© Решетняк Н. А., Якубенко Е. Д., Хрипаченко И. А.

УДК: 616.16+616.24:612.221.3+615.273.53] – 001+615.816

Решетняк Н. А., Якубенко Е. Д., Хрипаченко И. А.

МОДИФИКАЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ АЛЬВЕОЛОКАПИЛЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ НЕБУЛИЗИРОВАННЫМ ГЕПАРИНОМ В МОДЕЛИВЕНТИЛЯТОР-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ

Донецкий национальный медицинский университет

им. М. Горького (г. Красный Лиман)

nsaichuk@mail.ru

Работа является фрагментом НИР «Принципы стресс-лимитирующей анестезии и интенсивной терапии у детей и взрослых с полиэтиологичным повреждением ЦНС», № государственной регистрации 0105U008732.

Вступление. Проблема лечения острого респираторного дистресс синдрома (ОРДС) в клинической практике как у детей так и у взрослых остается нерешенной и по-прежнему связана с высоким уровнем летальности [12,14]. Основными стратегиями в лечении ОРДС являются механическая вентиляция легких и оксигенотерапия [6]. С одной стороны они позволяют сохранить больному жизнь, а с другой, к сожалению, за счет механического растяжения и провоспалительных эффектов гипероксии способствуют дальнейшему повреждению легких [8,14]. Возможность воспроизведения эффектов механической вентиляции и оксигенотерапии в различных моделях ОРДС обуславливает нарастающий интерес исследователей, направленный на разработку новых стратегий в лечении этого критического состояния [9].

Известно, что ОРДС проявляются не только воспалением, но и легочной коагулопатией, которая характеризуется прокоагулянтным альвеолярным ответом, ингибированием антикоагулянтов, угнетением фибринолиза и отложением фибрина [10]. Одним из фармакологических подходов, который в настоящее время интенсивно изучается, является использование локальной антикоагулянтной терапии, в частности небулизированного гепарина [7]. Противоречивость опубликованных экспериментальных данных, посвященных этому вопросу, обусловлена двумя основными обстоятельствами. Во-первых, это использование разных моделей и разных животных для воспроизведения легочного повреждения. Во-вторых, это разные дозы небулизированного гепарина из расчета от 333 ЕД/кг до 1000 ЕД/кг массы тела животных [13]. Нами установлено, что доза небулизированного гепарина для крыс из расчета 200 ЕД/кг массы тела не вызывает структурных изменений в легких интактных животных. При этом, в открытых источниках нами не обнаружено данных относительно влияния такой дозы гепарина на проницаемость альвеолокапиллярной мембраны в условиях модели вентилятор-индуцированного повреждения легких.

Цель исследования. Определить влияние небулизированного гепарина на проницаемость альвеолокапиллярной мембраны в условиях экспериментальной модели вентилятор-индуцированного повреждения легких.

Объект и методы исследования. Протокол данного исследования согласован с комиссией по биоэтике Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького и выполнен в соответствии с международными требованиями по содержанию и уходу за животными [5].

Эксперименты проведены на 10 белых лабораторных крысах-самцах (массой тела 180-240 гр.) линии «Вистар». Животные, по условиям эксперимента, были разделены на 2 группы (n = 5 в каждой). Крыс обеих групп подвергали обработке небулизированным гепарином в дозе из расчета 200 ЕД/кг массы животного. Ингаляцию осуществляли в течение 15-30 минут с использованием небулайзера с компрессором Ulaizer First Aid (UA) и аэрозольной камерой Cirrus 2 Intersurgical, ltd, (UK). Компрессор посредством ПХВ трубки дыхательного контура небулайзера соединяли с аэрозольной камерой, которую при помощи коннектора фиксировали к отверстию контейнера, в который помещали животное. В аэрозольную камеру вводили расчётную дозу гепарина в 5 мл. 0,9% р-ра NaCl. После завершения ингаляции животным производили трахеостомию с последующей механической вентиляцией (МВ) легких с избыточным дыхательным объемом (ДО) в течение 2 часов. В 1-й группе вентилятор-индуцированное повреждение легких моделировали путем МВ с ДО 20 мл/кг массы тела (умеренная волюмотравма), во 2-й группе крыс с ДО 40 мл/кг (тяжелая волюмотравма). После окончания МВ легких животных выводили из эксперимента и на открытых легких производили забор образцов бронхоальвеолярной жидкости путем бронхоальвеолярного лаважа.

Подробное описание методики создания модели вентилятор-индуцированного повреждения легких, включающее использованную аппаратуру, параметры МВ, анестезию, компенсацию перспирационных потерь и эвтаназию, а также методики

получения бронхоальвеолярной жидкости и результатов, которые использованы в качестве контроля, представлено нами в предыдущей публикации [4]. В качестве маркеров проницаемости альвеолокапиллярной мембраны в бронхоальвеолярной жидкости определяли концентрацию общего белка (ОБ) по Лоури [1] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина и концентрацию мочевины уреазным методом [2]. Кроме того, определяли уровень диеновых коньюгат (ДК) по методу Гаврилова В. Б. и соавт. [11], активность каталазы (К) по методу Королюк М. А. и соавт. [2] и содержание молекул средней массы (МСМ) по экстинкции при длинах волн 238 нм., 254 нм., 260 нм., и 280 нм. по методике Габриэляна [12]. Концентрацию мочевины в крови использовали для определения истинной концентрации исследуемых в бронхоальвеолярном секрете веществ с учетом разведения жидкостью бронхоальвеолярного лаважа [11].

Полученные данные обрабатывали методами непараметрической статистики. Выявленные межгрупповые различия оценивали по критерию Краскела-Уоллиса, медианного теста и критерия ХИ-квадрат. Достоверными считали таковые при $p < 0,05$. Статистические моменты в тексте и таблице представлены значениями медианы (Me), минимальным и максимальным значениями (min-max) показателя в исследуемой выборке.

Результаты исследований и их обсуждение. Оценка влияния небулизированного гепарина на проницаемость альвеолокапиллярной мембраны в условиях модели умеренного вентилятор-индуцированного повреждения легких (ДО 20 мл/кг) показала, что по сравнению с контролем, у животных 1-й группы концентрация ОБ в бронхоальвеолярной жидкости уменьшилась в 1,1 раза **(табл.).** Эти отличия статистически незначимы: ранговая сумма в контроле составила 31,5, а в экспериментальной группе соответственно 23,5. U-тест Манна-Уитни – 8,5; Z-статистика 0,83 при $p = 0,4$.

Содержание МСМ в бронхоальвеолярной жидкости при длине волны 238 нм. в условиях модели умеренной волюмотравмы у крыс в контроле было в 1,6 раза ниже, чем у животных 1-й группы после воздействия небулизированного гепарина. Ранговая сумма в контроле составила 24,5, а в экспериментальной группе 30,5 соответственно. U-тест Манна-Уитни составил 9,5; Z-статистика -0,62 при $p = 0,53$.

Содержание МСМ в бронхоальвеолярной жидкости при длине волны 254 нм. в контроле также было ниже значений 1-й группы. Медианы рассматриваемого показателя в сравниваемых группах отличаются почти в два раза. Ранговая сумма данного показателя для второй контрольной группы составила 19, а для второй экспериментальной группы 36 соответственно. U-тест Манна-Уитни составил 4, Z-статистика -1,77 при $p = 0,07$.

Медиана МСМ бронхоальвеолярной жидкости при длине волны 260 нм. в контрольной группе ниже, чем в экспериментальной группе. Несмотря на почти двукратное превышение показателя в 1-й экспериментальной группе, различия в сравниваемых группах также как и предыдущего показателя статистически не значимы. Ранговая сумма данного показателя для контрольной группы составила 25,5 а для 1-й экспериментальной группы 29,5, U-тест Манна-Уитни составил 10,5; Z-статистика -0,41, при $p = 0,67$.

МСМ бронхоальвеолярной жидкости при 280 нм. у крыс 1-й группы не отличается от таковых контроля. Ранговая сумма данного показателя в контроле составила 26,5, а для 2-й группы 28,5; U-тест Манна-Уитни составил 11,5; Z-статистика -0,2 при $p = 0,83$.

Содержание ДК в бронхоальвеолярной жидкости у животных с моделью умеренной волюмотравмы (ДО 20 мл/кг массы тела) с предварительной обработкой небулизированным гепарином существенно не отличалось от контроля. Ранговая сумма в контроле составила 24, а во 2-й группе, соответственно, 31. U-тест Манна-Уитни составил 9; Z-статистика -0,73 при $p = 0,46$.

Наиболее значимые отличия в сравниваемых группах животных обнаружены для показателя активности каталазы в бронхоальвеолярной жидкости. В 1-й группе животных медиана этого показателя оказалась в 5,3 раза выше по сравнению с контролем. Ранговая сумма контрольной группы составила 17,5, а у крыс 2-й группы 37,5, соответственно. U-тест Манна-Уитни составил 2,5; Z-статистика -2,08, при $p = 0,04$.

Таким образом, предварительная обработка крыс небулизированным гепарином в дозе 200 ЕД/кг массы тела животного в условиях модели умерен-

Таблица.

Маркеры проницаемости альвеолокапиллярной мембраны в модели вентилятор-индуцированного повреждения легких, Me (min-max)

Показатель	Дыхательный объем, мл/кг			
	20		40	
	1-я группа	Контроль	2-я группа	Контроль
ОБ	2,13 (1,2-2,7)	2,38 (1,5-3,2)	0,59* (0,28-2,4)	3,96 (1,9-6,2)
МСМ 238	4,92 (1,3-5,6)	3,08 (1,6-4,6)	2,41* (1,9-4,1)	6,68 (3,9-7,6)
МСМ 254	0,82 (0,4-9,2)	0,42 (0,3-0,6)	0,51 (0,32-1,30)	1,52 (0,4-1,8)
МСМ 260	0,43 (0,19-0,6)	0,22 (0,2-0,6)	0,27 (0,20-0,85)	0,94 (0,3-1,5)
МСМ 280	0,3 (0,16-0,52)	0,22 (0,2-0,6)	0,19 (0,09-0,72)	0,65 (0,2-0,8)
ДК	23,1 (6,3-26,3)	19,95 (3,4-25,8)	1,96 * (1,2-23,5)	26,73 (9,2-28,2)
К	31,24 * (19,6-42,1)	5,92 (4,8-30,6)	35,3 (23,2-39,8)	58,86 (20,6-61,3)

Примечание: * – различия с контролем значимы при $p < 0,05$.

ной волюмотравмы легких практически не изменяет проницаемость альвеолокапиллярной мембраны для белка и среднемолекулярных пептидов. В ответ на обработку небулизированным гепарином уровень липопероксидации не изменяется, а активность каталазы бронхоальвеолярной жидкости существенно возрастает.

МВ легких в течение 2 часов с чрезмерным ДО (40 мл/кг массы тела) приводит к тяжелой волюмотравме. Концентрация ОБ в бронхоальвеолярной жидкости крыс контрольной группы при таких экспериментальных условиях достаточно высока. Предварительная обработка животных небулизированным гепарином (2-я группа) приводила к драматическому (в 6,7 раза) снижению концентрации ОБ в бронхоальвеолярной жидкости. Обнаруженные отличия статистически значимы. Ранговая сумма в контроле составила 38, а в 3-й группе 17. U-тест Манна-Уитни составил 2,0; Z-статистика 2,19 при p = 0,03.

МСМ бронхоальвеолярной жидкости при 238 нм. во 2-ой группе животных в 2,7 раза ниже, чем в контроле. Влияние небулизированного гепарина на содержание в бронхоальвеолярной жидкости крыс МСМ при длине волны 238 нм. оказалось статистически значимым. Ранговая сумма в контроле составила 39, а во 2-ой группе 16. U-тест Манна-Уитни составил 1,0; Z-статистика 2,4 при p = 0,02.

Медиана МСМ при длине волны 254 нм. во 2-ой группе почти в 3 раза ниже таковой в контроле. Ранговая сумма контрольной группы животных составила 33, а во 2-ой группе 22. U-тест Манна-Уитни составил 7,0; Z-статистика 1,14 при p = 0,25.

Также в 3 раза меньше под влиянием небулизированного гепарина оказалось содержание в бронхоальвеолярной жидкости МСМ, определяемых детекцией при длине волны 260 нм. Однако эти различия статистически незначимы – ранговая сумма в контроле составила 34, а во 2-ой группе 20,5 соответственно. U-тест Манна-Уитни составил 5,5; Z-статистика 1,46 при p = 0,14.

Разница МСМ бронхоальвеолярной жидкости, при длине волны 280 нм. у животных сравниваемых групп статистически незначима. Ранговая сумма для описываемого показателя в контрольной группе животных составила 35, а во 2-ой экспериментальной группе 20 соответственно. U-тест Манна-Уитни составил 5,0; Z-статистика 1,56 при p = 0,11.

В условиях выраженного вентилятор-индуцированного повреждения легких содержание в бронхоальвеолярной жидкости ДК под влиянием небулизированного гепарина снижается в 13,6 раза. Ранговая сумма для описываемого показателя в контрольной группе животных составила 38, а во 2-ой экспериментальной группе 17 соответственно. U-тест Манна-Уитни составил 2,0; Z-статистика 2,19 при p = 0,02.

Активность каталазы в бронхоальвеолярном секрете экспериментальных животных с выраженным вентилятор-индуцированным повреждением легких под влиянием небулизированного гепарина существенно не изменяется. Ранговая сумма для описываемого показателя в контроле составила 32, а во 2-ой экспериментальной группе 23. U-тест Манна-Уитни составил 8,0; Z-статистика 0,94 при p = 0,34.

Таким образом, обработка небулизированным гепарином при тяжелой волюмотравме характеризуется почти семикратным снижением концентрации общего белка, более чем 2-х кратным снижением среднемолекулярных пептидов, определяемых экстинкцией при длине волны 238 нм, и почти 14-кратным снижением содержания в бронхоальвеолярной жидкости диеновых конъюгат.

Выводы. В условиях экспериментальной модели вентилятор-индуцированного повреждения легких небулизированный гепарин при умеренной волюмотравме не изменяет проницаемость альвеолокапиллярной мембраны для белка и среднемолекулярных пептидов, но обладает протективным эффектом в отношении тяжелой волюмотравмы. Этот эффект вероятно обусловлен обнаруженным снижением уровня липопероксидации в бронхоальвеолярной жидкости.

Перспективы дальнейших исследований. Полученные данные перспективны в отношении возможности клинической апробации и оценки эффективности использования небулизированного гепарина в предупреждении вентилятор-индуцированного повреждения легких у пациентов групп риска.

Литература

1. Алексеев В. В. Медицинские лабораторные технологии. Т. 2 [Текст] / В. В. Алексеев, А. И. Карпищенко, А. Н. Алипов; под ред. А. И. Карпищенко. – 3-е изд., пер. и доп. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2013. – 792 с.
2. Габриэлян Н. И. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях [Текст] / Н. И. Габриэлян, Э.Р. Левицкий, А. А. Дмитриев. – М., 1985. – 20 с.
3. Кабанова А. А. Свободнорадикальное окисление при гнойно-воспалительных процессах челюстно-лицевой области [Текст] / А. А. Кабанова // Вестник ВГМУ. – 2013. – № 1. – С. 107-111.
4. Решетняк Н. А. Проницаемость альвеолокапиллярной мембраны в условиях экспериментальной модели вентилятор-индуцированного повреждения легких [Текст] / Н. А. Решетняк, Е. Д. Якубенко, И. А. Хрипаченко // Science Rise. – 2016. – Vol. 1/3, Issue 18. – P. 43-47. doi: 10.15587/2313-8416.2016.59058.
5. Arts J. W. M. The Impact of Transportation on Physiological and Behavioral Parameters in Wistar Rats: Implications for Acclimatization Periods [Text] / J. W. M. Arts [et al.] // ILAR Journal. – 2012. – Vol. 53, Issue 1. – P. 82-98. doi: 10.1093/ilar.53.1.82.
6. de Prost N. Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications [Text] / N. de Prost, Jean-Damien Ricard, G. Saumon, D. Dreyfuss // Annals of Intensive Care. – 2011. – Vol. 1. – P. 28. doi:10.1186/2110-5820-1-2.
7. Dixon B. Nebulized heparin is associated with fewer days of mechanical ventilation in critically ill patients: a randomized controlled trial [Text] / B. Dixon, M. J. Schultz, R. Smith, J. B. Fink [et al.] // Crit Care. – 2010. – Vol. 14, Issue 5. – P. 180. doi: 10.1186/cc9286.
8. Frohlich S. Hypoxia-induced inflammation in the lung: a potential therapeutic target in acute lung injury? [Text] / S. Frohlich, J. Boylan, P. McLoughlin // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2013. – Vol. 48, Issue 3. – P. 271-279. doi: 10.1165/rcmb.2012-0137TR.

9. Gonzalez-Lopez A. Lung strain and biological response in mechanically ventilated patients [Text] / A. Gonzalez-Lopez, E. Garcia-Prieto, E. Batalla-Solis, L. Amado-Rodriguez [et al.] // Intensive Care Med. – 2012. – Vol. 38, Issue 2. – P. 240-247. doi:10.1007/s00134-011-2403-1.
10. Hofstra J. J. Pulmonary coagulopathy as a new target in lung injury – a review of available pre-clinical models [Text] / J.J. Hofstra, N. P. Juffermans, M. J. Schultz, M. M. Zweers // Curr Med Chem. – 2008. – Vol. 15, Issue 6. – P. 588-595. doi: 10.2174/092986708783769696
11. Konstantinidi E. M. Exhaled Breath Condensate: Technical and Diagnostic Aspects [Text] / E. M. Konstantinidi, A. S. Lappas, A.S. Tzortzi, P. K. Behrakis // The Scientific World Journal. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-25. doi: 10.1155/2015/435160.
12. Sadowitz B. Preemptive mechanical ventilation can block progressive acute lung injury [Text] / B. Sadowitz, S. Jain, M. Kollisch-Singule, J. Satalin, P. Andrews, N. Habashi, L. A. Gatto, G. Nieman // World Journal of Critical Care Medicine. – 2016. – Vol. 5, Issue 1. – P. 74-82. doi: 10.5492/wjccm.v5.i1.74.
13. Tuinman P. R. Nebulized anticoagulants for acute lung injury – a systematic review of preclinical and clinical investigations [Text] / P. R. Tuinman, B. Dixon, M. Levi, N. P. Juffermans, M. J. Schultz // Crit Care. – 2012. – Vol. 16, Issue 2. – P. 70. doi: 10.1186/cc11325.
14. Zimmerman J. J. Incidence and outcomes of pediatric acute lung injury [Text] / J. J. Zimmerman, S. R. Akhtar, E. Caldwell, G. D. Rubenfeld // Pediatrics. – 2009. – Vol. 124, Issue 1. – P. 87-95. doi: 10.1542/peds.2007-2462.

УДК: 616.16+616.24:612.221.3+615.273.53] – 001+615.816

МОДИФІКАЦІЯ ПРОНИКНОСТІ АЛЬВЕОЛОКАПІЛЯРНОЇ МЕМБРАНИ НЕБУЛІЗОВАНИМ ГЕПАРИНОМ В МОДЕЛІ ВЕНТИЛЯТОР-ІНДУКОВАНОГО ПОШКОДЖЕННЯ ЛЕГЕНІВ

Решетняк Н. О., Якубенко О. Д., Хрипаченко І. А.

Резюме. Метою дослідження було визначити вплив небулізованого гепарину на проникність альвеолокапілярної мембрани в моделі вентилятор-індукованого пошкодження легенів щурів. Небулізований гепарин при помірній волюмотравмі не змінює проникність альвеолокапілярної мембрани для білка та середньомолекулярних пептидів, але має протективний вплив при тяжкій волюмотравмі, мабуть за рахунок зниження рівня ліпопероксидації.

Ключові слова: небулізований гепарин, модель вентилятор-індукованого пошкодження легенів, щури.

УДК: 616.16+616.24:612.221.3+615.273.53] – 001+615.816

МОДИФИКАЦИЯ ПРОНИЦАЕМОСТИ АЛЬВЕОЛОКАПИЛЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ НЕБУЛИЗИРОВАННЫМ ГЕПАРИНОМ В МОДЕЛИ ВЕНТИЛЯТОР-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГКИХ

Решетняк Н. А., Якубенко Е. Д., Хрипаченко И. А.

Резюме. Целью исследования было определить влияние небулизированного гепарина на проницаемость альвеолокапиллярной мембраны в модели вентилятор-индуцированного повреждения легких у крыс. Небулизированный гепарин при умеренной волюмотравме не изменяет проницаемость альвеолокапиллярной мембраны для белка и среднемолекулярных пептидов, но обладает протективным эффектом в отношении тяжелой волюмотравмы, вероятно за счет снижения уровня липопероксидации.

Ключевые слова: небулизированный гепарин, модель вентилятор-индуцированного повреждения легких, крысы.

UDC: 616.16+616.24:612.221.3+615.273.53] – 001+615.816

MODIFICATION OF ALVEOLOCAPILLARY PERMEABILITY BY NEBULIZED HEPARIN IN RAT'S MODEL OF VENTILATOR INDUCED LUNG INJURY

Reshetnyak N. A**., Yakubenko O. D., Khripachenko I.** A**.**

Abstract. The aim of the study was to determine influence on the alveolocapillary membrane permeability in condition of ventilator induced lung injury experimental model.

Experiments were performed on the ten Wistar laboratory male rats (180-240 g of BM). Rats expose to pretreatment of nebulized heparin in the dose, which calculated as 200 U/kg of animal BM, by aerosol chamber Cirrus 2 Intersurgical, ltd, (UK). In the first group ventilator induced lung injury we simulate by mechanical ventilation with tidal volume of 20 ml/kg (moderate volumotrauma), and in second group of rats with tidal volume of 40 ml/kg (severe volumotrauma). After mechanical ventilation completion, the animals withdraw from experiment and by bronchoalveolar lavage; selection of bronchoalveolar liquid probe was performed on the open lungs. In the bronchoalveolar liquid, we determine concentration of total protein according to Lowry with bovine serum albumin as standard and urea concentration by urease method. In addition we determine level of dien conjugates according to method of Gavrilova and all, catalase activity according to Koroluk and all method and content of middle molecular mass substances by extinction at 238 nm., 254 nm., 260 nm., and 280 nm. of wavelength according to Gabrielyan. Serum concentration of the urea we used for determination of true concentration of analyzing substances in bronchoalveolar liquid with accounting of dilution by the bronchoalveolar lavage solution.

We found that pretreatment of rats with nebulized heparin in the dose of 200 U/kg of animals BM in condition of moderate lung volumotrauma practically not change alveolocapillary permeability for total protein and middle molecular mass substances. The level of lipoperoxidation was not changed in the response to pretreatment with nebulized heparin but bronchoalveolar liquid catalase activity significantly increased.

We also found that pretreatment of rats with nebulized heparin in condition of severe lung volumotrauma characterized by near sevenfold decreasing of total protein concentration, and more than twofold decreasing middle molecular mass substances, with determined by extinction at 238 nm wavelength, and near 14 fold decreasing of bronchoalveolar liquid dien conjugates content.

Thereby, nebulized heparin in condition of experimental model of ventilator induced lung injury with moderate volumotrauma not change alveolocapillary membrane permeability for total protein and middle molecular mass substances but has protective effect concerning severe volumotruma. This one probably determined by finding decreasing level of lipoperoxidation in bronchoalveolar liquid.

The finding may be useful in respect to possibility of clinical trials and nebulized heparin using effectiveness estimation in the prevention of ventilator induced lung injury in risk group patients.

Keywords: nebulized heparin, ventilator induced lung injury model, rats.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 28.01.2016 року