УДК 612.112.5:612.225-092.4

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА НА ФОНЕ ЕЖЕДНЕВНЫХ ОХЛАЖДЕНИЙ ДО СВЕРХГЛУБОКОЙ СТЕПЕНИ ГИПОТЕРМИИ У КРЫС

Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

Лычева Н.А., Макушкина Д.А., Седов А.В., Шахматов И.И., Киселев В.И.

Цель: изучить изменения показателей системы гемостаза у крыс в ответ на ежедневное охлаждение до сверхглубокой степени гипотермии. Материалы и методы: в исследовании использовались крысы-самцы линии Wistar (140 особей). Гипотермия моделировалась путем ежедневного помещения животных в воду температурой 5°С на протяжении 30 дней. Критерием прекращения воздействия служило достижение экспериментальными животными ректальной температуры ниже 20°С, что соответствовало сверхглубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и составляло 55 ± 5 минут. Контрольная группа животных помещалась в воду температурой 30°С. Забор крови осуществлялся на 1-й, 2-й, 5-й, 10-й, 14-й, 20-й, 30-й дни ежедневных охлаждений. Результаты. Наблюдали последовательную смену реакции системы гемостаза на ежедневные охлаждения. Так, в 1-й экспериментальный день регистрировалась гипокоагуляция. Однако начиная со 2-го дня регистрировали гиперкоагуляционный сдвиг. Наиболее выраженная гиперкоагуляция регистрировалась на 14-й день. К окончанию эксперимента (на 30-й день) регистрировали гиперкоагуляцию на фоне увеличения скорости образования фибриновой сети и показателя максимальной плотности сгустка. Выводы. Ежедневное охлаждение до сверхглубокой степени гипотермии сопровождалось стадийными изменениями в системе гемостаза. В 1-й экспериментальный день регистрировали гипокоагуляционный сдвиг. Начиная со 2-го экспериментального дня регистрировали развитие и нарастание гиперкоагуляционного сдвига. Максимальный гиперкоагуляционный сдвиг наблюдался на 14-й экспериментальный день и сопровождался наименьшим временем свертывания, зарегистрированным за весь экспериментальный период. На 30-й день наблюдали гиперкоагуляцию и уменьшение времени образования тромба, с образованием максимально плотного сгустка.

Ключевые слова: *гипотермия, гемостаз, крысы.*

The aim was to study the state of hemostasis system parameters in rats in response to daily cooling up to an extremely high degree of hypothermia. Materials and methods: the study used male rats Wistar (140 animals). Hypothermia was modeled by daily placing the animals in water at a temperature of 5°C for 30 days. The criterion for cessation of exposure was the achievement of a rectal temperature below 20°C by experimental animals, which corresponded to an extremely high degree of hypothermia. Exposure time was individual and constituted 55±5 minutes. The control group of the animals was placed in water at a temperature of 30°C. Blood sampling was carried out on the 1st, 2nd, 5th, 10th, 14th, 20th, 30th days of daily cooling. Results. A consistent change in the response of the hemostatic system to daily cooling was observed. Thus, on the 1st experimental day, hypocoagulation was recorded. However, starting from the 2nd day, a hypercoagulation shift was recorded. The most pronounced hypercoagulation was recorded on the 14th day. By the end of the experiment (on the 30th day), hypercoagulation was recorded against the background of an increase in the rate of formation of the fibrin network and an indicator of the maximum clot density. Conclusions. Daily cooling to an extremely high degree of hypothermia was accompanied by phased changes in the hemostasis system. On the 1st experimental day, hypocoagulation was recorded. Starting from the 2nd experimental day, the development and increase of the hypercoagulation was registered. The maximum hypercoagulation was observed on the 14th experimental day and was accompanied by the shortest clotting time recorded over the entire experimental period. On the 30th day, hypercoagulation and a reduction in the time of blood clot formation were observed, with the formation of the most dense clot.

Key words: *hypothermia, hemostasis, rats.*

Адаптация к холоду является интегральным процессом, в котором принимают участие в той или иной мере все органы и системы организма, однако основные изменения направлены на сохранение и увеличение продукции тепла. Сохранению тепла в организме при адаптации к холоду способствует прежде всего уменьшение теплоотдачи с поверхности тела, что может достигаться различными способами [1]. Также повышаются температурные пороги для возникновения дрожи и запуска ряда метаболических реакций, повышающих холодовую толерантность организма [2]. Вопросам адаптации дыхательной, сердечно-сосудистой, эндокринной систем к действию холода посвящены многочисленные исследования [3, 4]. В то же время среди работ, посвященных изучению длительного воздействия холода на организм, имеются лишь единичные публикации, отражающие состояние при этом системы гемостаза, что не позволяет оценить влияние гипотермического воздействия на развитие адаптационных изменений в системах свертывания и фибринолиза. В основном эти работы посвящены сравнительному анализу гемостатического статуса жителей коренных народов Севера и пришлых людей [5, 6, 7]. Все вышенаписанное обозначило цель нашего исследования. Целью работы явилось изучение влияния ежедневных холодовых воздействий на возможность формирования и характер адаптационных изменений в системе гемостаза.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 140 крысах-самцах линии Wistar, массой 300 ± 15 г. Иммерсионная гипотермия моделировалась путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду температурой 5°С и воздуха 7°С. Критерием прекращения воздействия служило достижение экспериментальными животными ректальной температуры <20°С, что соответствовало сверхглубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и составляло 55 ± 5 минут. Контрольная группа животных помещалась в воду температурой 30°С. Охлаждение воспроизводили ежедневно. Состояние системы гемостаза оценивалось в 1-й, 2-й, 5-й, 10-й, 14-й, 20-й и 30-й дни. Тромбоэластометрия выполнялась на приборе «Rotem» (Pentapharm GmbH, Германия) с использованием реагента «Natem», в состав которого входит хлорид кальция. Кровь для исследования в объеме 5 мл получали путем забора из печеночного синуса в полистироловый шприц, содержащий 0,11 М (3,8%) раствора цитрата натрия (соотношение крови и цитрата 9:1). До проведения эксперимента на протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания согласно требованиям GLP. Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, и Директивами 86/609/EEC. Сравнение полученных результатов осуществляли путем вычисления медианы (Ме) и процентилей (25% и 75%). Статистический анализ выполнен с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни на персональном компьютере с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показателей системы гемостаза у животных всех экспериментальных групп представлены в табл. 1. Ввиду отсутствия статистически значимых отличий по показателям гемостаза у крыс контрольных групп в течение всего эксперимента в таблице приведены усредненные значения исследуемых показателей. Сравнение проводили между контрольными и опытными группами в соответствующих временных точках.

Таблица 1

Показатели системы гемостаза у крыс в различные периоды гипотермии

	CT, сек	CFT, сек	α °	MCF
Контроль (n=70)	245,0 [232,0÷259,0]	107,0 [77,5÷93,0]	69,5 [61,0÷74,5]	35,0 [28,5÷39,0]
1-й день (n=10)	286,0 [233,0÷343,0]*	84,0 [70,0÷95,0]	73,0 [71,0÷77,0]	13,0 [9,5÷18,5]*
2-й день (n=10)	148,0 [124,0÷180,5]*#	103,5 [99,0÷116,5]#	71,0 [71,0÷72,0]	50,5 [43,0÷61,0]*#
5-й день (n=10)	234,0 [221,5 ÷243,0]#	69,0 [65,0÷92,5]#	76,0 [65,5÷81,5]	67,0 [64,5÷71,0]*
10-й день (n=10)	147,0 [126,0÷181,0]*#	96,5 [76,0÷104,5]	71,5 [69,0÷75,0]	25,0 [17,0÷37,0]#
14-й день (n=10)	108,0 [102,0÷124,0]*	92,0 [78,0÷104,0]	75,0 [73,0÷79,0]	69,5 [52,5÷71,0]*#
20-й день (n=10)	185,0 [164,0÷211,5]*#	86,5 [73,5÷101,0]	73,5 [64,0÷79,5]	42,0 [31,5÷58,0]
30-й день (n=10)	196,5 [176,0÷216,5]*	51,0 [45,0÷57,0]*#	80,5 [79,0÷82,0]*	77,0 [76,5÷77,5]*#

Примечание: данные представлены в виде Ме – медиана выборки, [25÷75] – процентили выборки; * - статистически достоверная разница между значениями контрольной и экспериментальной группы (p<0,05, p<0,01); # – статистически достоверная разница между исследуемой и предшествующей экспериментальной группами (p<0,05, p<0,01); CT – время свертывания; CFT – время формирования сгустка; α – угол α, отражает интенсивность тромбообразования; MCF – максимальная плотность сгустка.

Из данных, приведенных в таблице, следует, что в 1-й день, сразу после прекращения охлаждения, время свертывания, характеризующее длительность фаз активации и коагуляции сгустка, увеличивалось по сравнению с показателем контрольной группы животных на 16% (p=0,046). Показатель MCF, который дает представление о максимальной плотности фибринового сгустка, снижался в 2,7 раза (p=0,024).

На 2-й день, сразу после прекращения охлаждения, наблюдалось уменьшение времени свертывания в 1,6 раза (p=0,031) в сравнении с показателем контрольной группы. Показатель времени образования сгустка увеличивался на 20% (p=0,045) в сравнении с величиной, зафиксированной у предшествующей группы животных, и не отличался от показателей контрольной группы. Было зафиксировано увеличение плотности сгустка в 3,8 раза, в сравнении с данным показателем на 1-й день (p=0,0004), и в 1,5 раза – в сравнении с данными контрольной группы (p=0,034).

На 5-й день время свертывания увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с этим же показателем на 2-й день (p=0,0045) и не отличалось от показателя контрольной группы. Время образования сгустка при этом снижалось в 1,5 раза (p=0,0075) в сравнении с предыдущим днем и не отличалось от показателя контрольной группы. Максимальная плотность фибринового сгустка превосходила контрольные значения в 1,3 раза (p=0,028) и не отличалась от величины, зарегистрированной в предыдущий экспериментальной группе.

На 10-й день сразу после воздействия гипотермического фактора было зафиксировано уменьшение времени свертывания в 1,5 раза, как в сравнении с показателем контрольной группы, так и в сравнении с данным показателем на 5-й день (p=0,0024). Максимальная плотность сгустка уменьшалась на 60% (p=0,036) в сравнении с аналогичным параметром предыдущей экспериментальной группы и не отличалась от контрольных значений.

На 14-й день время свертывания уменьшалось до минимального значения, зафиксированного на протяжении всего эксперимента, и, по сравнению с показателем контрольной группы, снизилось в 2,0 раза (p=0,013). Время образования сгустка и величина угла α статистически не изменялись. Величина максимальной плотности сгустка приближалась к значению, зафиксированному на 5-й день, а по сравнению с величиной показателя на 10-й день – возрастала в 2,7 раза (p=0,0023). Также величина данного показателя превышала его уровень в контрольной группе в 1,9 раза (p=0,038).

На 20-й день при сравнении с параметром контрольной группы было зафиксировано уменьшение времени свертывания на 25% (p=0,0025).

На 30-й день наблюдалось снижение времени коагуляции на 20% в сравнении с контрольной группой (p=0,028). Время образования сгустка также снижалось как в сравнении с контрольной группой, так и в сравнении с предыдущей группой (20-й день) в 2 и 1,6 раза соответственно (p=0,0021). Наблюдали увеличение как угла альфа, отражающего процесс фибринообразования, на 7° (p=0,045), так и максимальной плотности сгустка – в 1,8 раза по сравнению с значениями, зафиксированными на 20-й день, и в 2,2 раза – в сравнении с величиной показателя в контрольной группе (p=0,0011).

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало стадийные изменения, развивающиеся в системе гемостаза под действием ежедневных охлаждений до сверхглубокой степени гипотермии. Согласно литературным данным, первичной реакцией системы гемостаза на стрессорное воздействие является гиперкоагуляция [8]. В проведенном исследовании гипокоагуляция, зафиксированная в 1-й экспериментальный день, обусловлена снижением активности ферментов под действием гипотермии и демонстрирует вторичные нарушения в системе гемостаза [9]. Стресс-реакция при действии низких температур опосредована активацией симпато-адреналовой системы и сопровождается выбросом катехоламинов в кровь, что подтверждается развитием гиперкоагуляционного сдвига и увеличением максимальной плотности сгустка на 2-й экспериментальный день сразу после прекращения охлаждения. Так как адаптация организма к холоду связана с увеличением концентрации катехоламинов, рядом авторов описано резкое увеличение концентрации норадреналина в периферической крови: на 5-й день охлаждения – в 1,5 раза; на 15-й день – в 1,7 раза, а к 30-му дню эксперимента – до 2 раз [10, 11, 12]. Кроме того, показано, что при выработке адаптации к холодовому воздействию в организме возникают и усиливаются механизмы, способствующие предотвращению процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). При этом наблюдается разобщение фосфорилирования и свободно-радикального окисления в пользу последнего [13]. Признаком несостоятельности ответной реакции считают достоверное увеличение продуктов ПОЛ на 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни эксперимента [14, 15, 16]. При этом установлено, что продукты ПОЛ стимулируют агрегационный потенциал клеток крови и способствуют развитию гемореологических нарушений [17]. В нашем исследовании гиперкоагуляция нарастает постепенно, начиная со 2-го дня, и достигает максимума на 14-й день. По истечении 2 недель ежедневных охлаждений регистрируется самый мощный гиперкоагуляционный сдвиг за весь экспериментальный период, характеризующийся минимальным значением времени свертывания и большой плотностью сгустка. К окончанию эксперимента (на 30-й день) гиперкоагуляция усугубляется увеличением скорости образования фибриновой сети (по показателю угла α) и увеличением плотности сгустка до максимальных значений, зафиксированных на протяжении всего эксперимента. Описанные изменения соотносятся с литературными данными и свидетельствуют о развитии напряженности в функциональных системах, сформированных с целью поддержания адекватного функционирования системы гемостаза [6].

Выводы:

1. Ежедневное охлаждение до сверхглубокой степени гипотермии сопровождается стадийными изменениями в системе гемостаза.

2. В 1-й экспериментальный день регистрируется гипокоагуляционный сдвиг. Начиная со 2-го экспериментального дня наблюдается развитие и нарастание гиперкоагуляционных изменений.

3. Максимальный гиперкоагуляционный сдвиг наблюдается на 14-й экспериментальный день, что сопровождается наименьшим значением времени свертывания, зарегистрированным за весь экспериментальный период.

4. На 30-й день наблюдается гиперкоагуляция, увеличение скорости образования фибриновой сети и увеличение максимальной плотности сгустка.

«Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60054 мол_а_дк».

Список литературы:

1. Румянцев Г.В. Динамика теплового обмена у крыс при выходе из состояния искусственной глубокой гипотермии. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2007; 93(11): 1326-1331.

2. Ткаченко Е.Я., Козырева Т.В. Механизмы модулирующего влияния симпатической нервной системы на терморегуляторные реакции при охлаждении у гипертензивных крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010; 149 (1): 25-29.

3. Ананьев В.Н. Холодовая адаптация и адренорецепторы. Успехи современного естествознания. 2010; 11: 8-11.

4. Ананьев В.Н., Ипполитов Е.В. Реактивность системного и регионального кровообращения к ацетилхолину после 10 дней адаптации к холоду. Естественные и технические науки. 2011; 3: 144-146.

5. Ананьев В.Н. Действие дозированной холодовой адаптации на адренорецепторы. Медицинские науки. 2011; 4: 13-16.

6. Фатеева Н.М., Колпаков В.В. Здоровье человека на Крайнем Севере: влияние экспедиционно-вахтового труда на биоритмы гемостаза, перекисное окисление липидов, антиоксидантную систему. Тюмень: Шадринский Дом Печати, 2011: 259.

7. Агаджанян Н.А. Биоритмы и адаптация к экстремальным условиям внешней среды. Временная организация чувствительности организма к биологическим и экологически активным веществам. Свердловск: Медицина, 1991: 154.

8. Шахматов И.И., Носова М.Н., Вдовин В.М., Бондарчук Ю.А., Киселев В.И. Особенности реакции гемостаза при стрессе у лиц с разным уровнем тренированности. Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова. 2011; 97(11): 1254-1261.

9. Forman KR, Wong E, Gallagher M et al. Effect of temperature on thromboelastography (TEG) and implications for clinical use in neonates undergoing therapeutic hypothermia. *Pediatr Res*. 2014; 75(5): 663–669.

10. Ананьев В.Н., Потапова Т.В. Действие норадреналина на системное и региональное кровообращение в различные сроки адаптации к холоду. Естественные и технические науки. 2010; 4: 65-68.

11. Ананьев В.Н. Реактивность системного кровообращения на норадреналин и ацетилхолин после 10-ти дней адаптации к холоду. Фундаментальные исследования. 2010; 10: 138-144.

12. Brandstrom H, Eriksson A, Giesbrecht G et al. Fatal hypothermia: an analysis from a sub-arctic region. *Critical Care*. 2012; 1(9): 325-328.

13. Маяхи Мохаммед Т.Д., Таджибова Л.Т., Даудова Т.Н., Кличханов Н.К. Влияние гипотермии на содержание гормонов и липопротеинов в сыворотке крови крыс. Вестник Дагестанского государственного университета. Серия 1: Естественные науки. 2012; 1: 140-144.

14. Шаповаленко Н.С., Доровских В.А., Коршунова Н.В., Штарберг М.А., Сластин С.С., Невмывако Е.Е. Влияние холодового стресса на интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную систему тканей экспериментальных животных. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2011; 39: 22-25.

15. Syamsunarno AA, Iso T, Yamaguchi A et al. Fatty acid binding protein 4 and 5 play a crucial role in thermogenesis under the conditions of fasting and cold stress. *PLoS ONE*. 2014; 9(3): e90825. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090825

16. Cavallaro G, Filippi L, Raffaeli G et al. Heart rate and arterial pressure changes during whole-body deep hypothermia (Clinical Study). *ISRN Pediatrics*. 2013. (13): Article ID 140213.

17. Bisschops LA, van der Hoeven JG, Mollnes TE, Hoedemaekers C. Seventy-two hours of mild hypothermia after cardiac arrest is associated with a lowered inflammatory response during rewarming in a prospective observational study. *Critical Care*. 2014; 18: 546.

Контактная информация

Автор, ответственный за переписку: Лычева Наталья Александровна, к.б.н., с.н.с. лаборатории биомедицины Центра медико-биологических исследований Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.
Тел.: (3852) 566928.
Email: natalia.lycheva@yandex.ru

Информация об авторах

Макушкина Дарья Александровна, студентка 5-го курса лечебного факультета Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.
Тел.: (3852) 566928.
Email: science@agmu.ru

Седов Антон Вячеславович, студент 5-го курса лечебного факультета Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.
Тел.: (3852) 566928.
Email: science@agmu.ru

Шахматов Игорь Ильич, д.м.н., заведующий кафедрой нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.
Тел.: (3852) 566928.
Email: iish59@yandex.ru

Киселев Валерий Иванович, д.м.н., профессор, профессор кафедры нормальной физиологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.
656038, г. Барнаул, ул. Папанинцев, 126.
Тел.: (3852) 566928.
Email: vik@mail.ru