

**ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НЕКОТОРЫХ АНТИКОАГУЛЯНТОВ ПРИ РАЗВИТИИ
ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ НА ФОНЕ ГРИППА А/Н1Н1**

Елена Владимировна Пруткина, Андрей Викторович Малярчиков, Намжил Нанзатович Цыбилов,
Константин Геннадьевич Шаповалов, Наталья Викторовна Исакова
(Читинская государственная медицинская академия, ректор – д.м.н., проф. А.В. Говорин, кафедра
патологической физиологии, зав. – д.м.н., проф. Н.Н. Цыбилов, кафедра анестезиологии и реаниматологии,
зав. – д.м.н. К.Г. Шаповалов)

Резюме. В исследование включены 68 больных с различными клиническими формами гриппа А/Н1Н1, у 30 из которых был установлен диагноз острого повреждения легких либо острого респираторного дистресс-синдрома (ОПЛ/ОРДС). Методом иммуноферментного анализа у них определялись концентрации TFPI, ADAMTS-13 и ее антител-ингибиторов класса IgG. Было показано, что уровень TFPI увеличивался параллельно нарастанию тяжести заболевания, самая высокая его концентрация обнаружена у больных с ОПЛ, находившихся на ИВЛ. При пневмонии средней степени тяжести обнаружена более высокая относительная активность ADAMTS-13, а у больных с пневмонией, осложненной ОПЛ/ОРДС, – относительная недостаточность этого фермента.

Ключевые слова: острое повреждение легких, TFPI, ADAMTS-13, грипп А/Н1Н1.

**CHANGE IN CONCENTRATION OF SOME ANTICOAGULANTS IN ACUTE LUNG DAMAGE
ASSOCIATED WITH FLU A/H1N1 IN ZABAIKAL REGION**

E. V. Prutkina, A. V. Malyarchikov, N. N. Tsybikov, K. G. Shopovalov, N. V. Isakova
(Chita State Medical Academy)

Summary. In our investigation from 68 patients suffering from different clinical forms of the flu A/H1N1, 30 ones had acute lung damage or acute respiratory distress syndrome. TFPI, ADAMTS-13 and its antibodies-inhibitors IgG concentrations were determined by immunoenzymatic method. The TFPI level was increasing simultaneously with the increase of severity of the disease. The highest concentration was found in patients with acute lung damage being exposed to artificial lung ventilation. In case of moderate form of pneumonia higher relative ADAMTS-13 activity was revealed, while in patients with pneumonia complicated by acute lung damage or acute respiratory distress syndrome relative lack of this enzyme was noted.

Key words: acute lung damage, TFPI, ADAMTS-13, flu A/H1N1.

Острое повреждение легких (ОПЛ) и его наиболее тяжелая форма – острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) являются частым компонентом полиорганной недостаточности у больных в критических состояниях. Последние исследования по распространенности ОПЛ/ОРДС обнаружили рост его частоты с 1,5 до 75 случаев на 100 000 населения в год, причем в 40-60% случаев он приводил к летальному исходу [1,2,6]. Прошедшая эпидемия гриппа А/Н1Н1 внесла свои коррективы в эту статистику в сторону увеличения указанных показателей.

Эпидемическая ситуация по заболеваемости гриппом А/Н1Н1 и ОРВИ, сложившаяся в Забайкальском крае осенью 2009 года, была расценена Роспотребнадзором как тяжелая (третья) степень развития пандемии [5]. За период эпидемии переболело 11,5% от совокупного населения края. Заболевания гриппом протекали преимущественно в средне-тяжелой форме (66,3%), удельный вес тяжелых форм составил 23,3%. В крае было зарегистрировано 57 летальных исходов от гриппа А/Н1Н1 (показатель летальности составил 6,8%) [7], непосредственной причиной смерти больных было развитие на фоне субтотальной/тотальной пневмонии ОПЛ/ОРДС.

Ключевым звеном развития ОРДС является аккумуляция нейтрофилов в капиллярах и ткани легких, ведущая к их повреждению, а также развитие синдрома системной воспалительной реакции и диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС) [2,6]. Большинство медиаторов воспаления способно активировать систему гемостаза путем воздействия как на эндотелий (с продукцией тканевого фактора), так и тромбоциты, запуская внешний путь коагуляции. Известно, что инициация ДВС возможна не только при активации каскада свертывания, но также при дефиците уровня естественных антикоагулянтов и нарушениях механизмов дезагрегации тромбоцитов [3,4,10].

Одним из основных узлов равновесия в системе гемокоагуляции при активации внешнего каскада является баланс между тканевым фактором (ТФ) и ингиби-

тором пути тканевого фактора (TFPI). При появлении тромбина TFPI выделяется из эндотелиоцитов, при этом один из его доменов связывается с Ха фактором, а другой реагирует с активным центром VII фактора, связанным с ТФ. Образуется полностью неактивный тетрамолекулярный комплекс, формирующий отрицательную обратную связь в системе [4,9].

ADAMTS-13 – металлопротеиназа, предохраняющая организм от неоправданной агрегации тромбоцитов в зоне микроциркуляции. Эндотелиальные клетки секретируют в кровь не только гемостатически активные молекулы фактора Виллебранда, но и его необычно большие мультимеры (ULVWF). Они заякориваются на поверхности эндотелия, и к ним адгезируются тромбоциты. При действии на этот комплекс напряжения сдвига экспонируются места расщепления для ADAMTS-13. Образовавшиеся молекулы фактора Виллебранда меньшего размера сохраняют гемостатический потенциал, но имеют меньшую адгезивно-агрегационную активность. Деятельность самой ADAMTS-13 ограничивается путем синтеза аутоантител-ингибиторов класса IgG [9].

Механизмы активации свертывающей системы крови при развитии ОПЛ/ОРДС достаточно изучены, вклад же некоторых естественных антикоагулянтов, регуляторов тромбоцитарного звена гемостаза в патогенез этих состояний требует уточнения [6].

Цель работы: изучить роль TFPI, ADAMTS-13 и ее ингибитора в патогенезе острого повреждения легких на фоне гриппа А/Н1Н1.

Материалы и методы

В исследование были включены 68 больных, находившихся 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. Диагноз пандемического гриппа А/Н1Н1 был верифицирован путем обнаружения вируса в назофарингиальных мазках (методом полимеразной

цепной реакции) либо в случае нарастания в сыворотке крови титра антител к антигенам вируса (определялось реакцией непрямой геммагглютинации). Больные были разделены на группы: 1-я – больные гриппом, осложненным субтотальной либо тотальной пневмонией с признаками ОПЛ/ОРДС, нуждающиеся в вентиляционной поддержке (n=30). Диагноз ОПЛ/ОРДС выставлялся с использованием действующих критериев [2,6]. Эта группа была разделена на две подгруппы: больные со спонтанным дыханием, получающие неинвазивную респираторную поддержку (кислород через маску) (n=16), и больные, находившиеся на инвазивной вентиляции легких (ИВЛ) (n=14). У 13 из 14 больных, находившихся на ИВЛ, наступил летальный исход от нарастающей острой дыхательной недостаточности. Для сопоставления исследовались: 2-я группа – больные гриппом тяжелого течения без осложнений (n=18); 3-я – больные гриппом, осложненным внебольничной полисегментарной пневмонией средней степени тяжести (n=20). В качестве контроля использовалась кровь доноров соответствующего возраста (n=15).

Объектом исследования служила плазма крови. Кровь у пациентов забиралась с их согласия, утром натощак, в первые 2-3 суток нахождения в стационаре (в среднем на 2-5 сутки болезни). Определение ТФРІ проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) наборами фирмы «American Diagnostica, inc.» (Stanford, 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 $p \leq 0,05$. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного (25-й и 75-й перцентили) интервала – указаны в скобках. Критический уровень значимости при проверке гипотез $p = 0,05$.

Результаты и обсуждение

Уровень ТФРІ в плазме здоровых составил 134 нг/мл, а у всех больных гриппом он был значимо выше. ТФРІ у больных с гриппом без осложнений повышался почти в два раза и достигал 232 нг/мл, а при развитии 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 тяжелой пневмонии с дыхательной недостаточностью, требующей респираторной поддержки, содержание ТФРІ еще более нарастало и достигло 252 нг/мл, что вдвое выше концентрации ингибитора у доноров и значимо выше показателей больных предыдущих групп (табл. 1).

Такая динамика косвенно указывает на значительное увеличение экспрессии тканевого фактора и активации внешнего пути свертывания крови при развитии тяжелых форм пневмонии.

Учитывая, что концентрации ТФРІ в плазме крови больных с неосложненным гриппом и больных пневмониями средней степени тяжести не отличались, при дальнейшем анализе они были объединены. При детальном изучении уровня ТФРІ у больных с респираторной поддержкой обнаружено, что наибольшая его концентрация регистрировалась у больных, находящихся на ИВЛ, как при сравнении с контролем, так и сопоставлении с больными без респираторной поддержки, равно как и страдающими тяжелыми пневмониями, получающими респираторную поддержку, но имеющими спонтанное дыхание. При этом уровень ТФРІ у больных,

Таблица 2
Уровень ТФРІ при различных формах гриппа А/Н1N1 с учетом вида респираторной поддержки (Me (25-й; 75-й))

	Здоровые (n=15)	Больные без респираторной поддержки (n=38)	Пневмония тяж. ст. тяж. с респираторной поддержкой	
			на спонтанном дыхании (n=16)	на ИВЛ (n=14)
ТФРІ (нг/мл)	134 (126; 142)	188 (172; 224) $Z = 3,4$; $p = 0,000^*$	132 (96; 206) $p \leq 0,05$ $Z = 1,4$; $p > 0,05$	262 (235; 324) $Z = 3,5$; $p = 0,000^*$ $Z = 2,9$; $p_1 = 0,004^*$ $Z = 1,9$; $p_2 = 0,05^*$

Примечание: Z – коэффициент Манна-Уитни, p – значение различий по сравнению со здоровыми, p_1 – значение различий по сравнению с больными без респираторной поддержки, p_2 – значение различий между группами больных с респираторной поддержкой, * – значимые различия.

не нуждающихся в респираторной поддержке, и больных, получающих кислород через маску, не различался (табл. 2).

Обнаруженная динамика ТФРІ, на наш взгляд, объясняется следующим. 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 [11]. 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 ОПЛ, что объясняет столь частое его развитие во время прошедшей 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 ТФРІ, наблюдаемое нами, носит компенсаторный характер, так как поддерживает равновесие в системе гемокоагуляции. Известно, что повышение коагуляционного потенциала *in situ* содействует развитию воспаления, а естественные антикоагулянты ограничивают не только коагуляционные, но и воспалительные реакции [3,4,10], 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 ДВС.

Обнаруженные нами изменения со стороны маркеров состояния сосудисто-тромбоцитарного звена: ADAMTS-13 и ее ингибитора, свидетельствуют о заинтересованности этой составляющей системы гемостаза в патогенезе ОПЛ при

Таблица 1
Уровень ТФРІ при различных формах гриппа А/Н1N1 (Me (25-й; 75-й))

	Здоровые (n=15)	Грипп без осложнений (n=18)	Пневмония ср. ст. тяж. (n=20)	Тяжелая пневмония с респираторной поддержкой (n=30)
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: Z – коэффициент Манна-Уитни, p – значение различий по сравнению со здоровыми, p_1 – значение различий между больными с гриппом без осложнений и пневмонией ср. ст. тяжести, p_2 – значение различий между больными с пневмонией ср. ст. тяжести и тяжелыми пневмониями, * – значимые различия.

Таблица 3

Уровень ADAMTS-13 и ее ингибитора при гриппе A/H1N1 (Ме (25-й; 75-й))

	Здоровые (n=15)	Больные гриппом (n=68)
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.

пандемическом гриппе A/H1N1. При сопоставлении данных доноров и больных гриппом A/H1N1 без учета клинической формы заболевания обнаружено, что концентрация ADAMTS-13 у больных значимо уменьшалась, при этом содержание ингибитора фермента также падало (табл. 3).

Таблица 4

Уровень ADAMTS-13 и ее ингибитора с учетом клинической формы гриппа (Ме (25-й; 75-й))

	Здоровые (n=15)	Грипп без осложнений (n=18)	Пневмония средней степени тяжести (n=20)	Тяжелая пневмония с респираторной поддержкой (n=30)
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*

Примечание: Z – коэффициент Манна-Уитни, p – значение различий по сравнению со здоровыми, p₁ – значение различий между больными с гриппом без осложнений и пневмонией ср. ст. тяжести, p₂ – значение различий между больными с пневмониями с различной степенью тяжести, * – значимые различия.

Такое пропорциональное уменьшение и металлопротеиназы, и аутоантител к ней при гриппе можно объяснить их «потреблением» реакцией антиген-антитело на фоне избыточного выделения больших мультимеров фактора Виллебранда из эндотелиоцитов в связи со стимуляцией последних медиаторами воспаления.

Проведя сравнения данных с учетом клинической формы заболевания, мы обнаружили следующее. При гриппе без осложнений концентрации ADAMTS-13 и ее ингибитора хотя и имели тенденции 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, что позволяет предположить ее более 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 гриппа тяжелых форм пневмонии, осложненных дыхательной недостаточностью, требующей респираторной поддержки, 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 (с компенсированной дыхательной недостаточностью) происходит увеличение концентрации антител ингибиторов, достигая уровня доноров (табл. 4).

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.

Таким образом, одним из механизмов, запускающих развитие СОПЛ/ОРДС при тяжелых формах пневмонии на фоне гриппа A/H1N1, является возникновение относительного функционального дефицита плазменной протеиназы ADAMTS-13. Сохраняющийся высокий уровень TFPI при пневмонии на фоне гриппозной инфекции может быть предиктором развития ОПЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев Е.В., Чурляев Ю.А., Разумов А.С. Перспективы диагностики острого повреждения легких // Интенсивная терапия. – 2007. – №1. – С.34-43.
2. 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.
3. Кузник Б.И., Цыбиков Н.Н., Витковский Ю.А. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2005. – №2. – С.3-16.
4. Мамот А.П., Шойхет Я.Н. Роль гемостатических и воспалительных реакций в формировании очагов гнойной деструкции органов и тканей // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2009. – Т. 37. №1. – С.23-39.
5. Об усилении мероприятий в группах риска в период пандемического распространения гриппа // Письмо Роспотребнадзора №01/16326-9-23 от 01.11.2009.
6. Острый респираторный дистресс-синдром:

Практическое руководство / под ред. Б. Р. Гельфанда, В. Л. Кассиля. – М.: Литтера, 2007. – 232 с.

7. Родина Н.Н., Скрипченко Е.М., Дорожкова А.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика гриппа А (H1N1)/09 // Итоги эпидемии гриппа A/H1N1: Материалы Всерос. науч.-практ. конф. с межд. участ., Чита, 26-27 окт. 2010 г. – Чита: ЧГМА, 2010. – С.165-167.

8. Суханов В.А. Воспалительно-коагуляционный ответ как часть синдрома системной воспалительной реакции (SIRS) // Интенсивная терапия. – 2006. – №1. – С.27-32.

9. Шитикова А.С. Тромбоцитопатии, врожденные и приобретенные. – СПб: ИИЦ ВМА, 2008. – 320 с.

10. Шойхет Я.Н., Заремба С.В., Роцев И.П. Пневмония и пневмогенный сепсис – новый взгляд на старую проблему // Проблемы клинической медицины. – 2005. – №1. – С.120-126.

11. Shieh Wun-Ju, Blau M.D., Denison A.M., et al. 2009 Pandemic H1N1 Influenza. Pathology and Pathogenesis of 100 Fatal Cases in the United States // American Journal of Pathology. – 2010. – Vol. 177. – P.166-175.

Информация об авторах: 672090, г. Чита, ул. Горького, 39-А, ЧГМА, каф. патологической физиологии, тел. раб.

(3022) 32-18-59, факс (3022) 32-30-58, e-mail: lenar75@mail.ru, Пруткина Елена Владимировна – ассистент, к.м.н.;

Малярчиков Андрей Викторович – ординатор; Цыбиков Намжил Нанзатович – заведующий кафедрой, профессор, д.м.н.; Шаповалов Константин Геннадьевич – заведующий кафедрой, профессор, д.м.н.; Исакова Наталья Викторовна – ассистент, к.м.н.