

Изменение показателей свертывающей системы крови и неспецифических плазменных протеиназ при развитии синдрома ишемии-реперфузии

Писарев А.А.¹, Петренко В.И.¹, Кубышкин А.В.¹, Харченко В.З.¹, Фомочкина И.И.¹, Кузичкин Д.С.²

¹ Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, Крымский федеральный университет (КФУ) им. В.И. Вернадского

Россия, Республика Крым, 295051, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7

² Государственный научный центр Российской Федерации (ГНЦ РФ), Институт медико-биологических проблем (ИМБП) Российской академии наук (РАН)

Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, 76а

РЕЗЮМЕ

Цель. Определить общие закономерности патогенетических изменений в свертывающей системе крови, неспецифических протеиназ и их ингибиторов при развитии экспериментального синдрома ишемии-реперфузии.

Материалы и методы. Исследование проведено на 48 половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 180–200 г. Модель синдрома ишемии-реперфузии создавали наложением резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки сроком на 6 ч. Реваскуляризацию производили через 6, 12 и 24 ч после наложения жгутов. Оценивали состояние внутреннего и внешнего путей свертывания крови, активность неспецифических протеиназ и их ингибиторов.

Результаты. Показатели свертывающей системы крови свидетельствуют о развитии гипокоагуляционных изменений по мере удлинения времени реперфузии. Выявлено повышение значения протромбинового времени (ПВ) на 112,0% ($p = 0,0142$) и увеличение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на 170,0% ($p = 0,0147$) к 6-му ч реперфузии по сравнению с группой контроля. К 12-м ч реперфузии протромбиновое время возрастало до 174,2% ($p = 0,0389$), АЧТВ – в 4,95 раза ($p = 0,0002$), а растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) – на 121,3% ($p = 0,0300$). Длительность реперфузионного периода до 24 ч характеризовалась сохранением высоких значений ПВ и АЧТВ, РФМК с повышением содержания антитромбина III – на 11,4% ($p = 0,0371$) и снижением протеина С на 71,4% ($p = 0,0071$). Изменение показателей неспецифических протеиназ и их ингибиторов характеризовалось ростом активности трипсиноподобных протеиназ в 2,8 раза ($p < 0,001$) по отношению к контролю, а также снижением антитриптической активности и уровня кислотостабильных ингибиторов в 2,2 раза ($p < 0,001$) с максимумом через 24 ч реперфузии. Выявлена прямая корреляционная связь между показателями, характеризующими дефицит факторов системы свертывания, и снижением антипротеиназного потенциала.

Заключение. На основании результатов исследования показателей системы свертывания крови и неспецифических протеиназ при развитии синдрома ишемии-реперфузии установлено, что нарушения в системе гемостаза характеризуются развитием гипокоагуляции на фоне роста активности трипсиноподобных протеиназ и снижения уровня их ингибиторов. Установленные изменения могут быть связаны с развитием дефицита факторов свертывания и ингибиторов протеиназ и иметь общие механизмы развития.

Ключевые слова: свертывающая система крови, синдром ишемии-реперфузии, неспецифические протеиназы.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

✉ Кубышкин Анатолий Владимирович, e-mail: kubyshkin_av@mail.ru.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке Программы развития ФГАВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» на 2015–2024 гг. в рамках реализации академической мобильности по проекту «Сеть академической мобильности «Развитие научных исследований в области экспериментальной медицины – РНИЭМ», а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований «Механизмы участия провоспалительных и апоптотических факторов в инициации повреждения органов при экстремальных состояниях», проект № 17-415-92010р_а.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комитетом по этике ФГАОУ ВО «КФУ имени В.И. Вернадского» (протокол № 2 от 11.09.2015).

Для цитирования: Писарев А.А., Петренко В.И., Кубышкин А.В., Харченко В.З., Фомочкина И.И., Кузичкин Д.С. Изменение показателей свертывающей системы крови и неспецифических плазменных протеиназ при развитии синдрома ишемии-реперфузии. *Бюллетень сибирской медицины.* 2020; 19 (3): 67–75. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-3-67-75>.

Changes in the blood coagulation system and non-specific plasma proteinases in ischemia-reperfusion injury

Pisarev A.A.¹, Petrenko V.I.¹, Kubyshkin A.V.¹, Kharchenko V.Z.¹, Fomochkina I.I.¹, Kuzichkin D.S.²

¹ *Medical Academy named after S.I. Georgievsky, V.I. Vernadsky Crimean Federal University 5/7, Lenin Boul., Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation*

² *State Scientific Center of the Russian Federation, Institute of Medical and Biological Problems of Russian Academy of Sciences 76a, Khoroshevskoe Highway, Moscow, Russian Federation*

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the general patterns of pathogenetic changes in the blood coagulation system and in non-specific proteinases and their inhibitors during the development of experimental ischemia-reperfusion injury.

Materials and methods. The study was conducted on 48 male Wistar rats (180–200 g). We used a model of ischemia-reperfusion injury achieved by applying rubber tourniquets to both hind limbs at the inguinal fold level for 6 hours. Revascularization was performed for 6, 12, or 24 hours following the application of tourniquets, after which we examined the state of the internal and external blood coagulation pathways and the activity of non-specific proteinases and their inhibitors.

Results. Indicators of blood coagulation system change show the development of blood hypocoagulation changes as the reperfusion time increases. By the 6th hour of reperfusion, the prothrombin time (PT) was lengthened by 112.0% ($p = 0.0142$) and the activated partial thromboplastin time (APTT) by 170.0% ($p = 0.0147$) compared with values in the control group. By the 12th reperfusion hour, the PT was lengthened by 174.2% ($p = 0.0389$), and the APTT increased 4.9-fold ($p = 0.0002$). When the reperfusion period was increased to 24 hours, it was characterized by lengthened PT and APTT, accompanied by an increase in antithrombin III by 11.5% ($p = 0.0371$) and a decrease in protein C by 71.4% ($p = 0.0071$). Changes in the non-specific proteinases and their inhibitors were characterized by a 2.8-fold increase in the trypsin-like proteinase activity ($p < 0.001$) relative to the control, as well as a 2.2-fold decrease in antitrypsin activity and acid-stable inhibitors ($p < 0.001$), which reached a maximum after 24 hours of reperfusion. A direct correlation was found between indicators characterizing the deficiency of coagulation system factors and a decrease in antiproteinase potential.

Conclusion. Hemostatic system disorders are characterized by the development of hypocoagulation during ischemia-reperfusion injury as the result of an increase in the trypsin-like proteinase activity and a decrease in the levels of inhibitors. The established changes may be associated with the deficiency of coagulation factors and proteinase inhibitors and share common pathogenic mechanisms.

Key words: blood coagulation, ischemia-reperfusion injury, non-specific proteinases.

Conflict of interest. Authors declare no actual or potential conflict of interest related to publication of this manuscript.

Source of financing. The study was conducted with support of 2015-2024 V.I. Vernadsky Crimean Federal University Development program in line with the realization of “Network of Academic Mobility” project “The Development of Scientific Research in Experimental Medicine” and with the support of Russian Foundation for Basic Research (project № 17-415-92010p_a)

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the ethics committee at V.I. Vernadsky Crimean Federal University (Protocol No. 2 of 11.09.2015).

For citation: Pisarev A.A., Petrenko V.I., Kubyshekin A.V., Kharchenko V.Z., Fomochkina I.I., Kuzichkin D.S. Changes in the blood coagulation system and non-specific plasma proteinases in ischemia-reperfusion injury. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (3): 67–75. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-3-67-75>.

ВВЕДЕНИЕ

Нарушения в свертывающей системе крови являются одним из факторов, осложняющих течение различных критических состояний. Наряду с синдромом полиорганной недостаточности и формированием синдрома системного воспалительного ответа, нарушения в свертывающей системе, крайним проявлением которых является формирование синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома) [1], существенно влияют на течение основного, сопутствующего, фонового заболевания, эффективность лечения и летальность пациентов. В последнее время врачи различных специальностей все чаще сталкиваются с формированием синдрома ишемии-реперфузии, который встречается в ангиохирургии, трансплантологии, травматологии, различных областях внутренней медицины (инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения), медицине неотложных состояний [1, 2]. Существенное значение в патогенезе синдрома ишемии-реперфузии имеет формирование полиорганной недостаточности, среди проявлений которой одну из ключевых ролей играют нарушения со стороны свертывающей системы, а также неспецифических протеиназ [2, 3].

Повреждение тканей при реперфузионных расстройствах и связанное с ним развитие воспалительной реакции играют важную роль в патогенезе коагуляционных и сосудисто-тромбоцитарных нарушений, поскольку являются одной из причин возникновения эндотелиальной дисфункции, повышения активности тромбоцитов, активации плазменных факторов свертывания, нарушений функций физиологических антикоагулянтов и подавления фибринолитической активности [4]. Указанные нарушения могут варьировать от субклинических форм (локальное венозное тромбообразование) до формирования тяжелых нарушений гемостаза, вплоть до ДВС-синдрома, характеризующегося массивным системным

тромбообразованием с последующим возникновением эпизодов кровотечения вследствие потребления факторов свертывания [5].

Провоспалительные реакции у пациентов с экстремальными состояниями сопровождаются комплексными гуморальными и клеточными взаимодействиями с активацией многочисленных сигнальных путей, включая генерацию или экспрессию тромбина, комплемента, цитокинов, нейтрофилов, молекул адгезии и множества воспалительных медиаторов. Избыточность воспалительных каскадов при неблагоприятном течении основного заболевания приводит к полиорганной дисфункции, которая может проявляться в виде коагулопатии, дисфункции миокарда, дыхательной, почечной недостаточности и нейрокогнитивных дефектов. Коагуляция и воспаление также тесно взаимосвязаны через сети как гуморальных, так и клеточных компонентов, включая факторы свертывания, неспецифические протеиназы и фибринолитические каскады [6, 7]. Несмотря на значительное количество современных отечественных и зарубежных научных трудов, посвященных изучению состояния свертывающей системы и протеолиза при критических состояниях, многие вопросы патогенеза и, как следствие, лечебной тактики остаются дискуссионными.

Учитывая вышеизложенное, целью исследования являются определение общих закономерностей патогенетических изменений в свертывающей системе крови, неспецифических протеиназ и их ингибиторов при развитии экспериментального синдрома ишемии-реперфузии и обоснование этиопатогенетических подходов экспериментальной коррекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 48 белых самцах крыс линии Вистар массой 180–200 г. Животных содержали в стандартных идентичных условиях

(«Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», ГОСТ 33215-2014, ст. 5 Конвенции), что необходимо для создания структурной группы. Исследования и эвтаназия выполнялись в строгом соответствии с государственными и международными нормами о гуманном отношении к животным и соблюдением основных положений нормативно-правовых актов [8–10].

Экспериментальные исследования по изучению патогенетических изменений в свертывающей системе крови, неспецифических протеиназ и их ингибиторов проводили на модели синдрома ишемии-реперфузии, который моделировали путем наложения резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки сроком на 6 ч [3]. Ширина пережатия тканей составила 2–3 мм. Показателями правильности наложения жгута являлись отсутствие отека конечностей и бледность их окраски. Реваскуляризацию производили одномоментно путем рассечения жгутов через 6 ч после их наложения [3]. Посредством простой рандомизации были сформированы следующие экспериментальные группы животных: группа контроля ($n = 15$) – интактные животные; группа реперфузии 6 ч ($n = 12$) – группа 2; группа реперфузии 12 ч ($n = 11$) – группа 3; группа реперфузии 24 ч ($n = 10$) – группа 4. Материалом для исследования служила кровь крыс, которую получали путем выполнения кардиопункции, однократно, объемом 4 мл в одноразовые пробирки вакутейнеры с 0,05 М ЭДТА в течение 10–15 с. Кровь центрифугировали в течение 15 мин при 1 200 г. Эвтаназию животных осуществляли после предварительной наркотизации тиопенталом натрия (40 мг/кг) путем декапитации [11].

Для оценки состояния свертывающей системы определяли следующие показатели: протромбиновое время (ПВ), с; активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), с; концентрация фибриногена (ФБГ), г/л; растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК), мг/л, антитромбин III (АТ III), %; пламиноген (ПГ), %; α 2-антиплазмин (АПЛ), %; протеин С (ПС), %. Показатели гемостаза измеряли на автоматическом коагулометре СА 1500 (Sysmex, Япония) с использованием стандартных коммерческих наборов реактивов (Simens, Германия). Концентрацию ФБГ, ПВ и АЧТВ измеряли клоттинговыми методами. Концентрацию АТ III, АПЛ, ПС и ПГ определяли с помощью хромогенных методов. Содержание РФМК оценивали ручным паракоагуляционным методом с использованием наборов реагентов (Технология-Стандарт, Россия).

Для оценки показателей активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов определяли трип-

синоподобную, эластазоподобную и антитриптическую активности (ТПА, ЭПА, АТА), а также уровень кислотостабильных ингибиторов (КСИ). Изучение активности компонентов протеиназ-ингибиторной системы проводили с использованием энзиматических методов на спектрофотометре Biomat 5 (Великобритания) [12, 13]. ТПА определяли по скорости отщепления N-бензоил-L-аргинина от синтетического субстрата этилового эфира N- α -Benzoil-L-arginine ethyl ester hydrochloride (BAEE) (Sigma, США). Исследование ЭПА проводили на основании изучения скорости гидролиза синтетического субстрата Boc-L-alanine-4-nitrophenil ester (Boc-Ala-ONp) (Sigma, США). Определение АТА проводили на основании торможения расщепления трипсином BAEE. Аналогично изучали активность КСИ после предварительной подготовки сыворотки путем прогревания в кислой среде.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывались методом математической статистики с использованием сертифицированного компьютерного пакета обработки данных MedStat для работы в среде Windows. Определялись основные статистические характеристики: среднее M , ошибка среднего m и стандартное отклонение s . Все показатели выражены количественно, распределение не отличалось от нормального, согласно критерию Шапиро – Уилка [14]. Для сравнения групповых средних в двух группах использовался t -критерий Стьюдента. Результаты статистической обработки показателей системы гемостаза представлены в виде относительных различий с контрольной группой (%). Для оценки степени взаимосвязей проводился корреляционный анализ с вычислением линейного коэффициента корреляции Пирсона, в качестве программы использована программа Microsoft Excel 2016, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенных исследований при анализе свертывающей системы крови крыс с экспериментальным синдромом ишемии-реперфузии выявлена закономерная динамика изменения показателей. Выявленные изменения наблюдаются уже к 6-му ч развития ишемически-реперфузионного повреждения как в показателях внешнего, так и внутреннего пути свертывания крови: повышение значения ПВ – на 112,0% ($p = 0,0142$), удлинение АЧТВ – на 170,0% ($p = 0,0147$) по сравнению с группой контроля (рис. 1). Также при 6-часовой ишемии-реперфузии наблюдалось выраженное снижение уровня АТ III (рис. 2) на 29,6% ($p = 0,0002$), снижение уровня ПГ – на 29,6% ($p = 0,0207$), наряду со снижени-

ем уровня АПЛ крови крыс на 11,7% ($p = 0,0256$) по сравнению с контрольными значениями (рис. 3).

При моделировании синдрома ишемии-реперфузии в течение 12 ч наблюдалось увеличение ПВ на 174,2% ($p = 0,0389$), АЧТВ – в 4,95 раза ($p = 0,0002$)

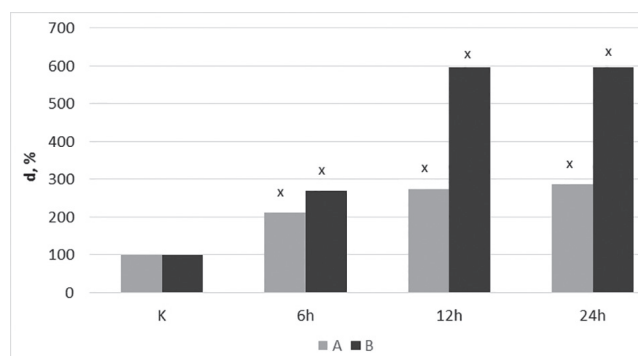


Рис. 1. Протромбиновое время (А) и активированное частичное тромбопластиновое время (В) в группах с различной длительностью (6, 12 и 24 ч) ишемии-реперфузии ($d, \%$) относительно контрольной (К) группы. Здесь и на рис. 2–4: X – различие с контрольной группой (К) по Стьюденту ($p < 0,05$)

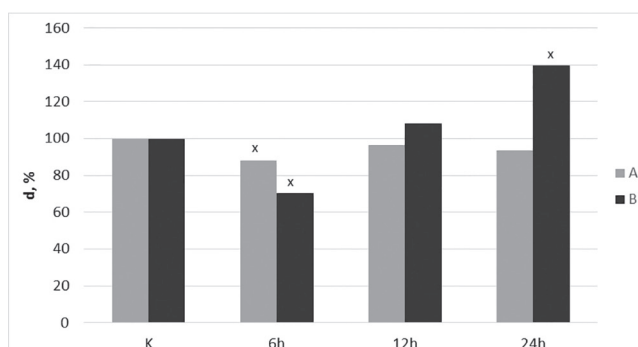


Рис. 3. Уровни плазминогена (А) и антиплазмина (В) в группах с различной длительностью (6, 12 и 24 ч) ишемии-реперфузии ($d, \%$) относительно контрольной (К) группы

Увеличение длительности реперфузионного периода до 24 ч сопровождалось ростом РФМК на 59,6% ($p = 0,0114$), повышением содержания АТ III на 11,5% ($p = 0,0371$), снижением ПС на 71,4% ($p = 0,0071$) (см. рис. 3), увеличением ПГ на 39,8% ($p = 0,0494$), а также максимальным сдвигом следующих показателей: удлинением ПВ на 186,6% ($p = 0,0346$), максимальным ростом АЧТВ – в 4,9 раза ($p = 0,0147$) по сравнению с контрольными величинами.

В целом можно предположить, что в течение 24-часового реперфузионного периода имеет место системное повреждение тканей, которое сопровождается острофазным ответом, представляющим собой реакцию на стрессорное воздействие, на фоне

по сравнению с контрольными показателями. Уровень АТ III при 12-часовой ишемии-реперфузии снизился на 10,4% ($p = 0,0442$). Содержание РФМК увеличилось на 121,3% ($p = 0,0300$) по сравнению с контрольным уровнем (рис. 4).

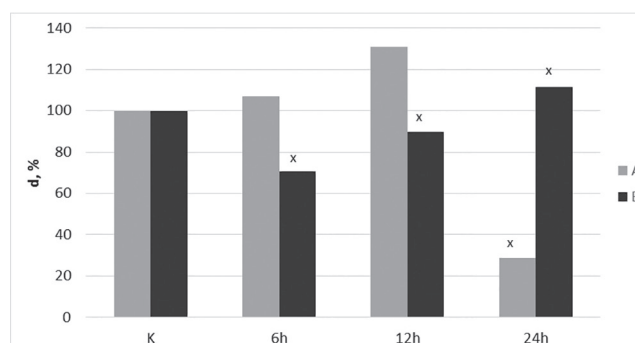


Рис. 2. Уровни протеина С (А) и антитромбина III (В) в группах с различной длительностью (6, 12 и 24 ч) ишемии-реперфузии ($d, \%$) относительно контрольной (К) группы

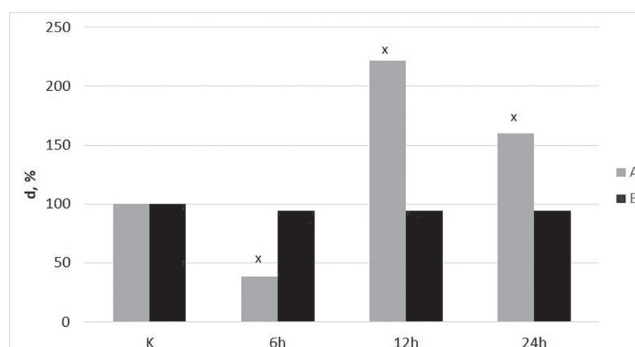


Рис. 4. Уровни растворимых фибрин-мономерных комплексов (А) и фибриногена (В) в группах с различной длительностью (6, 12 и 24 ч) ишемии-реперфузии ($d, \%$) относительно контрольной (К) группы

которого наблюдаются отчетливые признаки развития коагулопатии потребления.

В первые 6 ч наблюдалось снижение активности ПГ. В последующие сроки, вероятно, происходит инактивация плазмينا продуктами фибринолиза и (или) не происходит активации ПГ. Свободный АПЛ также расходуется на связывание с плазмином и принимает участие в реакциях ингибирования неспецифических протеиназ [15]. ПГ и АПЛ тоже являются белками острой фазы, и их уровень растет к 24 ч эксперимента на фоне относительно сниженного потребления вследствие гипокоагуляции.

В первые 6 ч уровень АТ III уменьшается, что вызвано ответной реакцией на активацию процесса

свертывания, однако по мере расходования тромбина и других кофакторов для АТ III (Ха, XIa, IXa), плазменный уровень свободного АТ III начинает расти.

В ходе эксперимента наблюдалась несколько отличная динамика изменения уровня ПС. В отличие от АТ и АПЛ, белков-кофакторов, чей уровень уменьшается сразу после связывания с мишенями, протеин С является ферментом. Тромбин-антитромбиновый комплекс разрушается протеолитическими системами печени в течение нескольких минут; время полувыведения ПС из циркуляции – около 6 ч. Таким образом, в ходе ишемии-реперфузии, по всей вероятности, имеет место быстрое истощение функциональных резервов и развитие гипокоагуляции уже к 6-му ч повреждающего воздействия.

Наряду с изучением динамики показателей свертывающей системы крови в ходе проведения эксперимента исследовали характер сдвигов активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови экспериментальных животных в

зависимости от сроков развития синдрома ишемии-реперфузии. Анализ полученных данных показал следующую динамику изменения активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов (табл. 1). Так, через 6 ч после ревазуляризации конечностей эластазоподобная активность сыворотки крови была ниже контрольных значений в 3,8 раза ($p = 0,0012$), а через 12 ч наблюдалось еще большее понижение, вплоть до значения, которое составило 19,0% от контрольного показателя ($p = 0,0008$). Выраженное снижение ЭПА, по нашему мнению, свидетельствует об активации естественных ингибиторов протеиназ, которые нейтрализуют эластазу, уменьшая ее сывороточную активность в разы. Через 24 ч после развития ишемии-реперфузии наметилась тенденция к росту ЭПА; при этом активность оставалась ниже контрольного параметра в 2 раза ($p = 0,0011$). По-видимому, по истечении 1-х сут после развития ишемии-реперфузии ингибиторный контроль ослабевал, что приводило к повышению протеолитической активности сыворотки крови.

Таблица 1

Изменение протеолитической активности и ингибиторного потенциала крови крыс с моделью ишемически-реперфузионного повреждения в различные сроки наблюдений, $M \pm m$				
Группа	ЭПА, нмоль/мл × мин	ТПА, нмоль/мл × мин	АТА, ИЕ/мл	КСИ, ИЕ/мл
Контроль, $n = 15$	$2,19 \pm 0,14$	$0,26 \pm 0,02$	$34,67 \pm 1,57$	$6,83 \pm 0,30$
Синдром И/Р 6 ч, $n = 12$	$0,57 \pm 0,05$ $p = 0,0012$	$0,50 \pm 0,06$ $p = 0,0006$	$20,61 \pm 1,16$ $p = 0,0009$	$3,18 \pm 0,31$ $p = 0,0009$
Синдром И/Р 12 ч, $n = 11$	$0,41 \pm 0,02$ $p = 0,0008$	$0,73 \pm 0,06$ $p = 0,0011$	$25,76 \pm 1,76$ $p = 0,0743$	$3,39 \pm 0,30$ $p = 0,0012$
Синдром И/Р 24 ч, $n = 10$	$1,10 \pm 0,09$ $p = 0,0011$	$0,46 \pm 0,12$ $p = 0,0472$	$16,02 \pm 0,79$ $p = 0,0004$	$3,08 \pm 0,23$ $p = 0,0007$

Примечание. Здесь и в табл. 2: И/Р – ишемия-реперфузия; ЭПА – эластазоподобная активность; ТПА – трипсиноподобная активность; АТА – антитриптическая активность; КСИ – кислотостабильные ингибиторы; p – статистически значимые корреляционные связи.

Динамика ТПА сыворотки крови при формировании реперфузионного повреждения характеризовалась другими изменениями. Так, через 6 ч после ревазуляризации конечностей значение ТПА стало на 48,0% выше контрольного ($p = 0,0006$), а через 12 ч показатель, достигнув максимального уровня, превысил показатели контроля в 2,8 раза ($p = 0,0011$), что, по-видимому, связано с поступлением в системный кровоток большого количества протеиназ из ранее ишемизированных тканей. В дальнейшем отмечалась тенденция к снижению исследуемого показателя. Так, через 24 ч после реперфузии ТПА, понизившись на 37,0%, оставалась на 43,0% выше значения в контрольной группе ($p = 0,0472$), что

свидетельствует о запуске компенсаторных механизмов и своевременном повышении ингибиторной активности. Интересные данные, подтверждающие наши предыдущие предположения, были получены при изучении антитриптической активности: через 6 ч после реперфузии отмечалось снижение АТА в 1,7 раза ($p = 0,0009$), а через 12 ч – в 1,4 раза. В дальнейшем снижение изучаемого показателя прогрессировало, и к 24-му ч после реперфузии АТА стала ниже контрольного значения в 2,2 раза ($p = 0,0004$).

Уровень кислотостабильных ингибиторов также в значительной степени зависел от длительности реперфузионного периода. Так, через 6 ч после ре-

васкуляризации уровень КСИ был ниже контрольного значения в 2,2 раза ($p = 0,0009$), через 12 ч – в 2 раза ($p = 0,0012$), через 24 ч – в 2,2 раза ($p = 0,0007$). Описанная динамика уровня КСИ связана с их повышенным потреблением в результате повышения активности протеиназ.

Таким образом, следует отметить повышение активности неспецифических протеиназ крови при формировании реперфузионного повреждения на ранних его этапах, в ответ на которое имеет место

рост ингибиторной активности. При продолжающемся реперфузионном воздействии отмечается тенденция к снижению ингибиторной емкости и увеличивается активность неспецифических протеиназ крови экспериментальных животных.

Для выяснения взаимосвязей между показателями коагулограммы и состоянием системы неспецифических протеиназ и их ингибиторов при экспериментальном синдроме ишемии-реперфузии нами был проведен корреляционный анализ (табл. 2).

Таблица 2

Результаты корреляционного анализа показателей коагулограммы и активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов								
Показатель	ПВ	АЧТВ	ФБГ	РФМК	АПЛ	АТ III	ПС	ПГ
ЭПА	-0,799 $p = 0,002$	-0,869 $p = 0,002$	+0,930 $p = 0,001$	-0,248	+0,670 $p = 0,032$	+0,521 $p = 0,048$	-0,232	+0,153
ТПА	+0,781 $p = 0,003$	+0,820 $p = 0,002$	-0,786 $p = 0,003$	0,594 $p = 0,043$	-0,296	-0,318	+0,358	+0,031
АТА	-0,826 $p = 0,002$	-0,833 $p = 0,002$	+0,867 $p = 0,002$	-0,045	+0,755 $p = 0,006$	-0,003	+0,585 $p = 0,046$	-0,304
КСИ	-0,921 $p = 0,001$	-0,959 $p = 0,001$	+0,997 $p = 0,001$	-0,217	+0,752 $p = 0,005$	+0,248	+0,201	-0,127

Примечание. ПВ – протромбиновое время; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ФБГ – фибриноген; РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы; АПЛ – $\alpha 2$ -антиплазмин; АТ III – антитромбин III; ПС – протеин С; ПГ – пламиноген. Знак «-» указывает на обратную корреляцию.

Выявлена значимая положительная корреляционная связь между изменениями показателей ТПА и ПВ, АЧТВ, РФМК в крови во время формирования синдрома ишемии-реперфузии в течение 6, 12 и 24 ч ($r = 0,78$; $0,82$ и $0,59$ соответственно): чем больше росла активность данной протеиназы, тем больше увеличивались значения показателей свертывания крови по внешнему (ПВ) и внутреннему пути (АЧТВ), а также все выше поднималась концентрация РФМК в крови экспериментальных животных. При этом для показателей АТА и ПВ с АЧТВ выявлена отрицательная корреляционная связь (коэффициенты корреляции $-0,82$ и $-0,83$ соответственно), т.е. большая антириптическая активность, преимущественно $\alpha 1$ -ингибитора-протеиназ, соответствовала меньшему уровню вышеуказанных показателей коагулограммы. Кроме того, было установлено, что антириптическая активность прямо пропорционально коррелирует со значениями ФБГ, АПЛ и ПС (коэффициент корреляции $0,86$; $0,75$ и $0,5$ соответственно), т.е. чем больше ингибиторный потенциал протеиназной системы в виде повышения АТА, тем выше значение данных лабораторных показателей.

Между уровнем КСИ и показателями ПВ и АЧТВ выявлена отрицательная корреляционная зависимость (коэффициент корреляции $-0,92$ и $-0,95$ соот-

ветственно), а также положительная корреляционная связь между показателями КСИ и уровнем ФБГ и АПЛ (коэффициент корреляции $0,99$ и $0,75$ соответственно).

При анализе значений ЭПА при синдроме ишемии-реперфузии и показателей коагулограммы – ПВ и АЧТВ, выявлена отрицательная корреляционная активность (коэффициент корреляции $-0,79$ и $-0,86$ соответственно), а при изучении значений ФБГ, АПЛ, АТ III – положительная корреляционная связь (коэффициент корреляции $0,93$; $0,67$ и $0,52$ соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ динамики показателей свертывающей системы свидетельствует о значительных отличиях и стадийности в реакции системы гемостаза в разные сроки формирования синдрома ишемии-реперфузии. Так, уже при кратковременной, 6-часовой, ишемии-реперфузии наблюдается преобладание гипокоагуляции, что можно объяснить системной активацией плазменных систем в ответ на острое повреждение, на что указывает увеличение РФМК как маркера последствия развивающейся тромбинемии в ответ на острое повреждение. Увеличение длительности течения синдрома ишемии-реперфузии

(до 12 и, особенно, до 24 ч) приводит к дальнейшим сдвигам, свидетельствующим об усугублении гипокоагуляционных расстройств, что, по-видимому, связано с истощением факторов свертывания крови и неадекватным их поступлением в системный кровоток из-за снижения синтетической функции печени в условиях длительной стимуляции и большой функциональной нагрузки.

Аналогичным образом направленные изменения наблюдаются в системе неспецифических протеиназ и их ингибиторов. Анализ динамики показателей протеиназ и их ингибиторов в разные сроки реперфузионного синдрома свидетельствует о выраженной активации неспецифических протеиназ (ТПА) в сыворотке крови экспериментальных животных с моделью ишемии-реперфузии, что связано с непосредственным участием протеолитических ферментов как в гемокоагуляционном каскаде, так и в системном адаптационном ответе организма на массивное повреждение эндотелия. Так, в сроки ишемии-реперфузии 6 ч имеет место компенсаторное повышение ингибиторов протеиназ, на фоне которого уменьшалась протеиназная активность. С увеличением длительности синдрома ишемии-реперфузии (12 и 24 ч) наблюдалось истощение ингибиторного потенциала с ростом протеиназной активности.

Наиболее выраженные изменения как в системе гемостаза, так и в системе неспецифических протеиназ и их ингибиторов выявлены в группе ишемии-реперфузии продолжительностью 24 ч, в которой наблюдался срыв адаптационных возможностей организма в виде истощения факторов свертывания крови и, как следствие, выраженный сдвиг показателей системы гемостаза в сторону гипокоагуляции, а также увеличение протеиназной активности на фоне дефицита ингибиторного потенциала, что может быть предрасполагающим фактором к развитию ДВС-синдрома. Данное предположение находит отклик и в литературных данных, подтверждающих развитие ДВС-синдрома в ответ на системную активацию коагуляционного пути [16]. Внутрисосудистое образование фибрина усиливается дисфункцией природных антикоагулянтных систем, таких как антитромбиновые (АТ III) и белковые системы (ПС), во время активного развития ДВС. В дальнейшем все компоненты коагуляционного и противкоагуляционного каскада истощаются, что приводит к полной несвертываемости крови [17].

Статистически значимые данные корреляционного анализа подтверждают вышеописанные предположения и свидетельствуют о тесной взаимосвязи между изменениями показателей системы свертывания

крови и параметрами протеиназ-ингибиторной системы. По-видимому, изменения состояния системы свертывания крови при синдроме ишемии-реперфузии, а именно, начальная гипокоагуляция с последующим дальнейшим увеличением продолжительности времени свертывания крови (показателей внешнего и внутреннего пути) на сроке 12 и 24 ч, тесно взаимосвязаны и могут быть обусловлены изменениями в протеиназ-ингибиторной системе в виде роста протеолитической активности и уменьшения ингибиторного потенциала. Возможно, именно дефицит ингибиторов совместно с недостатком факторов свертывания крови на фоне сниженной синтетической функции печени на более поздних сроках формирования синдрома ишемии-реперфузии являются ключевыми звеньями патогенеза и возможными целями коррекции данных нарушений не только на фоне реперфузионного повреждения, а также при ДВС-синдроме, приобретенных тромбофилических состояниях и других нарушениях свертывания крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов экспериментального исследования по изучению показателей свертывающей системы крови и неспецифических протеиназ при развитии синдрома ишемии-реперфузии в течение 6, 12 и 24 ч установлено, что нарушения в системе гемостаза характеризуются развитием гипокоагуляции на фоне роста активности трипсиноподобных протеиназ и снижения уровня их ингибиторов. Установленные изменения могут быть связаны с развитием дефицита факторов свертывания и ингибиторов протеиназ и иметь общие механизмы развития, связанные как с их избыточным потреблением в условиях длительной активации коагуляционного каскада, так и, возможно, со снижением синтетической функции печени в условиях длительной функциональной нагрузки гепатоцитов и их гипоксического и реперфузионного повреждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maegele M., Schöchl H., Cohen M.J. An up-date on the coagulopathy of trauma. *Shock*. 2014; 41 (21): 21–25. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000088.
2. Федосов М.И., Фомочкина И.И., Кубышкин А.В., Бабанин А.А., Пылаева Н.Ю. Патогенетическое значение протеолитических и цитокиновых механизмов при реперфузионном синдроме. *Таврический медико-биологический вестник*. 2012; 15 (3): 353–357.
3. Харченко В.З., Кубышкин А.В., Анисимова Л.В., Фомочкина И.И., Иванцова Н.Л., Жукова А.А. и др. Ингибиторы протеиназ и антиоксиданты в патогенетической терапии

- органопатологии при реперфузионном синдроме, осложненном кровопотерей. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2016; 7 (2): 49–52.
4. Maegele M., Spinella P.C., Schoechl H. The acute coagulopathy of trauma: mechanisms and tools for risk stratification. *Shock*. 2012; 38 (5): 450–458. DOI: 10.1097/SNK.0b013e31826dbd23.
 5. Oshiro A., Yanagida Y., Gando S., Henzan N., Takahashi I., Makise H. Hemostasis during the early stage of trauma: comparison with disseminated intravascular coagulation. *Critical Care*. 2014; 18: 61–63. DOI: 10.1186/cc13816.
 6. Francis A., Baynosa R. Ischaemia-reperfusion injury and hyperbaric oxygen pathways: a review of cellular mechanisms. *Diving and Hyperbaric Medicine*. 2017; 47 (2): 110–117. DOI: 10.28920/dhm47.2.110-117.
 7. Kalogeris T., Baines C.P., Krenz M., Korthuis R.J. Ischemia-reperfusion. *Comprehensive Physiology*. 2016; 7 (1): 113–170. DOI: 10.1002/cphy.c160006.
 8. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль, 2010: 344.
 9. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е изд.; пер. с англ. под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017: 336.
 10. Конвенция Совета Европы о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, 1986: 37.
 11. Рекомендации по эвтаназии экспериментальных животных. Документ экспертной группы Европейской комиссии. Ч. 1. 1996; 30: 293–316. Ч. 2. 1997; 31: 1–32.
 12. Оглоблина О.Г., Платонова Л.В., Пасхина Т.С. Измерение активности трипсино- и эластазоподобных протеиназ полиморфноядерных лейкоцитов и уровня их кислотостабильных ингибиторов в бронхиальном секрете человека. М.: Изд-во МГУ, 1984: 14.
 13. Кубышкин А.В., Харченко В.З., Семенец П.Ф., Алиев Л.Л., Фомочкина И.И., Анисимова Л.В. Методы определения активности неспецифических протеиназ и их ингибиторов в сыворотке крови и биологических жидкостях. Киев: Изд-во КНМУ, 2010: 28.
 14. Hanusz Z., Tarasinska J. Simulation Study on Improved Shapiro – Wilk Tests for Normality. *Communications in Statistics – Simulation and Computation*. 2014; 43 (9): 2093–2105. DOI: 10.1080/03610918.2013.844835.
 15. Iba T., Kidokoro A. High-dose antithrombin therapy for sepsis: mechanisms of action. *Shock*. 2002; 18 (5): 389–394. DOI: 10.1097/00024382-200211000-00001.
 16. Levi M., Toh C.H., Thachil J., Watson H.G. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. *British Journal of Haematology*. 2009; 145: 24–33. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07600.x.
 17. Sawamura A., Gando S., Hayakawa M., Hoshino H., Kubota N., Sugano M. Effects of antithrombin III in patients with disseminated intravascular coagulation diagnosed by newly developed diagnostic criteria for critical illness. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2009; 15 (5): 561–566. DOI: 10.1177/1076029608323497.

Сведения об авторах

Писарев Анатолий Аркадьевич, аспирант, кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, КФУ им. В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-9204-5198.

Петренко Виталина Игоревна, соискатель, кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, КФУ им. В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0001-9451-1757.

Кубышкин Анатолий Владимирович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, КФУ им. В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0002-1309-4005.

Харченко Владимир Захарович, д-р мед. наук, профессор, кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, КФУ им. В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0001-5092-4672.

Фомочкина Ирина Ивановна, д-р мед. наук, профессор, кафедра общей и клинической патофизиологии, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского, КФУ им. В.И. Вернадского, г. Симферополь. ORCID 0000-0003-3065-5748.

Кузичкин Дмитрий Сергеевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория медицинской биохимии и нейроэндокринологии, ГНЦ РФ, ИМБП РАН, г. Москва.

(✉) **Кубышкин Анатолий Владимирович**, e-mail: kubyshkin_av@mail.ru.

Поступила в редакцию 01.08.2019

Подписана в печать 25.12.2019