

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМОКОАГУЛЯЦИОННЫХ НАРУШЕНИЙ И ИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ ИХ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В РЕГИОНЕ ЦИРКУЛЯЦИИ НЕСКОЛЬКИХ СЕРОТИПОВ ХАНТАВИРУСА

Виктория Игоревна АФАНАСЬЕВА¹, Ирина Геннадьевна МАКСЁМА²,
Виктория Александровна ИВАНИС¹, Раиса Александровна СЛОНОВА²

¹ ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздрава России
690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

² ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН
690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1

Изменения в системе гемостаза, особенно «феномен тромбоцитопении», являются характерным и в то же время малоизученным синдромом при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС). С целью изучения роли IL-17 в патогенезе гемокоагуляционных нарушений при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в динамике заболевания проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование 60 пациентов, находившихся на стационарном лечении в инфекционных стационарах Приморского края в период 2008–2012 гг. Выявлено достоверное повышение содержания сывороточного IL-17 при ГЛПС, ассоциированной с разными серотипами хантавируса, коррелирующее с уровнем тромбоцитов периферической крови. Отмечено значимое увеличение концентрации растворимых фибрин-мономерных комплексов в сыворотке крови обследованных пациентов при остальных неизмененных показателях функционирования системы гемостаза.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), интерлейкин 17, гемостаз, тромбоциты, гемокоагуляционные нарушения, иммунопатогенез.

Общепризнано, что ключевым моментом инфекционного процесса при ГЛПС является не авторитарная роль вируса, а инициация им иммунного ответа, играющего ведущее значение в активации эндотелиальных клеток, развитии сосудистых дисфункций и, как следствие, деструктивных процессов в тканях и полиорганной недостаточности. По данным ряда исследователей, ведущую роль в патогенезе ГЛПС играет клеточный иммунный ответ [4, 7]. Однако на сегодняшний день обсуждается его двойственная роль (как защитная, так и иммунопатогенная) [14].

Как известно, геморрагический синдром – один из ведущих в клинике ГЛПС, выраженность его зачастую определяет исход заболевания. Одним из нерешенных вопросов, касающихся изменений в системе гемостаза при ГЛПС, является «феномен тромбоцитопении». Раннюю

тромбоцитопению связывают в основном с имобилизацией тромбоцитов для участия в иммунном ответе в качестве эффекторных клеток (образование тромбоцитарных агрегатов, иммунных комплексов), с разрушением клеток при репликации возбудителя, секвестированием в селезенке, перераспределением циркулирующего и пристеночного пулов тромбоцитов [1, 3]. Первоначальные исследования, направленные на выяснение этиологии тромбоцитопении, касались преимущественно связи тромбоцитопении с изменениями в системе гемостаза. Как показали Л.А. Ибрагимова и соавт., у всех больных ГЛПС имеет место синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) различной степени. При этом интересным замечанием авторов стало отсутствие связи числа тромбоцитов со стадией ДВС-синдрома. Также авторы выявили

Афанасьева В.И. – аспирант кафедры инфекционных болезней, e-mail: victory_21@mail.ru
Максёма И.Г. – старший научный сотрудник лаборатории ГЛПС, e-mail: irinaluna@inbox.ru
Иванис В.А. – проф. кафедры инфекционных болезней, e-mail: ivanis2003@bk.ru
Слонова Р.А. – зав. лабораторией ГЛПС, e-mail: slonova@inbox.ru

повышение функциональной активности тромбоцитов, что, вероятно, приводит к их потреблению с развитием тромбоцитопении [3]. Помимо значения тромбоцитов в процессе коагуляции как компонента первого звена гемостаза (сосудисто-тромбоцитарного) в развитии ДВС-синдрома, данные клетки, безусловно, являются и важным компонентом иммунопатогенеза заболевания [2, 4]. По мнению В.А. Иванис и соавт., тромбоциты периферической крови следует считать потенциальной клеткой-мишенью хантавируса [2]. Тромбоциты, подобно макрофагам и другим эффекторным клеткам, обладают поверхностными F_{сe}-рецепторами, с участием которых осуществляется их антителозависимая клеточная цитотоксичность, ассоциированная с IgE [6, 8, 9].

По данным Р.Т. Мурзабаевой и соавт., тромбоцитопения у больных ГЛПС связана с образованием агрегатов из тромбоцитов и их адгезией к эндотелию микрососудов, а также связыванием тромбоцитарными рецепторами продуцируемых В-лимфоцитами IgG с последующим их лизисом [7]. Данный взгляд разделяют В. Denecke et al., предполагая, что тромбоцитопения при ГЛПС может быть основана на иммунологически опосредованном разрушении тромбоцитов, учитывая положительный эффект применения кортикостероидов при данном состоянии [10]. О. Laine et al. считают, что тромбоцитопения в процессе острой эпидемической нефропатии связана с уменьшением количества естественных антикоагулянтов (антитромбин, протеины С и S), укорочением тромбинового времени и фибринолизом [15]. Как показали последние исследования И.Н. Гавриловской и соавт., патогенные хантавирусы могут связывать тромбоциты через β3-интегрин-зависимый механизм с поверхностью эндотелиальных клеток, в то время как непатогенные для человека хантавирусы не обладают данным свойством. Исследователи также сообщают, что вирусы, обнаруженные на поверхности эндотелиальной клетки, привязывают к ней покоящиеся тромбоциты. Это фундаментально меняет внешний вид эндотелиальных клеток и является потенциалом к изменению активности тромбоцита и функции эндотелиальных клеток, вызывая повышенную сосудистую проницаемость [11, 12]. Данные авторов, вероятно, базируются на результатах недавних исследований, установивших, что β3-интегрины являются главной мишенью вируса на эндотелиальных клетках [16]. Е. Maskow et al. сообщают, что на поверхности тромбоцита содержатся аналогичные рецепторы интегринов, которые также могут служить мишенью для хантавируса [16]. Как показали исследо-

вания M.J. Raftery et al., патогенные хантавирусы инфицируют клеточные линии мегакариоцитов. После индукции дифференцировки мегакариоциты останавливают пролиферацию и переключаются с низкого уровня продукции хантавируса на высокий одновременно со снижением регуляции генов, вовлеченных в противовирусный врожденный ответ. Инфекция выражается в увеличении экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I класса на клеточной поверхности, что повышает уязвимость к цитотоксической атаке. Таким образом, хантавирус-специфический иммунный ответ против инфицированных мегакариоцитов приводит к элиминации с помощью цитотоксических Т-клеток, редуцированному мегакариопозу и снижению продукции тромбоцитов [17].

Учитывая доказанный иммуноопосредованный патогенез заболевания, вполне обоснованным является рассмотрение взаимосвязи между изменениями гемостаза и состоянием иммунных механизмов их регуляции.

Группа цитокинов, включающая разновидности IL-17, привлекла всеобщее внимание в связи с открытием особой субпопуляции Т-хелперов – Th17, участвующей в развитии некоторых повреждающих форм воспалительных реакций, в частности, при аутоиммунных процессах. Эти цитокины продуцируются Th17, Т-клетками CD8⁺, эозинофилами, нейтрофилами. Рецепторы для IL-17 экспрессируются многими клетками: эпителиальными, фибробластами, клетками иммунной системы, в частности нейтрофилами [5, 9]. Высокие концентрации IL-17 могут способствовать развитию воспаления с деструкцией тканей и аутоиммунными расстройствами [6, 8, 9, 13].

Цель исследования – изучение роли IL-17 в патогенезе гемокоагуляционных нарушений при геморрагической лихорадке с почечным синдромом в динамике заболевания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено комплексное клинико-лабораторное обследование 60 пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом, находившихся на стационарном лечении в инфекционных стационарах г. Владивостока в период 2008–2012 гг. Средний возраст группы составил 39 ± 3,6 года. Среди пациентов 79 % составили мужчины (47 человек) и 21 % – женщины (13 человек). Диагноз ГЛПС установлен на основании комплекса анамнестических, эпидемиологических данных, результатов клинического, инстру-

ментального и лабораторного видов обследования. У 100 % больных диагноз был подтвержден серологически с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител регистрацией нарастания титра специфических антител в 4 раза и более в парных сыворотках крови, взятых с интервалом 10–12 дней, а также обнаружением антител в моче этим же методом в ранние сроки болезни. Контрольную группу, по среднему возрасту сопоставимую с контингентом больных ГЛПС ($36 \pm 3,2$ года), составили 40 практически здоровых добровольцев. Половой состав контрольной группы также соответствовал группе обследованных больных (2/3 мужчин и 1/3 женщин). Все больные были разделены на 3 группы по этиологическому признаку, а именно в зависимости от серотипа/генотипа хантавируса, вызвавшего заболевания: Seoul-инфекция, Hantaan-инфекция, Amur-инфекция. В дальнейшем каждая из трех групп была разделена также на три подгруппы по степени тяжести заболевания: легкая, среднетяжелая, тяжелая.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, достоверными считались результаты при $p < 0,05$. Связь между различными признаками в исследуемой

выборке определялась с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В общей группе больных содержание сывороточного IL-17 было достоверно повышено в 4 раза ($4,14 \pm 0,54$ пг/мл при $0,94 \pm 0,09$ пг/мл в контроле, $p = 0,013$). При этом степень увеличения концентрации данного цитокина значительно различалась в зависимости от этиологии и степени тяжести заболевания (табл. 1).

Максимальный сывороточный уровень IL-17 отмечен при ГЛПС, ассоциированной с серотипом Amur ($7,14 \pm 0,13$ пг/мл при $0,94 \pm 0,09$ пг/мл в контроле, $p < 0,001$), величина показателя возрастала с повышением тяжести заболевания. Менее выраженное увеличение наблюдалось при Seoul-инфекции ($4,91 \pm 0,94$ пг/мл при $0,94 \pm 0,09$ пг/мл в контроле, $p < 0,001$). При ГЛПС, ассоциированной с хантавирусом Hantaan, концентрация IL-17 в сыворотке крови составила $3,65 \pm 0,21$ пг/мл (в контроле $0,94 \pm 0,09$ пг/мл, $p < 0,005$). При этом также отмечалось нарастание содержания IL-17 с повышением тяжести заболевания.

В динамике заболевания регистрировалось достоверное снижение содержания сывороточного IL-17 наряду с нормализацией количества тромбоцитов периферической крови (табл. 2).

Таблица 1

Содержание IL-17 (пг/мл) в сыворотке крови пациентов геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в зависимости от серотипа хантавируса и степени тяжести заболевания

Степень тяжести заболевания	Amur ($n = 15$)	Hantaan ($n = 20$)	Seoul ($n = 25$)
Легкая	$3,54 \pm 0,07^*$	$1,93 \pm 0,02^*$	$2,04 \pm 0,73^*$
Средняя	$5,41 \pm 0,46^*$	$2,49 \pm 0,05^*$	$3,06 \pm 0,95^*$
Тяжелая	$12,46 \pm 0,18^*$	$6,54 \pm 0,32^*$	$9,64 \pm 0,14^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2 * – отличие от величины соответствующего показателя в контрольной группе статистически значимо при $p < 0,05$.

Таблица 2

Содержание сывороточного IL-17 и количества тромбоцитов у пациентов с геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в динамике заболевания

Показатель	Фаза заболевания	
	Ранняя (5–7 день болезни)	Поздняя (15–19 день болезни)
Содержание IL-17, пг/мл	$5,24 \pm 0,43^*$	$2,83 \pm 0,64^{* \#}$
Содержание тромбоцитов, $10^9/\text{л}$	$122,54 \pm 3,51^*$	$243,85 \pm 6,17^{* \#}$

Примечание. # – отличие от величины соответствующего показателя в раннюю фазу заболевания статистически значимо при $p < 0,05$.

Учитывая возможность аутоиммунного генеза тромбоцитопении при ГЛПС, признаваемой рядом авторов, был проведен корреляционный анализ между сывороточным уровнем IL-17 и количеством тромбоцитов периферической крови. Выявлена сильная обратная корреляционная связь между указанными показателями ($r = -0,805$, $p < 0,001$), что свидетельствует в пользу роли аутоиммунных механизмов в развитии тромбоцитопении при данном заболевании.

В большинстве исследований, в том числе касающихся изменений гемостаза при ГЛПС, тромбоцитопения рассматривается в рамках ДВС-синдрома. Для проверки данной гипотезы мы сравнили показатели гемостазиограммы и корреляционные связи между ними с количеством тромбоцитов периферической крови, а также сыворотным уровнем IL-17 у обследованных больных. Параметры гемостазиограммы оценивались в ранние сроки заболевания (5–6 день от начала заболевания, что соответствовало 1–2 суткам пребывания пациента в стационаре).

Основным показателем, характеризующим внешний путь свертывания крови, как известно, является ПВ (протромбиновое время). Среднее значение ПВ у обследованных больных не изменено (табл. 3). При этом корреляции между величиной ПВ и содержанием IL-17 ($r = -0,143$; $p = 0,67$), а также количеством тромбоцитов периферической крови ($r = 0,21$; $p = 0,53$) не выявлено.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) относится к основным маркерам нарушений внутреннего пути свертывания крови и одним из первых подвергается фазовым

изменениям при развитии синдрома ДВС. Среднее значение АЧТВ у обследованных пациентов находилось в пределах нормы (см. табл. 3). Корреляции между уровнями АЧТВ и IL-17 ($r = 0,406$; $p = 0,19$), АЧТВ и количеством тромбоцитов ($r = -0,309$; $p = 0,37$) также не выявлено.

Выявленное время агрегации с универсальным индуктором (УИА) (см. табл. 3) свидетельствует о сохраненной агрегационной функции тромбоцитов при ГЛПС, даже при тромбоцитопении. В пользу отсутствия связи между количеством тромбоцитов и их функциональной активностью при ГЛПС свидетельствует также значение коэффициента корреляции между количеством тромбоцитов периферической крови и временем агрегации с УИА ($r = -0,408$; $p = 0,21$).

Концентрация РФМК (растворимых фибриномономерных комплексов) у обследованных пациентов была значительно повышена (см. табл. 3). При этом корреляции между количеством тромбоцитов периферической крови и концентрацией РФМК ($r = 0,23$; $p = 0,59$), а также между содержанием сывороточного IL-17 и РФМК ($r = 0,12$; $p = 0,76$) не выявлено. Как известно, РФМК являются маркером тромбинемии при внутрисосудистом свертывании крови. Таким образом, данный результат свидетельствует об активации свертывания крови при ГЛПС в ранние сроки заболевания независимо от этиологической характеристики и степени тяжести инфекции.

Величины остальных показателей гемостазиограммы у обследованных пациентов оставались в пределах нормальных значений и также не коррелировали с количеством тромбоцитов периферической крови и содержанием сывороточного IL-17 (см. табл. 3).

Таблица 3

Основные показатели гемостаза у обследованных пациентов в раннюю стадию ГЛПС

Показатель	Ранняя стадия ГЛПС ($n = 60$)	Норма
Протромбиновый индекс, %	$90,8 \pm 0,84$	85–105
ПВ, с	$16,09 \pm 1,24$	12–17
Содержание фибриногена, г/л	$3,79 \pm 0,63$	2–4
АЧТВ, с	$39,09 \pm 1,5$	35–42
Содержание РФМК, мг/100 мл	$14,62 \pm 0,15$	До 4
ХП-а-зависимый лизис, мин	$8,13 \pm 0,20$	4–10
Спонтанный лизис, мин	$215 \pm 2,1$	180–240
Этаноловый тест	Отрицательный	Отрицательный
Активность фибриназы, %	$71,13 \pm 1,2$	50–100
Количество тромбоцитов, 10^9 /л	$122 \pm 3,27$	180–400
Время агрегации с УИА, с	$17,5 \pm 1,32$	14–18

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выявлен ряд ранних маркеров гемокоагуляционных сдвигов у больных ГЛПС, которые лежат в основе геморрагического синдрома. Установлено достоверное повышение уровня IL-17 в зависимости от серотипа хантавируса и тяжести заболевания, коррелирующее с количеством тромбоцитов периферической крови. Также у обследованных пациентов зарегистрировано достоверное повышение концентрации РФМК при неизмененных остальных показателях функции системы гемостаза. Данные критерии могут служить ранними маркерами нарушений системы гемостаза и разветвления ДВС-синдрома у больных ГЛПС, что способствует своевременному распознаванию угрозы развития жизнеугрожающих состояний и проведению неотложной терапии у больных ГЛПС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабушкина Ф.А. Особенности гемостаза при геморрагической лихорадке с почечным синдромом // Казанский мед. журн. 2003. 83. (3). 194–197.
2. Слонова Р.А., Ткаченко Е.А., Иванис В.А. и др. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Владивосток, 2006. 246 с.
3. Ибрагимова Л.А. Сравнительная оценка показателей центральной гемодинамики и взаимосвязь гемодинамических изменений с вегетативной регуляцией у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Мед. вестн. Башкортостана. 2008. 3. (2). 50–54.
4. Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника и иммунокорректирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в регионе циркуляции различных серотипов хантавируса: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Владивосток, 2004.
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб., 2008. 552 с.
6. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Ройтм А. Иммунология. М., 2007. 568 с.
7. Мурзабаева Р.Т. Состояние иммунной и интерфероновой систем у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Эпидемиол. инфекц. болезни. 2003. (5). 40–43.
8. Черешнев А.В., Юшков Б.Г., Климин В.Г., Лебедева Е.В. Иммунофизиология. Екатеринбург, 2002. 257 с.
9. Ярилин А.А. Иммунология. М., 2010. 752 с.
10. Denecke B., Bigalke B., Haap M. Hantaviruses infection: a neglected diagnosis in thrombocytopenia and fever? // Mayo Clin. Proc. 2010. 11. 1016–1020.
11. Gavrilovskaya I., Gorbunova E., Mackow E. Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells // Abstr. VIII Int. Conf. of HFRS, HPS and hantaviruses: Athens, 2010. 172.
12. Gavrilovskaya I.N., Gorbunova E.E., Mackow E.R. Pathogenic hantaviruses direct the adherence of quiescent platelets to infected endothelial cells // J. Virol. 2010. 84. (9). 4832–4839.
13. Kimura A., Kishimoto T. Th17 cells in inflammation // Int. Immunopharmacol. 2011. 11. (3). 319–322.
14. Krüger D.H., Schönrich G., Klempa B. Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection // Hum. Vaccin. 2011. 7. (6). 685–693.
15. Laine O., Joutsen-Korhonen L., Mäkelä S. et al. Thrombocytopenia during acute nephropathia epidemica associates with thrombin generation and fibrinolysis // Abstr. VIII Int. Conf. of HFRS, HPS and hantaviruses: Athens, 2010. 151.
16. Mackow E., Gavrilovskaya I. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2001. 256. 91–115.
17. Raftery M.J., Lutteke N., Lalwani P. Switch to high-level Hantaan virus replication in megakaryocytic cells after stimulation of differentiation through the Ras/MAPK pathway // Abstr. VIII Int. Conf. of HFRS, HPS and hantaviruses: Athens, 2010. 68.

THE ASSESSMENT OF HEMOCOAGULATION DISORDERS AND IMMUNE MECHANISMS OF THEIR REGULATION AT HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME IN REGION OF CIRCULATION OF SEVERAL SEROTYPES OF HANTAVIRUSES

**Viktoriya Igorevna AFANAS'EVA¹, Irina Gennad'evna MAKSEMA²,
Viktoriya Aleksandrovna IVANIS¹, Raisa Aleksandrovna SLONOVA²**

¹ *Vladivostok State Medical University of Minzdrav of Russia
690002, Vladivostok, Ostryakov av., 2*

² *FSBI «RI for Epidemiology and Microbiology named after G.P. Somov» of SB RAMS
690087, Vladivostok, Selskaya str., 1*

Hemorrhagic disorders, especially the «phenomenon of thrombocytopenia», are typical and, at the same time, unknown syndrome in hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). The aim: to study the role of IL-17 in the pathogenesis of hemocoagulation disorders in hemorrhagic fever with renal syndrome in the course of the disease. Materials and methods: a comprehensive clinical and laboratory examination of 60 patients with hemorrhagic fever with renal syndrome, taking place in infectious hospitals of Vladivostok in 2008–2012 has been done. Results: a significant increase IL-17 in serum of patients with HFRS, associated with different serotypes of hantavirus, which correlates with the level of platelets in peripheral blood are revealed. Also the significant increase in the concentration of soluble fibrin-monomer complexes in the patients serum with the other unchanged rates of the haemostatic system.

Key words: hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS), interleukin 17, hemostasis, thrombocytes, hemocoagulation disorders, immunopathogenesis.

Afanas'yeva V.I. – postgraduate student of the chair of infectious diseases, e-mail: victory_21@mail.ru

Maksema I.G. – senior researcher of the laboratory of HFRS, e-mail: irinaluna@inbox.ru

Ivanis V.A. – professor of the chair of infectious diseases, e-mail: ivanis2003@bk.ru

Slonova R.A. – head of the laboratory of HFRS, e-mail: slonova@inbox.ru