

## МОДЕЛЬ КОЛИ-СЕПСИСА НА ПАВИАНАХ: РОЛЬ ФОСФОЛИПИДНЫХ МИКРОЧАСТИЦ В ДИССЕМИНИРОВАННОМ ВНУТРИСОСУДИСТОМ СВЕРТЫВАНИИ КРОВИ

Ф.Б. Тейлор мл.

Медицинский исследовательский фонд, Оклахома, США

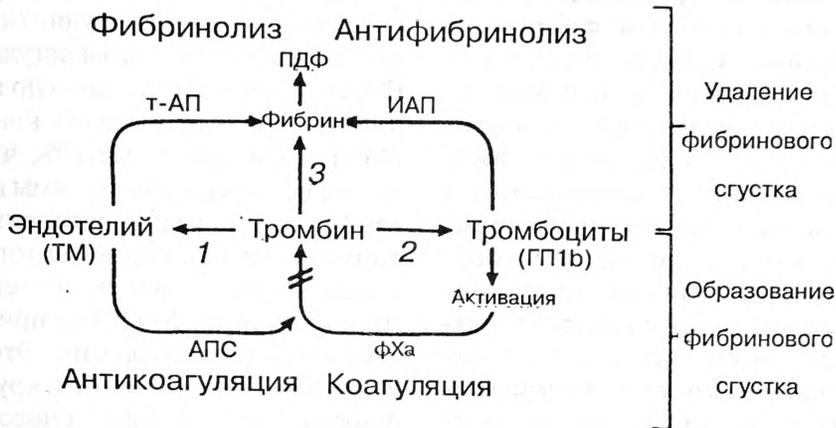
Реакция системы гемостаза павианов на внутривенную инфузию взвеси *E. coli* в количестве, эквивалентном  $LD_{100}$ , варьирует от синдрома капиллярной проницаемости и шока с относительно небольшими гемостатическими проявлениями до массивной коагулопатии потребления и кровоточивости вплоть до тромботической коагулопатии с необратимым тромбозом микрососудов [1]. Наш опыт последних десяти лет подвел нас к необходимости выяснения двух главных вопросов. Во-первых, при каких обстоятельствах дисфункция системы гемостаза (потребление/тромбоз) перестает быть простым маркером реакции приматов на *E. coli*, а становится важным звеном в летальной цепи событий, приводящих к смерти? Во-вторых, в тех случаях, когда система гемостаза является связующим звеном в летальной цепи событий, каким образом она осуществляет свой вклад — путем закупорки кровотока, усилением или пролонгированием воспалительного ответа либо верно и то, и другое? Однако прежде чем обратиться к изучению этих вопросов мы исследовали факторы, контролирующие гемостатическую активность на павиановой модели синдрома ДВС, индуцированного смесью фактора Ха и фосфолипидов. Мы описываем реакцию системы гемостаза павианов на гемостатический (то есть действие фактора Ха и фосфолипидных частиц) и воспалительный (действие *E. coli*) стрессы, а также взаимообусловленную реакцию систем гемостаза и воспаления на микробы *E. coli* и их токсины.

**Четыре функциональных квадранта системы гемостаза.** На рис. 1А показаны четыре функциональных квадранта системы гемостаза. Антикоагулянтный и коагуляционный блоки, действующие соответственно через сосудистый эндо-

тели и тромбоциты, конкурируют за контроль над образованием сгустка. Фибринолитический и антифибринолитический квадранты аналогичным образом конкурируют за удаление сгустка. Все четыре квадранта реагируют на тромбин благодаря его действию на сосудистый эндотелий, тромбоциты и фибриноген [2]. Ключом к пониманию этой интегральной системы является существование иерархии реакций на тромбин. Сосудистый эндотелий и ассоциированные с ним антикоагулянтный и фибринолитический квадранты наиболее чувствительны (1), им уступают в этом отношении тромбоциты (2), последним и наименее реактивным является фибриноген (3). При нормальных обстоятельствах небольшие количества тромбина, образующиеся спонтанно в микроциркуляторном русле, связываются с рецепторами на сосудистом эндотелии, такими, как тромбомодулин (ТМ) [3, 4]. Это взаимодействие ведет к образованию активированного протеина С (АРС) [3] и высвобождению тканевого активатора плазминогена (т-АП) [5, 6]. Активированный протеин С ингибирует дальнейшее образование тромбина путем инактивации факторов Va и VIIIa по принципу отрицательной обратной связи [3, 4]. Тканевый активатор превращает плазминоген в плазмин и таким образом растворяет любой образовавшийся фибрин [7].

На рис. 1В показано, что коагуляционный и фибринолитический квадранты вступают в действие тогда, когда эндотелий либо отсутствует (разрыв сосуда), либо функционально неполноценен вследствие метаболических нарушений (например, при диабете) [8] или из-за воздействия медиаторов воспаления (цитокины, эндотоксины) [9, 10, 11, 12]. Отсутствие эндотелия ведет к со-

А



В

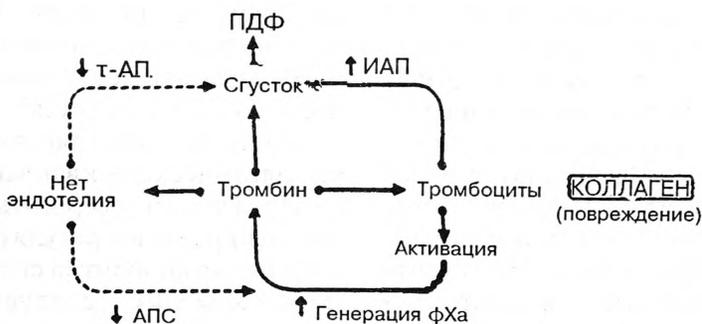


Рис.1А. Четырехквadrантная конструкция системы гемостаза в норме. Систему гемостаза можно рассматривать как состоящую из четырех функциональных квадрантов: коагуляция-антикоагуляция и фибринолиз-антифибринолиз, причем все они регулируются тромбином. Коагуляционный и антикоагулянтный квадранты регулируют образование сгустка, а фибринолитический и антифибринолитический квадранты — удаление сгустка. Цифры 1, 2, 3 указывают порядок уменьшения чувствительности к тромбину соответственно тромбомодулина, тромбоцитов и фибриногена. Остальные обозначения на этом рисунке даны в тексте.

Рис.1В. Влияние удаления сосудистого эндотелия. Удаление эндотелия, как это происходит при разрывах или разрезах, само по себе вызывает два следствия. Во-первых, при этом исчезает эндотелиальный источник антикоагулянтной и фибринолитической активности, что позволяет сгустку образоваться и закрыть брешь в сосудистой стенке. Во-вторых, это приводит кровь в соприкосновение с тканевым фактором и коллагеном, что вызывает адгезию и агрегацию тромбоцитов, а также инициирует образование сгустка.

прикосновению тромбоцитов с коллагеном, что вызывает агрегацию тромбоцитов, ассоциацию факторов свертывания (Ха) [13] и высвобождение из этих тромбоцитов ингибитора активатора плазминогена (ИАП) [14, 15, 16]. Метаболическая дисфункция эндотелия или активация моноцитов/макрофагов медиаторами воспаления ведет к экспрессии тканевого фактора [11, 17], который также инициирует описанные выше прокоагулянтные и антифибринолитические процессы.

Итак, эта система четырех квадрантов предназначена, с одной стороны,

для поддержания жидкого состояния крови, а с другой — для герметизации щелей в сосудистой стенке. Патологический тромбоз развивается только тогда, когда оба механизма, один из которых поддерживает кровь в жидком состоянии (антикоагулянтный и фибринолитический квадранты), а другой заклеивает течь (коагуляционный и антифибринолитический квадранты), нарушаются вследствие метаболических или воспалительных изменений. Далее мы рассмотрим равновесие между этими четырьмя квадрантами системы гемостаза павианов и влияние медиаторов воспаления на этот баланс.

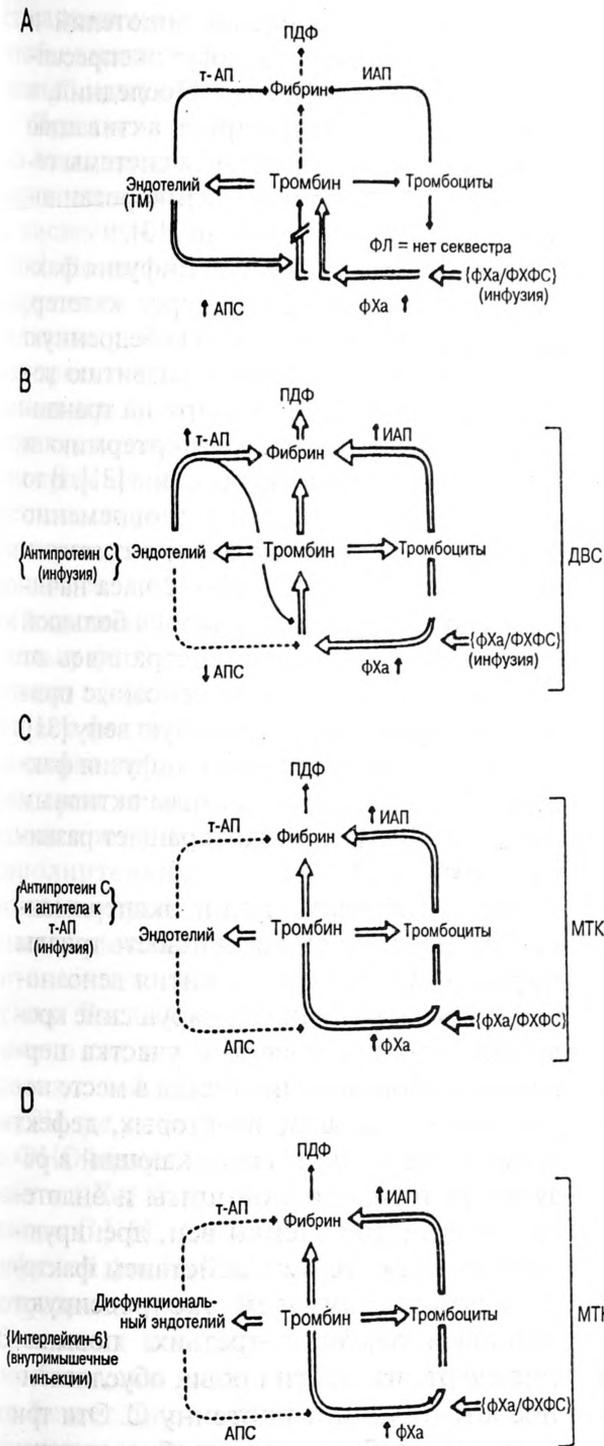
**Гемостатический стресс (реакция системы гемостаза на инфузию фактора Ха и фосфолипидных везикул).** Внутривенная инфузия фактора Ха и фосфолипидных везикул, содержащих фосфатидилхолин и фосфатидилсерин (фХа/ФХФС), вызывает кратковременный взрыв очень высокой активности тромбина [18]. На рис.2А показано, что образование большого количества тромбина у павианов не ведет к неблагоприятным последствиям, так как большая часть тромбина связывается преимущественно с рецепторами эндотелиальных клеток, включая тромбомодулин (ТМ) [3, 4]. Комплекс тромбин/тромбомодулин соответственно активирует большое количество протеина С, который в виде активированного протеина С (АРС) инактивирует кофакторы свертывания Va и VIIa по принципу отрицательной обратной связи [3, 4]. В результате как активация тромбоцитов, так и образование фибрина имеют очень ограниченный характер. Кроме того, если судить по низкой концентрации продуктов деградации фибрина (ПДФ), высвобождается мало тканевого активатора плазминогена (т-АП) и фибринолитическая активность остается низкой [18].

Рис. 2В, напротив, демонстрирует механизм взаимодействия фХа/ФХФС, введенных вместе с антителами к протеину С [18]. Когда отсутствует регулирующее влияние антикоагулянтного квадранта, фХа/ФХФС вызывают образование гораздо большего количества тромбина, ведущего к полыхающей коагулопатии потребления (ДВС), при которой активируются и удаляются тромбоциты и образуется фибрин, что ведет к тромбоцитопении и гипофибриногемии у павианов. На рисунке также видно, что тромбин высвобождает из эндотелия большое количество тканевого активатора плазминогена (т-АП). В результате выраженная и стремительная фибринолитическая реакция предотвращает переход коагулопатии потребления в катастрофическую тромботическую коагулопатию.

Наконец, на рис. 2С показаны последствия введения фХа/ФХФС вместе с антителами к протеину С и тканевому

активатору плазминогена [19]. Когда отсутствуют и антикоагулянтное, и фибринолитическое звенья регуляции, фХа/ФХФС вызывают летальную микрососудистую тромботическую коагулопатию (МТК). Следует отметить, что тромботические нарушения системы гемостаза — гемолитико-уремический синдром или тромботическая тромбоцитопеническая пурпура [20] — могут протекать с распространенной МТК без признаков коагулопатии потребления. Это объясняется тем, что скорость кругооборота фибрина не превышает способности печени синтезировать фибриноген, несмотря на отложение фибрина в микроциркуляторном русле. Если не учитывать особые обстоятельства, то для того чтобы вызвать коагулопатию потребления (рис.2В), требуется повышенная активность как коагулянтного, так и фибринолитического квадрантов [18].

Прежде чем завершить раздел, посвященный реакции регуляторных и медиаторных компонентов системы гемостаза на фХа/ФХФС, следует рассмотреть роль модуляторов этой системы. Модуляторы — это вещества, которые изменяют физиологическое состояние организма таким образом, что его нормальная реакция на один и тот же стимул меняется. При этом в зависимости от состояния организма и времени воздействия реакция на стимул в виде фХа/ФХФС может варьировать от коагулопатии потребления до тромботической коагулопатии и их сочетания. Модуляторы не являются ни регуляторами, ни посредниками гемостатической реакции. Они действуют в рамках физиологической нормы либо в форме физиологических циклов (эстрогены, кортизол, инсулин и т.д.), либо как часть компенсированной реакции организма на стресс — белки теплового шока, макрофаг-ингибирующий фактор, интерферон- $\gamma$ , интерлейкин-6 (IL-6) и т.д. Это отличие чрезвычайно важно, потому что оно позволяет понять, почему два как будто нормальных и схожих организма (например, павианы из одного стада) иногда по-разному реагируют на один и тот же стимул (у одних развиваются капиллярная кровоточивость и шок,



**Рис.2А. Влияние инфузии фХа/ФХФС на нормальную систему гемостаза.** Инфузия фХа/ФХФС вводит нормальную систему гемостаза в состояние прокоагулянтного стресса, в котором она способна преодолеть равно эффективную антикоагулянтную реакцию. Несмотря на короткий взрыв активности тромбина, она моментально выключается в результате образования активированного протеина С и сборки комплекса тромбин/тромбомодулин/протеин С на сосудистом эндотелии.

**Рис.2В. Влияние инфузии фХа/ФХФС плюс антител к протеину С на нормальную систему гемостаза.** Одновременное введение фХа/ФХФС и антител к протеину С подавляет регуляторную антикоагулянтную активность и приводит к беспрепятственному образованию тромбина. Это ведет к усиленному образованию фибрина, который, однако, моментально исчезает под действием регуляторной фибринолитической активности (ДВС). Она возникает вследствие выброса тканевого активатора плазминогена (т-АП), вызванного тромбином, из сосудистого эндотелия, который по-прежнему интактен и функционально полноценен.

**Рис.2С. Влияние инфузии фХа/ФХФС плюс антител к протеину С и тканевому активатору плазминогена.** Инфузия этих двух видов антител вместе с фХа/ФХФС подавляет регуляторную активность как антикоагулянтного, так и фибринолитического квадранта. В этом случае отсутствует фибринолитическая активность, спасающая организм от массивной микрососудистой тромботической коагулопатии (МТК). Она вызывается тромбином и далее усугубляется индуцированным тромбином высвобождением ингибитора активатора плазминогена из тромбоцитов и эндотелия. Эндотелий в этом случае остается функционально полноценным, но его регуляторная функция подавляется двумя видами антител.

**Рис.2D. Влияние инфузии фХа/ФХФС с последующими многократными внутримышечными инъекциями интерлейкина-6 (IL-6).** Инфузия фХа/ФХФС с последующими инъекциями IL-6 также вызывает летальную МТК. Причины этого, однако, не столь очевидны, как при МТК, показанной на рис.2С. IL-6 вызывает повышение концентрации фибриногена и тромбоцитов, что способствует более интенсивной прокоагулянтной реакции. Кроме того, IL-6 ведет к развитию эндотелиальной дисфункции и уменьшению фибринолитической реакции на фХа/ФХФС.

у других — коагулопатия потребления с гемorragиями, у третьих — тромбоцитическая коагулопатия и почечная недостаточность).

Мы полагаем, что модуляторы могут «наклонять» игровое поле гемостатических квадрантов в пользу того или другого функционального квадранта либо путем смещения баланса между регуляторными и медиаторными компонентами, либо изменяя чувствительность тканевых мишеней к действию этих компонентов. Рис. 2D демонстрирует влияние IL-6 (40 мкг/кг) при внутримышечных ежедневных инъекциях в течение 6—10 дней на реакцию, развивающуюся в ответ на введение фХа/ФХФС [21]. При этом контрольная реакция (рис. 2A) трансформируется в МТК (рис. 2D). Хотя IL-6 имеет и другие эффекты, это изменение предположительно объясняется увеличением концентрации фибриногена и тромбоцитов, которое смещает равновесие в пользу коагуляционного ( $\uparrow$  фибриноген) и антифибринолитического ( $\uparrow$  тромбоцитарный ингибитор активатора плазминогена, ИАП-1) квадрантов. IL-6 может оказывать на эту систему и другие влияния, включая дисфункциональные воздействия на эндотелий и элементы антикоагулянтного и фибринолитического квадрантов, которые управляют ситуацией через тканевый активатор плазминогена [22], компоненты системы протеина С [23—25], ингибитор пути тканевого фактора [26, 27], антитромбин [28] и активированный тромбином ингибитор фибринолиза [29].

**Воспалительный стресс-I (реакция системы гемостаза на инфузию фактора некроза опухолей, антител к протеину С и фосфолипидных везикул).** Наиболее очевидные примеры нефизиологических модуляторов системы гемостаза включают членов семейства цитокинов, в частности фактор некроза опухолей (ФНО). При каких обстоятельствах фактор некроза опухолей может нарушить равновесие между четырьмя квадрантами гемостатической системы в пользу тромбоцитической коагулопатии и/или коагулопатии потребления? Как показали исследования *in vitro* [11, 12] и *in vivo* [30], под влиянием фактора некро-

за опухолей сосудистый эндотелий и моноциты/макрофаги могут экспрессировать тканевый фактор. Последний, в свою очередь, инициирует активацию коагуляционного квадранта системы гемостаза с образованием активированного фактора Ха и тромбина [13].

Однако изолированная инфузия фактора некроза опухолей через катетер, введенный в поверхностную бедренную вену павиана, не ведет к развитию венозного тромбоза, несмотря на транзитную лейкопению, гипертермию и симпатомиметическую реакцию [31]. В то же время если ввести одновременно фактор некроза опухолей и антитела к протеину С, то через 48—72 часа начинается медленно формироваться большой венозный тромб, распространяясь от перевязанной культы на венозные притоки, включая нижнюю полую вену [31]. Наконец, одновременная инфузия фактора VIIa с ингибированным активным центром (fVIIai) предотвращает развитие тромба [32].

Таким образом, наши эксперименты подтвердили справедливость триады Вирхова [33, 34] для развития венозного тромбоза: во-первых, нарушение кровотока, начинающееся с участка первичного образования сгустка в месте перевязанной культы; во-вторых, дефект сосудистой стенки, возникающий в результате того, что моноциты и эндотелий сосудистой стенки вен, дренирующих конечность, под действием фактора некроза опухолей экспрессируют тканевый фактор; в-третьих, повышение свертываемости крови, обусловленное антителами к протеину С. Эти три условия необходимы, чтобы сдвинуть равновесие между четырьмя квадрантами системы гемостаза в пользу разрастания патологического венозного тромба из участка перевязки вены. Важно подчеркнуть, что воспалительный стресс может усугублять эти условия. Комбинация данных факторов демонстрирует принцип, согласно которому и регуляторный подъем активности одного из эффекторных (коагулянтного) квадрантов, и регуляторное падение активности одного из регуляторных (антикоагулянтного) квадрантов системы гемо-

стаза должны наступить одновременно, чтобы вызвать развитие декомпенсированной коагулопатической реакции.

При каких условиях эта относительно локализованная тромботическая коагулопатия может трансформироваться в системную коагулопатию потребления? На рис.3А показана комбинация нарушения кровотока, локальной эндотелиальной дисфункции с повышенной экспрессией тканевого фактора под действием фактора некроза опухолей и подавления антикоагулянтной активности протеина С антителами к нему. Кроме того, по рисунку видно, что эта комбинация способна вызвать рост тромба, однако ее недостаточно, чтобы привести к системной коагулопатии [31]. Поскольку фосфолипидные везикулы усиливают эффект инфузирования экзогенного фактора Ха (см. рис. 2А—D), совместная инфузия этих пузырьков с фактором некроза опухолей и антителами к протеину С должна предоставить дополнительную липидную поверхность, которая нужна для усиления активности эндогенного фактора Ха и развития системной коагулопатии потребления. Рис.3В подтверждает, что это именно так и что данная реакция [31] сходна с той, которая представлена на рис.2В, где экзогенный фактор Ха (вместо ФНО-индуцированного эндогенного фактора Ха) был введен вместе с протеином С [18]. Это усиление, вызванное инфузией фосфолипидных частиц, можно сравнить с потоком микропузырьков, образуемых комплементом (С5b-9) из тромбоцитов и клеточных мембран, как это бывает при лихорадке Денге [35] и некоторых злокачественных новообразованиях [36].

Несмотря на то что мы не можем провести количественное сравнение концентрации фосфолипидных пузырьков, которые использовались в наших исследованиях, и везикул, образующихся в клинических условиях, мы все-таки полагаем, что наши наблюдения сопоставимы с теми процессами, которые происходят спонтанно как составная часть клинической патологии, связанной с малигнизацией и сепсисом. Во-первых, от опухолевых клеток отщуровы-

ваются везикулы, способные экспрессировать тканевый фактор и собирать протромбиназу как в культуре, так и *in vivo* [36]. Во-вторых, комплемент С5b-9 индуцирует высвобождение неадгезивных везикул, на которых может собираться протромбиназа [37, 38], а субкомпонент комплемента С1q ведет к экспрессии тромбоцитарных гликопротеидов IIb—IIIa, поддерживающих везикуляцию тромбоцитов *in vitro* [40]. В-третьих, показано, что инулин вызывает у кроликов коагулопатию потребления, которая нуждается в С6 компоненте комплемента и ассоциирована с ранним и интенсивным высвобождением тромбоцитарного фактора 3 *in vivo*. Это свидетельствует о том, что в данной модели С5b-9 вызывает везикуляцию тромбоцитов с высвобождением тромбоцитарного фактора 3 [41]. В-четвертых, образование везикул тромбоцитарного происхождения имело место у всех 22 пациентов с ДВС [42]. У пациентов с антифосфолипидными антителами [42] и индуцированной гепарином тромбоцитопенией [43] также были обнаружены тромбоцитарные везикулы, причем оба патологических состояния были ассоциированы с артериальными и венозными гемостатическими осложнениями. Активация комплемента в сочетании с коагулопатией потребления, как это происходит в инулиновой модели у кроликов, наблюдалась не только у больных с бактериальным сепсисом (10), но и при вирусной геморрагической лихорадке типа Денге [35]. Однако приведенные наблюдения применимы только к тем случаям, когда воспалительный аппарат бывает востребован чужеродными микроорганизмами (то есть ФНО с индукцией экспрессии тканевого фактора и активация комплемента с последующей везикуляцией тромбоцитов). Например, в случае молниеносной септицемии, вызванной *S. aureus*, микроб сам прямо активирует систему гемокоагуляции коагулазой [45].

**Воспалительный стресс-II (реакция системы гемостаза на инфузию *E.coli* по типу системной коагулопатии потребления).** Хотя реакция на LD<sub>100</sub> *E.coli* в виде системной коагулопатии потребления

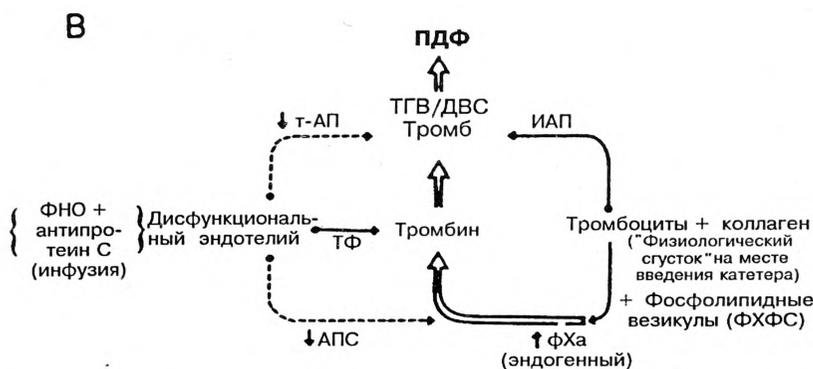
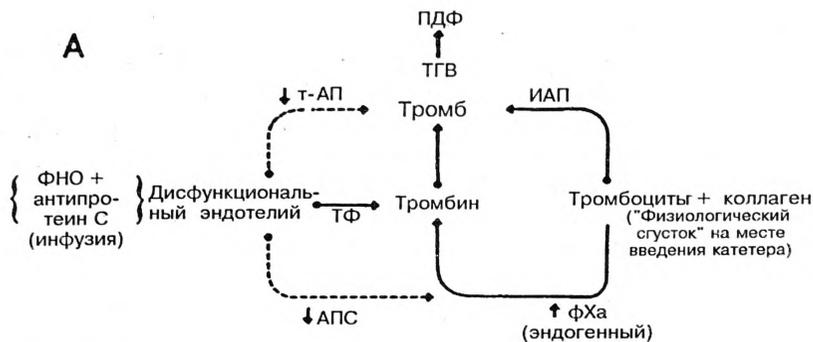


Рис.3А. Влияние катетеризации вены и инфузии фактора некроза опухолей (ФНО) плюс антител к протейну С. Венозный катетер, который удаляется после перевязки поверхностной бедренной вены, вызывает нарушение кровотока и образование венозной культи, в которой образуется и растет сгусток, достигая размеров большого патологического тромба. Однако это требует совместной инфузии фактора некроза опухолей (ФНО) и антител к протейну С. Для развития тромбоза глубоких вен (ТГВ) достаточно сочетания дисфункции эндотелия и моноцитов, вырабатывающих тканевый фактор (ТФ), сниженной активности протеина С и описанного выше нарушения кровотока.

Рис.3В. Влияние совместной инфузии фосфолипидных везикул (ФХФС) на описанной выше модели тромбоза глубоких вен. Совместная инфузия фосфолипидных везикул (ФХФС) с фактором некроза опухолей (ФНО) и антителами к протейну С на модели тромбоза глубоких вен создает дополнительную площадь фосфолипидной поверхности. Этой дополнительной площади достаточно для концентрирования эндогенного фактора Ха в области тромба глубокой вены и превращения локального тромбоза глубоких вен (ТГВ) в системную коагулопатию потребления (ДВС).

(ДВС) более сложная, чем в описанных выше реконструктивных экспериментах, тем не менее она также может быть подвергнута рациональному анализу с использованием четырехквadrантной схемы. Сначала будут описаны и разделены по стадиям клинические и клинико-химические реакции во времени [37, 38], а затем они будут обозначены анатомическими терминами с указанием элементов крови, взаимодействующих со структурами сосудистой стенки [46, 47].

**Стадия I.** Рис. 4А демонстрирует последовательность химических и клинико-химических реакций на *E.coli* во вре-

мени и делит процесс на четыре стадии (I—IV). Рис. 4В дает картину структурных элементов, вовлеченных в реакцию на каждой из этих четырех стадий. Рис. 4А показывает, что стадия I начинается с инфузии *E.coli* и завершается через 2 часа, когда число лейкоцитов достигает самого низкого уровня, а воспалительные медиаторы (ФНО, т-АП, эластаза) — пика. В течение этого периода микроорганизмы *E.coli* подвергаются фагоцитозу нейтрофилами и фиксированными макрофагами легких, печени и селезенки. На рис.4В видно, что на протяжении стадии I активированные макрофаги высвобождают воспалительные медиато-

A

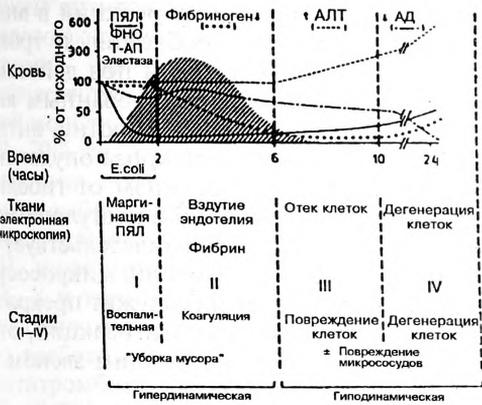


Рис.4А. Модель диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС): описание последовательности событий и стадий (с I по IV) после инфузии LD<sub>100</sub> *E. coli*: Последовательность событий в этой модели можно разделить на четыре стадии: воспалительная стадия I (от 0 до 2 часов), коагулопатическая стадия II (от 2 до 6 часов), повреждение и дегенерация клеток, т.е. стадии III и IV (соответственно от 6 до 10 и более 10 часов). Заштрихованная площадь отражает концентрацию частиц *E. coli* в крови. Она достигает максимума около  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл через 2 часа, после чего микробы исчезают к 8 часам. Стадия I характеризуется падением числа лейкоцитов и появлением в плазме фактора некроза опухолей, эластазы и тканевого активатора плазминогена, которые достигают максимума концентрации через T = +2 часа. Стадия характеризуется падением концентрации фибриногена и ростом уровня продуктов деградации фибрина. Стадии III и IV характеризуются повышением концентрации маркеров повреждения клеток (АЛТ) и устойчивым падением количества тромбоцитов и артериального давления (АД). Животные погибли через 16–30 часов.

B

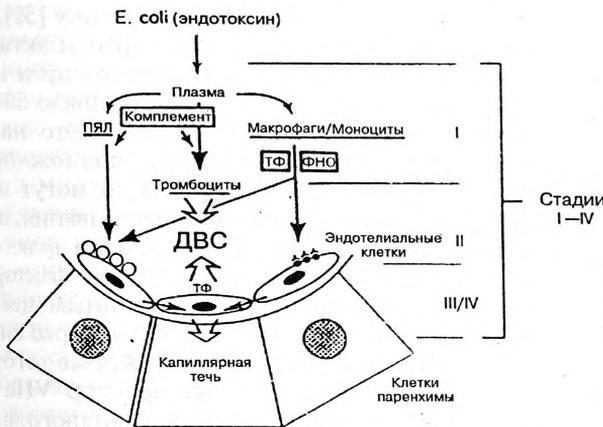


Рис.4В. Модель диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) как реакции павианов на LD<sub>100</sub> *E. coli*. Клетки *E. coli* активируют компоненты комплемента, нейтрофилы и макрофаги/моноциты, которые высвобождают медиаторы. Эти медиаторы воздействуют на сосудистый эндотелий, который инициирует и усиливает активацию факторов гемокоагуляции (тканевый фактор, ТФ) с развитием (ДВС). Наконец, в ответ на эти взрывные события, происходящие внутри кровеносного русла, прилежащие паренхиматозные ткани на противоположной стороне эндотелия накапливают жидкость (капиллярная течь) и в конечном итоге подвергаются дегенерации.

ры (ФНО, интерлейкины), а активированные нейтрофилы осуществляют краевое стояние и адгезию к капиллярному и посткапиллярному эндотелию, который высвобождает протеолитические ферменты. Из нейтрофилов поступает эластаза, а потревоженный эндотелий, в свою очередь, выбрасывает тканевый активатор плазминогена. Все это происходит в течение двух часов, пока длится стадия I (см. рис. 4А) и проявляется острой лейкопенией, появлением в плазме ФНО и эластазы из активированных макрофагов и нейтрофилов, а также выделением тканевого активатора плазминогена из эндотелия, который при-

нимает на себя основной удар в этой аномальной воспалительной реакции. Стадия I называется воспалительной.

**Стадия II.** На рис. 4А показано, что стадия II начинается с T=+2 часа со снижения концентрации фибриногена сразу после транзитного падения АД и заканчивается на T=+6 часов, когда концентрация фибриногена становится минимальной. На рис. 4В видно, что стадия I сменяется стадией II, в которой тканевый фактор (ТФ) экспрессируется не только моноцитами/макрофагами, но и эндотелием некоторых участков сосудистого ложа в состоянии дисфункции. Это активирует коагуляционный

каскад с развитием массивной коагулопатии потребления, или ДВС, на обращенной в просвет поверхности эндотелия. Стадия II называется коагулопатической. Эти две стадии соответствуют гипердинамическому, или теплому, шоку и совпадают с клиренсом частиц *E. coli* из кровотока к  $T=+6$  часам.

**Стадии III и IV.** Рис.4 показывает, что стадия III начинается после  $T=+6$  часов с увеличения плазменной концентрации маркеров повреждения клеток (например, сывороточной АЛТ), которая сопровождается устойчивым снижением АД и тромбоцитопенией. На рис. 4В видно, что в этом процессе комбинация воспалительных и коагулопатических реакций на стадиях I и II вызывает у эндотелия более глубокую дисфункцию, которая проявляется усугублением ДВС (на люминальной поверхности) и капиллярной кровоточивостью (противоположная поверхность). Все это приводит к внутри- и внеклеточному отеку паренхиматозных тканей и переходу клеточного повреждения из обратимой фазы в необратимую, которая характеризует стадию IV и начинается примерно с 10-12 часов. Эти две поздние стадии называются стадиями клеточного повреждения (обратимого) и клеточной дегенерации (необратимой). Они совпадают с гиподинамической реакцией, или холодной фазой шока, павианов в ответ на  $LD_{100}$  *E. coli* (см рис. 4А).

В отличие от описанных ранее моделей гемостатического (ФХа/ФХФС) или воспалительного (ФНО) стресса, которые были воспроизведены компонент за компонентом, для анализа механизма общей реакции организма на взвесь *E. coli* потребовалось введение специфических антител против наиболее важных медиаторов и регуляторов. Ключевым вопросом в этих экспериментах был такой: является ли наблюдаемая на этой модели коагулопатия связующим звеном в летальной цепи событий или это просто эпифеномен? Мы полагаем, что это эпифеномен (побочное явление) по следующим причинам. Во-первых, микросудистый тромбоз не был необратимым и не всегда обнаруживался на вскрытии [48]. Во-вторых, полное ингибирование тромбоза, геморрагии и инфаркта тканей отсроченной инфузией ингибитора пути тканевого фактора не защищало от

$LD_{100}$  *E. coli* [49]. В-третьих, от  $LD_{100}$  *E. coli* не защищало даже полное ингибирование коагулопатических реакций в виде и коагулопатии потребления, и тромботической коагулопатии под действием фактора Ха с ингибированным активным центром [50]. Напротив, антитела против фактора некроза опухоли, хотя и защищали организм от гибели, однако не предотвращали коагулопатию потребления [51]. Это свидетельствует о том, что в данной модели микросудистый тромбоз, хотя и служит прекрасным показателем тяжести реакции, отнюдь не является связующим звеном в летальной цепи событий.

В то же время подавление коагулопатической реакции ранним введением антител к тканевому фактору [52], фактора VIIa с ингибированным активным центром [53] и ингибитора пути тканевого фактора [26, 27] защищало 60—70% животных от  $LD_{100}$  *E. coli*. Это наводит на мысль об иной роли, возможно, провоспалительной, которую могут играть эти близкие факторы свертывания, в частности комплекс тканевого фактора с фактором VIIa. Известно, что фактор VIIa с ингибированным активным центром блокирует кальциевый ток через клеточные мембраны [54, 55]. Кроме того, этот же ингибированный фактор VIIa [53], как и ингибитор пути тканевого фактора [26, 27], уменьшает появление в плазме IL-6 и IL-8 после инфузии  $LD_{100}$  *E. coli*. Эти данные свидетельствуют о том, что активация родственных компонентов системы гемостаза может усиливать и/или пролонгировать уже начавшуюся воспалительную реакцию.

В отличие от описанных выше экспериментов, направленных на подавление функции медиаторов антителами на летальной модели коли-сепсиса, антитела к регуляторам вводили при сублетальном варианте, чтобы выяснить, не станет ли он летальным. Антитела, которые предотвращали активацию протеина С, но не ингибировали активированный протеин С, превращали сублетальную реакцию на сублетальные дозы *E. coli* в летальную [56]. Совместная инфузия активированного протеина С восстанавливала первоначальную реакцию [56].

Подобные результаты были получены при одновременном введении кроликам антител к ингибитору пути тканевого фактора и эндотоксина [57]. Напротив, заместительная инфузия этих двух естественных регуляторов на летальной модели коли-сепсиса спасала жизнь 60—70% животных [26, 56]. Как было уже отмечено, это сопровождалось уменьшением выброса в плазму IL-6 и IL-8. Заместительная терапия антитромбином III, ингибирующим сходные факторы IX, X и тромбин, также обладала протективным действием, однако для этого требовалось введение больших доз антитромбина перед вливанием взвеси *E.coli* [28]. Аргументы в пользу противовоспалительной роли веществ, ингибирующих схожие факторы гемокоагуляции при сублетальном коли-сепсисе, по видимому, сохраняют свое значение и в экспериментах по введению LD<sub>100</sub> *E.coli*.

Важно добавить, что эти регуляторные вещества образуют тесную ассоциацию с микрососудистым эндотелием посредством прямой связи с рецепторами эндотелиальных клеток и поверхностными структурами [58]. Эти взаимодействия включают связывание ингибитора пути тканевого фактора с гликозаминогликанами [59, 60], протеина С с тромбомодулином [3, 4], активированного протеина С с эндотелиальным рецептором протеина С [61], фактора VIIa с тканевым фактором [62, 63] и антитромбина с гликозаминогликанами [64].

Таким образом, дополнительное объяснение относительной эффективности сходных прокоагулянтов по сравнению с такими ингибиторами, как фактор Ха с ингибированным активным центром или гирудин, состоит в том, что они защищают поверхность микрососудистого эндотелия от повреждения продуктами неконтролируемой, аномальной воспалительной реакции на *E. coli*.

Модуляторы при этой модели *E.coli* так же важны, как и при модели гемостатического стресса под действием фХа/ФХФС. Как отмечалось во введении, реакция павианов на LD<sub>100</sub> *E.coli* варьирует от кровоточивости капилляров, шока и смерти менее чем через 6 часов до микрососудистого тромбоза, почечной недостаточности и гибели в течение 5 суток. На фоне течи сублетальные дозы *E.coli* вызывают массивный

микрососудистый тромбоз. Аналогичная картина наблюдается у животных, которым предварительно на протяжении 6—10 дней вводили IL-6 в дозе 40 мкг/кг. Другие факторы, возрастающие при хронических субклинических воспалительных состояниях, включают макрофагингибирующий фактор и интерферон- $\gamma$ , оба из которых блокируют реактивность клеток к кортизолу [65]. В ответ на *E.coli* у животных с искусственным дефицитом кортизола или нечувствительных к кортизолу развиваются сердечно-сосудистый коллапс и повышенная капиллярная проницаемость [66].

Таким образом, исходное состояние организма, определяемое гормональным, метаболическим и иммунным статусом, может, в свою очередь, влиять на характер клинической реакции на *E.coli*. Это разнообразие реакций, вероятно, имеет место и у пациентов, что осложняет выбор стратегии вмешательства даже тогда, когда известен тип организма. Мы полагаем, что при отсутствии поливалентной терапии для эффективной профилактики и/или лечения требуется понимание основополагающих условий, которые предопределяют тот или иной тип реагирования.

**Конструкция четырех квадрантов.** Предшествующее описание клинических проявлений и некоторых механизмов реакции на *E.coli* можно рассмотреть концептуально, используя схему четырех квадрантов системы гемостаза. На рис. 5А и 5В сравниваются реакции на введение фХа/ФХФС с антителами к протеину С и на инфузию *E.coli*. Обе иллюстрации похожи с той разницей, что животные с чисто гемостатическим стрессом (рис. 5А) остаются живыми, а животные с комбинированным стрессом (воспалительным и гемостатическим — ДВС) погибают (рис. 5В). Эти септические нарушения отличаются от двух только что обсужденных моделей тем, что большая интенсивность воспаления вызывает дисфункцию регуляторной эндотелиальной сети протеина С, тогда как одновременная активация прокоагулянтных элементов (тромбоциты, моноциты/макрофаги), в том числе комплемента, ведет к высвобождению фосфолипидных микрочастиц, или везикул. Таким образом, в этом разделе рассмот-

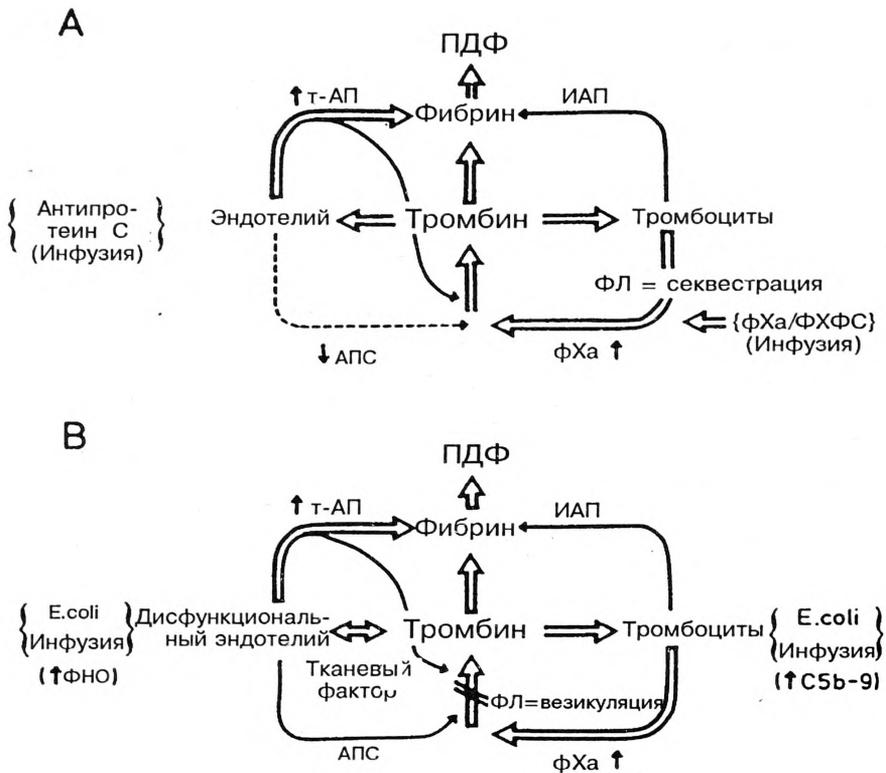


Рис 5. Диссеминированное внутрисосудистое свертывание (ДВС) как реакция на инфузию fXa/ФХФС плюс антител к протеину С (А) и LD<sub>100</sub> *E. coli* (В). Воспалительный эффект *E. coli* имитирует реакцию на fXa/ФХФС в виде коагулопатии потребления (ДВС). Наблюдаются интенсивное регуляторное возрастание коагуляционной активности (тканевый фактор, Ха) и уменьшение антикоагулянтной активности (АПС) с последующим взрывом активности тромбина и фибринолитической активности (т-АП), как это имеют место после инфузии fXa/ФХФС. Отличия заключаются только в том, что, во-первых, в ответ на LD<sub>100</sub> *E. coli* организм, чтобы воспроизвести эффект fXa/ФХФС и антител к протеину С, использует эндогенные факторы и, во-вторых, воспалительная реакция на LD<sub>100</sub> *E. coli* в дополнение к реакции в виде ДВС запускает самопроизвольные воспалительные процессы (например, повреждение свободными радикалами), которые являются необратимыми и в конечном счете губят организм.

рены исходы или стадии сепсиса, а также вовлекаемые в этот процесс механизмы.

## ВЫВОДЫ

Система гемостаза состоит из четырех квадрантов, каждый из которых реагирует на тромбин. Антикоагулянтный (протеин С) и профибринолитический (т-АП) регуляторные квадранты управляются эндотелием. Они наиболее чувствительны к действию тромбина, и их действие направлено на предупреждение фибринообразования и удаление сгустков. Прокоагулянтный (фактор Ха) и антифибринолитический (ИАП) медиаторные квадранты управляются тромбоцитами. Они менее чувствитель-

ны к тромбину, и их действие направлено на образование и стабилизацию сгустков. Изолированная инфузия только фактора Ха при хорошо сбалансированной системе гемостаза не оказывает никакого действия. Инфузия фактора Ха вместе с фосфолипидными везикулами вызывает стресс антикоагулянтного квадранта протеина С. Однако достаточно введения фактора Ха, антител к протеину С и фосфолипидных везикул, или микрочастиц, чтобы перевесить или подавить основанную на эндотелии регуляторную реакцию антикоагулянта протеина С и вызвать молниеносное развитие ДВС.

На модели воспаления с использованием тромбоза глубоких вен мы показали, что фосфолипидные везикулы

могут увеличивать прокоагулянтную активность эндогенного фактора Ха в сочетании с нарастанием венозного тромбоза и развитием системной коагулопатии (ДВС) точно так же, как они усиливают прокоагулянтную активность инфузировавшегося экзогенного фактора Ха.

Наконец, на модели воспаления, основанной на коли-сепсисе, были созданы условия, при которых регуляторные реакции протеина С были подавлены и эндотелий становился несостоятельным. В этом случае микроорганизмы *E. coli* (эндотоксин) и воспалительные реакции макроорганизма сами вызывали системную коагулопатию (ДВС) без подавления антикоагулянтной системы протеина С.

## РЕЗЮМЕ

В статье описываются модельные опыты на приматах по изучению сепсиса, вызванного *E. coli*, с акцентом на реакцию системы гемостаза и механизм этой реакции, причем особое внимание уделено роли фосфолипидных микрочастиц в диссеминированном внутрисосудистом свертывании крови (ДВС). Понимание принципов того, как система гемостаза реагирует на воспалительный стресс, основывается на рассмотрении этой системы как состоящей из медиаторов и регуляторов. Они объединены в сбалансированную систему, состоящую из четырех функциональных квадрантов. В зависимости от обстоятельств эта система предназначена для контроля за проходимость или за целостностью (сохранностью) сердечно-сосудистой системы.

В первом разделе описываются эти четыре функциональных квадранта: коагуляционный с антикоагулянтным и фибринолитическим с антифибринолитическим. Функции всех квадрантов регулируются тромбином путем его взаимодействия или с эндотелием, или с тромбоцитами. Затем следует описание модуляторов, которые определяют равновесие между четырьмя функциональными квадрантами. Особое внимание уделено тому, как модуляторы, такие, как эстроген, интерлейкин-6 и другие, влияют на баланс между прокоагулянтными **медиаторами** (например, фактор Ха

плюс фосфолипидные микрочастицы, или везикулы) и антикоагулянтными и фибринолитическими **регуляторами** (протеин С, активаторы плазминогена).

Второй раздел посвящен изучению того, как эта система реагирует на воспалительный стресс в серии экспериментов, основанных на ее воссоздании или вмешательстве. Особое внимание уделено роли фосфолипидных частиц, а также определению тех (клинических) обстоятельств, при которых система гемостаза является звеном в летальной цепи событий по сравнению с теми, где она функционирует параллельно (как эпифеномен, или побочное явление).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Taylor F.B., Kosanke S., Emerson T. et al.// Shock. — 1994. — Vol. 42. — P. 92—103.
2. Taylor F.B. Jr. In: Brigham K.L., ed. Endotoxin and Lungs. — N.-Y.: Marcel Dekker, 1994.
3. Esmon C.T.//J. Biol. Chem. — 1989. — Vol. 264. — P. 4743.
4. Esmon C.T., Fukudome K. et al.// 3-rd International Symposium on Fibrinogen-Hemostasis, Inflammation and Cardiovascular Disease, Ulm, Germany, May 3—4, 1996.
5. Hanns M., Collen D.// J. Lab. Clin. Med. — 1987. — Vol. 109. — P. 97.
6. Loskutoff D.J., Edgington T.S.// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 3903.
7. Collen D.// Thromb and Haemost. — 1980. — Vol. 43. — P. 77—89.
8. Tesfamariam B.// Free Radicals in Biol. and Med. — 1994. — Vol. 16. — P. 383—391.
9. Read M.A., Meyrick B.O.// In: K.L. Brigham/ ed. Endotoxin and Lungs. — N.-Y.: Marcel Dekker, 1993.
10. Old L.J.// Sci Amer. — 1988. — Vol. 258. — P. 59.
11. Nawroth P.P., Stern D.M.// J. Exp. Med. — 1986. — Vol. 163. — P. 740.
12. Pohlman T.H., Stannes K.A. et al.// J. Immunol. — 1986. — Vol. 136. — P. 4548.
13. Davis E.W., Fujikawa K., Kiesel W.// Biochemistry. — 1991. — Vol. 30. — P. 10366.
14. Booth N.A., Anderson J.A., Bennett B.// J. Clin. Path. — 1985. — Vol. 38. — P. 825.
15. Erickson L.A., Ginsberg M.G., Loskutoff D.J.// J. Clin. Invest. — 1984. — Vol. 74. — P. 1465.
16. Sprengos E.D., Kluff C.// Blood. — 1987. — Vol. 69. — P. 381—387.
17. Drake T.A., Cheng J. et al.// Am. J. Pathol. — 1983. — Vol. 142. — P. 458.
18. Taylor F.B. Jr., Hoogendorn H. et al.// Blood. — 1991. — Vol. 79. — P. 1720—1728.
19. Unpublished Observation. Effects of anti protein C and t-PA antibodies on the response to LD<sub>100</sub> *E. coli*.
20. George J.N., El-Harake// In: Beutler E., Lichtman M., Coller B., Kipps T.J. eds. — Williams Hematology (5-th ed.). — N.-Y.: McGraw-Hill Inc, 1996.
21. Taylor F.B. Jr., Chang A.K. et al. 15-th Congress of the International Society on Thrombosis

and Haemostasis — Jerusalem, Israel, June 1116, 1995.

22. *Kruithof E.K.O., Mestries J.C. et al.*//Thromb. and Haemost. — 1997. — Vol. 77. — P. 905—910.

23. *Taylor F., Chang A.C.K. et al.*// Blood. — 1987. — Vol. 78. — P. 918.

24. *Taylor F.B. Jr., Dahlback B. et al.*// Blood. — 1995. — Vol. 86. — 342.

25. *Dahlback B.*//Semin Thromb Hemost. — 1984. — Vol. 10. — P. 139.

26. *Creasey A.A., Chang A.C.K. et al.*// J. Clin. Invest. — 1993. — Vol. 91. — P. 2850—2860.

27. *Carr C., Bild G.S. et al.*//Circ. Shock. — 1995. — Vol. 44. — P. 126.

28. *Naylor F.B. Jr., Emerson T.E. Jr. et al.*// Circ. Shock. — 1988. — Vol. 26. — P. 227.

29. *Bajzer L., Taylor F., Tracy P.B.*//Thrombosis and Haemostasis Suppl, pg 596 (abstr) C-2434). — June 1997.

30. *Anguo L., Chang A.C.K. et al.*// Shock. — 1996. — Vol. 5. — P. 274—279.

31. *Taylor F.B. Jr., He S.E. et al.*//Thromb and Haemost. — 1996. — Vol. 75. — P. 578—584.

32. *Taylor F.B., Chang A.C.K. et al.* Active site inhibited factor VIIa inhibits deep vein thrombosis in the primate. Blood (in press).

33. *Virchow R.*/In: Virchow R. (ed.), *Gesammelte Abhandlungen für Wissenschaftlichen Medicin.* — 1856, Frankfurt Von Meidinger Sohn. — P. 458—636.

34. *Slack S.M., Cui Y., Turitto V.T.*// Thromb Haemost. — 1993. — Vol. 1. — P. 129—133.

35. *Bokisch V.A., Top F.H. Jr. et al.*//Engl. J. Med. — 1973. — Vol. 289. — P. 996—1003.

36. *Dvorak H.F., Van De Water L. et al.*//Cancer Res. — 1983. — Vol. 43. — P. 4434—4443.

37. *Wiedmer T., Esmon C.T., Sims P.J.*// Blood. — 1986. — Vol. 68. — P. 875—880.

38. *Ando B., Wiedmer T. et al.*// J. Biol. Chem. — 1988. — Vol. 263. — P. 11907—11914.

39. *Peerschke E.I.B., Reid K.B.M.*// Thromb. Haemost. — 1993. — Vol. 69. — P. 785.(abstr.).

40. *Gemmell C.H., Sefton M.V., Yeo E.L.*//Thromb Haemost. — 1993. — Vol. 69. — P. 700 (abstr.).

41. *Zimmerman T.S., Muller-Eberhard H.J.*// J. Exp. Med. — 1971. — Vol. 134. — P. 1601—1607.

42. *Holme P.A., Solum N.O., Brosstad F.*//Thromb Haemost. — 1993. — Vol. 69. — P. 1198 (abstr.).

43. *Galli M., Grassi A., Barbui T.*// Thromb Haemost. — 1993. — Vol. 69. — P. 541 (abstr.).

44. *Warkentin T.E., Hayward C.P.M., Santos A.V., Kelton J.G.*//Thromb Haemost. — 1993. — Vol. 69. — P. 912 (abstr.).

45. *He S., Hinshaw L. et al.*//Circ Shock. — 1993. — Vol. 41. — P. 88—102.

46. *Taylor F.B. Jr., Esmon C.T., Hinshaw L.B.*// J. Trauma. — 1991. — Vol. 30. — P. 197.

47. *Taylor F.B. Jr.* /In: JL Ryan, D.C. Morrison, eds. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides.* — 1991. — Vol. 2.

48. *Voss B.L., DeBault L.E. et al.*// Circ Shock. — 1991. — Vol. 33. — P. 142.

49. *Randolf M.M., White G.L. et al.* Complete inhibition of tissue thrombosis and hemorrhage by ALA-TFPI does not account for its protection against *E.coli*: A comparative study of treated and untreated non surviving baboons challenged with LD<sub>100</sub> *E.coli*. (Submitted to Thromb and Haemost).

50. *Taylor F.B. Jr., Chang A.C.K. et al.*//Blood. — 1991. — Vol. 78. — P. 364.

51. *Hinshaw L.B., Tekamp-Olsen P., Chang A.C.K. et al.*//Circ Shock. — 1990. — Vol. 30. — P. 279.

52. *Taylor F.B. Jr., Chang A.C.K. et al.*//Circ Shock. — 1991. — Vol. 33. — P. 127.

53. *Taylor F.B. Jr.*// Haemosttasis. — 1996. — Vol. 26. — P. 83—91.

54. *Rottingen J.A., Enden T. et al.*//J. Biol. Chem. — 1995. — Vol. 270. — P. 4650.

55. *Camerer E., Rottingen J.A. et al.*//J. Biol. Chem. — 1996. — Vol. 271. — P. 29034.

56. *Taylor F.B. Jr., Chang A. et al.*//J. Clin. Invest. — 1987. — Vol. 79. — P. 918.

57. *Sandest P.M., Warm-Cramer B.J. et al.*//Blood. — 1991. — Vol. 78. — P. 1496—1502.

58. *Taylor F.B. Jr.* /In: Muller-Berghaus G. et al. eds. *DIC: Pathogenesis and Therapy of Disseminated Intravascular Fibrin Formation.* — N.-Y., 1993.

59. *Broze G.J. Jr.* Blood Coagul Fibrinol. — 1995. — Vol. 6. — P. 7—13.

60. *Rapaport S.I.*//Thromb and Haemost. — 1991. — Vol. 66. — P. 6—15.

61. *Kurosawa S., Stearns-Kurosawa D.J. et al.*// J. Clin. Invest. — 1995; abstract.

62. *Davie E.W.*//Thromb Haemostas. — 1995. — Vol. 74. — P. 1—6.

63. *Bom V.J.J., Bertina R.M.*//Biochem J. — 1990. — Vol. 265. — P. 327—336.

64. *Marcum I.A., Rosenberg R.D.*//Biochemistry. — 1984. — Vol. 23. — P. 1730.

65. *Calandra T., Bucala R.*//J. Inflamm. — 1996. — Vol. 47. — P. 39—51.

66. *Hinshaw L.B., Beller B.K. et al.*//Circ Shock. — 1985. — Vol. 16. — P. 265—277.

Поступила 15.04.99.

## BABOON MODELS OF *E. COLI* SEPSIS: ROLE OF PHOSPHOLIPID MICROPARTICLES IN DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION

*Fletcher B. Taylor Jr. M.D.*

### S u m m a r y

The experiences with primate models of *E.coli* sepsis with emphasis on the responses of the hemostatic system and the mechanism of these responses with emphasis on the role of phospholipid microparticles in mediating disseminated intravascular coagulation, (DIC) are described. Understanding the principles of how the hemostatic system responds to inflammatory stress depends on viewing this system as a collection of mediator and regulator factors. They are integrated into a balanced system consisting of four functional quadrants. Depending on circumstances this system is designed to control either the patency or the integrity of the cardiovascular system.

\*Oklahoma Medical Research Foundation 825 N.E. 13th Street, Oklahoma City, OK 73104, USA.

Grant Support: NIH 2 R01 GMHL37704-13.