

УДК 616.921.5:616.24-002-037:616.017.1

Романова Е.Н., Говорин А.В., Горбунов В.В., Лукьянов С.А.

## МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ ПРИ ПНЕВМОНИЯХ У БОЛЬНЫХ ГРИППОМ А/H1N1

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия

У больных пневмонией подсчитано число десквамированных эндотелиоцитов крови, исследована плазменная концентрация растворимой формы межклеточной адгезии-1, фактора некроза опухолей-альфа и интерферона-гамма. Число эндотелиоцитов, содержание молекулы адгезии-1 и цитокинов было значительно повышенным при тяжелой пневмонии и остром респираторном дистресс-синдроме. Выявленные изменения содержания маркеров повреждения эндотелия и провоспалительных цитокинов при пневмониях на фоне гриппа A/H1N1 отличаются от аналогичных показателей при бактериальных пневмониях, что подтверждает прогностическое значение определения этих показателей.

**Ключевые слова:** грипп A/H1N1, пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, эндотелиоциты, молекула межклеточной адгезии-1, цитокины.

E.N. Romanova, A.V. Govorin, V.V. Gorbunov, S.A. Lukyanov

**MARKERS OF ENDOTHELIAL DAMAGE AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH PNEUMONIA ASSOCIATED WITH PANDEMIC INFLUENZA A/H1N1**

*Chita State Medical Academy*

*Plasma desquamated endothelial cells amount, intercellular adhesion molecule-1 level, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma concentration were estimated in patients with influenza A/H1N1-associated pneumonia. The plasma level of desquamated endotheliocytes, intercellular adhesion molecule-1 and cytokines were shown to be elevated in severe pneumonia and acute respiratory distress-syndrome. The revealed changes of markers of endothelial damage and cytokine profile in pneumonia caused by influenza A (H1N1) differ from the same in bacterial pneumonia, which causes their diagnostic value.*

**Keywords:** influenza A/H1N1, pneumonia, acute respiratory distress-syndrome, endotheliocytes, intercellular adhesion molecule-1, cytokines.

В силу высочайшей изменчивости возбудителя грипп до настоящего времени остается неконтролируемой инфекцией, несмотря на крупные достижения в области создания современных вакцин и противогриппозных препаратов. Особую обеспокоенность мирового сообщества вызывают периодически возникающие глобальные пандемии, являющиеся результатом появления новых шифт-вариантов вируса с радикально измененной структурой гемагглютинина и нейраминидазы. Такие вирусы беспрепятственно распространяются в человеческой популяции, вызывая острые подъемы массовой заболеваемости в короткие промежутки времени [4, 5].

В 2009 году средняя продолжительность эпидемии по городам составила 6,8 недель, при колебании в отдельных городах от 4 (Брянск, Краснодар, Норильск, Орел, Пермь, Якутск) до 13 недель (Чита). Наиболее высокая заболеваемость (10,2-10,3%) была зарегистрирована в городах Дальневосточного и Сибирского регионов, особенно в Чите (19,2%), Магадане (12%), Южно-Сахалинске (11,7%). Самая низкая - 5,7% в Южном федеральном округе, в Ростове-на-Дону заболеваемость составила 4,3%, в Краснодаре - 2,3% [4]. Особенностью гриппа A/H1N1 явилась большая частота развития пневмоний. У ряда больных поражение легочной ткани и осложнения

на этом фоне развивались стремительно. В Забайкальском крае было зарегистрировано 57 летальных исходов. По данным патологоанатомических исследований у всех умерших выявлены признаки острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [7].

Высокая частота развития поражения легких при гриппе A/H1N1 объясняется тропностью вируса к эпителиальным клеткам, в том числе и к эндотелию, что определяет характерную клиническую картину гриппа и пневмонии на этом фоне [4, 5]. Повышенная проницаемость капилляров легких, а также чрезмерная индукция цитокинов, повреждение эндотелия являются основными механизмами развития ОРДС [8].

По данным экспериментальных исследований показано, что вирус гриппа A/H1N1 способен размножаться в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов и вызывать их апоптоз [10]. Также антигены вируса гриппа A/H1N1 были обнаружены при морфологических исследованиях в эндотелии легочных капилляров пациентов, умерших от гриппозной пневмонии [13].

Одним из методов объективизации повреждения эндотелия является определение в крови циркулирующих десквамированных эндотелиальных клеток (ДЭК) [1, 9, 12] и растворимых форм молекул адгезии, характеризующих процессы активации эндотелиоцитов и способствующих взаимодействию лейкоцитов и эндотелиальных клеток [2, 6]. Известно, что для выраженной экспрессии sICAM-1 необходима активация клеток провоспалительными цитокинами - IF $\gamma$ , TNF $\alpha$  [2, 6, 8]. Однако практически не изучены особенности цитокинового профиля и уровень маркеров повреждения эндотелия при пневмониях на фоне гриппа A/H1N1.

**Целью** настоящей работы явилось изучение особенностей содержания маркеров патологической активации эндотелия (ДЭК, sICAM-1) и провоспалительных цитокинов (IF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) при пневмониях различной тяжести на фоне гриппа A/H1N1.

#### **Материал и методы.**

Исследования проводились с информированного согласия больных, также получено положительное решение локального

этнического комитета (протокол №16 от 26.11.2010). Обследованы пациенты, находившиеся на лечении по поводу пневмонии на фоне высокопатогенного гриппа в стационарах города Читы в период с октября по декабрь 2009 года. Грипп A/H1N1 верифицирован методом полимеразной цепной реакции и при реакции торможения гемагглютинации: I группа (n=58) - пациенты с тяжелыми пневмониями на фоне гриппа A/H1N1; II группа (n=76) - больные с нетяжелыми пневмониями на фоне гриппа A/H1N1. Для сравнения в исследование включены больные с нетяжелыми внебольничными пневмониями бактериальной этиологии, заболевшие после эпидемии гриппа - III группа (n=38). Оценка тяжести пациентов в стационаре основывалась на степени дыхательной недостаточности, выраженности интоксикации, объеме воспалительной инфильтрации, наличии осложнений, декомпенсации сопутствующих заболеваний [3]. IV группа контроля (n=23) - относительно здоровые. Все группы были сопоставимы по полу и возрасту (средний возраст 40,5±12,7). Количество ДЭК определяли по классической методике Hladovec (1978). В плазме крови определяли концентрацию TNF $\alpha$ , IF $\gamma$ , IL-10 и s-ICAM-1 методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью реактивов "Вектор-Бест" и "Bender Medsystems" соответственно. Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета программ Statistica 6.0. При сравнении групп использовался критерий Манна-Уитни, сравнение дискретных величин проводилось с использованием непараметрического критерия -  $\chi^2$ -квадрат Пирсона ( $\chi^2$ ).

#### **Результаты и обсуждение**

Изучение количества ДЭК у больных гриппом A/H1N1 выявило наибольшее их увеличение у пациентов с тяжелыми пневмониями в первые сутки пребывания в стационаре - среднее количество составило 15,8±4,38 в 1 мкл, во II группе - 8,55±2,92 в 1 мкл, что выше в 3,2 и 1,6 раза соответственно по сравнению с содержанием их у пациентов с бактериальными пневмониями - 5,4±0,7 в 1 мкл (табл. 1). При этом у

пациентов с ОПЛ/ОРДС выявлено трехкратное и более превышение нормы содержания десквамированных эндотелиоцитов. Среднее количество ДЭК в крови умерших больных при гриппе A/H1N1 составило  $19,75 \pm 17,5$  в 1 мкл. Рядом исследователей проводилось определение ДЭК в крови при различных патологических состояниях. Так, при тяжелом отравлении уксусной кислотой содержание ДЭК в среднем составило  $6,6 \pm 0,5$  в 1 мкл [1]; при отморожениях конечностей II-IV степени -  $21,2 \pm 1,6$  в 1 мкл [9]. Количество ДЭК при этих критических состояниях сопоставимо с таковыми при тяжелой пневмонии на фоне гриппа A/H1N1.

При изучении концентрации sICAM-1 в плазме пациентов выявлено, что тяжелые пневмонии при гриппе A/H1N1 в первые сутки госпитализации характеризуются наиболее высокой концентрацией адгезивной молекулы - в 1,4 раза выше чем в контрольной группе ( $p < 0,01$ ), сверхвысокий уровень sICAM-1 ( $>700$  нг/мл) отмечен в первой группе в 15,5 % случаев, среди которых и пациенты с ОПЛ/ОРДС. При нетяжелом течении вирусных пневмоний наблюдается иная картина - меньшее содержание sICAM-1 по сравнению с группой здоровых лиц в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ). Концентрация sICAM-1 в плазме больных с нетяжелым течением пневмонии была в 1,6 раза меньше ( $p < 0,001$ ) по сравнению с бактериальными.

По данным ряда авторов (G.P. Downey, L. Falkow, 1995) концентрация sICAM-1 в плазме крови может служить критерием исхода критического состояния - концентрация  $>1000$  нг/мл свидетельствует о высокой вероятности летального исхода [11]. У двух исследуемых пациентов в нашей работе концентрация sICAM-1 соответствовала 1108 и 1333 нг/мл, в обоих случаях имел место летальный исход вследствие ОРДС.

В процессе воспаления цитокины (IFN, TNF) стимулируют клетки эндотелия, что усиливает экспрессию адгезивных молекул [2, 6]. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов зарегистрирована в группе тяжелого течения гриппозных пневмоний, этим можно объяснить и гиперпродукцию

молекул адгезии у наиболее тяжелых пациентов вследствие развившегося эндотелиоза. Изучение цитокинового профиля при пневмонии у больных гриппом A/H1N1 показало наиболее значительное увеличение IF (табл. 1). Известно, что индукция интерферонов является центральным звеном в защите клеток от гриппозной инфекции [4, 5]. Содержание IF в первые сутки пребывания в стационаре у пациентов с тяжелыми и нетяжелыми пневмониями в 13,8 и 8,3 раза соответственно превышало показатели контрольной группы ( $p < 0,001$ ). Выявлено, что концентрация IF в группе с более тяжелым течением пневмонии была в 1,6 раз выше, чем при меньшей степени тяжести ( $p < 0,001$ ). А у части тяжелых больных (20%) гиперпродукция изучаемого цитокина в 20-65 раз превышала контрольные показатели. Содержание IF в первые сутки госпитализации при бактериальных пневмониях не отличалось от показателей группы контроля (табл. 1).

Согласно данным литературы, гиперпродукция фактора некроза опухолей приводит к сильному повреждающему действию как на эндотелий кровеносных сосудов, в первую очередь капилляров, так и на саму легочную ткань [4, 5, 8]. В нашем исследовании концентрация в крови TNF была значительно повышена при вирусных пневмониях в первые сутки госпитализации, в группе тяжелых пациентов его содержание в 8,2 раза превышало контрольные цифры ( $p < 0,001$ ), а у ряда заболевших (19%), преимущественно с признаками ОПЛ/ОРДС в 15 и более раз. При пневмонии меньшей степени тяжести показатели изучаемого цитокина в 4,9 раза были выше контроля ( $p < 0,001$ ). В отличие от вирусных пневмоний на фоне гриппа A/H1N1 при бактериальных пневмониях вне эпидемии содержание TNF $\alpha$  в первые дни стационарного лечения превышало уровень контроля в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ). В группах больных гриппом A/H1N1, разделенных по степени тяжести, отмечено, что при тяжелых пневмониях показатели в 1,7 раз были больше по сравнению с нетяжелыми ( $p < 0,001$ ).

Таблица

**Содержание цитокинов и маркеров повреждения эндотелия у пациентов разных групп (Медиана [25й; 75й перцентили])**

Группы	Показатели	IF $\gamma$ , пк/мл	TNF $\alpha$ , пк/мл	ДЭК, в 1 мкл	sICAM-1, нг/мл
I группа Пневмонии при гриппе A/H1N1, тяжелое течение (n=58)	1-2 день	44 [26,3; 71,8] p<0,001	67,6 [45,8; 128] p<0,001	16 [12; 19] p<0,001	415 [238,3;552] p<0,01
II группа Пневмонии при гриппе A/H1N1, нетяжелое течение (n=76)	1-2 день	26,7 [9,5; 50,5] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	40,4 [27,5; 59,9] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	8[6; 10] p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	219,2 [179;337,9] p<0,05 p <sub>1</sub> <0,001
III группа Бактериальные пневмонии, нетяжелое течение(n=38)	1-2 день	3,8 [2; 6,3] p>0,05 p <sub>1-2</sub> <0,001	12,7 [8,7; 20,1] p<0,001 p <sub>1-2</sub> <0,001	5 [3,3; 5,8] p<0,05 p <sub>1-2</sub> <0,001	358,8 [286;439,7] p<0,05 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,001
IV группа Контроль (n=23)		3,2 [1,3; 4,4]	8,2 [5,3; 10,1]	2,2 [1,2; 4,7]	286,9 [214,7;363]

p - статистическая значимость различий относительно контроля;

p<sub>1</sub> - статистическая значимость различий относительно I группы;

p<sub>2</sub> - статистическая значимость различий относительно II группы;

Таким образом, при пневмониях у больных гриппом A/H1N1 выявлены лабораторные признаки изменения эндотелиальной функции в виде увеличения в крови содержания десквамированных эндотелиоцитов и растворимых форм молекул адгезии. Установлены существенные отличия содержания ДЭК и провоспалительных цитокинов при гриппозных и бактериальных пнев-

мониях. Наиболее выраженная гиперпродукция провоспалительных цитокинов (IF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) и маркеров патологической активации эндотелия (ДЭК, sICAM-1) зарегистрирована в группе наиболее тяжелых пациентов, в том числе с ОПЛ/ОРДС, что свидетельствует о процессе системного воспаления и подтверждает прогностическое значение определения этих показателей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Агрегационная способность тромбоцитов и эндотелиальная дисфункция у больных с острым отравлением уксусной кислотой / Н.А. Соколова [и др.] // Дальневосточный медицинский журнал. - 2007. - № 3. - С.42-44.
2. Белоцкий С.М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты / С.М. Белоцкий, Р.Р. Авталион. - М. : БИНОМ, 2008. - 240 с.
3. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / Чучалин А.Г. [и др.]. Смоленск : МАКМАХ, 2010. - 80 с.
4. Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика / Под редакцией О.И. Кисилева, Л.М. Цыбаловой, В.И. Покровского. - М. : "Медицинское информационное агентство", 2012. - 496 с.
5. Деева Э.Г. Грипп на пороге пандемии: Руководство для врачей / Э.Г. Деева. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 208 с.
6. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б.И. Кузник. - Чита : Экспресс-издательство, 2010. - 832 с.

7. Морфологическая характеристика поражения дыхательной системы при гриппе A/H1N1 в Забайкальском крае / Н.Н. Чарторижская [и др.] // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. - 2011. - №39. - С.8-12.
8. Острый респираторный дистресс-синдром: Практическое руководство / Под ред. Б.Р. Гельфанда, В.Л. Кассиля. - М. : Литтерра, 2007. - 232 с.
9. Повреждение клеток эндотелия и содержание цитокинов в разные периоды местной холодовой травмы / К.Г. Шаповалов [и др.] // Травматология и ортопедия России. - 2008. - № 47. - С.35-37.
10. Репродукция вируса гриппа A(H1N1v) в клетках эндотелия кровеносных сосудов / Азаренок А.А. [и др.] // Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями: материалы международной научной конференции. - СПб., 2010. - С. 44.
11. Черний В.И. Нарушения иммунитета при критических состояниях. Особенности диагностики [Электронный ресурс] / В.И. Черний, А.Н. Нестеренко // Внутренняя медицина. - 2007. - №3 (3). - Режим доступа: <http://mif-ua.com/archive/issue-178> (10 марта 2007).
12. Эндотелиальная дисфункция: современное состояние вопроса / В.А. Петухов [и др.] // ConsiliumMedicum. Приложение "Хирургия". - 2008. - №1. - С.3-11.
13. 2009 Pandemic H1N1 Influenza. Pathology and Pathogenesis of 100 Fatal Cases in the United States / Shieh W.J. [et al.] // Am. J. Pathol. - 2010. - Vol.177. - P.166-175.