

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ФАГОЦИТАРНОГО
ЗВЕНА ИММУНИТЕТА ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКЕ
С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ**

© Г.М. Хасанова¹, А.С. Свирина³, З.Р. Камаева²,
Л.Д. Хабибуллина², Д.Н. Хасанов¹

¹*Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия*

²*Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан,
г. Уфа, Россия*

³*ГБУЗ Республиканская клиническая инфекционная больница №4,
г. Уфа, Россия*

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - острое природно-очаговое вирусное заболевание, которое вызывается вирусами рода Hantavirus. Согласно данным научной литературы ведущая роль в патогенезе ГЛПС принадлежит не хантавирусу, а инициации им иммунного ответа, приводящего к развитию деструктивных процессов. Факторы врожденного иммунитета включаются в защиту первыми после внедрения микроорганизма. Одним из ранних признаков активации фагоцитоза является резкое увеличение потребления кислорода, интенсификация гексозомонофосфатного пути и образования свободных радикалов. Продукция активных форм кислорода фагоцитами имеет важное значение для осуществления завершеного фагоцитоза.

Целью исследования явилось изучение емкости резерва функциональной активности фагоцитов у больных ГЛПС в различные

периоды заболевания при среднетяжелой и тяжелой форме ГЛПС. Обследовано 148 больных ГЛПС. Функциональную активность фагоцитов оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции на приборе хемилуминомер «ХЛМ-003». Выявили зависимость между емкостью резерва функциональной активности фагоцитов в зависимости от периода и тяжести ГЛПС.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, емкость резерва функциональной активности фагоцитов.

FUNCTIONAL POSSIBILITIES OF PHAGOCYtic LINK OF IMMUNITY IN HEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME

© G.M. Khasanova¹, A.S. Svirina³, Z.R. Kamaeva²,
L.D. Khabibullina², D.N. Khasanov¹

¹*Bashkir State Medical University, Ufa, Russia*

²*Rospotrebnadzor Administration for the Republic of Bashkortostan,
Ufa, Russia*

³*GBUZ Republican Clinical Infectious Diseases Hospital No. 4, Ufa, Russia*

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is an acute natural focal viral disease caused by viruses of the genus Hantavirus. According to scientific literature, the leading role in the pathogenesis of HFRS belongs not to the hantavirus, but to the initiation of an immune response by it, leading to the development of destructive processes. The factors of innate immunity are included in the defense first after the introduction of the microorganism. One of the early signs of phagocytosis activation is a sharp increase in oxygen consumption, an intensification of the hexose-monophosphate pathway and the formation of free radicals. The production of reactive oxygen species by phagocytes is essential for the implementation of complete phagocytosis.

The aim of the study was to study the capacity of the reserve of functional activity of phagocytes in patients with HFRS in different periods of the disease with moderate and severe forms of HFRS. 148 patients with HFRS were examined. The functional activity of phagocytes was assessed by the method of luminol-dependent chemiluminescence on a chemiluminescence device "KhLM-003". Revealed the relationship between the capacity of the reserve of functional activity of phagocytes, depending on the period and severity of HFRS.

Key words: *hemorrhagic fever with renal syndrome, capacity of the reserve of functional activity of phagocytes.*

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) - острое природно-очаговое вирусное заболевание, которая вызывается вирусами рода Hantavirus, характеризующееся системным поражением мелких сосудов, геморрагическим диатезом, гемодинамическими расстройствами и поражением почек с развитием острой почечной недостаточности (ОПН) [1, 2]. Концепция о ведущей роли иммунных реакций в патогенезе вирусных инфекций получила всеобщее признание. Согласно рабочей гипотезе относительно патогенеза хантавирусной инфекции, принятой на Международной конференции 2004 года в Сеуле, ведущая роль принадлежит не хантавирусу, а инициации им иммунного ответа, приводящего к развитию деструктивных процессов [3]. Факторы врожденного иммунитета включаются в защиту единственными, в первые 4 часа после внедрения микроорганизма, и они представлены клеточными (моноциты/макрофаги, нейтрофилы, натуральные киллеры) и гуморальными (естественные иммуноглобулины и комплемент) компонентами.

Одними из ранних признаков активации фагоцитоза являются резкое увеличение потребления кислорода, интенсификация гексозомонофосфатного пути и образования свободных радикалов [4].

Активные формы кислорода (АФК), будучи по природе свободными радикалами, появляются первыми в цепи реакций свободнорадикального окисления и дают начало серии других радикалов – окисленных галогенов, окислов азота, инициируют перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот.

Фагоциты являются основным источником первичных радикалов в организме, в них происходит образование АФК с использованием различных ферментных и неферментных систем. В течение нескольких секунд после антигенного воздействия фагоцитирующие клетки резко увеличивают потребление кислорода, в результате чего образуется супероксидный анион-радикал. Он является пусковым звеном в цепи реакций, приводящих к образованию активированных кислородных метаболитов, например таких токсических производных как пероксинитрит, продуцирующего высоко реакционноспособные гидроксильные радикалы, которые в свою очередь приводят к усилению окислительного стресса [5].

Таким образом, продукция АФК фагоцитами имеет важное значение для осуществления завершеного фагоцитоза. Без преувеличения можно сказать, что способность к генерации активных форм кислорода отражает состояние и функциональные возможности фагоцитарного звена иммунитета [6].

Установлено, что самым информативным методом оценки функционального состояния фагоцитов является регистрация сверхслабого свечения – хемилюминесценции. Хемилюминесцентные методы, отражая процессы генерации свободных радикалов – активных форм кислорода, позволяют характеризовать метаболический профиль фагоцитов, как в норме, так и при патологии [7].

Целью настоящего исследования явилось изучение емкости резерва функциональной активности фагоцитов в зависимости от периода и тяжести течения геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

Материалы и методы

В исследование включили 148 больных, находившихся на стационарном лечении в МУ «Городская клиническая больница № 13» г. Уфы с серологически подтвержденным методом непрямым флюоресцирующим антител диагнозом ГЛПС, из них 119 мужчин (82,1%), и 26 женщин (17,9%). Возраст обследованных 14-55 лет (средний возраст $37,4 \pm 2,6$ лет). Из исследования исключались те лица, которые до заболевания ГЛПС имели болезни почек, печени, сердечно-сосудистой системы, нервной системы, эндокринологические и онкологические заболевания. При определении степени тяжести заболевания использовали классификацию Сиротина Б.З. [8]. Среднетяжелая форма выявлена у 73 больных (50,3%), тяжелая – у 62 больных (49,7%). Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту. Методика исследования хемилюминесценции цельной крови: венозная кровь отбирается в пластиковую пробирку (в стеклянной активизируется дыхательный взрыв фагоцитов), с предварительно налитым раствором гепарина. Регистрацию свечения проводили на приборе хемилюминомер «ХЛМ-003». Интенсивность генерации фагоцитами АФК определяли с помощью регистрации уровня люминол-зависимой хемилюминесценции. Изучая ХЛ ответ фагоцитов крови на стимулятор фагоцитоза (зимозан), представлялось целесообразным исследовать резервные возможности фагоцитирующих клеток крови. В качестве наиболее информативных показателей ХЛ были взяты светосумма спонтанная и стимулированная $S_{сп}$ и $S_{стим}$, а так же спонтанная и стимулированная максимальная амплитуда медленной вспышки ($I_{сп}$ и $I_{стим}$). Для оценки емкости резерва функциональной активности фагоцитов крови, применялась формула, показывающая кратность отношения резерва к спонтанному свечению: $X = (I_{стим} - I_{сп}) / I_{сп}$, где X – соотношение резерва функциональной активности к спонтанному свечению фагоцитов крови; $I_{стим}$ – максимальная интенсивность индуцированного свечения крови, $I_{сп}$ –

максимальная интенсивность спонтанного свечения крови. Исследование проводилось в Центральной научной исследовательской лаборатории БГМУ. Параллельно с исследованием люминол-зависимой хемилюминесценции цельной крови изучали содержание микроэлементов в плазме крови. Оценивали концентрацию цинка, меди, селена, алюминия, свинца, ртути, кадмия, стронция с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS; Elan-9000, PerkinElmer, США) и атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-OES; Optima-2000 DV, PerkinElmer, США). Исследование проводили в лаборатории АНО «Центр биотической медицины» в г. Москве.

Математическую обработку результатов исследования проводили с использованием стандартного статистического пакета программ Statistica 7.0 for Windows. Среднее значение M и ошибку среднего значения m вычисляли в Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Исследование состояния функциональной активности фагоцитов путем регистрации спонтанного и индуцированного зимозаном люминолзависимого свечения цельной крови проводилось в зависимости от степени тяжести ГЛПС и периода заболевания. Полученные результаты представлены в таблицах 1 и 2. В лихорадочный период у больных ГЛПС среднетяжелой и тяжелой формами отмечается повышение генерации активных форм кислорода, что проявляется в увеличении светосуммы и величины пика спонтанной хемилюминесценции цельной крови ($S_{сп} 12,51 \pm 1,2$ у.е., $I_{сп} 2,88 \pm 0,4$ у.е. и $S_{сп} 16,2 \pm 2,4$ у.е., $I_{сп} 4,1 \pm 0,2$ у.е. соответственно). Однако у больных тяжелой формы ГЛПС емкость резерва функциональной активности фагоцитов достоверно ниже, чем у больных средней тяжести ($5,44 \pm 0,4$ у.е. и $12,3 \pm 0,3$ у.е. соответственно, $p < 0,01$).

В олигурический период продолжается повышение светосуммы и максимальной амплитуды медленной вспышки спонтанной хемилюминесценции цельной крови, как при среднетяжелой, так и при

тяжелой форме ГЛПС ($S_{\text{сп}} 17,7 \pm 2,3$ у.е., $I_{\text{сп}} 3,86 \pm 0,2$ у.е. и $S_{\text{сп}} 19,4 \pm 1,6$ у.е., $I_{\text{сп}} 4,6 \pm 0,1$ у.е. соответственно), а индекс индукции фагоцитоза снижался. Наиболее выраженное падение емкости резерва функциональной активности фагоцитов отмечается в олигурическом периоде тяжелой формы ГЛПС ($2,85 \pm 0,1$ у.е.). В полиурическом периоде отмечается снижение светосуммы и максимальной амплитуды медленной вспышки спонтанной и индуцированной хемилюминесценции при среднетяжелой и тяжелой форме ГЛПС ($S_{\text{сп}} 11,04 \pm 1,3$ у.е., $I_{\text{сп}} 2,4 \pm 0,3$ у.е. и $S_{\text{сп}} 14,7 \pm 1,3$ у.е., $I_{\text{сп}} 3,2 \pm 0,2$ у.е. соответственно), а индекс индукции повышался. Емкость резерва функциональной активности фагоцитов в полиурический период была достоверно ниже, чем в контрольной группе ($p < 0,01$), особенно при тяжелой форме ГЛПС.

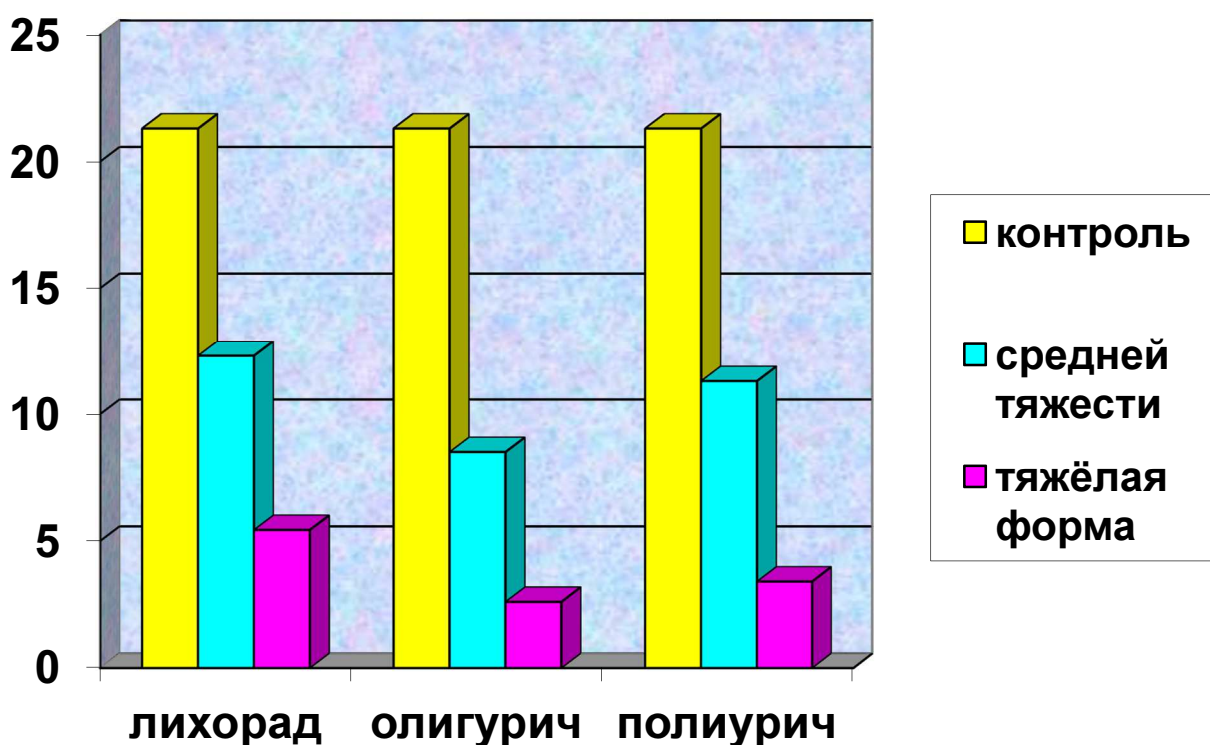


Рис. Ёмкость резерва функциональной активности ПМЛ у больных ГЛПС среднетяжёлой и тяжёлой формы.

В качестве примера приводим клиническое наблюдение.

Больная В., 44 года, медицинская карта № 6281, находилась на лечении в Городской клинической больнице №13 г. Уфы с 23.07.2010г. по 17.08.2010г. с диагнозом: ГЛПС, тяжёлая форма.

Поступила на 4 день болезни. Заболела остро 20 июля, с повышением температуры до 39°C, появлением слабости, головной боли. 21, 22 июля беспокоили сильная слабость, лихорадка до 39-40°C, головная боль, головокружение, тошнота. 23.07. ухудшилось зрение, появились боли в пояснице, сухость во рту. 23.07. после осмотра участковым врачом направлена на стационарное лечение в ГКБ №13.

При поступлении состояние тяжёлое, сознание ясное, вялая. Температура тела – 38,9°C. Гиперемия кожи лица, шеи, верхней половины туловища. Выраженная инъецированность сосудов склер, гиперемия конъюнктив. Слизистая оболочка ротоглотки гиперемирована, энантема на мягком небе. Над лёгкими жесткое дыхание. Число дыханий – 18 в минуту. Тоны сердца приглушены, ритмичные. Пульс 80 ударов в минуту, артериальное давление – 110/70 мм.рт.ст. Язык суховат, густо обложен белым налётом. Живот умеренно вздут, при пальпации болезненный в области проекции почек. Печень выступает ниже края реберной дуги на 2 см. Симптом поколачивания по поясничной области положительный с обеих сторон. Стул 1 раз кашицеобразный, мочи за сутки выделено 700 мл.

Лабораторные показатели: 23.07. (4 день болезни) общий анализ крови – эритроциты 4,5x10¹²/л, Нб 137 г/л, тромбоциты 250x10⁹/л, лейкоциты 5,0x10⁹/л, палочкоядерные – 10%; сегментоядерные – 65%; лимфоциты – 17%; моноциты – 8%, СОЭ 9 мм/ч.

Общий анализ мочи (4 день болезни) – относительная плотность 1003, белок 0,676%, эритроциты - сплошь в поле зрения, цилиндры гиалиновые 1-2 в поле зрения, цилиндры зернистые 2-3 в поле зрения, слизь++.

Биохимический анализ крови (4 день болезни) – мочевины 12,1 ммоль/л, креатинин 199 мкмоль/л.

Показатели хемилюминесценции цельной крови на 4 день болезни: светосумма спонтанная – 17,3; светосумма стимулированная – 110,4; максимальная амплитуда медленной вспышки спонтанной хемилюминесценции цельной крови – 4,2; максимальная амплитуда медленной вспышки хемилюминесценции цельной крови, стимулированной зимозаном – 26,5; ёмкость резерва функциональной активности фагоцитов – 5,3.

Состояние в динамике продолжало ухудшаться, усилились боли в пояснице, стали мучительными, появилась икота, бессонница, количество мочи уменьшилось до 150 мл в сутки, несмотря на проводимую патогенетическую и симптоматическую терапию.

Лабораторные показатели: 27.07. (8 день болезни) общий анализ крови – эритроциты $4,2 \times 10^{12}$ /л, Hb 128 г/л, лейкоциты $10,7 \times 10^9$ /л, тромбоциты 109×10^9 /л, СОЭ 28 мм/ч.

Общий анализ мочи (8 день болезни) – относительная плотность 1002, белок 3,3%, эритроциты – 8-10 в поле зрения, цилиндры гиалиновые 3-4 в поле зрения, цилиндры зернистые 10-12 в поле зрения.

Биохимический анализ крови (8 день болезни) – мочевины 37,5 ммоль/л, креатинин 985 мкмоль/л.

Показатели хемилюминесценции цельной крови на 8 день болезни: светосумма спонтанная – 19,7; светосумма стимулированная – 118,8; максимальная амплитуда медленной вспышки спонтанной хемилюминесценции цельной крови – 4,2; максимальная амплитуда медленной вспышки хемилюминесценции цельной крови, стимулированной зимозаном – 17,2; ёмкость резерва функциональной активности фагоцитов – 3,1.

На 9 день болезни больная была переведена в реанимацию с диагнозом: ГЛПС, тяжёлая форма, олигурический период. Осложнение ОПН.

Таким образом, в приведенном клиническом примере заболевание протекало в тяжёлой форме и осложнилось развитием ОПН.

Показатели хемилюминесценции цельной крови характеризовали снижение функциональной возможности фагоцитарного звена иммунитета. Примечательно то, что уже в лихорадочном периоде ёмкость резерва функциональной активности фагоцитов была значительно ниже, чем в контрольной группе ($21,7 \pm 0,6$).

Выводы

1. У больных ГЛПС происходит снижение ёмкости резерва функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов в зависимости от периода и тяжести заболевания.

2. Наименьшие показатели ёмкости резерва функциональной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов отмечаются в олигурическом периоде тяжёлой формы ГЛПС.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№16-04-20105).

ЛИТЕРАТУРА

1. Хасанова Г.М. Комплексная реабилитация больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом - монография. - Уфа: Изд-во БашГУ. - 2011. – 272 с.

2. Хасанова Г.М., Тутельян А.В., Валишин Д.А. Иммунопатогенез и иммунокоррекция геморрагической лихорадки с почечным синдромом: монография - Уфа: Изд-во БашГУ. - 2012. – 158 с.

3. Vaheri A. Pathogenesis and immune response in hantavirus infections / A. Vaheri, X.D. Li, S. Kukkonen [et al.] // 6-th International

Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. – Seoul (Korea), 2004. – P. 21.

4. Parment K. Long-term immunosuppression in burned patients assessed by in vitro neutrophil oxidative burst (Phagoburst) / K. Parment, A. Zetterberg, J. Ernerudh [et al.] // *Burns*. – 2007. – Vol. 33, № 7. – P. 865- 871.

5. Parment K. Long-term immunosuppression in burned patients assessed by in vitro neutrophil oxidative burst (Phagoburst) / K. Parment, A. Zetterberg, J. Ernerudh [et al.] // *Burns*. – 2007. – Vol. 33, № 7. – P. 865-871.

6. Bilitewski U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system / U. Bilitewski // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – Vol. 391, № 5. – P. 1545- 1554.

7. Guzik T.J. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence / T.J. Guzik, K.M. Channon // *Methods Mol. Med.* – 2005. – Vol. 108. – P. 73- 89.

8. Сиротин Б.З. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом / Б.З. Сиротин. – Хабаровск, - 1994. – 302 с.

REFERENCES

1. Khasanova G.M. Comprehensive rehabilitation of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome - monograph - Ufa: BashGU.- 2011. – 272 s. (In Russ)

2. Khasanova G.M., Tutel'yan A.V., Valishin D.A. Immunopathogenesis and immunocorrection of hemorrhagic fever with renal syndrome: monograph - Ufa: BashGU. - 2012. – 158 s. (In Russ)

3. Vaheri A. Pathogenesis and immune response in hantavirus infections / A. Vaheri, X.D. Li, S. Kukkonen [et al.] // 6-th International Conference on Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Hantavirus Pulmonary Syndrome and Hantaviruses. – Seoul (Korea), 2004. – P. 21.

4. Parment K. Long-term immunosuppression in burned patients

assessed by in vitro neutrophil oxidative burst (Phagoburst) / K. Parment, A. Zetterberg, J. Ernerudh [et al.] // *Burns*. – 2007. – Vol. 33, № 7. – P. 865- 871.

5. Parment K. Long-term immunosuppression in burned patients assessed by in vitro neutrophil oxidative burst (Phagoburst) / K. Parment, A. Zetterberg, J. Ernerudh [et al.] // *Burns*. – 2007. – Vol. 33, № 7. – P. 865- 871.

6. Bilitewski U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system / U. Bilitewski // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2008. – Vol. 391, № 5. – P. 1545-1554.

7. Guzik T.J. Measurement of vascular reactive oxygen species production by chemiluminescence / T.J. Guzik, K.M. Channon // *Methods Mol. Med.* – 2005. – Vol. 108. – P. 73-89.

8. Sirotin B.Z. Gemorragicheskaya lihoradka s pochechnym sindromom (Hemorrhagic fever with renal syndrome) / B.Z. Sirotin. – Habarovsk, - 1994. – 302 s. (In Russ)