

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ ОДНОКРАТНОЙ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ГЕМОСТАЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO

¹Москаленко С.В., ^{1,2}Шахматов И.И., ^{1,2}Киселёв В.И., ^{1,2}Николаев В.Ю.

¹ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Барнаул, e-mail: rector@agmu.ru;

²ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины» СО РАН,
Новосибирск, e-mail: iph@physiol.ru

Цель исследования. Проведение анализа состояния системы гемостаза плазмы крови у крыс на различных стадиях перегревания: стадия «безразличия», «двигательного возбуждения», «начала и разгара теплового удара» и «терминальная стадия теплового удара». Материалы и методы. В работе использовались крысы-самцы (100 особей) линии Вистар. Гипертермия моделировалась помещением плазмы крови крыс на время, соответствующее достижению той или иной стадии гипертермии *in vivo*, в тепловую камеру (термостат) с температурой воздуха внутри +45°C. Результаты и их обсуждение. При гипертермическом воздействию коагуляционный гемостаз реагировал угнетением внешнего, внутреннего и конечного этапов свёртывания крови. Кроме этого, более длительное воздействие гипертермии сопровождалось снижением концентрации фибриногена, повышением уровня растворимых фибрин-мономеров и угнетением фибринолитической активности плазмы.

Ключевые слова: гемостаз, общее перегревание *in vitro*

EFFECT OF DIFFERENT MODES OF SINGLE HYPERTHERMIC LOAD GEMOSTAZIOLOGICHESKIE PROFILE IN EXPERIMENTAL RATS IN VITRO

¹Moskalenko S.V., ^{1,2}Shakhmatov I.I., ^{1,2}Kiselev V.I., ^{1,2}Nikolaev V.Y.

¹Altai State Medical University, Barnaul, e-mail: rector@agmu.ru;

²FGBI «Institute of Physiology and Fundamental Medicine» SB RAS, Novosibirsk, e-mail: iph@physiol.ru

Objective: to review the state of the hemostatic system of blood plasma in rats in various stages of overheating: the stage of «indifference», «motor excitation», «the beginning and the midst of a heat stroke and end-stage heat stroke». Material and methods. The study used rats-males (100 individuals) of Wistar line. Hyperthermia was simulated inserting the plasma of rats at the time corresponding to the attainment of a certain stage of hyperthermia *in vivo*, in thermal chamber (thermostat) the temperature is within + 45°C. The results and discussion. When exposed to hyperthermic coagulative hemostasis reacted inhibition of external, internal, and final stages of blood coagulation. In addition, a more prolonged exposure to hyperthermia was accompanied by a decrease in fibrinogen concentration, increase the level of soluble fibrin-monomer and inhibition of plasma fibrinolytic activity.

Keywords: hemostasis, general overheating *in vitro*

Гипертермия – состояние, вызванное искусственным согреванием всего тела или его части до уровня, превышающего границы обычного теплового режима, а точнее рубеж + 37,0°C [9]. Гипертермическое воздействие успешно применяется при лечении онкологических, аллергических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний [8]. Стоит отметить, что температура тела является одним из важнейших параметров гомеостаза, а также фактором регуляции функционирования живых систем. От температуры зависят структура и функциональные свойства биополимеров, биомембран, клеток, функционирование всех систем организма, включая систему гемостаза [10].

Вместе с тем, нормальная работа клеток может сохраняться при довольно широком

температурном диапазоне. Это достигается изменениями физико-химического состава самой клетки. Установлено, что даже кратковременное пребывание человека и животных в условиях экстремально высокой внешней температуры приводит к метаболическим и функциональным изменениям на трех уровнях многоклеточного организма: молекулярном, клеточном и тканевом [10].

Стоит учесть, что зависимость изменений системы гемостаза при гипертермическом воздействии исследовалась в работах *in vivo*. Основной вывод этих работ состоит в том, что при повышении температуры тела до + 41,7°C происходит активация системы гемостаза, а именно появляется угроза тромбообразования с развитием гиперкоагуляционной фазы ДВС-синдрома. Однако,

при достижении температуры + 43,1 °С ответ системы гемостаза на температурное воздействие изменяется на гипокоагуляционный [4].

Градиацию стадий эксперимента (момент прекращения гипертермического воздействия) мы проводили основываясь на литературных данных [1], а также на основании ранее проведенных экспериментов *in vivo*, что позволило выделить 5 стадий перегревания: стадия «безразличия», «возбуждения», «начала теплового удара», «разгара теплового удара», а также «терминальную стадию теплового удара».

Безусловно, прогнозирование возможных нарушений со стороны системы гемостаза, развивающихся после прекращения перегревания, позволит минимизировать последствия повреждающего действия гипертермии на организм. Важно отметить, что практическая медицина нуждается в теоретическом обосновании патогенетических механизмов экстремальных состояний.

Непосредственное влияние высокой температуры на клеточный метаболизм во многом определяется ролью слабых взаимодействий и, в частности, гидрофобными взаимодействиями, стабилизирующими третичную и четвертичную структуры белковых молекул. Эти взаимодействия легко разрушаются под влиянием тепла, что приводит к потере каталитической активности ферментов [3; 10]. Поскольку большинство факторов свёртывания – это белки, то особое внимание мы обратили на изучение состояния системы гемостаза *in vitro* при различных температурных режимах.

Цель исследования – изучение особенностей реагирования системы гемостаза на однократное гипертермическое воздействие *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Исследования были выполнены на 100 половозрелых крысах-самцах линии Wistar средней массой 245,0 ± 35,0 г. Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с международными «Руководящими принципами ухода за животными и их использования в эксперименте» [5].

Все экспериментальные животные были разделены на 10 групп: пять контрольных ($n = 10$) и пять опытных групп ($n = 10$). Кровь для исследования в объеме 5–6 мл получали путем забора из печеночного синуса, под эфирным наркозом. Полученную кровь центрифугировали в течение 15 минут при скорости 3000 об./мин (1200 g), в результате получали плазму, лишенную тромбоцитов.

Гипертермия моделировалась с помощью воздушного термостата при температуре +45 °С (эта температура считается оптимальной при моделировании общей гипертермии *in vivo*) [1; 10]. Длительность нахождения в термостате для достижения той или иной стадии была нами установлена экспериментально в ходе предварительных исследований,

выбранный уровень температуры основан на литературных данных.

Бедная тромбоцитами плазма крови опытных групп помещалась в воздушный термостат при температуре +45 °С: 1-я опытная группа – на 28 минут, до достижения стадии «безразличия» (температура плазмы +39,6 °С), 2-я опытная группа – на 41 минуту, до достижения стадии «возбуждения» (+41,7 °С), 3-я опытная группа – на 48 минут, до достижения стадии «начала теплового удара» (+42,5 °С), 4-я опытная группа – на 56 минут, до достижения стадии «разгара теплового удара» (+43,2 °С), 5-я опытная группа – на 62 минуты, до достижения «терминальной стадии теплового удара» (+43,9 °С).

В группах контроля бедная тромбоцитами плазма крови находилась в водяной термобане при температуре +37,0 °С на протяжении такого же времени, что и опытные группы. Это позволило максимально отделить влияние экзогенного перегревания на результаты экспериментов, от влияния различных факторов организма, которые способствуют адаптации системы гемостаза к гипертермическому воздействию *in vivo*. Термометрия плазмы осуществлялась с помощью водного термометра ТБ-3-М1.

Комплекс методик, позволяющий оценить состояние системы гемостаза, включал исследование коагуляционного звена гемостаза, антикоагулянтной активности и фибринолитической системы крови. В качестве реагентов для оценки системы гемостаза были выбраны диагностические наборы фирмы «Технология-Стандарт» (Россия) с использованием коагулометров «Минилаб» (Россия) и «Trombostat-2» (Германия).

Все цифровые данные, полученные в ходе исследования, подвергались статистической обработке. Данные исследований представлены в виде $m [25-75\%]$, где m – медиана в выборочной совокупности, $[25-75\%]$ – 25-й и 75-й перцентиль [5].

Исходя из того, что не все наблюдаемые признаки подчинялись нормальному распределению, достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U критерия Манна – Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Для обработки и хранения полученного экспериментального материала создавали базы данных с использованием редактора электронных таблиц Microsoft Excel 2010. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли при помощи программ математической статистики Jmp Statistical Discovery v 6.1.2 и Biostat 5.03 на персональном компьютере. Графическая обработка данных производилась в программе Sigma Plot 9.0. и Smart Draw 7.01.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнительный анализ результатов исследования показателей системы гемостаза, зарегистрированных через различные периоды времени с момента окончания воздействия гипертермии на изолированную плазму крови *in vitro*, приведен в таблице.

На основании данных, представленных в таблице, мы можем утверждать, что по истечении времени инкубации, соответствующему достижению «стадии безразличия»

в прогретой плазме крови регистрировалось развитие гипокоагуляции по внутреннему и внешнему путям свертывания, что подтверждалось удлинением активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) на 12% ($p < 0,01$) и протромбинового времени (ПВ) – на 29% ($p < 0,001$). Остальные исследуемые показатели системы гемостаза оставались на уровне контрольных величин.

Время экспозиции **плазмы крови** лабораторных животных было обусловлено завершением к указанному времени второй стадии общего перегревания – «стадии возбуждения», которая характеризовалась гипокоагуляцией по внутреннему и внешнему путям активации начального этапа свертывания крови, а также на конечном этапе гемокоагуляции. Это проявлялось в удлинении АПТВ на 33% ($p < 0,001$), ПВ – на 32% ($p < 0,001$), времени полимеризации фибрин-мономеров (ВПФМ) – на 23% ($p < 0,001$) и эхитоксового времени – на 29% ($p < 0,001$). Кроме того, в прогретой плазме крови регистрировалось повышение уровня растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК) на 33% ($p < 0,001$), снижение уровня фибриногена – на 24% ($p < 0,001$). Статистически значимых различий в опытной и контрольной группах по антикоагулянтной и фибринолитической активности по-прежнему зафиксировано не было.

На стадиях «начала теплового удара», «разгара теплового удара» и в «терминальную стадию теплового удара» коагуляционный гемостаз реагировал на данное воздействие нарастающей гипокоагуляцией на всех этапах свертывания гемостаза. На описываемых стадиях стабильно отмечался рост РФМК в диапазоне от 83 до 100% ($p < 0,001$) при снижении уровня фибриногена от 29 до 56% соответственно ($p < 0,001$), а также был зафиксирован значительный рост ВПФМ более 100%.

При дальнейшем увеличении температуры плазмы *in vitro* на стадии «начала теплового удара» было зарегистрировано угнетение фибринолитической активности крови на 59% ($p < 0,001$). Ещё более продолжительное нагревание плазмы крови до достижения в экспериментах *in vivo* стадии «разгара теплового удара» и «терминальной стадии теплового удара» приводило к окончательной блокаде фибринолитической её активности, что проявлялось в отсутствии лизиса фибринового сгустка на протяжении суток.

Ранее нами было установлено, что общее перегревание экспериментальных животных (*in vivo*) при достижении температуры + 39,5°C («стадия безразличия») приводило к активации внутреннего звена и конечного этапа свертывания плазмы крови, повышению количества фибриногена и угнетению активности фибринолитической системы

Показатели системы гемостаза плазмы крови крыс при различной продолжительности острого однократного перегревания *in vitro* (m [25%÷75%])

Показатели	Опыт (n = 10)				
	Ст. Б	Ст. В	Ст. НТУ	Ст. РТУ	Ст. ТУ
АПТВ, с	17,2 ** [17,1–17,7] (Δ + 12%)	20,6 *** [20,3–21,4] (Δ + 33%)	20,2 *** [19,8–20,8] (Δ + 29%)	20,4 *** [19,6–21,2] (Δ + 34%)	20,8 *** [20,5–21,7] (Δ + 31%)
Протромбиновое время, с	29,9 *** [29,3–30,7] (Δ + 29%)	29,2 *** [27,7–29,9] (Δ + 32%)	29,1 *** [28,0–30,2] (Δ + 28%)	29,1 *** [28,1–29,7] (Δ + 25%)	30,3 *** [28,8–31,4] (Δ + 31%)
Тромбиновое время, с	30,0 [28,5÷32,6]	31,8 [31,0÷33,0]	34,0 *** [32,7–36,0] (Δ + 21%)	48,9 *** [46,3–50,7] (Δ + 56%)	59,9 *** [59,3–65,0] (Δ + 90%)
ВПФМ, с	57,1 [54,8–58,3]	64,1 *** [61,6–66,3] (+ 23%)	103,4 *** [96,4–113,7] (+ 97%)	> 240,0 *** (> 100%)	> 240,0 *** (> 100%)
Эхитоксовое время, с	21,6 * [20,7–22,0] (Δ + 6%)	25,7 *** [20,8–26,4] (Δ + 29%)	26,3 *** [26,0–26,6] (Δ + 35%)	27,2 *** [26,4–28,2] (Δ + 39%)	28,9 *** [26,7–29,8] (Δ + 45%)
Содержание РФМК, мг/100 мл	4,0 [4,0–4,6]	4,0 *** [3,4–4,5] (Δ + 33%)	6,0 *** [5,4–6,6] (Δ + 100%)	5,5 *** [5,0–6,0] (Δ + 83%)	5,5 *** [4,9–6,0] (Δ + 83%)
Содержание фибриногена, г/л	3,0 [3,0–3,1]	2,2 *** [2,1–2,2] (Δ – 24%)	2,0 *** [1,9–2,1] (Δ – 29%)	1,3 *** [1,2–1,5] (Δ – 52%)	1,2 *** [1,0–1,4] (Δ – 56%)
Содержание анти-тромбина III, %	101,5 [97,5–104,0]	101,5 [97,3–102,5]	97,5 [95,0–101,3]	99,0 [97,0–101,3]	97,5 [92,0–104,5]
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	690,0 [660,0–720,0]	630,0 [577,5–660,0]	975,0 *** [915,0–990,0] (Δ + 59%)	> 1440,0 *** (Δ > 100%)	> 1440,0 *** (Δ > 100%)

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от соответствующих показателей группы контроля: * – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$; Δ (%) – статистически значимые изменения величин показателей относительно величин в контроле (в процентах). АПТВ – активированное парциальное тромбопластиновое время; ВПФМ – время полимеризации растворимых фибрин-мономерных комплексов; РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы. Ст. Б – стадия «безразличия», ст. В – стадия «возбуждения», ст. НТУ – стадия «начала теплового удара», ст. РТУ – стадия «разгара теплового удара», ст. ТУ – «терминальная стадия теплового удара».

крови. При температуре ядра организма более + 41,7°C, вплоть до + 43,9°C (последовательное развитие от «стадии двигательного возбуждения» до «терминальной стадии теплового удара»), состояние опытных животных сопровождалось выраженным изменением направленности гемостатического статуса, характеризующимся резким переходом от состояния тромботической готовности к существенной гипокоагуляции в системе гемостаза [4].

Таким образом, показано, что при достижении температуры плазмы крови животных в экспериментах *in vitro* выше физиологической нормы (+37,0°C), происходит последовательное нарастание гипокоагуляционного сдвига в системе гемостаза на фоне роста уровня РФМК и снижения концентрации фибриногена, а также выраженное нарастание угнетения её фибринолитической активности.

Механизм, объясняющий повышение уровня РФМК на фоне развития гипокоагуляции – достаточен сложен. Можно предположить, что в ходе экспериментов гиперкоагуляционная стадия системы гемостаза не была зарегистрирована ввиду того, что действие каждого из факторов свертывания ограничено определенным температурным диапазоном. Одним из факторов свертывания, который обладает повышенной температурной устойчивостью, является тромбин [3].

Тромбин приводит к образованию большого количества фибрин-мономеров из фибриногена, причем некоторые из них не успевают полимеризоваться и, имея свободные N-терминалы, могут соединяться с молекулами нерасщепленного фибриногена, образуя с ним макромолекулярные комплексы [7]. Они, в свою очередь, связываются с избыточными фибрин-мономерами, препятствуя их дальнейшей полимеризации, что и приводит к образованию РФМК, которые либо плохо свертываются, либо вообще не свертываются тромбином [2; 3; 6].

Заключение

Полученные результаты позволяют предположить, что отсутствие гиперкоагуляционного сдвига при перегревании *in vitro*, в отличие от перегревания *in vivo* [4], может быть обусловлено тем, что экспози-

ция плазмы в условиях повышенной температуры в опытах *in vitro* исключает возможность коррекции её гемостазиологических показателей путем воздействия нервных и гуморальных регуляторных факторов.

Зарегистрированный гипокоагуляционный сдвиг, по-видимому, обусловлен действием высокой температуры на структуру белковых молекул, задействованных в системе гемостаза, вследствие чего происходит нарушение их функционирования.

Полученные данные об изменении лабораторных показателей системы гемостаза в условиях экзогенной гипертермии расширяют и углубляют существующие представления о клеточных механизмах адаптации организма к действию тепловой нагрузки.

Список литературы

1. Боженкова М.В. Морфофункциональные изменения слюнных желёз белых крыс в условиях воздействия высокой внешней температуры (экспериментальное исследование): дис. ... канд. мед. наук. – Смоленск, 2008. – 182 с.
2. Василевич И.В. Влияние общей гипертермии на изменение некоторых показателей гомеостаза в эксперименте / И.В. Василевич и др. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в эстетической медицине и пластической хирургии» (апрель 2005). – Новосибир.: Альфа Виста, 2005. – С. 94–95.
3. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. – Каз.: ФЭН, 2000. – 367 с.
4. Николаев В.Ю. Система гемостаза у крыс при различных режимах однократной гипертермической нагрузки / В.Ю. Николаев, И.И. Шахматов, В.И. Киселёв, В.М. Вдовин // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4. – С. 6. URL: www.science-education.ru/118-14114 (дата обращения: 29.07.2014).
5. Руководящие принципы ухода за животными и их использования в эксперименте // Высшая нервная деятельность. – 1990. – № 1. – 203 с.
6. Стручко Г.Ю. Лабораторные методы исследования системы гемостаза и диагностика нарушений гемокоагуляции: учебное пособие. – Ставрополь: Медицина, 2009. – 64 с.
7. Hambleton J. Coagulation: Consultative Hemostasis // Hematology. – 2002. – Vol. 2. – P. 335–353.
8. Ostberg J.R. Regulation of immune activity by mild (fever-range) whole body hyperthermia: effects on epidermal Langerhans cells // Cell Stress Chaperones. – 2000. – Vol. 5. – № 5. – P. 458–461.
9. Rowe-Horwege R.W. Hyperthermia, systemic // Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, Second Edition, edited by John G. Webster, 2006. – P. 42–63.
10. Suvernev A.V. Intensive Hyperthermia Therapy / A.V. Suvernev, G.V. Ivanov, S.Yu. Novozhilov, A.V. Yefremov // Siberian Research Institute of Hyperthermia – Novosib.: Geo, 2011. – P. 96.