

**Применение острой иммерсионной гипотермии для определения устойчивости крыс к холоду в условиях их естественной реактивности**

*Белорусский государственный медицинский университет*

Предложено использование острой иммерсионной гипотермии для определения индивидуальной устойчивости крыс к холоду на основании различной степени снижения температуры тела животных в одинаковых условиях охлаждения. Проведено сравнение степени и скорости снижения ректальной температуры отобранных устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при различной продолжительности острого охлаждения. Описанная методика острой иммерсионной гипотермии у крыс позволяет изучать отличительные особенности устойчивых к холоду животных по сравнению с неустойчивыми.

Ключевые слова: устойчивость к холоду, острая иммерсионная гипотермия, скорость охлаждения.

Изучение механизмов устойчивости к холоду имеет большое социальное и медицинское значение. В последние годы получены новые данные о закономерностях развития гипотермии и устойчивости организма к холоду [7, 11, 4]. Однако изучены далеко не все аспекты механизмов устойчивости к холоду, и исследования в области гипотермии по-прежнему остаются актуальными. Выявление особенностей ответа на охлаждение организма животных, устойчивых к холоду, позволяет разрабатывать подходы к повышению устойчивости человека к холоду. Так, значительное количество работ, изучающих проблемы гипотермии, посвящено изучению животных, обладающих видовой устойчивостью к холоду [15]. Это животные, которые впадают в сезонную спячку, и в это время способны переносить значительное снижение температуры тела. Однако кроме видовой устойчивости животные имеют и различную врожденную индивидуальную устойчивость к холоду. Среди теплокровных животных отмечаются значительные внутривидовые различия по признаку устойчивости ко многим экстремальным факторам, в том числе и к холоду [12]. Так, обнаружены значительные различия температуры тела крыс при их охлаждении в одинаковых условиях [6]. Показано, что температура, при которой происходит остановка дыхания у крыс при охлаждении, у разных животных отличается на несколько градусов Цельсия [10].

Устойчивость к холоду может реализоваться путем различных стратегий. С одной стороны, это способность противостоять охлаждению при снижении температуры окружающей среды и; с другой стороны – способность переносить снижение температуры тела без необратимых нарушений. Однако в условиях острого охлаждения именно способность поддерживать более высокую температуру тела имеет решающее значение для выживания теплокровного организма, так как при определенном уровне снижения температуры тела нарушаются такие жизненно важные функции, как кровообращение и дыхание. Соответственно поддержание более высокой температуры тела является одним

из важнейших показателей устойчивости к острому охлаждению.

Индивидуальная устойчивость организма к холоду зависит от множества факторов, в том числе от возраста, пола, массы тела, количества жировой ткани и т.д. Даже при отсутствии морфологических и возрастных различий устойчивость организма к холоду может быть различной, например, вследствие разной интенсивности обменных процессов, лежащих в основе теплопродукции.

Для исследования причин таких различий устойчивости организма к холоду в эксперименте необходима методика разделения животных на группы, различающиеся по способности поддерживать температуру тела в условиях общего охлаждения. Отбор таких групп из однородной популяции животных дает возможность выявления и изучения различий многих показателей, которые могут быть связаны с устойчивостью организма к холоду.

В исследованиях гипотермии применяются разнообразные методики охлаждения экспериментальных животных, в которых используется локальное и общее, поверхностное и глубокое, острое и длительное охлаждение [3]. В некоторых экспериментах исследователи применяют локальное охлаждение с помощью термода [13]. В ряде опытов применяется общее охлаждение организма путем обкладывания мешочками со льдом [8], в других – помещают животных на поверхность покрытой полиэтиленом ванночки с холодной водой [1]. Такие методики требуют жесткой фиксации животного (крысы), что создает дополнительный мощный иммобилизационный стресс. Кроме того, при таких способах охлаждения не всегда возможна стандартизация холодового воздействия.

Одним из методов достижения гипотермии у животных является острая иммерсионная гипотермия. Экспериментальные модели с использованием погружения (иммерсии) в холодную воду приближены к естественным условиям переохлаждения человека при экстренных ситуациях. Воздействие холодной воды, обладающей высокой теплопроводностью, способствует быстрому охлаждению. Методики охлаждения в воде позволяют получить быстрое снижение температуры тела экспериментальных животных и являются удобной моделью для изучения острой гипотермии.

Так, например, в исследованиях К.П. Иванова и его сотрудников применяется методика иммерсионной гипотермии, при которой крыс в фиксированном с помощью специальных держателей положении помещают в заполненную холодной водой (9-10°C) ванну с наклонным дном так, чтобы над водой находилась только голова животного. При такой методике охлаждения температура тела крыс снижается очень быстро, с достижением экстремальной гипотермии и гибели животных через  $79 \pm 8$  минут при ректальной температуре 15-13°C [14].

В большинстве случаев охлаждение экспериментальных животных проводится в условиях наркоза. С одной стороны, наркоз увеличивает скорость развития гипотермии, но это достигается за счет подавления нормальной естественной реакции организма на охлаждение. Выключение или ослабление таких важных компонентов ответа организма на охлаждение, как активация

симпато-адреналовой системы и холодная мышечная дрожь, не позволяет изучать естественную динамику развития гипотермии, приближенную к условиям экстремальных ситуаций с угрозой переохлаждения человека.

Для разделения однородной группы животных по их индивидуальной устойчивости к холоду необходимо проводить охлаждение в одинаковых условиях и оценивать их температуру тела и скорость охлаждения. К таким методам, позволяющим разделить крыс на группы более устойчивых и менее устойчивых к холоду, относится методика, использованная И.А. Застенской. Охлаждение крыс в этой методике осуществляется в холодной камере при температуре 5°C, с периодическим смачиванием животных в воде температурой 6°C [5,6]. При охлаждении в течение одинаковых периодов времени ректальная температура животных отличается, что позволяет разделить крыс на группы, различающиеся по устойчивости к холоду.

Примененное в данной методике периодическое смачивание крыс в воде требует дополнительных манипуляций с животными на протяжении охлаждения и повышает стрессовое воздействие на крыс. Сочетание подхода, использованного в данной методике, с охлаждением иммерсионного типа может позволить уменьшить стрессовый компонент гипотермии. Кроме того, применение иммерсионной гипотермии может обеспечить большую стандартизацию условий опыта, что, в свою очередь, влияет на точность разделения животных на группы в зависимости от их устойчивости к холоду.

Для получения достоверных различий температуры тела крыс при развитии гипотермии необходима достаточная продолжительность охлаждения, при которой эти различия станут заметными. Для поиска необходимой продолжительности охлаждения требуется исследовать температуру тела крыс после нескольких различных по продолжительности периодов охлаждения, и для каждого такого периода определить различие ректальной температуры крыс, отобранных в группы устойчивых и неустойчивых к холоду.

В соответствии с этим целью одного из разделов нашей работы было определение устойчивости к холоду и последующий отбор устойчивых и неустойчивых к холоду крыс в условиях острой иммерсионной гипотермии.

В дальнейшем отобранные устойчивые и неустойчивые к холоду крысы использовались для исследования некоторых биохимических показателей, в частности, активности ряда лизосомных ферментов печени [9].

#### Материал и методы

Опыты проведены на 111 беспородных белых крысах-самцах массой 180-210 г. Эксперименты проводились в специально оборудованной холодильной камере, в которой поддерживалась температура воздуха 5°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Крысы помещались в емкости с водой. Уровень воды составлял 4,5 см, температура воды 5°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Крысы находились в отдельных отсеках, по одному животному в отсеке. Животные могли стоять в воде, не плавая. Подвижность их была ограничена небольшими размерами отсеков, однако жесткая фиксация крыс не проводилась.

В первой серии экспериментов животные охлаждались в течение 1 часа 20 минут, во второй – 2 часа, в третьей – 2 часа 30 минут, и в четвертой серии

экспериментов охлаждение крыс длилось 2 часа 40 минут. Периоды охлаждения в данной экспериментальной модели гипотермии эмпирически подобраны в соответствии с уровнем гипотермии у неустойчивых к холоду крыс после охлаждения. Так, в каждой серии опытов неустойчивые к холоду животные последовательно достигали гипотермии около 30°C (охлаждение в течение 1 часа 20 минут), затем 25°C (2 часа), 20°C (2 часа 30 минут) и 16°C (2 часа 40 минут).

Исходная температура тела животных не отличалась. В конце периода охлаждения у крыс измеряли ректальную температуру электротермометром ТПЭМ-1 на глубине 3,5 см. Для дальнейшего изучения отбирались животные, более устойчивые к холоду (в дальнейшем – устойчивые), и менее устойчивые к холоду крысы (в дальнейшем – неустойчивые). Животные с промежуточной устойчивостью в опыт не отбирались. В среднем в наших опытах количество устойчивых к холоду крыс составляло 40-50%, крыс, неустойчивых к холоду, – 30-40%, и животных с промежуточной устойчивостью к холоду – 10-20%.

При продолжительности охлаждения 1 час 20 минут в группу крыс, неустойчивых к холоду, отбирали животных, температура тела которых за указанный период снижалась в среднем до 30°C, то есть до 31°C и ниже. В группу устойчивых к холоду крыс отбирали животных, которые в тех же условиях охлаждения поддерживали температуру на 4-5°C выше, т.е. 34-35°C и выше. При более длительном охлаждении эта разность температуры между устойчивыми и неустойчивыми к холоду крысами возрастала. При этом средняя масса тела крыс в группах устойчивых и неустойчивых к холоду животных во всех сериях экспериментов не отличалась.

Результаты обработаны методами параметрической статистики. Достоверность различий между показателями двух экспериментальных групп оценивали по критерию t Стьюдента [2]. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

Температура тела устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при охлаждении.

В первой серии экспериментов (охлаждение в течение 1 часа 20 минут) температура тела крыс, отобранных в группу неустойчивых к холоду, снизилась с  $37,3 \pm 0,17^\circ\text{C}$  до  $30,3 \pm 0,13^\circ\text{C}$ , т.е. на  $7,0^\circ\text{C}$  ( $p < 0,001$ ;  $n=9$ ). Температура тела крыс, отобранных в группу устойчивых к холоду, при охлаждении в тех же условиях снизилась с  $37,3^\circ\text{C} \pm 0,16^\circ\text{C}$  до  $35,1 \pm 0,13^\circ\text{C}$ , т.е. на  $2,2^\circ\text{C}$  ( $p < 0,001$ ;  $n=10$ ). Таким образом, после охлаждения крыс в одинаковых условиях в течение 1 часа 20 минут различие средней ректальной температуры между группами устойчивых и неустойчивых к холоду животных составляет  $4,8^\circ\text{C}$  ( $p < 0,001$ ).

Длительность охлаждения животных в следующей серии экспериментов составляла 2 часа. Установлено, что за этот период охлаждения ректальная температура у неустойчивых к холоду крыс снизилась с  $37,4 \pm 0,07^\circ\text{C}$  до  $24,6 \pm 0,18^\circ\text{C}$ , т.е. на  $12,8^\circ\text{C}$  ( $p < 0,001$ ;  $n=14$ ). Температура крыс, отобранных в группу устойчивых к холоду, в тех же условиях охлаждения снизилась с  $37,4 \pm$

0,07°C до 32,7±0,32°C, т.е. на 4,7°C ( $p < 0,001$ ;  $n=16$ ). Следовательно, при охлаждении устойчивых и неустойчивых к холоду крыс в течение 2 часов устойчивые к холоду животные поддерживали ректальную температуру на 8,1°C выше температуры крыс, неустойчивых к холоду ( $p < 0,001$ ).

В третьей серии экспериментов длительность охлаждения крыс составляла 2 часа 30 минут. Опыты показали, что за этот период охлаждения ректальная температура крыс, неустойчивых к холоду, снизилась на 17,5°C: с 37,4±0,06°C до 19,9±0,37°C ( $p < 0,001$ ;  $n=14$ ). Температура крыс, устойчивых к холоду, за указанный период охлаждения снизилась на 6,1°C: с 37,4±0,05°C до 31,3±0,34°C ( $p < 0,001$ ;  $n=18$ ). Таким образом, при охлаждении в течение 2 часов 30 минут в одинаковых условиях устойчивые к холоду крысы поддерживали температуру тела на 11,4°C выше по сравнению с температурой крыс, неустойчивых к холоду ( $p < 0,001$ ).

И, наконец, в четвертой серии экспериментов охлаждение крыс продолжалось 2 часа 40 минут. Несмотря на незначительное увеличение продолжительности охлаждения по сравнению с предыдущей серией опытов, различия температуры между животными с различной устойчивостью к холоду особенно возросли. Так, ректальная температура неустойчивых к холоду крыс снизилась с 37,4±0,08°C до 16,2±0,02°C, т.е. на 21,2°C ( $p < 0,001$ ;  $n=14$ ). За тот же период охлаждения ректальная температура крыс, устойчивых к холоду, снизилась на 8,4°C: с 37,5±0,05°C до 29,1±0,42°C ( $p < 0,001$ ;  $n=16$ ). Таким образом, при охлаждении крыс в течение 2 часа 40 минут устойчивые к холоду животные поддерживали температуру тела на 12,9°C выше по сравнению с крысами, неустойчивыми к холоду ( $p < 0,001$ ).

Температура тела устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при различной продолжительности охлаждения представлена на рисунке 1.

\* - достоверность различий между группами устойчивых и неустойчивых к холоду крыс, во всех случаях  $p < 0,001$

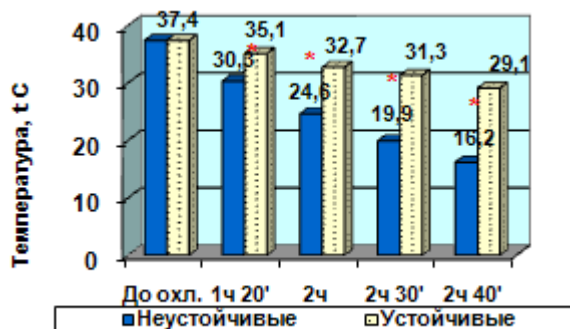


Рис. 1. Ректальная температура устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при различной продолжительности охлаждения

Опыты показали, что величина снижения ректальной температуры крыс при охлаждении в одинаковых условиях и при одинаковой продолжительности охлаждения значительно отличается, что позволяет разделить животных на группы, различающиеся по устойчивости к холоду. По мере возрастания продолжительности охлаждения у всех животных происходит снижение

ректальной температуры, но снижение температуры у крыс, устойчивых к холоду, происходит значительно медленнее, чем у неустойчивых к холоду животных. Это приводит к возрастанию различий температуры тела, наблюдаемых при увеличении продолжительности охлаждения. Так, если в первой серии экспериментов различие средней температуры тела у животных с различной устойчивостью к холоду составило  $4,8^{\circ}\text{C}$ , то в последующих сериях экспериментов при увеличении продолжительности охлаждения эта разность температур возрастает:  $8,1^{\circ}\text{C}$  (охлаждение в течение 2 часов), затем  $11,4^{\circ}\text{C}$  (2 часа 30 минут), и наконец,  $12,9^{\circ}\text{C}$  (2 часа 40 минут). Во всех случаях достоверность различий  $p < 0,001$ .

Устойчивые к холоду крысы достигают приблизительно такого же уровня ректальной температуры, как неустойчивые к холоду за 1 час 20 минут (около  $30^{\circ}\text{C}$ ), только к концу периода охлаждения 2 часа 40 минут, т.е. за почти вдвое больший период охлаждения.

Скорость охлаждения устойчивых и неустойчивых к холоду крыс.

Приведенные данные показывают, что снижение ректальной температуры животных происходит не прямо пропорционально продолжительности охлаждения, т.е. зависимость достигаемой при охлаждении температуры тела от времени нелинейная. Как показали опыты, у крыс с различной устойчивостью к холоду при охлаждении значительно отличаются не только уровень достигаемой гипотермии, но и скорость снижения ректальной температуры. По мере увеличения продолжительности охлаждения скорость снижения температуры возрастает, как у неустойчивых, так и у устойчивых к холоду крыс, но в разной степени. Несмотря на изменение скорости снижения температуры в процессе охлаждения, можно рассчитать среднюю скорость снижения ректальной температуры крыс при различной продолжительности охлаждения.

Установлено, что средние скорости охлаждения животных с различной устойчивостью к холоду на каждой стадии охлаждения значительно отличаются. Так, средняя скорость охлаждения крыс, неустойчивых к холоду, при охлаждении в течение 1 часа 20 минут составляет  $5,25^{\circ}\text{C}/\text{час}$ . В то же время средняя скорость охлаждения устойчивых к холоду крыс за тот же период охлаждения составляет  $1,65^{\circ}\text{C}/\text{час}$ , т.е. в 3,2 раза меньше по сравнению с неустойчивыми к холоду животными.

При охлаждении крыс в течение большего периода времени скорость снижения температуры увеличивается. На протяжении охлаждения в течение 2 часов средняя скорость снижения температуры у неустойчивых к холоду крыс составляет уже  $6,4^{\circ}\text{C}/\text{час}$ . У устойчивых к холоду животных средняя скорость охлаждения составляет

$2,35^{\circ}\text{C}/\text{час}$ , что по сравнению с неустойчивыми к холоду крысами в 2,7 раза меньше.

На протяжении периода охлаждения в течение 2 часов 30 минут средняя скорость охлаждения крыс, неустойчивых к холоду, составляет  $7^{\circ}\text{C}/\text{час}$ . За этот же период скорость охлаждения устойчивых к холоду крыс составляет  $2,44^{\circ}\text{C}/\text{час}$ , что в 2,9 раза меньше по сравнению с неустойчивыми к холоду

крысами.

И, наконец, при охлаждении в течение 2 часов 40 минут средняя скорость снижения температуры тела неустойчивых к холоду животных достигает  $7,95^{\circ}\text{C}/\text{час}$ . Крысы, устойчивые к холоду, за этот период охлаждаются со скоростью  $3,15^{\circ}\text{C}/\text{час}$ . Это в 2,5 раза меньше сравнению с неустойчивыми к холоду крысами.

Скорости снижения температуры устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при различной продолжительности охлаждения представлены на рисунке 2.

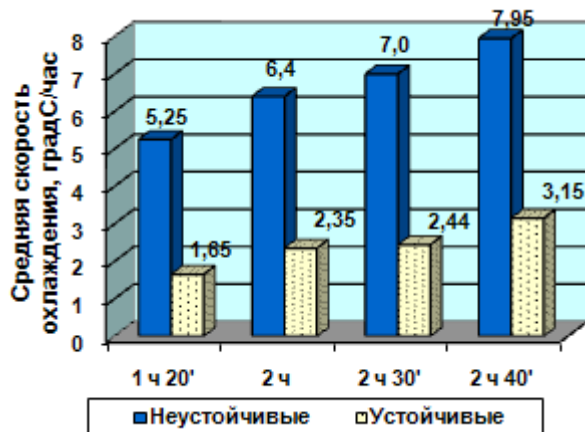


Рис. 2. Средняя скорость снижения ректальной температуры устойчивых и неустойчивых к холоду крыс при различной продолжительности охлаждения

Полученные значительные различия ректальной температуры и скорости охлаждения у крыс одного и того же пола, возраста и массы тела свидетельствуют о различной индивидуальной устойчивости животных к холоду. Можно предположить, что в основе выявленных различий лежат особенности процессов терморегуляции, и, прежде всего, теплопродукции. В условиях естественной реактивности организма, когда сохранена регуляция теплопродукции, различия индивидуальной устойчивости животных к холоду проявляются особенно ярко.

Таким образом, примененная в наших опытах методика острой иммерсионной гипотермии у крыс в условиях естественной реактивности, максимально приближенная к условиям переохлаждения человека при морских и других катастрофах, позволяет отбирать устойчивых и неустойчивых к холоду животных и затем изучать отличительные особенности устойчивых к холоду животных по сравнению с неустойчивыми. Изучение таких особенностей устойчивых к холоду животных может внести важный вклад в раскрытие механизмов индивидуальной устойчивости организма к холоду.

## Литература

1. Борисов, В. А. Методика искусственной гипотермии на мелких лабораторных животных / В. А. Борисов, О. Д. Мяделец, В. Н. Бринкевич // Криобиология. 1989. № 4. С. 49–50.
2. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с.
3. Гулиева, С. А. О методах охлаждения, применяемых в условиях эксперимента / С. А. Гулиева // Азербайджанский мед. журнал. 1979. № 3. С. 44–50.
4. Зайцев, А. Г. Исследование фригопротекторной активности фармакологических средств в условиях острого иммерсионного охлаждения / А. Г. Зайцев, Е. Б. Шустов // Всеармейская науч.-практ. конф. «Теоретические и прикладные вопросы обитаемости и профессионального отбора»: тез. докл. СПб.; Североморск, 1996. С. 37.
5. Застенская, И. А. Метаболизм миокарда у крыс в условиях гипотермии / И. А. Застенская // Здоровоохранение Белоруссии. 1989. № 12. С. 28–31.
6. Застенская, И. А. Роль липидов в механизмах гипотермии и естественной терморезистентности / И. А. Застенская // Нарушение механизмов регуляции и их коррекция: тез. докл. IV Всесоюз. съезда патофизиологов, Кишинев, 3–6 окт. 1989 г. М., 1989. Т. 2. С. 589.
7. Иванов, К. П. Основы энергетики организма: теоретические и практические аспекты / К. П. Иванов. СПб.: Наука, 2001. Т. 3: Современные проблемы, загадки и парадоксы регуляции энергетического баланса. 278 с.
8. Львова, С. П. Температурная компенсация активности ферментов у гомойотермных животных / С. П. Львова, И. С. Мейланов // Биофизика. 2000. Т. 45. № 2. С. 228–231.
9. Северина, Т. Г. Влияние острой иммерсионной гипотермии на температуру тела и активность лизосомных ферментов печени устойчивых и неустойчивых к холоду крыс / Т. Г. Северина, А. И. Кубарко // Мед. журн. 2009. Т. 28. № 2. С. 112–115.
10. Слепчук, Н. А. Температурные изменения в различных органах при иммерсионной гипотермии / Н. А. Слепчук, К. П. Иванов // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 1992. Т. 78. № 12. С. 127–131.
11. Тимофеев, Н. Н. Нейрохимия гипобиоза и пределы криорезистентности организма / Н. Н. Тимофеев, Л. П. Прокопьева // М.: Медицина, 1997. 208 с.
12. Тимочко, М. Ф. О некоторых биохимических механизмах жизнеобеспечения высокорезистентных животных / М. Ф. Тимочко, Я. И. Алексеева, Ю. Г. Бобков // Пат. физиол. и эксп. тер. 1991. № 2. С. 28–29.
13. Ткаченко, Е. Я. Роль  $\alpha_1$ - и  $\beta$ -адренорецепторов в инициации и формировании терморегуляторных реакций при быстром и медленном охлаждении / Е. Я. Ткаченко [и др.] // Бюл. эксп. биол. и мед. 2008. Т. 145. № 3. С. 259–262.
14. Чуйкин, А. Е. Транспорт кислорода и газообмен у крыс в условиях



иммерсионной гипотермии / А.Е. Чуйкин, Т. Е. Федорова // Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 1992. Т. 78. № 12. С. 141–148.

15. Van Breukelen, F. Invited review: Molecular adaptations in mammalian hibernators: unique adaptations or generalized responses / Van Breukelen, Frank, and Sandra L. Martin // J. Appl. Physiol. 2002. Vol. 92. P. 2640–2647.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ