

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ НЕЙТРОФИЛОВ И ИХ ИНГИБИТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА НА ФОНЕ ГРИППОЗНОЙ ПНЕВМОНИИ

Пруткина Е.В., Цыбиков Н.Н., Исакова Н.В., Сепп А.В.

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ, г. Чита

Резюме. У 52 больных различными формами гриппа А/Н1N1, у 16 из которых развился респираторный дистресс-синдром, в плазме крови определяли содержание ферментов нейтрофилов: эластазы, миелопероксидазы (МРО), MMP-2; и их локальных ингибиторов – белка клеток Клара (CC16) и HSP-70. Показано, что при неосложненном гриппе уровень эластазы и МРО увеличивается, а MMP-2 не изменяется на фоне роста содержания HSP-70 и неизменного количества CC16. При развитии пневмонии, по сравнению с неосложненным гриппом, концентрация эластазы и МРО увеличивается, а MMP-2 уменьшается на фоне неизменного количества CC16 и HSP-70. При формировании дистресс-синдрома резко снижается содержание CC16, количество остальных веществ остается на уровне пациентов с пневмонией. Было доказано, что одним из механизмов формирования пневмонии является повышение концентрации нейтрофильной эластазы и МРО с формированием относительного дефицита CC16 и уменьшением MMP-2; снижение концентрации CC16 может служить одним из предикторов развития острого респираторного дистресс-синдрома.

Ключевые слова: ферменты нейтрофилов, белок клеток Клара, HSP-70, дистресс-синдром, грипп А/Н1N1.

Prutkina E. V., Tsybikov N. N., Isakova N. V., Sepp A. V.

INTERRELATIONS BETWEEN NEUTROPHIL ENZYMES AND THEIR INHIBITORS IN PATHOGENESIS OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME ASSOCIATED WITH INFLUENZA PNEUMONIA

Abstract. Amounts of several neutrophil enzymes (elastase, myeloperoxidase (MPO), MMP-2) and their local inhibitors, i.e., Clara cell protein (CC16) and HSP-70, have been determined in blood plasma from fifty-two patients with various forms of influenza A/H1N1. Sixteen patients have developed acute respiratory distress syndrome (ARDS). In cases of uncomplicated influenza, elastase and MPO levels were shown to be increased, while MMP-2 levels did not change, along with higher contents of HSP-70 and unchanged CC16 amounts. Upon development of influenza-associated pneumonia, elastase and MPO concentrations became elevated, whereas MMP-2 levels were decreased, along with unchanged amounts of CC16 and HSP-70. In cases of ARDS development, CC16 amounts exhibited a sharp decrease. Meanwhile, contents of other proteins remained at the levels shown for pneumonia patients. It has been shown that increased concentrations of neutrophil elastase and MPO with a relative CC16 deficiency and decreased MMP-2 may represent a mechanism of pneumonia development. Decreased CC16 concentration may serve as a risk predictor of ARDS development. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 3, pp 227-232)

Адрес для переписки:

*Пруткина Елена Владимировна,
Читинская медицинская академия, кафедра
патофизиологии*

672090, г. Чита, ул. Горького, 39а.

Тел.: (3022) 32-18-59.

Факс: (3022) 32-30-58.

E-mail: lenap75@mail.ru

Keywords: neutrophil enzymes, Clara cell protein, HSP-70, acute respiratory distress syndrome, influenza A/H1N1.

Одной из проблем современной медицины является острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС). До сих пор не решены многие вопросы его этиологии и патогенеза, что ведет к разногласиям в классификации, трудностям в диагностике и лечении. Наиболее частой «легочной» причиной развития синдрома является пневмония неаспирационного генеза. В настоящее время до конца неясно, почему в одних случаях воздействие патогена ограничивается развитием пневмонии, в других – сопровождается повреждением альвеолярно-капиллярной мембраны с развитием некардиогенного отека легких, т.е. ОРДС [7, 9]. Прояснить эту проблему может детальное изучение особенностей взаимодействий ферментов нейтрофилов и их ингибиторов как основы процессов повреждения и воспаления легких.

Одним из ключевых звеньев развития ОРДС является системная воспалительная реакция с избыточной адгезией полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) в легочных капиллярах [7], что сопровождается феноменом их гиперактивации. При последнем происходит нерегулируемое высвобождение микробицидных соединений не в фагосому, а в экстраклеточное пространство. Наибольшую опасность для тканей хозяина представляет мобилизация азурофильных гранул, ферменты которых (миелопероксидаза, эластаза, металлопротеиназы и др.) являются аутоагрессивными [1, 3, 6]. В свою очередь, эластаза способна активировать семейство матриксных металлопротеиназ (ММП), которые выделяются лейкоцитами, фибробластами в интерстиций в неактивной форме с последующим формированием местного «протеазного взрыва» [1, 12]. Избыточный протеолиз компенсируется ингибиторами: α_1 -антитрипсином, α_2 -макроглобулином, антитромбином III и другими плазменными белками [1], динамика которых при развитии ОРДС достаточно изучена [9]. На наш взгляд, при этом упускаются из внимания взаимоотношения между агрессивными энзимами нейтрофилов и их локальными ингибиторами, составляющими «первую линию обороны», активность которых определяет: произойдет ли повреждение аэргематического барьера.

В легких уникальным источником биологически активных веществ (БАВ) с противовоспалительным эффектом являются секреторные бронхиолярные клетки (клетки Клара). Белковый компонент их секрета – белок клеток Клара (CC16) – обладает антипротеазной активностью, особенно по отношению к эластазе нейтрофилов, трипсину; ингибирует фосфолипазу A_2 и фактор активации тромбоцитов; подавляет продукцию $IFN\gamma$, модулирует синтез сурфактанта, его гидро-

фобный сайт способен связывать фосфолипиды, ксенобиотики [2, 11].

В фокусе воспаления различные клетки (легких, форменные элементы крови) для противостояния токсинам микроорганизмов, действию цитокинов, оксидативному стрессу активируют самозащитный стресс-ответ, ключевым механизмом которого является накопление индуцибельного белка теплового шока HSP-70. Ранее HSP-70 считался типичным внутриклеточным протеином, однако, в последнее время доказано его существование в экстраклеточной среде: он выделяется путем экзоцитоза, а также высвобождается из некротизированных клеток. Защитные эффекты HSP-70 обеспечиваются шаперонной активностью, способностью к фолдингу белков, активацией антиоксидантной защиты, ограничением гиперпродукции оксида азота, антиапоптотическими и иммуномодулирующими свойствами [4, 5]. На экспериментальной модели сепсис-индуцированного ОРДС показано: дополнительное введение животным HSP-70 приводит к уменьшению выработки провоспалительных цитокинов, препятствует активации нейтрофилов и подавляет их миграцию в легочную ткань [13].

В Забайкальском крае эпидемия гриппа А/Н1N1 2009-10 гг. была расценена Роспотребнадзором как тяжелая (третья) степень развития пандемии [8]. В крае было зарегистрировано 57 летальных исходов от гриппа А/Н1N1 (летальность составила 6,8%) [10]. В этот период подавляющее большинство пациентов стационаров составляли больные пневмониями, отмечалось необычно частое развитие ОРДС. Во время эпидемии появилась уникальная возможность последовательно проследить взаимодействия ферментов нейтрофилов и их ингибиторов на всех этапах развития заболевания: от несложного гриппа – к пневмонии, вплоть до ОРДС, что явилось целью нашей работы.

Материалы и методы

В исследование были включены 52 больных, находившихся на лечении в стационарах г. Читы во время эпидемии гриппа 2009-10 гг., обоего пола, в возрасте от 19 до 40 лет. Диагноз пандемического гриппа А/Н1N1 был верифицирован путем обнаружения вируса в назофарингиальных мазках (методом полимеразной цепной реакции) либо в случае нарастания в сыворотке крови антител к его антигенам. Основную группу составили больные гриппом, осложненным тяжелой пневмонией, приведшей к развитию ОРДС I-II стадий (n = 16). ОРДС диагностировали в соответствии с критериями, рекомендован-

ными Американско-Европейской Согласительной Конференцией, его стадии выделяли по клинической классификации, являющейся модифицированной методикой J.F. Murray [7]. У 14 из 16 больных группы наступил летальный исход от нарастающей острой дыхательной недостаточности. У всех умерших диагноз дистресс-синдрома был подтвержден морфологическим исследованием. По результатам аутопсий в 75% случаев он развился на фоне вирусной пневмонии, а в 24,5% – вирусно-бактериальной, наиболее частой причиной ко-инфекции был *Staphylococcus aureus*. Для сравнения исследовались: 2-ая группа – больные гриппом тяжелого течения в форме трахеобронхита без осложнений (n = 16); 3-ая – больные гриппом, осложненным внебольничной полисегментарной пневмонией средней степени тяжести (n = 20). В качестве контроля использовалась кровь доноров соответствующего возраста (n = 16).

Объектом исследования служила плазма крови, которая забиралась на 2-5 сутки болезни. Концентрации исследуемых веществ определяли методом иммуноферментного анализа фирменными наборами по протоколам производителей: эластазы и миелопероксидазы (МРО) – «Нусулт

biotech», Нидерланды; MMP-2 – «Quantikine», США; CC16 – «BioVendor», Чехия; индуцибельного HSP-70 – «Assay Designs», США.

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 (Me) и интерквартильного (25-й и 75-й перцентили) интервала – указан в скобках.

Результаты и обсуждение

В группах больных динамика концентраций аутоагрессивных лейкоцитарных БАВ имела отличия: изменения эластазы и МРО были схожими, а MMP-2 носили иной характер (табл. 1). Уровень нейтрофильной эластазы при всех формах гриппа А/Н1N1 был значительно выше, чем у здоровых лиц. У пациентов с неосложненным гриппом он увеличивался почти вдвое ($p = 0,002$), а у больных пневмонией средней степени тяжести и при развитии ОРДС – в 4 раза (в обоих случаях $p = 0,000$). При этом формирование ОРДС не сопровождалось дополнительным ростом концентрации эластазы ($p = 0,81$). Содержание

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ФЕРМЕНТОВ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ГРИППА А/Н1N1 (Me [25-й; 75-й])

Фермент	Здоровые (n = 16)	Неосложненный грипп (n = 16)	Пневмония (n = 20)	ОРДС (n = 16)
Эластаза (нг/мл)	57,8 (16,0; 66,5)	99,9 (79,2; 134,9) Z = 3,1; p = 0,002*	206,1 (119,3; 265,4) Z = 3,8; p = 0,000* Z = 2,6; p ₁ = 0,008*	199,4 (137,7; 271,9) Z = 3,8; p = 0,000* Z = 2,8; p ₁ = 0,004* Z = 0,2; p ₂ = 0,81
МРО (нг/мл)	71,1 (66,7; 80,3)	84,8 (79,8; 92,9) Z = 2,9; p = 0,004*	102,7 (92,2; 142,3) Z = 3,9; p = 0,000* Z = 2,4; p ₁ = 0,01*	111,9 (78,4; 122,6) Z = 3,2; p = 0,002* Z = 1,9; p ₁ = 0,05* Z = 0,4; p ₂ = 0,68
MMP-2 (нг/мл)	190,0 (184,9; 198,1)	196,4 (147,1; 257,4) Z = 0,3; p = 0,75	152,4 (138; 177,4) Z = 2,6; p = 0,01* Z = 1,6; p ₁ = 0,11	162,9 (140,2; 195,9) Z = 2,0; p = 0,044* Z = 1,2; p ₁ = 0,27 Z = 1,1; p ₂ = 0,29

Примечание. p – значение различий по сравнению со здоровыми;

p₁ – значение различий по сравнению с больными неосложненным гриппом;

p₂ – значение различий по сравнению с больными пневмонией средней степени тяжести;

Z – коэффициент Манна–Уитни; * – значимые различия.

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТОВ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ГРИППА А/Н1N1 (Ме [25-Й; 75-Й])

Ингибитор	Здоровые (n = 16)	Неосложненный грипп (n = 16)	Пневмония (n = 20)	ОРДС (n = 16)
СС16 (нг/мл)	18,2 (15,7; 20,4)	19,3 (15,7; 26,8) Z = 0,6; p = 0,55	20,2 (16,5; 21,6) Z = 1,0; p = 0,28 Z = 0,1; p ₁ = 0,9	8,5 (6,6; 11,8) Z = 4,7; p = 0,000* Z = 4,1; p ₁ = 0,000* Z = 5,0; p ₂ = 0,000*
HSP-70 индуцибельный (нг/мл)	0,13 (0,1; 0,5)	0,85 (0,4; 0,9) Z = 2,9; p = 0,004*	0,88 (0,7; 0,9) Z = 3,4; p = 0,000* Z = 0,3; p ₁ = 0,75	0,82 (0,5; 1,3) Z = 2,8; p = 0,004* Z = 1,2; p ₁ = 0,21 Z = 0,5; p ₂ = 0,60

Примечание. p – значение различий по сравнению со здоровыми;

p₁ – значение различий по сравнению с больными неосложненным гриппом;

p₂ – значение различий по сравнению с больными пневмонией средней степени тяжести;

Z – коэффициент Манна–Уитни; * – значимые различия.

МРО в плазме крови также увеличивалось в ряду: здоровые – больные неосложненным гриппом (p = 0,004) – пациенты с пневмонией (p = 0,01), а при развитии ОРДС оно оставалось таким же, как и у больных пневмонией средней степени тяжести (p = 0,68). При этом степень роста концентрации МРО была меньшей, чем эластазы: не превышала 50% от содержания фермента у здоровых.

Количество ММР-2 у пациентов с неосложненным гриппом оставалось таким же, как у здоровых лиц (p = 0,75), при присоединении пневмонии (p = 0,01), а также при развитии ОРДС (p = 0,044) оно уменьшалось. Разницы уровней металлопротеиназы в плазме больных пневмонией средней степени тяжести и у пациентов с ОРДС не наблюдалось (p = 0,29).

При параллельном изучении содержания СС16 в плазме крови обнаружено: у пациентов с неосложненной гриппозной инфекцией и больных пневмонией средней степени тяжести оно оставалось на уровне показателей здоровых лиц (p = 0,55 и p = 0,28 соответственно) (табл. 2). При развитии на фоне тяжелой пневмонии ОРДС количество СС16 резко снижалось по сравнению не только со здоровыми, но и страдающими другими формами гриппа (при всех сравнениях p = 0,000). Уровень индуцибельного HSP-70 во всех группах больных был значительно выше (в 6-7 раз), чем у здоровых, но между пациентами с различными формами

вирусной инфекции разницы в содержании протеина не зафиксировано.

Нейтрофильные лейкоциты являются первым эшелонем защиты организма от инфекции трансформированных или поврежденных клеток. Увеличенная адгезия нейтрофилов, ведущая к их гиперактивации, приводит к высвобождению биологически активных соединений во внеклеточное пространство [3, 6], поэтому мы видим рост их концентрации в плазме крови.

При неосложненном гриппе повышение уровня эластазы и МРО уравнивается, в том числе эффектами СС16 в концентрациях, не отличающихся от содержания у здоровых лиц, а также активацией синтеза индуцибельного HSP-70. По всей видимости, одним из механизмов развития пневмонии на фоне гриппозной инфекции является повышение содержания агрессивных лейкоцитарных ферментов (при ней уровень эластазы и МРО выше, чем при неосложненном гриппе), вследствие чего формируется относительная недостаточность локальных ингибиторных систем, в том числе СС16 и HSP-70.

Избыточное скопление ПМЯЛ в легочных капиллярах и паренхиме, наблюдаемое при ОРДС [7], приводит не только к уничтожению возбудителей инфекции (в нашем случае вируса А/Н1N1), оно может повредить компоненты сурфактанта, базальной мембраны альвеол, эндотелиоцитов. Нарушение целостности альвеолярно-капиллярной мембраны при ОРДС на фоне пневмонии происходит не за счет прироста концентраций

эластазы и МРО, а вследствие локального уменьшения содержания СС16 и его защитных свойств, эффектов с участием продолжающегося выделяться HSP-70 в этом случае уже недостаточно.

Необычная динамика содержания ММР-2 при изучаемых процессах, на наш взгляд, объяснима следующими фактами. Несмотря на то, что ММР-2 называют нейтрофильной желатиназой, в ряде исследований установлено, что она прежде всего экспрессируется фибробластами в период активной регенерации ткани [12, 15]. Основным субстратом этого фермента является коллаген базальных мембран (IV типа), с интерстициальным коллагеном он не взаимодействует. Есть данные, что ММР-2 активирует трансформирующий фактор роста β (TGF- β), высвобождая его из матрикса [15], кроме того, инактивирует важнейший провоспалительный цитокин IL-1 β [14]. В связи с этим ММР-2 нельзя однозначно отнести к повреждающим БАВ, так как она способна в очаге воспаления оказывать значимые протективные эффекты. ММР-2 может препятствовать адгезии ПМЯЛ к эндотелию и их гиперактивации (нивелируются свойства IL-1 β), а также опосредованно привлекать в очаг моноциты крови (TGF- β является их хемоаттрактантом). Уменьшение количества ММР-2, обнаруженное нами, вероятно, является одним из механизмов развития осложнений гриппа, так как способствует нарушению смены субпопуляций лейкоцитов в очаге воспаления легочной паренхимы: нейтрофилы кумулируются, а миграция макрофагов тормозится. В итоге в локусе воспаления становится невозможной полноценная регенерация поврежденных структур.

Заключение

Одним из механизмов формирования пневмонии при гриппе является повышение уровня нейтрофильной эластазы и МРО, с возникновением относительного дефицита белка клеток Клара; а также уменьшение концентрации ММР-2. Снижение содержания СС16 в плазме крови – важнейшее звено развития ОРДС при тяжелых формах гриппозной пневмонии – может служить одним из предикторов развития синдрома.

Список литературы

1. Аверьянов А.В., Поливанова А.Э. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания // Пульмонология. – 2006. – № 5. – С. 74-79.
2. Боркина А.Н. Роль клеток Клара в гистофизиологии бронхиального эпителия и их значение в развитии легочной патологии // Пульмонология. – 2007. – № 5. – С. 94-99.
3. Галкин А.А., Демидова В.С. Роль адгезии в активации нейтрофилов и цитотоксическом взаимодействии нейтрофилов с эндотелием // Успехи современной биологии. – 2011. – Т. 131, № 1. – С. 62-78.
4. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 2. – С. 130-137.
5. Малайцев В.В., Богданова И.М., Макарова О.В. Белки теплового шока и их роль в развитии патологических процессов // Архив патологии. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 31-38.
6. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 6. – С. 467-474.
7. Мороз В.В., Власенко А.В., Голубев А.М., Яковлев В.Н., Алексеев В.Г., Булатов Н.Н., Смелая Т.В. Дифференцированное лечение острого респираторного дистресс-синдрома, обусловленного прямыми и непрямыми этиологическими факторами // Общая реаниматология. – 2011. – Т. VII, № 4. – С. 5-15.
8. Об усилении мероприятий в группах риска в период пандемического распространения гриппа. Письмо Роспотребнадзора № 01/16326-9-23 от 01.11.2009.
9. Павлов К.А., Дубова Е.А., Мишнев О.Д., Щеголев А.И. Медиаторные взаимодействия при остром респираторном дистресс-синдроме // Общая реаниматология. – 2007. – Т. III, № 5-6. – С. 208-212.
10. Родина Н.Н., Скрипченко Е.М., Дорожкова А.А. Клинико-эпидемиологическая характеристика гриппа А (H1N1)/09 // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Итоги эпидемии гриппа А/H1N1». – Чита, 2010. – С. 65-167.
11. Романова Л.К., Горячкина В.Л. Цитофизиология секреторных бронхиолярных клеток легкого – источника «антимедиаторов» воспаления // Архив патологии. – 1999. – Т. 61, № 2. – С. 20-27.
12. Шойхет Я.Н., Кореновский Ю.В., Мотин Ю.Г., Лепилов А.В., Лель Н.В. Роль матриксных металлопротеиназ при воспалительных заболеваниях легких // Проблемы клинической медицины. – 2008. – № 3 (15). – С. 99-101.
13. Bromberg Z., Raj N., Goloubinoff P., Deutschman C.S., Weiss Y.G. Enhanced expression of 70-kilodalton heat shock protein limits cell division

in a sepsis-induced model of acute respiratory distress syndrome // Crit. Care Med. – 2008. – Vol. 36 (1). – P. 246-255.

14. Hiller O. Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3 and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 8-13.

15. Mohammed F.F., Smookler D., Khokha R. Metalloproteinases, inflammation and rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – Vol. 62, Suppl. (II). – P. 1143-1147.

*поступила в редакцию 16.01.2012
отправлена на доработку 29.01.2012
принята к печати 02.02.2012*