

## СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА У КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ОДНОКРАТНОЙ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

Николаев В.Ю.<sup>1,2</sup>, Шахматов И.И.<sup>1,2</sup>, Киселёв В.И.<sup>1,2</sup>, Вдовин В.М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул, Россия (656038, Барнаул, пр-т. Ленина, 40), e-mail: rector@agmu.ru

<sup>2</sup>ФГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины» СО РАМН, Новосибирск, Россия (630117, г.Новосибирск, ул. Тимакова, 4) e-mail: iph@physiol.ru

Проведен анализ состояния системы гемостаза у крыс в различные стадии перегревания: стадию двигательного возбуждения и стадию разгара теплового удара. В работе использовались крысы-самцы (64 особи) линии Вистар. Гипертермия моделировалась помещением лабораторных животных на определенное время в тепловую камеру (термостат) с температурой воздуха внутри +45°C. Стадия двигательного возбуждения характеризовалась гиперкоагуляцией на всех этапах свёртывания, регистрируемой как на обоих путях активации начального этапа, так и на конечном этапе гемокоагуляции. При этом рост уровня фибриногена усугублял претромботическую готовность. Также рост уровня растворимых фибрин-мономеров, являющихся маркерами тромбинемии, указывал на формирование состояния претромбоза. Изменения, выявленные в системе гемостаза на стадии разгара теплового удара, имели другую направленность. Более длительное воздействие гипертермии сопровождалось снижением количества тромбоцитов и их агрегационной активности. Коагуляционный гемостаз реагировал на данное воздействие угнетением конечного этапа свёртывания при повышении уровня фибриногена.

Ключевые слова: гемостаз, общее перегревание.

## RAT'S HEMOSTASIS SYSTEM IN DIFFERENT MODES OF THE SINGLE HYPERTHERMICAL LOAD

Nikolaev V.Y.<sup>1,2</sup>, Shakhmatov I.I.<sup>1,2</sup>, Kiselev V.I.<sup>1,2</sup>, Vdovin V.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Altai State Medical University, Barnaul, Russia (656038, Barnaul, st. Lenin, 40), e-mail: rector@agmu.ru

<sup>2</sup>FGBI "Institute of Physiology and Fundamental Medicine" SB RAMS, Novosibirsk, Russia (630117, Novosibirsk, st. Timakov, 4), e-mail: iph@physiol.ru

The analysis of the state of hemostasis system in rats at different stages of becoming stage active excitation and height of the stage of thermal shock. We used at work Wistar line rats-males (64 species). Hyperthermia is modeled premise of laboratory animals at a certain time in thermal chamber (thermostat) the temperature inside +45°C. Stage of active excitation characterized hypercoagulation at all stages of coagulation, registered as to both ways of activation the initial phase and the destination phase of gemocoagulation. With this increase of fibrinogen's level aggravated before trombotic stage readiness. Also the increase of the level of soluble fibrin monomers, which are used as markers of trombinemia, pointed to the formation of trombotic state. Changes identified in the hemostasis system at the stage of peak heat stroke, had a different focus. Longer term effects of hyperthermia accompanied by a reduction in the number of platelets and their aggregation activity. Coagulation hemostasis reacted to this effect by inhibition of the final stage clotting when the high level of fibrinogen.

Keywords: hemostasis, general overheating

С действием высокой внешней температуры человеку приходится встречаться довольно часто: в силу особенностей некоторых климатических зон, при работе на самых различных производствах и т.д. В последнее время гипертермические воздействия с успехом используются и в медицине. К настоящему времени собран большой теоретический и практический материал, посвященный изучению и совершенствованию методики применения искусственного перегревания организма в медицинской практике. Гипертермия рассматривается многими исследователями как один из перспективных методов

профилактики и терапии бронхиальной астмы, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний [7]. Углубленное изучение гипертермического воздействия на организм экспериментальных животных позволило выделить 5 стадий перегревания: безразличия, возбуждения, начала теплового удара, разгара теплового удара, а также терминальную стадию теплового удара. Деление по стадиям основывалось как на изменении общего состояния подопытных животных (их поведенческих реакций), так и на повышении ректальной температуры крыс в зависимости от длительности их пребывания в тепловой камере [2].

Влияние экстремальных температур рассматривается исследователями как вариант стрессорного воздействия, сопровождающегося целым рядом адаптивных изменений в функционировании организма [3]. Очевидно, что система гемостаза играет одну из ключевых ролей в процессе адаптации организма к различным внешним воздействиям. В ряде работ показана и роль этой системы в адаптации к условиям перегревания [9]. Однако, механизмы влияния высокой температуры на различные звенья системы гемостаза изучены вне зависимости от длительности и интенсивности гипертермии.

Таким образом, целью работы явилось изучение состояния системы гемостаза в стадию двигательного возбуждения и разгара теплового удара.

### **Материал и методы**

Исследования были выполнены на 64 половозрелых крысах-самцах линии Wistar средней массой  $227,0 \pm 33,0$  г. Подопытные и контрольные животные до эксперимента содержались в одинаковых условиях.

Все экспериментальные животные были разделены на 4 группы: две контрольные группы по 15 крыс и две опытные группы по 17 крыс.

В ходе экспериментов крысы опытных групп помещались в воздушный термостат при температуре  $+45^{\circ}\text{C}$  в среднем на 19 минут (1-я опытная группа) до достижения ректальной температуры  $41,6 \pm 0,6$  °C и в среднем на 33 минуты (2-я опытная группа) до достижения ректальной температуры  $43,2 \pm 0,3$  °C, соответственно избранным стадиям перегревания. Длительность нахождения в термостате для достижения той или иной стадии была основана на литературных данных, а также подтверждена в ходе предварительных экспериментов [2].

В группах контроля животные находились в термостате при комнатной температуре на протяжении такого же времени, что и опытные. Кровь для исследования в объеме 5—6 мл забиралась сразу по истечении времени нахождения в термостате, под эфирным наркозом из печеночного синуса [5]. Использование крыс в экспериментах осуществлялось в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте [8].

Комплекс методик, позволяющий оценить состояние системы гемостаза, включал исследование агрегационной активности тромбоцитов, коагуляционного звена гемостаза, антикоагулянтной активности крови и фибринолитической системы [6]. Исследование системы гемостаза осуществлялось диагностическими наборами фирмы «Технология-Стандарт» (Россия) с использованием коагулометра «Минилаб» (Россия). Подсчет показателя гематокрита и количества тромбоцитов периферической крови проводился при помощи гематологического анализатора Drew3 (Великобритания).

Данные исследований представлены в виде  $X \pm m$ , где  $X$  – среднее арифметическое в выборочной совокупности,  $m$  - стандартная ошибка средней арифметической.

Так как не все наблюдаемые признаки подчинялись нормальному распределению, достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U критерия Манна-Уитни. Различия считались достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли при помощи программ математической статистики (Jmp Statistical Discovery v6.1.2; Biostat 5.03) на персональном компьютере.

### Результаты

Согласно полученным в ходе экспериментов данным (см. табл.) выявлен целый ряд изменений показателей системы гемостаза по мере нарастания длительности воздействия температурного фактора.

Сравнение показателей системы гемостаза при нарастании продолжительности гипертермического воздействия ( $M \pm SD$ )

№	Показатели	стадия В		стадия РТУ		Достигнутый уровень значимости между группами $p_{1-2}$ ; $p_{3-4}$ ; $p_{2-4}$
		Контроль (1)	Опыт (2)	Контроль (3)	Опыт (4)	
1.	Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	529,8 $\pm$ 31,2	493,5 $\pm$ 52,7	550,4 $\pm$ 77,2	504,4 $\pm$ 68,9	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$ $p_{2-4} > 0,05$
2.	Агрегация, макс. знач., у.е.	46,0 $\pm$ 6,5	43,4 $\pm$ 11,4	25,6 $\pm$ 7,3	15,6 $\pm$ 5,1	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{3-4} < 0,01$ $p_{2-4} < 0,001$
3.	АПТВ, с	14,7 $\pm$ 0,5	10,8 $\pm$ 2,9	14,6 $\pm$ 0,6	15,5 $\pm$ 2,6	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{2-4} < 0,001$
4.	Протромбиновое время, с	24,2 $\pm$ 2,3	20,4 $\pm$ 2,7	23,9 $\pm$ 0,8	22,4 $\pm$ 3,5	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{2-4} > 0,05$
5.	Тромбиновое время, с	48,9 $\pm$ 11,1	26,0 $\pm$ 3,5	41,5 $\pm$ 4,9	45,5 $\pm$ 12,6	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{3-4} > 0,05$

						$p_{2-4} < 0,001$
6.	Эхитоксовое время, с	21,2±2,6	19,5±2,5	18,8±1,8	25,9±4,3	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{3-4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,001$
7.	Коэффициент полимеризации фибрин-мономеров, R	1,6±0,6	0,9±0,2	2,8±0,5	2,4±0,9	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{2-4} < 0,001$
8.	РФМК, мг%	3,0±0	7,4±7,1	3,0±0	3,5±1,2	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{2-4} < 0,01$
9.	Фибриноген, г/л	2,3±0,1	3,4±0,7	2,4±0,4	2,8±0,4	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,01$ $p_{2-4} < 0,05$
10.	Антитромбин III, %	88,1±11,3	91,4±6,8	99,8±7,5	101,6±7,7	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{3-4} > 0,05$ $p_{2-4} < 0,001$

Примечание: В - стадия двигательного возбуждения; РТУ - стадия разгара теплового удара, РФМК - растворимые фибрин-мономерные комплексы, АПТВ - активированное парциальное тромбопластиновое время.

Как видно из представленных в таблице данных, **стадия возбуждения** характеризовалась гиперкоагуляцией по внутреннему и внешнему пути активации начального этапа свёртывания крови, а также на конечном этапе гемокоагуляции. Это проявлялось в укорочении АПТВ в 1,4 раза ( $p < 0,01$ ), протромбинового времени - в 1,2 раза ( $p < 0,001$ ), тромбинового времени - в 1,9 раза ( $p < 0,001$ ) и времени полимеризации фибрин-мономеров – в 1,8 раза ( $p < 0,001$ ). Рост уровня растворимых фибрин-мономерных комплексов, являющихся маркёрами тромбинемии, увеличивался более, чем в 2,5 раза ( $p < 0,001$ ), что указывает на формирование состояния претромбоза. Рост уровня фибриногена в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) усугублял претромботическую готовность, увеличивая концентрацию субстрата для образования сгустка.

Изменения, выявленные в системе гемостаза на **стадии разгара теплового удара**, отличались от **стадии двигательного возбуждения**. Более длительное воздействие гипертермии сопровождалось реакцией со стороны сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, что проявлялось в снижении в 1,1 раза количества тромбоцитов ( $p < 0,05$ ) и в 1,7 раза - их агрегационной активности ( $p < 0,01$ ). Коагуляционный гемостаз реагировал на данное воздействие угнетением в 1,4 раза конечного этапа свёртывания (по данным эхитоксового времени,  $p < 0,001$ ) при повышенном в 1,2 раза уровне фибриногена ( $p < 0,001$ ). Удлинение времени свертывания по данным эхитоксового теста, не чувствительного к уровню антикоагулянтов в плазме крови, может свидетельствовать об истощении факторов свертывания, задействованных на конечном этапе [1].

Для установления влияния длительности гипертермического воздействия на параметры гемостаза был проведён сравнительный анализ показателей системы гемостаза обеих опытных групп. При этом увеличение длительности гипертермического воздействия приводило к снижению агрегационной активности тромбоцитов в 2,8 раза ( $p < 0,001$ ), гипокоагуляции по внутреннему пути свертывания (в 1,5 раза по данным АПТВ,  $p < 0,001$ ), а также гипокоагуляции на конечных этапах свертывания (по удлинению тромбинового времени - в 1,8 раза ( $p < 0,001$ ), времени полимеризации фибрин-мономеров - в 2,6 раза ( $p < 0,001$ ), эхитоксового времени - в 1,3 раза,  $p < 0,001$ ). Уровень фибриногена снижался в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ). Кроме того, регистрировалось снижение количества РФМК в 2,1 раза, т.е. до исходного уровня ( $p < 0,01$ ) на фоне возросшего в 1,1 раза уровня антитромбина III ( $p < 0,001$ ).

Из таблицы следует, что удлинение времени пребывания в термостате без термического воздействия оказывается фактором, по всей-видимости, значимо изменяющим отдельные показатели. Этот факт можно объяснить снижением стрессорного влияние на организм лабораторного животного по прошествии некоторого времени, т.е. крысы в термостате попросту «успокаиваются», что и изменяет отдельные показатели, особенно зависящие от активности симпато-адреналовой системы.

### **Обсуждение**

Таким образом, гиперкоагуляция, зарегистрированная на начальных этапах гипертермии, может быть обусловлена термоиндуцированной реорганизацией плазматических мембран эндотелия, сопровождающейся выбросом тромбопластина в системный кровоток [5].

Удлинение времени гипертермического воздействия влечет за собой гипокоагуляционные изменения во всех звеньях системы гемостаза, обусловленные, на наш взгляд, развитием начальных этапов коагулопатии потребления, определяющей дальнейшее развитие клиники диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови (ДВС-синдрома) [1], [4].

### **Заключение**

Полученные результаты позволяют предположить, что высокая температура при кратковременном воздействии обладает активирующим влиянием на гемостаз, вплоть до появления угрозы тромбообразования с развитием гиперкоагуляционной фазы ДВС-синдрома. Однако, при дальнейшем перегревании организма ответ системы гемостаза на температурное воздействие изменяется на гипокоагуляционный, что может быть обусловлено дальнейшим потреблением ряда активированных факторов свертывания, зафиксированном на более ранних этапах воздействия гипертермии, а также, возможно, денатурацией белковых компонентов системы гемостаза, ввиду высокой температуры «ядра».

## Список литературы

1. Баркаган З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза/ З.С. Баркаган, А.П. Момот - М.: Ньюдиамед–АО, 2008.– 292 с.
2. 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.
3. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А., Галян С.Л., Чирятьев Е.А., Левен П.И. «Биохимические компоненты свёртывания крови», Свердловск. Изд.: Уральского университета, 1990г. – 212 с.
4. Верещагина И.П., Верещагина Е.И. Ксенотемпературы в медицинской практике: от гипотермии к гипертермии - Новосибирск. Изд.: НГТУ, 2013. — 184 с.
5. Данилова З. И. Влияние гипертермии на гемокоагуляционные и фибринолитические свойства крови: Автореф. дис. канд. мед. наук. - Минск, 1990. - 23 с.
6. Руководящие принципы ухода за животными и их использования в эксперименте // Журн. высш. нервн. деятельности, 1990. №1, - 203 с.
7. Сувернев А.В. Пути практического использования интенсивного теплолечения/ А.В. Сувернев, Г.В. Иванов, И.В. Василевич, В.Н. Гальченко, Р.П. Алейников, С.Ю. Новожилов – Н.: Академическое изд-во “Гео”, 2009.- 61- 66 с.
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasburg: Council of Europe, 1986. – 51 p.
9. Xiaoming He. Thermostability of Biological Systems: Fundamentals, Challenges, and Quantification / Xiaoming He // The Open Biomedical Engineering Journal. - 2011. - P. - 47-73 с.

### Рецензенты:

Момот А.П., д.м.н., профессор, директор Алтайского филиала ФГБУ «Гематологический научный центр», г. Барнаул.

Куликов В.П., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики, Алтайский государственный медицинский университет, г.Барнаул.

Сентябрев Н.Н., д.б.н., профессор, профессор кафедры физиологии Волгоградской государственной академии физической культуры, г.Волгоград.