

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ
КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА ПРИ РАЗВИТИИ ОСТРОГО
РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА ТОКСИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ**

Пугач В.А., Строкина Е.И., Исаева А.А., Сапкина Е.В., Тюнин М.А., Гоголевский А.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение

*«Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Санкт-Петербург,
ул. Лесопарковая д. 4, телефон/факс 8-812-775-02-41, gniiivm_2@mil.ru*

Резюме. В экспериментальной модели липополисахарид-индуцированного острого респираторного дистресс-синдрома у крыс исследовано состояние коагуляционного гемостаза в течение первых суток после воздействия этиологического фактора. Установлено, что развитие острого респираторного дистресс-синдрома сопровождается гиперкоагуляцией, которая характеризуется активацией внешнего пути образования протромбиназы, гиперфибриногенемией, увеличением уровня растворимых фибрин-мономеров, а также тенденцией к угнетению активности системы естественных антикоагулянтов. Полученные результаты значимы для обоснования использования антикоагулянтной терапии с целью коррекции гемостазиологических нарушений в ранние сроки развития острого респираторного дистресс-синдрома и разработки методов лабораторной диагностики.

Ключевые слова: острый респираторный дистресс-синдром, пульмонотоксичность, липополисахарид, гемостаз, клоттинговые тесты, гиперкоагуляция, ранняя диагностика.

**EXPERIMENTAL STUDY OF COAGULATION HEMOSTASIS IN THE
DEVELOPMENT OF AN ACUTE RESPIRATORY DISTRESS-SYNDROME OF TOXIC
ETIOLOGY**

Pugach V.A., Strokina E.I., Isaeva A.A., Sapkina E.V., Tyunin M.A., Gogolevskiy A.S.

State Scientific-research Test Institute of the Military Medicine, Russian Federation
Defense Ministry, Saint-Petersburg, Russia.

Abstract. In an experimental model of a lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress-syndrome in rats the coagulation hemostasis during the first day following exposure has been studied. It has been found that acute respiratory distress-syndrome is accompanied by activation of extrinsic pathway of blood coagulation, hyperfibrinogenemia, elevated level of

soluble fibrin monomer complexes and tendency to natural anticoagulant activity suppression. The findings are significant for justification of anticoagulant therapy of hemostatic disorders in acute respiratory distress-syndrome and for development of laboratory diagnostics methods.

Key words: acute respiratory distress syndrome, pulmonotoxicity, lipopolysaccharide, hemostasis, blood clotting tests, hypercoagulation, early diagnostics.

Введение. Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) – критическое состояние, которое характеризуется диффузным воспалительным поражением паренхимы легких и проявляется клиническими признаками прогрессирующей дыхательной недостаточности. Наиболее тяжелым течением характеризуется ОРДС при отравлениях веществами пульмонотоксического действия. Особенностью ОРДС в этих условиях является стремительное прогрессирование дыхательной недостаточности в течение 6 – 12 часов, требующее проведения интенсивной терапии и искусственной вентиляции легких [1]. Следует отметить, что при современном уровне развития медицинской помощи летальность при ОРДС, вызванном воздействием пульмонотоксикантов, достигает 50–70 % [2]. Принимая во внимание этот факт, в настоящее время представляет актуальность разработка новых подходов к патогенетической терапии ОРДС токсической этиологии, в числе которых рассматривается коррекция ранних гемостазиологических нарушений [1, 3].

Известно, что развитие ОРДС сопровождается выраженными изменениями в системе гемостаза, которые возникают вследствие нарушения недыхательных функций легких и системного воспалительного ответа [3, 4, 5]. В физиологических условиях продукция атромбогенных факторов эндотелиоцитами сосудов легких преобладает над тромбогенными, обеспечивая высокую плазминовую и низкую тромбопластиновую активность циркулирующей крови [3, 4, 5]. Повреждение эндотелия сосудов при ОРДС является определяющим событием в развитии гемостазиологических нарушений, что проявляется в повышении прокоагулянтной активности крови, а также в угнетении систем фибринолиза и естественных антикоагулянтов [6]. Указанные нарушения в функционировании системы гемостаза вызывают местные (на уровне легких) и системные изменения агрегатного состояния крови.

Известно, что характер системных изменений агрегатного состояния крови зависит, в значительной степени, от тяжести острого повреждения легких. Легкая и средняя степень тяжести сопровождается преимущественно гиперкоагуляционными сдвигами. При тяжелой форме ОРДС наблюдается различная степень выраженности геморрагического

синдрома вследствие стремительного развития коагулопатии потребления [2, 4, 5]. Поэтому назначение патогенетической терапии для коррекции гемостазиологических изменений в ранние сроки ОРДС требует уточнения направленности расстройств в системе гемостаза.

Цель. Экспериментально исследовать состояние коагуляционного гемостаза в ранние сроки развития ОРДС, вызванного воздействием прямого повреждающего фактора.

Материалы и методы. Работа выполнена на 78 взрослых линейных крысах-самцах Wistar, массой тела 250–300 г. (питомник «Рапполово», Ленинградская область). ОРДС моделировали посредством однократного интратрахеального введения липополисахарида (ЛПС) E.coli 055:B5 («Sigma-Aldrich») в среднесмертельной дозе (4 мг/кг) в виде раствора на фосфатно-солевом буфере (PBS) в объеме 0,1 мл на 100 г массы тела. В качестве контроля использовали животных после интратрахеального введения PBS в аналогичном объеме. Животных содержали в условиях вивария с соблюдением основных зоогигиенических норм и правил. Экспериментальную работу проводили в соответствии с требованиями приказа Минздрава России от 01.04.2016 г. №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Через 6, 12 и 24 ч после введения ЛПС у животных отбирали пробы бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ), плазмы крови и ткани легкого. Для оценки выраженности отека легких рассчитывали массовый коэффициент (МК) (отношение массы легочного комплекса к массе животного).

Пробы БАЛЖ получали посредством трёхкратной промывки нижних дыхательных путей стерильным раствором PBS в объёме 5 мл на 250 г массы животного. Из осадка пробы после центрифугирования (10 мин, 3000 об/мин) изготавливали мазки для цитологического исследования (окраска по Романовскому-Гимза). Производили подсчет количества альвеолярных макрофагов, нейтрофильных гранулоцитов, эозинофильных гранулоцитов, лимфоцитов до 200 клеток суммарно, после чего определяли процентное соотношение каждой популяции.

Кровь для исследования показателей коагуляционного гемостаза стабилизировали цитратом натрия (3,2 %), центрифугировали при температуре 20°C (15 минут, 3000 об/мин), после чего отбирали плазму. На полуавтоматическом анализаторе-коагулометре при помощи реагентов «Tcoag» и НПО «Ренам» определяли: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ), уровень фибриногена и

активность антитромбина III. Уровень растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) исследовали в паракоагуляционном фенантролиновом тесте (НПО «Ренам»).

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 в операционной среде Windows 7. При сравнении показателей использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Через 6-8 ч после интратрахеального введения ЛПС у животных наблюдали угнетение общего состояния и появление инспираторной одышки. При цитологическом анализе состава БАЛЖ определяли увеличение относительного количества нейтрофильных гранулоцитов через 12 ч в 2 раза ($p < 0,05$), что свидетельствовало об аккумуляции этих клеток в ткани легких и их выходе в просвет альвеол. Известно, что инфильтрация нейтрофилами паренхимы легких является ключевым звеном в развитии местной воспалительной реакции при ОРДС. Продукция активированными нейтрофилами различных протеаз и оксидативных субстанций в процессе их эмиграции в ткань легких является центральным событием в механизмах нарушения проницаемости аэрогематического барьера на ранних сроках формирования ОРДС [7]. К 24 ч после интратрахеального введения ЛПС помимо прогрессивного повышения числа нейтрофилов в БАЛЖ также определяли увеличение МК легких ($p < 0,05$), что свидетельствовало о развитии отека (таблица 1).

Таблица 1

Показатели массового коэффициента лёгких у крыс на фоне ОРДС, вызванного интратрахеальным введением липополисахарида *E. coli* в дозе ЛД₅₀ (4 мг/кг), Ме [Q1;Q3]

Группа	Массовый коэффициент		
	Через 6 ч	Через 12 ч	Через 24 ч
Контроль	5,02 [4,77;5,39]	6,32 [5,96;6,58]	6,07 [5,49;6,42]
Опыт	5,07 [4,80;5,94]	6,31 [6,20;7,35]	10,30 [8,83;12,55]*
Примечание: * – $p < 0,05$ – различия статистически значимы относительно контрольной группы			

При исследовании динамики АЧТВ статистически значимых изменений не определяли (таблица 2). Через 12 ч и 24 ч выявляли снижение ПВ в среднем на 18 % и увеличение уровня фибриногена в среднем на 35 %. Концентрация РФМК повышалась к 12 ч на 118 % ($p < 0,01$), а к 24 ч на 257 % ($p < 0,01$). Полученные данные свидетельствуют о том, что в патогенез ОРДС вовлекается только внешний путь свертывания крови.

Повышение маркеров тромбообразования (внутрисосудистого свертывания) – РФМК и уровня фибриногена дополнительно свидетельствует о развитии гиперкоагуляционного состояния.

Таблица 2

Показатели коагуляционного гемостаза у крыс на фоне ОРДС, вызванного интратрахеальным введением липополисахарида *E. coli*, Me [Q1;Q3]

Показатели	Срок исследования					
	Через 6 ч		Через 12 ч		Через 24 ч	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
АЧТВ, с	19,0 [17,1;20,6]	20,4 [16,9;21,25]	20,8 [18,6;21,9]	17,5 [16,5;18,3]	18,4 [15,7;19,9]	19,9 [18,3;20,9]
ПВ, с	24,5 [22,7;25,5]	22,5 [21,3;23,6]	25,9 [24,7;26,7]	21,3* [19,9;24,0]	28,0 [25,9;28,4]	23,0* [19,1;23,9]
Фибриноген, г/л	2,9 [2,6;3,4]	3,4 [3,2;3,7]	3,0 [2,9;3,3]	4,1** [3,9;4,2]	3,5 [3,4;3,9]	4,7** [4,6;4,7]
РФМК, г/л x 10 ²	6,8 [6,0;7,5]	8,8 [6,0;11,0]	5,5 [5,0;5,5]	12,0* [11,0;14,0]	7,0 [6,0;9,0]	25,5* [22,0;26,0]
Антитромбин III, %	119,3 [114,2;125,4]	115,9 [99,7;128,2]	110,2 [110,2;131,9]	120,5 [101,4;122,1]	128,3 [122,6;135,6]	101,9 [#] [97,1;122,1]
Примечание: # – p<0,1 – различия статистически значимы относительно контрольной группы * – p<0,05 – различия статистически значимы относительно контрольной группы ** – p<0,01 – различия статистически значимы относительно контрольной группы						

На фоне развития ОРДС отмечено угнетение системы естественных антикоагулянтов, что проявлялось в тенденции к снижению активности антитромбина III через 24 ч (таблица 2).

Выявленные изменения показателей гемостаза указывают на то, что в ранние сроки ОРДС (стадия экссудации) на фоне развития воспалительных процессов и нарастания отека легких преобладают процессы гиперкоагуляции, характеризующиеся прогрессирующим увеличением образования тромбина по внешнему пути, а также депрессией механизмов, ингибирующих коагуляцию. Как известно, стремительное нарастание уровня тромбина на пике фазы гиперкоагуляции приводит к избыточному образованию из фибриногена фибрин-мономерных комплексов, что проявляется в

увеличении концентрации РФМК, а следовательно и в интенсификации процессов внутрисосудистого свертывания.

Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют предположить, что прогрессирующее повышение концентрации РФМК и снижение активности антитромбина III на фоне отека легких следует рассмотреть в качестве ранних биомаркеров гемостазиологических нарушений при ОРДС. Следует также отметить, что совокупные изменения показателей коагуляционного гемостаза могут служить обоснованием для назначения ранней антикоагулянтной терапии.

Заключение. В результате проведенного исследования установлено, что уже через 12 ч после индукции ОРДС возникают значимые гиперкогуляционные сдвиги в системе гемостаза, выраженность которых прогрессирует к 24 ч на фоне развития отека легких. Анализ выявленных изменений в состоянии коагуляционного гемостаза свидетельствует об активации внешнего пути образования протромбиназы, гиперфибриногенемии, увеличения уровня РФМК и тенденции к снижению активности антитромбина III. С учетом выявленных совокупных изменений, компоненты системы гемостаза следует рассмотреть в качестве мишеней для фармакологического воздействия при назначении ранней патогенетической терапии, а изменения показателей коагуляционного гемостаза рекомендовать в качестве лабораторных предикторов развития ОРДС. Актуальным направлением считаем проведение экспериментальных исследований по определению эффективности и безопасности различных антикоагулянтных средств в составе комбинированной терапии на моделях ОРДС токсической этиологии.

Литература

1. Angelini D.J. et al. Chemical warfare agent and biological toxin-induced pulmonary toxicity: could stem cells provide potential therapies? / *Inhal. Toxicol.* 2013. Vol. 25, N 1. P. 37–62. doi: 10.3109/08958378.2012.750406
2. Máca, J. et al. Past and present ARDS mortality rates: a systematic review / *Respiratory care.* 2017. Vol. 62, N 1. P. 113–122. doi: 10.4187/respcare.04716
3. Camprubí-Rimblas M. et al. Anticoagulant therapy in acute respiratory distress syndrome / *Ann. Transl. Med.* 2018. Vol. 6, N 2. P. 36. doi: 10.21037/atm.2018.01.08
4. Blondonnet R., Constantin J.M., Sapin V., Jabaudon M. Pathophysiologic approach to biomarkers in acute respiratory distress syndrome / *Dis. Markers.* 2016. Vol. 2016. ID 3501373. doi:10.1155/2016/3501273

5. Синьков С.В., Заболотских И.Б., Шапошников С.А., Федоренко А.А. Вклад острого повреждения легких в патогенез развития нарушений системы гемостаза / Общая реаниматология. 2008. Т. 4, N 3. С. 9–13 [

6. Millar F.R. et al. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities / Thorax. 2016. Vol. 71, N 5. P. 462–473. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207461

7. Potey P.M., Rossi A.G., Lucas C.D., Doward D.A. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential / J Pathol. 2019. Vol. 247, N 5. P. 672–685. doi: 10.1002/path.5221

Reference

1. Angelini D.J. et al. Chemical warfare agent and biological toxin-induced pulmonary toxicity: could stem cells provide potential therapies? / Inhal. Toxicol. 2013. Vol. 25, N 1. P. 37–62. doi: 10.3109/08958378.2012.750406

2. Máca, J. et al. Past and present ARDS mortality rates: a systematic review / Respiratory care. 2017. Vol. 62, N 1. P. 113–122. doi: 10.4187/respcare.04716

3. Camprubí-Rimblas M. et al. Anticoagulant therapy in acute respiratory distress syndrome / Ann. Transl. Med. 2018. Vol. 6, N 2. P. 36. doi: 10.21037/atm.2018.01.08

4. Blondonnet R., Constantin J.M., Sapin V., Jabaudon M. Pathophysiologic approach to biomarkers in acute respiratory distress syndrome / Dis. Markers. 2016. Vol. 2016. ID 3501373. doi:10.1155/2016/3501273

5. Sinkov S.V., Zabolotskikh I.B., Shaposhnikov S.A., Fedorenko A.A. Implication of Acute Lung Injury in the Pathogenesis of Hemostatic Disorders. Obshhaja reanimatologija=General Reanimatology / 2008. Vol. 4, N 3. P. 9–13. [In Russian]. doi: 10.15360/1813-9779-2012-3-9

6. Millar F.R. et al. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities / Thorax. 2016. Vol. 71, N 5. P. 462–473. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207461

7. Potey P.M., Rossi A.G., Lucas C.D., Doward D.A. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential / J Pathol. 2019. Vol. 247, N 5. P. 672–685. doi: 10.1002/path.5221