

А. А. Байгильдина (к. мед.н., доц.)

Регуляторные факторы фибринолиза при вирус-ассоциированном повреждении эндотелия

Башкирский государственный медицинский университет,
кафедра биологической химии

450000, г. Уфа, ул. Ленина, 3; тел. (347) 2724173, факс (347) 2723751, e-mail: baigildinaasia@mail.ru

A. A. Baygildina

Fibrinolysis regulatory factors at virus-associated endothelium damage

Bashkir State Medical University

3, Lenina Str., 450000, Ufa, Russia; ph. (347) 2724173, fax (347) 2723751, e-mail: baigildinaasia@mail.ru

Изучен уровень тканевого активатора плазминогена (ТАП) и ингибитора активаторов плазминогена 1 типа (ИАП-1) в плазме крови больных при геморрагической лихорадке с почечным синдромом (ГЛПС) и оценена их роль в патогенезе заболевания. Уровень ТАП и ИАП-1 в период лихорадки среднетяжелой и тяжелой неосложненной форм ГЛПС статистически значимо выше контроля, в остальные периоды — ниже контроля; при тяжелой осложненной форме содержание ТАП ниже контроля, ИАП-1 преимущественно на уровне контроля. Корреляция между ними преимущественно отрицательная средней силы. Сделан вывод о возможной связи снижения их синтеза с процессами купирования геморрагий при среднетяжелой и тяжелой неосложненной формах ГЛПС и развитием ДВС-синдрома при тяжелой форме с осложнениями.

Ключевые слова: вирус-ассоциированное повреждение эндотелия; ингибитор активаторов плазминогена 1 типа; тк.

The aim of study was to research the levels of both tissue plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in blood of patients suffered from hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) of different severity for establishing their importance in HFRS pathogenesis. The tPA and PAI-1 blood levels in fever period of moderate and severe uncomplicated types were statistically significant higher than control, in another periods — lower than control; in severe complicated type the tPA level was lower than control, PAI-1 — was normal. There was predominantly moderate negative correlation between them. It was concluded about possible connection of tPA and PAI-1 low synthesis with haemorrhage stopping at moderate and severe uncomplicated types and DIC-syndrome development at severe complicated HFRS type.

Key words: virus-associated endothelium damage; plasminogen activator inhibitor type 1; tissue plasminogen activator.

В настоящее время является доказанным, что главной мишенью для действия возбудителей всех вирусных геморрагических лихорадок, в том числе и геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемой хантавирусом серотипа *Puumala*, является эндотелий^{1,2}, причем особенностью их действия является полное отсутствие цитопатического эффекта в отношении инфицированных эндотелиоцитов^{3,4}. Вирус-ассоциированные активация и повреждение внутренней выстилки сосудов влекут за собой изменение спектра выделяемых ею соединений, что результируется, в частности, в ослаблении ее антикоагулянтной активности и усилении прокоагулянтных

свойств с параллельной активацией системы фибринолиза⁵. Клиническими проявлениями подобных сдвигов в системе гемостаза при вирусных геморрагических лихорадках являются петехии, экхимозы, кровоизлияния в слизистые оболочки и в гипофиз, желудочно-кишечные кровотечения и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром), наиболее выраженные при тяжелой форме болезни^{6,7}. Эндотелий вовлекается в регуляцию фибринолиза путем продукции тканевого активатора плазминогена (ТАП) и ингибитора активаторов плазминогена 1 типа (ИАП-1). ТАП — это сериновая протеиназа (КФ 3.4.21.68), синтезируемая и секретируемая эндотелиоцитами в виде одноцепочечного

Дата поступления 26.04.12

зимогена и активируемая путем частичного протеолиза под действием плазмина, калликреина и активированного фактора X с формированием двухцепочечной структуры⁸. Функцией ТАП является превращение плазминогена в плазмин в присутствии фибрина при посредничестве аннексина II⁹. 95% циркулирующего в крови ТАП находится в неактивном состоянии в комплексе с ИАП-1. ИАП-1 — это гликопротеин, относящийся к группе серпинов и продуцируемый преимущественно эндотелиоцитами. В плазме он находится в трех формах — активной, латентной и в комплексе с двумя типами активаторов плазминогена — тканевым и урокиназным. Латентная, то есть неактивная фракция является преобладающей: до 90% общего плазменного ИАП-1 депонировано в тромбоцитах¹⁰. Функцией ИАП-1 является ингибирование этих двух активаторов плазминогена путем их химической модификации и образования прочного комплекса^{5, 11, 12, 13}. В состоянии покоя уровень ИАП-1 превалирует над уровнем ТАП для предотвращения активации плазминогена. Определение в крови уровня этих регуляторов фибринолиза и их соотношения могут быть информативны для оценки фибринолитической активности эндотелия при различных воздействиях. Данные ряда исследователей доказывают развитие дисбаланса в протеолитической системе ТАП-ИАП-1 при многих заболеваниях вирусной этиологии. Так, Huang Y.H et al. установили увеличение уровня ТАП в крови больных в острой фазе геморрагической лихорадки денге, вызываемой арбовирусом рода *Flavivirus*, с последующим его снижением и одновременным увеличением уровня ИАП-1 к периоду выздоровления¹⁴; позднее эти авторы показали, что в культуре эндотелиоцитов, инфицированных этим арбовирусом, развивается иная реакция этих клеток: происходит увеличение секреции ТАП, сопровождающееся нормальным уровнем продукции ИАП-1¹⁵. Mairuhu A.T. et al. также установили возрастание уровня антигена ИАП-1 в крови больных лихорадкой денге¹⁶. Аргентинская геморрагическая лихорадка, вызываемая ареновирусом *Junin*, сопровождается, по данным Heller M.V. et al., повышением концентрации в крови больных антигена ТАП и нормальным уровнем антигена ИАП-1¹⁷. По данным Carmeliet P. et al., аденовирусы в культуре эндотелиоцитов стимулируют выраженное усиление продукции ТАП¹⁸. Peraldi M. N. et al. выявили увеличение активности ТАП и ИАП-1 в крови ВИЧ-инфицированных больных¹⁹. По данным А.В. Ягоды и

соавт., хроническая вирусная патология печени сопровождается увеличением содержания ТАП, ИАП-1 и активности ТАП в плазме крови²⁰. Таким образом, данные о содержании ТАП и ИАП-1 в крови больных, в частности, вирусными геморрагическими лихорадками, весьма немногочисленны и зачастую противоречивы, а данные об уровне этих регуляторов фибринолиза при ГЛПС в доступной литературе отсутствуют. В связи с этим целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение содержания ТАП и ИАП-1 в плазме крови больных ГЛПС в зависимости от периода и степени тяжести и оценка их роли в патогенезе заболевания.

Экспериментальная часть

Работа одобрена экспертным советом по биомедицинской этике по клиническим дисциплинам ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России. В группу динамического исследования концентрации антигенов ТАП и ИАП-1 в ЭДТА-плазме крови вошли 109 больных (91 мужчин и 18 женщин) с серологически подтвержденным методом непрямых флюоресцирующих антител диагнозом ГЛПС, вызываемым хантавирусом серотипа *Puumala*, в возрасте 37.4 [26.8; 53.3] лет, находившихся на стационарном лечении в ГБУЗ РБ «Инфекционная клиническая больница № 4» г. Уфы и в отделении гемодиализа Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова в 2004-2009 годах. От каждого больного было получено информированное согласие. Критериями исключения из исследования явились наличие в анамнезе гипертонической болезни, атеросклероза, болезней сердца и сосудов, сахарного диабета, злокачественных заболеваний, заболеваний печени и почек. При определении степени тяжести ГЛПС использовали классификацию Б.З. Сиротина²¹. Среднетяжелая форма выявлена у 57 больных (52.3%), тяжелая без осложнений — у 29 больных (26.6%), тяжелая с осложненным течением (инфекционно-токсический шок I-II степени, острая почечная недостаточность, ДВС-синдром, острая дыхательная недостаточность, острый эрозивный гастрит, гематома почки) — у 23 больных (21.1%). Контрольную группу составили 23 практически здоровых добровольца, сопоставимых по полу и возрасту. Кровь брали утром натощак в стандартных условиях. Образцы ЭДТА-плазмы крови для определения концентрации антигенов ТАП и

ИАП-1 хранили при -20°C до момента исследования. Концентрацию антигенов ТАП и ИАП-1 в ЭДТА-плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем компании Technoclone (Австрия) и выражали в нг/мл. Абсорбцию света регистрировали с помощью микропланшетного ридера «Bench mark» компании Bio-Rad (США). Результаты обработали с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004). Результаты исследования концентрации антигенов ТАП и ИАП-1 оценивали методами непараметрической статистики: определяли медиану, интерквартильный интервал (25-й и 75-й процентиля), максимальное и минимальное значения и данные представили в виде Ме [25; 75]; достоверность межгрупповых различий средних величин оценивали по критерию U Манна-Уитни с поправкой Бонферрони, взаимосвязь двух признаков оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы p принимали равным 0.05.

Результаты и их обсуждение

Концентрация антигена ТАП в крови больных ГЛПС практически не зависит от периода и степени тяжести болезни (рис. 1). Однако прослеживается определенное сходство в изменении его уровня при среднетяжелой и тяжелой неосложненной формах, заключающееся в статистически значимо высоком уровне в лихорадочный период с последующим статистически значимым снижением вплоть до периода восстановленного диуреза. Концентрация определяемого антигена при тяжелой неосложненной форме статистически значимо отличается не только от контроля, но и от соответствующих периодов при среднетяжелой форме. При тяжелой форме ГЛПС с осложнениями его содержание на всем протяжении болезни остается статистически значи-

мо низким с минимумом в периоды олигурии и полиурии и статистически значимо отличаются не только от контроля, но и от соответствующих периодов среднетяжелой и тяжелой неосложненной форм.

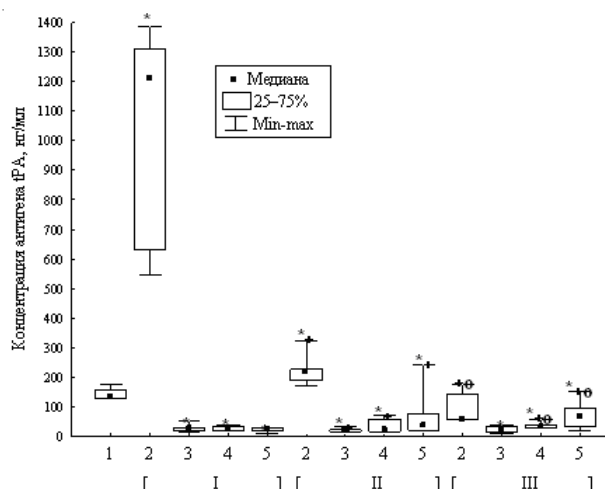


Рис. 1. Концентрация антигена ТАП в плазме крови больных ГЛПС на фоне базовой лекарственной терапии: 1 – контроль; 2 – период лихорадки; 3 – период олигурии; 4 – период полиурии; 5 – период восстановленного диуреза. I – среднетяжелая форма; II – тяжелая форма без осложнений; III – тяжелая форма с осложнениями. $p < 0.05$ по сравнению: * – с контролем; + – со среднетяжелой формой; о – с тяжелой формой без осложнений.

Содержание антигена ИАП-1 в плазме крови больных ГЛПС зависит как от периода, так и от степени тяжести заболевания (рис. 2). Его изменения при среднетяжелой и тяжелой неосложненной формах болезни имеют сходную волнообразную динамику с максимумом в период лихорадки и минимумом – в период восстановленного диуреза, однако для среднетяжелой формы характерны более значительные перепады. Присоединение осложнений обуславливает иную динамику изменения концентрации антигена изучаемого ингибитора: в лихорадочный период его уровень, наоборот,

Таблица 1

Корреляционная зависимость между содержанием антигенов ТАП и ИАП-1 в ЭДТА-плазме крови больных ГЛПС различной степени тяжести по Спирмену, R

Период заболевания	Форма заболевания		
	среднетяжелая	тяжелая без осложнений	тяжелая с осложнениями
лихорадки	–0.4	–0.5	–0.3
олигурии	–0.6	–0.2	–0.3
полиурии	–0.5	–0.9*	–0.5
восстановленного диуреза	+0.8*	–0.6	+0.5

Примечание: * - $p < 0.05$

Соотношение ТАП/ИАП-1 при ГЛПС различной степени тяжести на фоне базисной лекарственной терапии

Период заболевания	Форма заболевания		
	среднетяжелая	тяжелая без осложнений	тяжелая с осложнениями
лихорадки	1.6 [0.9; 3.9]*	1.3 [1.1; 1.6]*	0.5 [0.4; 1.6] ^{+o}
олигурии	0.09 [0.09; 0.2]*	0.2 [0.17; 0.28]*	0.1 [0.1; 0.1]*
полиурии	0.11 [0.1; 0.2]*	0.14 [0.13; 0.23]*	0.1 [0.1; 0.2]*
восст. диуреза	0.12 [0.12; 0.2]*	0.33 [0.15; 1.9]**	0.5 [0.3; 0.9]*
контроль	0.7 [0.5; 0.8]		

Примечание: $p < 0.05$ по сравнению * — с контролем, + — со среднетяжелой формой, ^o — с тяжелой формой без осложнений

статистически значимо снижается и в последующие периоды статистически значимо нормализуется.

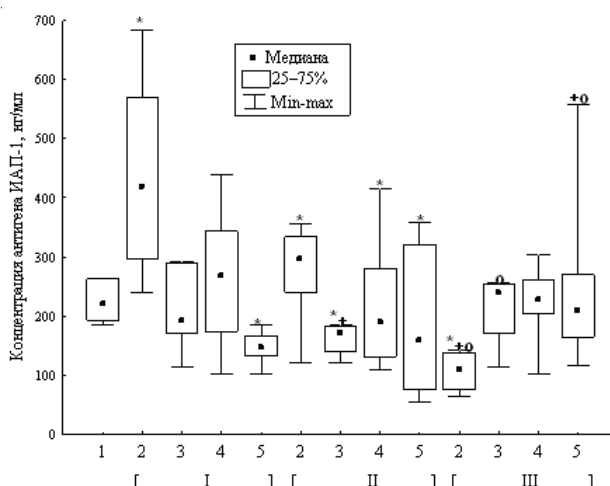


Рис. 2. Концентрация антигена ИАП-1 в плазме крови больных ГЛПС на фоне базовой лекарственной терапии: 1 — контроль; 2 — период лихорадки; 3 — период олигурии; 4 — период полиурии; 5 — период восстановленного диуреза. I — среднетяжелая форма; II — тяжелая форма без осложнений; III — тяжелая форма с осложнениями. $p < 0.05$ по сравнению: * — с контролем; + — со среднетяжелой формой; o — с тяжелой формой без осложнений.

Анализ корреляционных взаимоотношений между уровнями антигенов ТАП и ИАП-1 в крови больных ГЛПС показал наличие между ними преимущественно статистически незначимой связи средней силы и разной направленности (табл. 1). Так, при среднетяжелой форме наблюдается отрицательная корреляция средней силы, а при восстановлении диуреза связь становится статистически значимо сильной положительной. Тяжелая неосложненная форма болезни характеризуется отрицательной взаимосвязью в системе ТАП-ИАП-

1, которая только в период полиурии является статистически значимо сильной. При тяжелой форме с осложненным течением между ними развивается статистически незначимая преимущественно отрицательная связь средней и слабой степени выраженности, за исключением периода восстановленного диуреза, при которой развивается положительная связь средней силы.

Помимо абсолютных значений концентрации антигенов изучаемых факторов для оценки равновесия в системе ТАП-ИАП-1 информативным является вычисление количественного соотношения между ними. Увеличение этого индекса по сравнению с контролем может свидетельствовать о тенденции к усилению фибринолиза и наоборот. В течении ГЛПС при всех трех формах болезни можно отметить сходную динамику изменения этого показателя — снижение от начального периода к разгару болезни с последующей тенденцией к повышению к периоду восстановления диуреза (табл. 2). Статистически значимые изменения его величины отмечаются в динамике среднетяжелой и тяжелой неосложненной форм ГЛПС и в олигурический период осложненной формы. При осложненном течении болезни значения индекса статистически значимо понижены на всем протяжении болезни.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ГЛПС, вызываемая хантавирусом серотипа *Puumala*, характеризуется относительно высоким уровнем ТАП и ИАП-1 в начальный период болезни с последующим спадом в период ее разгара при среднетяжелой и тяжелой неосложненной формах болезни, причем этот перепад тем значительнее, чем легче протекает заболевание. Тяжелая осложненная форма ГЛПС сопровождается преимущественно низким уровнем обоих регуляторных факторов в течение всей болезни. Выявленные

нами закономерности изменения концентрации ТАП при ГЛПС аналогичны таковым при геморрагической лихорадке денге¹⁴ и противоположны его динамике при аргентинской геморрагической лихорадке¹⁷, в то время как динамика ИАП-1 при ГЛПС и при двух сравниваемых с ней типах геморрагической лихорадки различаются: при геморрагической лихорадке денге уровень ингибитора к периоду клинического выздоровления растет, а при аргентинской гемолихорадке остается нормальным на протяжении всей болезни. Подобные различия объяснимы с позиции существования особенностей в действии на эндотелиоциты разных вирусов.

Несмотря на относительно низкие уровни в крови больных ГЛПС исследуемых регуляторов фибринолиза следует отметить, что в системе ТАП-ИАП-1 наблюдается тенденция к достаточно согласованному взаимодействию, и доказательством этого служат, с одной стороны, характер корреляционных взаимосвязей между ними, с другой, — медианные значения индекса ТАП/ИАП-1. Практически во все периоды при всех формах тяжести болезни обнаружена преимущественно отрицательная корреляция средней силы, что соответствует характеру взаимоотношений между тканевым активатором плазминогена и его ингибитором. Высокие значения индекса ТАП/ИАП-1 в период лихорадки при среднетяжелой и тяжелой неосложненной формах ГЛПС указывают на тенденцию к усилению фибринолиза с целью сохранения нормального кровотока в условиях активации коагуляции, инициированной первичным повреждением хантавирусом эндотелиальной выстилки с последующим образованием микротромбов. Последующее уменьшение этого соотношения при среднетяжелой и тяжелой неосложненной формах, возможно, связано с патогенетически обусловленной реакцией торможения фибринолиза из-за повышения ломкости мелких сосудов с высвобождением тканевого тромбопластина и активацией внешнего пути свертывания крови. Возможно, определенный вклад в развитие реакции торможения фибринолиза в период разгара болезни вносит лекарственный препарат гемостатического действия дицинон, применяемый как средство патогенетического действия в комплексной базовой терапии при лечении больных ГЛПС.

Особая ситуация в системе ТАП-ИАП-1 наблюдается при ГЛПС, протекающей в осложненной форме. Достаточно низкая и не-

адекватная потребностям организма продукция их эндотелиоцитами с низким значением соотношения между ними в течение всего заболевания на фоне развивающегося ДВС-синдрома, возможно, являются одной из причин прогрессирования тромбообразования с последующим развитием синдрома полиорганной недостаточности (острая почечная недостаточность, шоковое легкое и др.) из-за нарушения тканевой перфузии. Сдвиги в продукции ТАП и ИАП-1 могут быть объяснены с позиции совместного действия как минимум двух факторов — потреблением тканевого активатора в результате реализации процессов фибринолиза при усиленном внутрисосудистом свертывании крови и снижением их экспрессии из-за обширного повреждения эндотелия — основного продуцента этих субстанций²².

Гиперкоагуляция как этап ДВС-синдрома при ГЛПС является мультифакторным процессом, и в качестве возможных могут быть выделены следующие причины. Во-первых, — это угнетение продукции эндотелиоцитами регуляторных факторов фибринолиза ТАП и ИАП-1 из-за повреждения их как самими хантавирусами, так и продуктами измененного под их действием метаболизма. Во-вторых, это активация внешнего пути свертывания крови из-за хрупкости сосудов с высвобождением тканевого тромбопластина и внутреннего пути — вследствие усиленного отслоения эндотелия и экспонирования в просвет сосуда его тромбогенных субстанций, в частности, коллагена IV типа. В-третьих, многократное увеличение в периферической крови количества циркулирующих поврежденных эндотелиоцитов, которые высвобождают микрочастицы; они, в свою очередь, экспонируют фосфолипиды, являющиеся дополнительными сайтами для активации процесса свертывания крови по внутреннему пути²³.

Наши наблюдения могут иметь не только теоретическое, но и практическое значение, так как содержание антигенов ТАП и ИАП-1 в крови в период лихорадки при различных формах тяжести статистически значимо отличаются не только от контроля, но и друг от друга. Так, уровни антигенов ТАП и ИАП-1 в начальный период болезни при среднетяжелой форме ГЛПС превышают контрольные значения в 7 и 1.9 раз соответственно, при тяжелой без осложнений — оба показателя в 1.5 раза выше контроля, а при тяжелой с осложнениями — ниже контроля в 2.3 и 2 раза соответственно. Следовательно, определение в крови

уровней антигенов ТАП и ИАП-1 может быть использовано как дополнение к классической панели ранней диагностики и прогноза развития осложнений при тяжелой форме ГЛПС.

Таким образом, представленные в настоящем исследовании данные позволяют предполагать возможную связь снижения продукции эндотелиоцитами факторов регуляции фибринолиза с процессами купирования геморрагий при среднетяжелой и тяжелой неосложненной формах ГЛПС и развитием ДВС-синдрома как одного из серьезных осложнений болезни. Кроме того, эти результаты могут быть использованы для оценки степени тяжести заболевания как дополнение к классической диагностической панели.

Литература

- Peters C. J., Zaki S. R. // *Crit. Care Med.*— 2002.— V.30, №5 (suppl.).— P.268.
- Valbuena G., Walker D. H. // *Annu. Rev. Pathol.*— 2006.— V.1, №1.— P.171.
- Heyman P., Vaheri A., Lundkvist A., Avsic-Zupanc T. // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*— 2009.— V.7.— P.205.
- Alazard-Dany N., Volchkova V., Reynard O., Carbonnelle C., Dolnik O., Ottmann M., Khromykh A., Volchkov V. E. // *J. Gen. Virol.*— 2005.— V.87.— P.1247.
- Medcalf R. L. // *J. Thromb. Haemost.*— 2007.— V.5.— P.132.
- Gorp E. C., Setiati T. E., Mairuhu A. T., Suharti C., Cate H. H., Dolmans W. M., van den Meer J. W., Hack C. E., Brandjes D. P. // *J. Med. Virol.*— 2002.— V.67.— P.549.
- Guesbert T. W., Young H. A., Jahrling P. B., Geisbert T. W., Young H. A., Jahrling P. B., Davis K. J., Larsen T., Kagan E., Hensley L. E. // *Am. J. Pathol.*— 2003.— V.163.— P.2371.
- Loscalzo J., Braunwald E. Tissue plasminogen activator // *N. Engl. J. Med.*— 1988.— V.319.— P.925.
- Bachlman F. Plasminogen-plasmin enzyme system // *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice.*— Philadelphia.— 2001.— P. 275.
- Andreasen P. A., Greog B., Lund L. R., Riccio A., Stacey S. N. // *Mol. Cell Endocrinol.*— 1990.— V.68.— P.1.
- Kruithof E. K., Tran-Thang C., Ransijn A., Bahmann F. // *Blood.*— 1984.— V.64.— P.907.
- Pannekoek H., Veerman Y., Lambers H., Diergaarde P., Verweij C. L., van Zonneveld A. J., van Mourik J. A. // *EMBO J.*— 1986.— V.5.— P.2539.
- Dellas C., Loskutoff D. J. // *Thromb. Haemost.*— 2005.— V.95.— P.631.
- Huang Y. H., Lei H. Y., Liu H. S., Lin Y. S., Chen S. H., Liu C. C., Yeh T. M. // *J. Med. Virol.*— 2003.— V.70, №4.— P.610.
- Huang Y.H., Liu H.S., Wang S.T., Lei H.Y., Liu H.L., Lin Y.S., Wu H.L., Yeh T.M. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection // *J. Med. Virol.*— 2001.— V.63.— P. 247.
- Mairuhu A. T., Setiati T. E., Koraka P., Hack C. E., Leyte A., Faradz S. M., ten Cate H., Brandjes D. P., Osterhaus A. D., Reitsma P. H., van Gorp E.C. Increased PAI-1 plasma levels and risk of death from dengue: no association with the 4G/5G promoter polymorphism // *Thromb. J.*— 2005.— V.3.— P.17.
- Heller M. V., Marta R. F., Sturk A., Maiztegui J. I., Hack C. E., Cate J. W., Molinas F. C. Early markers of blood coagulation and fibrinolysis activation in Argentine hemorrhagic fever // *Thromb. Haemost.*— 1995.— V.73.— P.368.
- Carmeliet P., Stassen J. M., van Vlaenderen I., Meidell R. S., Collen D., Gerard R. D. // *Blood.*— 1997.— V. 90.— P.1527.
- Peraldi M. N., Maslo C., Berrou J., Rondeau E., Rozenbaum W., Sraer J. D. Tissue-type plasminogen activator activity in HIV-associated HUS // *Nephrol. Dial. Transplant.*— 1998.— V.13.— P.919.
- Ягода А. В., Корой П. В. // *Терапевтич. архив.*— 2009.— Т.81, №2.— С.50.
- Сиротин Б. З. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом.— Хабаровск: Хабаровская краевая типография, 1994.— 300 с.
- Байгильдина А. А., Лебедева А. И., Вагапова В. Ш. // *Морфология.*— 2011.— Т.139, №3.— С.58.
- Brodsky S. V., Malinowski K., Golightly M., Gesty J., Goligorsky M. S. // *Circulation.*— 2002.— V.106.— P.2372.