ₁ >0,05	252 (196; 323) Z=2,8; p=0,005 Z=2,3; p ₁ =0,024 Z=2,4; p ₂ =0,018

Примечание. Здесь и в табл. 3: Z — коэффициент Манна-Уитни; p — значение различий по сравнению со здоровыми; p₁ — значение различий между пациентами с неосложненным гриппом и с пневмонией ср. ст. тяжести; p₂ — значение различий между пациентами с пневмонией ср. ст. тяжести и с пневмонией, осложненной ОРДС; * — значимые различия.

Таблица 2

Уровень ADAMTS-13 и ее ингибитора при гриппе А/Н1N1 [Ме (25-й; 75-й)]

Показатель	Значения показателей в группах	
	здоровые (n=15)	больные гриппом (n=52)
ADAMTS-13 антиген (%)	58,6 (37,7; 42,8)	36,2 (27,7; 48,8) Z=2,1; p=0,034
ADAMTS-13 ингибитор IgG (ед/мл)	96,6 (95,7; 97,9)	91,9 (89,9; 96,1) Z=2,1; p=0,032

Примечание. Z — коэффициент Манна-Уитни; p — значение различий по сравнению со здоровыми; * — значимые различия.

Таблица 3

Уровень ADAMTS-13 и ее ингибитора с учетом клинической формы заболевания и осложнений [Ме (25-й; 75-й)]

Показатель	Значения показателей в группах			
	здоровые (n=15)	грипп без осложнений (n=18)	пневмония ср. ст. тяж. (n=20)	тяжелая пневмония, осложненная ОРДС I–II стадий (n=14)
ADAMTS-13 антиген (%)	58,6 (37,7; 42,8)	41 (37,7; 42,8) Z=1,5; p>0,05	30,4 (27,7; 47,1) Z=1,8; p>0,05 Z=0,1; p ₁ >0,05	33,9 (26,9; 37,3) Z=1,7; p>0,05 Z=1,7; p ₁ >0,05 Z=0,09; p ₂ >0,05
ADAMTS-13 ингибитор IgG (ед/мл)	96,6 (95,7; 97,9)	87,6 (85,5; 99,1) Z=0,8; p>0,05	91,7 (91,5; 91,9) Z=3,3; p=0,000 Z=0,7; p ₁ >0,05	94,15 (91,4; 96,8) Z=1,3; p>0,05 Z=1,1; p ₁ >0,05 Z=1,9; p ₂ =0,04

USA) по протоколу производителя, результаты выражали в нг/мл. Концентрацию ADAMTS-13 и ее ингибитора (антител класса IgG) проводили также методом ИФА реактивами фирмы «Technoclone GmbH» (Vienna, Austria), результаты концентрации антигена выражали в%, а ингибитора — в ед/мл.

Статистическая обработка проведена с использованием пакета программ BIOSTAT. При сравнении групп использовался критерий Манна-Уитни, различия считали значимыми при p≤0,05. Данные представлены в виде медианы (Ме) и интерквартильного (25-й и 75-й перцентили) интервала — указан в скобках.

Результаты и обсуждение

Уровень ТФРІ в плазме здоровых составил 134 нг/мл, а у всех больных гриппом он был значимо выше (табл. 1). ТФРІ у пациентов с гриппом без осложнений повышался почти в два раза и достигал 232 нг/мл, а при присоединении пневмонии средней степени тяжести он был несколько ниже — 188 нг/мл. При этом разницы в концентрации ингибитора между упомянутыми группами больных не регистрировалось (Z=1,7; p>0,05). При развитии на фоне тяжелой пневмонии ОРДС содержание ТФРІ еще нарастало и достигло 252 нг/мл, что вдвое выше концентрации ингибитора у доноров и значимо выше показателей пациентов предыдущих групп.

Такая динамика косвенно указывает на значительное увеличение экспрессии тканевого фактора и активацию внешнего пути свертывания крови при развитии респираторного дистресс-синдрома.

При изучении участия ADAMTS-13 и ее ингибиторов (антител класса IgG) в патогенезе ОРДС на фоне гриппозной пневмонии нами получены следующие результаты. При сопоставлении данных доноров и больных гриппом А/Н1N1 без учета клинической формы заболевания и осложнений обнаружено, что концентрация ADAMTS-13 у больных значимо уменьшалась, при этом содержание ингибитора фермента также падало (табл. 2).

Проведя сравнения данных с учетом клинической формы заболевания и осложнений, мы обнаружили следующее (табл. 3). При гриппе без осложнений концентрации ADAMTS-13 и ее ингибитора хотя и имели тенденцию к уменьшению, но значимо не отличались от показателей доноров. При развитии, на фоне гриппа, пневмонии средней степени тяжести количество металлопротеиназы оставалось по-прежнему на уровне здоровых, а содержание ингибирующих ее аутоантител — значимо уменьшалось. При развитии, на фоне гриппа, тяжелых форм пневмонии, осложненных ОРДС, содержание ADAMTS-13 по-прежнему оставалось на уровне

доноров и не отличалось от больных других групп. При этом, по сравнению с пневмонией средней степени тяжести, происходит увеличение концентрации антител-ингибиторов, достигая уровня доноров.

Обнаруженная динамика уровня TFPI, наблюдаемая в исследуемых группах, на наш взгляд, объяснима следующим образом.

Исследования с использованием специфических противовирусных антител и электронной микроскопии показали, что основной мишенью вируса А/Н1N1 являются пневмоциты, преимущественно II типа, и реже — макрофаги. В клетках других органов и тканей вирусные антигены не обнаруживались [14]. Как известно, именно пневмоциты II типа синтезируют сурфактант и играют наиболее важную роль в регенерации ткани легкого при повреждении. Прямое цитопатическое действие вируса гриппа А/Н1N1 на эти клетки индуцирует развитие острого респираторного дистресс-синдрома, что объясняет столь высокую его частоту во время этой эпидемии. Пневмония инициирует системный воспалительный ответ, медиаторы которого, вероятно, снижают тромборезистентные свойства эндотелия сосудов. Обязательной составляющей этой трансформации является экспрессия тканевого фактора, повышение же в этом случае TFPI, наблюдаемое нами, носит компенсаторный характер, так как поддерживает равновесие в системе гемостаза. Известно, что повышение коагуляционного потенциала *in situ* содействует развитию воспаления, а естественные антикоагулянты ограничивают не только коагуляционные, но и воспалительные реакции [6, 7], что, скорее всего, происходит при пневмонии средней степени тяжести. При развитии субтотального/тотального поражения легких прогрессирование воспаления в большей степени усиливает гемостатические реакции, сдвигая равновесие в сторону тромбообразования, и, следовательно, инициирует развитие ДВС и дистресс-синдрома.

Обнаруженные нами изменения со стороны маркеров состояния сосудисто-тромбоцитарного звена ADAMTS-13 и ее ингибитора свидетельствуют о заинтересованности этой составляющей системы гемостаза

Литература

1. Об усилении мероприятий в группах риска в период пандемического распространения гриппа. Письмо Роспотребнадзора № 01/16326-9-23 от 01.11.2009.
2. Родина Н. Н., Скрипченко Е. М., Дорожкова А. А. Клинико-эпидемиологическая характеристика гриппа А (Н1N1)/09. Итоги эпидемии гриппа А/Н1N1. Мат-лы Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Чита, 26-27 октября 2010 г. Чита: ЧГМА; 2010. 165–167.
3. Гельфанд Б. Р., Кассиль В. Л. (ред.). Острый респираторный дистресс-синдром. М.: Литтера; 2007.
4. Павлов К. А., Дубова Е. А., Мишнев О. Д., Щеголев А. И. Медиаторные взаимодействия при остром респираторном дистресс-синдроме. Общая реаниматология 2007; III (5–6): 208 — 212.
5. Голубев А. М., Мороз В. В., Мецержиков Г. Н., Лысенко Д. В. Патогенез и морфология острого повреждения легких. Общая реаниматология 2005; I (5): 5–12.
6. Кузник Б. И., Цыбиков Н. Н., Витковский Ю. А. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма. Тромбоз, гемостаз и реология 2005; 2: 3–16.
7. Мамот А. П., Шойхет Я. Н. Роль гемостатических и воспалительных реакций в формировании очагов гнойной деструкции органов и тканей. Тромбоз, гемостаз и реология 2009; 1: 23–39.

в патогенезе респираторного дистресс-синдрома при пандемическом гриппе А/Н1N1. Пропорциональное уменьшение и металлопротеиназы, и аутоантител к ней при гриппе (табл. 2) можно объяснить их «потреблением» в реакции антиген-антитело на фоне избыточного выделения больших мультимеров фактора Виллебранда из эндотелиоцитов в связи со стимуляцией последних медиаторами воспаления [9].

Падение концентрации ингибитора ADAMTS-13 на фоне неизменного содержания самой металлопротеиназы, наблюдаемое нами при присоединении пневмонии средней степени тяжести, позволяет предположить высокую относительную функциональную активность, которая, безусловно, носит защитный характер. Стимуляция эндотелиоцитов при развитии воспаления в легких приводит к выделению ULVWF фактора Виллебранда и, как следствие, повышению адгезивно-агрегационного потенциала тромбоцитов, а высокая активность металлопротеиназы компенсирует эти процессы.

При развитии на фоне тяжелой пневмонии ОРДС содержание ADAMTS-13 по-прежнему оставалось на уровне доноров, но при этом происходило увеличение концентрации антител-ингибиторов по сравнению с больными пневмонией средней степени, достигая уровня здоровых (табл. 3). Мы считаем, что эти изменения приводят к появлению относительной недостаточности ADAMTS-13, что влечет за собой повышение адгезии и агрегации тромбоцитов, инициирует сладжирование крови и вносит вклад в развитие кризиса микроциркуляции при этой форме заболевания.

Заключение

Одним из механизмов, запускающим развитие острого респираторного дистресс-синдрома при тяжелых формах пневмонии на фоне гриппа А/Н1N1, является возникновение относительного функционального дефицита плазменной протеиназы ADAMTS-13.

Сохраняющийся высокий уровень TFPI при пневмонии на фоне гриппозной инфекции может быть предиктором развития ОРДС.

8. Чурилев Ю. А., Редкокаша Л. Ю. Роль тромбоцитарно-сосудистого звена гемостаза в развитии легочных осложнений при тяжелой черепно-мозговой травме. Общая реаниматология 2006; II (4): 22–25.
9. Шитикова А. С. Тромбоцитопатии, врожденные и приобретенные. СПб.: ИИЦ ВМА; 2008.
10. Bernard G. R., Atigas A., Brigham K. L. et al. Report of the American-European consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. J. Crit. Care 1994; 9 (1): 72–81.
11. Кузовлев А. Н., Мороз В. В., Голубев А. М. и соавт. Диагностика острого респираторного дистресс-синдрома при нозокомальной пневмонии. Общая реаниматология 2009; V (6): 5–12.
12. Диагностика и интенсивная терапия острого повреждения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. Протокол ведения больных. Принят на X съезде анестезиологов и реаниматологов РФ 21 сентября 2006 г.
13. Мороз В. В., Голубев А. М. Классификация острого респираторного дистресс-синдрома. Общая реаниматология 2007; III (5–6): 7–9.
14. Shieh W. J., Blau D. M., Denison A. M. et al. 2009 Pandemic H1N1 influenza. Pathology and pathogenesis of 100 fatal cases in the United States. Am. J. Pathol. 2010; 177 (1): 166–175.

Поступила 26.11.10