

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОСТГИПОТЕРМИИ У КРЫС НА ФОНЕ СВЕРХГЛУБОКОГО ОХЛАЖДЕНИЯ

Лычева Н.А.¹, Макушкина Д.А.¹, Седов А.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул, e-mail: natalia.lycheva@yandex.ru

Цель: изучить состояние микроциркуляторного русла в ответ на ежедневное охлаждение до сверхглубокой степени гипотермии у крыс. **Материалы и методы:** в исследовании использовались крысы-самцы линии Вистар (23 особи). Животные экспериментальных групп подвергались ежедневному охлаждению в воде температурой 5 °С до достижения сверхглубокой степени гипотермии. Анализ состояния микроциркуляторного русла проводился при помощи метода лазерной доплеровской флоуметрии с анализом амплитудно-частотного спектра колебаний кровотока на аппарате ЛАКК-02 и осуществлялся до охлаждения и сразу по достижении сверхглубокой степени гипотермии на 1, 3, 5, 10, 14-й дни. **Результаты и их обсуждение.** В 1-й день сразу по достижении сверхглубокой степени гипотермии регистрировалось снижение показателя перфузии с развитием вазоконстрикции и угнетением активности гладкомышечных клеток прекапилляров. На 14-й день сразу после охлаждения развилась мощная вазодилатация с застоем крови в венах.

Ключевые слова: гипотермия, микроциркуляция.

THE SYSTEM STATE OF THE MICROVASCULATURE IN DIFFERENT PERIODS OF AFTER HIPOTERMIA IN RATS ON A BACKGROUND OF DEEP COOLING

Lycheva N.A.¹, Makushkina D.A.¹, Sedov A.V.¹

¹Altai State Medical University, Barnaul, e-mail: natalia.lycheva@yandex.ru

Objective: to examine the state of the microvasculature in response to daily cooling to ultra-deep degrees of hypothermia in rats. **Materials and methods:** the study used male rats Wistar (23 individuals). Animals of experimental groups were subjected to daily cooling water temperature 5°C to achieve a deep degree of hypothermia. Analysis of the microcirculation was performed using laser Doppler flowmetry analysis of amplitude-frequency spectrum of fluctuations of blood flow on the LAKK-02 apparatus and carried out to cool and immediately upon reaching ultra-deep degrees of hypothermia on the 1st, 3rd, 5th, 10th, 14th days. **Results and their discussion.** In the 1st day immediately upon reaching ultra-deep degrees of hypothermia have recorded a decline in the perfusion with the development of vasoconstriction and inhibition of the activity of smooth muscle cells of the arteriolar. On the 14th day immediately after cooling, the developed powerful vasodilatation with blood stasis in the venules.

Keywords: hypothermia, circulation.

Гипотермия находит широкое применение в медицине, при этом она может выступать как часть профилактических мероприятий во время оперативных вмешательств, в период клинической смерти с целью предотвращения деструкции тканей организма и метаболических нарушений в них, например в неонатологии, а также в неврологии при лечении больных с острыми нарушениями мозгового кровообращения [1]. Также фактор гипотермии используется для лечения заболеваний в различных областях медицины, так, в офтальмологии холод используется для лечения глаукомы [2]. В то же время гипотермическое воздействие может привести к ряду серьёзных осложнений, вплоть до развития полиорганной недостаточности [3]. Известно, что при действии гипотермии первоначально развиваются компенсаторные изменения, достаточные для поддержания температуры ядра на необходимом уровне, при развитии стадии декомпенсации происходит

прогрессивное снижение температуры. При превышении порога охлаждения происходит срыв центральных механизмов регуляции теплового обмена, из-за чего угнетается деятельность корковых и подкорковых структур головного мозга, в том числе и жизненно важных центров продолговатого мозга (сосудодвигательного, дыхательного), что может привести к необратимым последствиям [4]. Оценить влияние гипотермии на организм можно с помощью сравнения показателей микроциркуляции, значений активных (эндотелиальные волны, вазомоторные волны) и пассивных (дыхательные волны, пульсовые волны) механизмов модуляции кровотока, зафиксированных до и сразу после охлаждения организма [5]. Прогнозирование возможных нарушений со стороны микроциркуляторного русла, развивающихся в гипотермический и постгипотермический периоды, позволит уменьшить последствия повреждающего действия гипотермии на организм. Цель исследования: изучить изменения показателей микроциркуляторного русла в ответ на ежедневное охлаждение до сверхглубокой степени гипотермии у крыс.

Материал и методы исследования

Исследования выполнены на 23 крысах-самцах линии Wistar, массой 300 ± 15 г. Иммерсионная гипотермия моделировалась путем помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду температурой 5°C и воздуха 7°C . Критерием прекращения воздействия служило достижение экспериментальными животными ректальной температуры $<20^\circ\text{C}$, что соответствовало сверхглубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и составило 55 ± 5 минут. Охлаждение воспроизводили ежедневно. Состояние микроциркуляторного русла оценивалось до воздействия и сразу после прекращения охлаждения в 1, 3, 5, 10 и 14-й дни. Оценка состояния микроциркуляции была проведена при помощи анализатора лазерной микроциркуляции крови ЛАКК-02, имеющего блок анализатора с лазером (длина волны $0,63$ мкм). Показатели микроциркуляции регистрировались до и после холодового воздействия путём приложения лазера к хвостовой вене в течение 7 минут.

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/ЕЕС [6]. Обезболивание и умерщвление животных проводилось в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Сравнение полученных результатов осуществляли путем вычисления медианы (Me) 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 исследования и их обсуждение

Результаты исследования показателей микроциркуляторного русла, зарегистрированные в указанные периоды гипотермии у крыс, представлены в таблице.

В проведенном исследовании установлено, что показатели микроциркуляторного русла до охлаждения и сразу по достижении сверхглубокой степени гипотермии значительно отличаются друг от друга. Так, в 1-й день сразу по достижении сверхглубокой степени гипотермии показатель микроциркуляции снизился в 2 раза ($p < 0,01$). Со стороны активных механизмов модуляции кровотока было зафиксировано уменьшение амплитуды эндотелиальных волн в 1,7 раза ($p < 0,05$), вазомоторных волн в 1,3 раза ($p < 0,05$). Амплитуда дыхательных и пульсовых волн статистически не отличалась от показателя до воздействия.

На 3-й день сразу после охлаждения был зафиксирован спад уровня перфузии на 21% ($p < 0,05$) по сравнению с показателем микроциркуляции в этот же день до холодного воздействия. При этом показатель эндотелиальных и вазомоторных волн повысился на 17% ($p < 0,05$) и на 38% ($p < 0,05$) соответственно. Также возростала амплитуда дыхательных волн - в 1,7 раза ($p < 0,05$). Амплитуда пульсовых волн до и сразу после охлаждения не изменялась.

На 5-й день показатель микроциркуляции изначально был сниженным, а сразу после охлаждения снизился в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателем до охлаждения. Возростала амплитуда эндотелиальных волн в 2,3 раза ($p < 0,05$) и вазомоторных волн в 3,46 раза ($p < 0,05$) соответственно. Говоря о пассивных факторах контроля микроциркуляции в данный период постгипотермии, следует отметить зафиксированное нами увеличение амплитуды колебаний дыхательных волн в 2,86 раза. В то же время показатель пульсовых колебаний кожного кровотока увеличился в 3,2 раза.

На 10-й день сразу после воздействия гипотермического фактора нами не было зафиксировано изменений показателя микроциркуляции по сравнению со значениями до воздействия. При этом наблюдался рост амплитуд колебаний волн всех частотных диапазонов: показателя эндотелиальных волн в 1,5 раза ($p < 0,05$), показателя вазомоторных волн в 1,3 раза ($p < 0,05$), показателя дыхательных волн в 1,76 раза ($p < 0,05$), показателя пульсовых волн в 1,87 раза ($p < 0,05$).

На 14-й день сразу после охлаждения значение показателя микроциркуляции не изменялось по сравнению с показателями до воздействия на этот же день. В то же время в данный период нами было отмечено существенное возрастание амплитуды волн всех частотных диапазонов: эндотелиальных волн - в 7,6 раза ($p < 0,05$), вазомоторных волн - в 7,4 раза ($p < 0,05$), дыхательных волн - в 9,6 раза ($p < 0,05$), пульсовых волн - в 5,02 раза ($p < 0,05$).

Динамика показателей микроциркуляторного русла

Экспериментальные дни		ПМ, пф.ед. (М)	Эндотелиальные волны, пф.ед.	Вазомоторные волны, пф.ед.	Дыхательные волны, пф.ед.	Пульсовые волны, пф.ед.
1-й день	до	7,63 [6,14÷10,24]	12,62 [9,31÷15,09]	9,32 [5,84÷14,20]	4,76 [3,29÷4,96]	1,33 [1,11÷1,85]
	после	3,05 [2,32÷6,55]*	7,30 [4,75÷10,21]*	7,19 [4,46÷9,49]*	4,07 [2,99÷5,61]*	1,40 [0,08÷1,67]*
3-й день	до	8,97 [8,95÷8,98]	6,69 [6,55÷6,83]	5,41 [4,63÷6,19]	2,77 [2,01÷3,53]	1,37 [1,03÷1,71]
	после	7,11 [6,59÷7,63]#	7,83 [4,95÷10,70]#	7,46 [4,45÷10,46]#	4,76 [2,77÷6,74]#	1,36 [0,99÷1,73]
5-й день	до	3,07 [2,98 ÷3,72]*	2,04 [1,31÷6,49]	1,27 [1,21÷5,46]	0,64 [0,45÷3,27]	0,22 [0,21÷1,26]
	после	2,29 [1,98÷3,49]#	4,75 [4,17÷6,25]#	4,40 [4,11÷4,52]#	1,83 [1,50÷2,39]#	0,70 [0,64÷0,77]#
10-й день	до	3,15 [2,49÷3,20]	5,63 [3,24÷6,46]	5,41 [3,62÷5,51]	1,92 [1,42÷2,83]	0,69 [0,57÷0,96]
	после	3,74 [2,39÷4,11]	8,67 [4,57÷9,36]#	7,08 [2,99÷7,44]#	3,38 [2,13÷4,16]#	1,29 [0,81÷1,52]#
14-й день	до	3,62 [3,48÷3,83]	2,65 [2,17÷3,74]	2,19 [1,59÷2,27]	0,69 [0,66÷1,30]	0,42 [0,36÷0,53]
	после	3,65 [3,62÷4,25]	20,35 [8,08÷27,48]#	16,22 [7,08÷27,61]#	6,65 [4,35÷13,32]#	2,11[1,43÷3,82]#

Примечание: данные представлены в виде Me – медиана выборки, [25÷75] – проценти выборки; * - статистически достоверная разница между исходными и регистрируемыми параметрами (p<0,05, p<0,01), # - статистически достоверная разница между исследуемой и предшествующей экспериментальной группами (p<0,05, p<0,01); ПМ - показатель микроциркуляции.

Таким образом, в 1-й день сразу после достижения сверхглубокой степени гипотермии у животных развивалась вазоконстрикция, что подтверждалось снижением показателя микроциркуляции и показателей активной модуляции кровотока. Увеличение тонуса и развитие спазма сосудов объясняется активацией симпатической нервной системы в собственно гипотермическом периоде, это приводит к увеличению напряжения в гладкомышечных клетках сосудистой стенки. Сформировавшийся спазм приводит к обеднению нутритивного кровотока и развитию ишемии.

На 3-й день показатель микроциркуляции исходно не отличался от такового в первый экспериментальный день, и сразу после охлаждения также наблюдалось снижение уровня перфузии, которое усугублялось депонированием крови преимущественно в венозном звене микроциркуляторного русла без всякой компенсации образовавшегося застоя работой сердца. Но при этом возрастали влияния активных механизмов модуляции кровотока. По повышению показателя эндотелиальных волн можно судить о выбросе в кровоток оксида азота и, как следствие, о развитии вазодилатации [7]. Повышение показателя вазомоторных волн свидетельствует об активации локальных пейсмекеров гладкомышечных клеток микроциркуляторного русла. Таким образом, ишемия и накопившиеся в клетках кислые продукты обмена веществ стали триггерным механизмом к работе активных факторов модуляции кровотока.

На 5-й день до начала действия гипотермии нами был зафиксирован исходно низкий уровень перфузии, что могло наблюдаться в результате нарушений механизмов регуляции кровотока. Кроме того, после охлаждения показатель микроциркуляции снижался до критически малых значений. На фоне зафиксированного уменьшения показателя микроциркуляции регистрировалось увеличение амплитуд волн всех частотных диапазонов, как до, так и после охлаждения. То есть активные и пассивные факторы модуляции кровотока не справлялись с прогрессирующей ишемией органов и тканей [8].

При анализе состояния микроциркуляторного русла на 10-й день было установлено, что уровень перфузии до воздействия был сниженным при сравнении с данными в первый экспериментальный день и не изменялся при сравнении с пятым днем. После прекращения охлаждения показатель микроциркуляции не изменялся. При этом амплитуды колебаний волн всех частотных диапазонов, как и на 5-й день, сразу после воздействия гипотермического фактора повышались по сравнению с показателями в этот же день до охлаждения.

На 14-й день сохранялось обеднение кровотока, что подтверждалось исходно низкими значениями показателя микроциркуляции, зафиксированными до охлаждения. Сразу после прекращения охлаждения уровень перфузии не изменялся. При этом сразу после охлаждения

значительно возрастало влияние активных факторов модуляции кровотока, что свидетельствует о мощной вазодилатации с усилением работы гладкомышечных клеток прекапилляров. Возрастали амплитуды колебаний дыхательных волн, что свидетельствует о снижении тонуса веноулярных сосудов, об ухудшении оттока крови и развитии застойных явлений в микроциркуляторном русле [9; 10]. Кроме того, наблюдалось повышение колебаний пульсовых волн, что можно объяснить стремлением сердечной мышцы увеличить приток крови в микроциркуляторное русло, снизить нарастающую гипоксию органов и тканей, устранить застой крови в венах [11]. Таким образом, показатель микроциркуляции на 14-й день, несмотря на активную работу всех факторов модуляции кровотока, так и остался сниженным. Этот факт можно объяснить тем, что в условиях многократного гипотермического воздействия организм многократно подключал механизмы срочной адаптации к ишемии. Это привело к структурно-функциональным изменениям организма с дальнейшим формированием долговременной адаптации к ишемическому воздействию [12].

Выводы

Достижение сверхглубокой степени гипотермии оказывает выраженное модулирующее влияние на систему микроциркуляции. На 1-й день сразу по достижении указанной степени гипотермии наблюдалось снижение периферического кровотока с развитием вазоконстрикции. К концу эксперимента сразу по достижении указанной степени гипотермии, несмотря на мощную вазодилатацию, застой крови в микроциркуляторном русле и активацию работы сердца, показатель перфузии не возвращался к изначальной величине, что можно объяснить развитием долговременной адаптации к ишемическому воздействию. Превентивная терапия для улучшения показателей микроциркуляции в гипотермический и постгипотермический периоды должна быть направлена на профилактику ишемических повреждений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60054/15 мол_а_дк

Список литературы

1. Функционально-морфологические изменения сердца при гипотермии / Ф.В. Алябьев, А.М. Парфирьева, Н.П. Чесалов и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – Т. 23. – № 1-1. – С. 55-60.
2. Эфферентная терапия в комплексном лечении холодовой травмы, осложненной синдромом полиорганной недостаточности / А.Ф. Потапов, Р.З. Алексеев, С.Ю. Евграфов // Якутский медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 105-108.

3. Микроциркуляция у здоровых людей и больных артериальной гипертонией / С.Г. Абрамович, А.В. Машанская, В.А. Дробышев, А.Ю. Долбилкин // *Journal Of Siberian Medical Sciences*. – 2013. - № 2. – С. 51–57.
4. Koopmans M., Kuipera M.A., Endemanb H. Microcirculatory perfusion and vascular reactivity are altered in post cardiac arrest patients, irrespective of target temperature management to 33°C vs 36°C. *Resuscitation*, 2015, vol. 86, pp. 14–18.
5. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови / под ред. А.И. Крупаткина, В.В. Сидорова. - М.: Медицина, 2005. - С. 102-104.
6. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. – Strasburg: Council of Europe, 1986. – 51 p.
7. Beyer A.M., Freed J.K., Durand M.J. Critical role for telomerase in the mechanism of flow-mediated dilation in the human microcirculation. *Circulation Research*, 2016, pp. 856-866.
8. Wu C.Y., Chan K., Cheng Y.-J. Effects of different types of fluid resuscitation for hemorrhagic shock on splanchnic organ microcirculation and renal reactive oxygen species formation. *Critical Care*, 2015, vol. 19 (434).
9. Вклад стрессоров различной природы в формирование ответной гемостатической реакции организма при действии общей гипотермии / Н.А. Лычева, В.И. Киселев, И.И. Шахматов, В.М. Вдовин // *Фундаментальные исследования*. - 2014. - № 7-1. – С. 106-110.
10. Schwab S. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *American Heart Association*, 1998, pp. 2461-2466.
11. Corry J.J., Crit W.J. Use of hypothermia in the intensive care unit. *Care Med*, 2012, vol. 1 (4), pp. 106-122.
12. Лопатина А.Б. Механизмы становления адаптации // *Международный научно-исследовательский журнал*. - 2016. - № 6-5. - С. 51-52.