

ГЕМОСТАЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ У КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ОДНОКРАТНОЙ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ IN VITRO

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

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

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

Ключевые слова: гемостаз, общее перегревание in vitro.

Резюме. Проведен анализ состояния системы гемостаза плазмы крови у крыс на различных стадиях перегревания. При гипертермическом воздействии коагуляционный гемостаз реагировал угнетением внешнего, внутреннего и конечного этапов свёртывания крови. Более длительное воздействие гипертермии сопровождалось снижением концентрации фибриногена, повышением уровня растворимых фибрин-мономеров и угнетением фибринолитической активности плазмы.

Resume. The analysis of the hemostatic system in rat plasma at various stages of overheating. When hyperthermal effects of coagulation hemostasis responded oppression external, internal, and the final stages of blood clotting. More lasting effect of hyperthermia associated with decreased fibrinogen concentration, increased levels of soluble fibrin monomers and suppression of plasma fibrinolytic activity.

Актуальность. Гипертермия – состояние, вызванное искусственным согреванием всего тела или его части до уровня, превышающего границы обычного теплового режима, а точнее рубеж 37,0 °С [3]. Гипертермическое воздействие успешно применяется при лечении онкологических, аллергических, аутоиммунных и инфекционных заболеваний [7]. 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 [3; 7].

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 [7].

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 [7]. Поскольку большинство факторов свёртывания – это белки, то особое внимание мы обратили

на изучение состояния системы гемостаза *in vitro* при различных температурных режимах.

Цель: Изучить особенности реагирования системы гемостаза на однократное гипертермическое воздействие *in vitro*.

Задача: Изучить состояние системы гемостаза *in vitro* при различных температурных режимах.

Материал и методы. Исследования были выполнены на 100 половозрелых крысах-самцах линии Wistar средней массой $245,0 \pm 35,0$ г. Все экспериментальные животные были разделены на 10 групп: пять контрольных ($n=10$) и пять опытных групп ($n=10$). Кровь для исследования в объеме 5 мл получали путем забора из печеночного синуса, под эфирным наркозом. Кровь центрифугировали в течение 15 минут при скорости 3000 об./мин (1200 g), в результате получали плазму, лишенную тромбоцитов.

Бедная тромбоцитами плазма крови опытных групп помещалась в воздушный термостат при температуре $+45$ °C: 1-я опытная группа - на 28 минут, до достижения стадии «безразличия» (температура плазмы $+39,6$ °C), 2-я опытная группа - на 41 минуту, до достижения стадии «возбуждения» ($+41,7$ °C), 3-я опытная группа - на 48 минут, до достижения стадии «начала теплового удара» ($+42,9$ °C), 4-я опытная группа - на 56 минут, до достижения стадии «разгара теплового удара» ($+43,2$ °C), 5-я опытная группа - на 62 минуты, до достижения «терминальной стадии теплового удара» ($+43,9$ °C). Длительность нахождения в термостате для достижения той или иной стадии была нами установлена экспериментально, градация стадий эксперимента - на основании литературных данных [1, 4].

В группах контроля бедная тромбоцитами плазма крови находилась в водяной термобане при температуре $+37,0$ °C на протяжении такого же времени, что и опытные группы. 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 коагулометра «Минилаб» (Россия), «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. 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 $p < 0,05$.

Результаты 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 (см. табл.).

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 путях 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 пути 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 % ($p < 0,001$) и удлинение анцистронового времени - на 20 % ($p < 0,05$). 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.

Показано, что при достижении температуры плазмы крови животных в экспериментах *in vitro* выше физиологической нормы, происходит нарастание гипокоагуляционного сдвига в системе гемостаза на фоне роста уровня РФМК и снижения концентрации фибриногена, а также выраженное нарастание угнетения её фибринолитической активности.

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 [2]. 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 [6]. Они, в свою очередь, связываются с избыточными фибрин-мономерами, препятствуя их дальнейшей полимеризации, что и приводит к образованию РФМК, которые либо плохо свертываются, либо вовсе не свертываются тромбином [2; 5].

Выводы:

1. Полученные результаты позволяют предположить, что отсутствие гиперкоагуляционного сдвига при перегревании *in vitro*, в отличие от перегревания *in vivo* [4], может быть обусловлено тем, что экспозиция плазмы в условиях повышенной температуры в опытах *in vitro* исключает возможность коррекции её гемостазиологических показателей путем воздействия нервных и гуморальных регуляторных факторов.

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

Таблица 1. Показатели системы гемостаза плазмы крови крыс при различных режимах острого однократного перегревания *in vitro* (n [25%÷75%])

Показатели	Опыт (n=10)			
	Ст. Б	Ст. В	Ст. НТУ	
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 *
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 *
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 *
ВПФМ, с	57,1 [54,8÷58,3]	64,1 *** [61,6÷66,3] (+23 %)	103,4 *** [96,4÷113,7] (+97 %)	>
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 *
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
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
Содержание	101,5 [97,5÷104,0]	101,5 [97,3÷102,5]	97,5 [95,0÷101,3]	99,0

антитромбина III, %				
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	690,0 [660,0÷720,0]	630,0 [577,5÷660,0]	975,0 *** [915,0÷990,0] (Δ+59 %)	> (

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».

Литература

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. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования / Д.М. Зубаиров. – Каз.: ФЭН, 2000. - 367 с.
3. Киншт Д.Н. Общая управляемая гипертермия: теория, практика, моделирование процессов / Д.Н. Киншт, Н.В. Киншт. — Владивосток: Дальнаука, 2006. — 194с.
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 (54). – С. 6. URL: www.science-education.ru/118-14114 (дата обращения: 29.07.2014).
5. Стручко Г.Ю. Лабораторные методы исследования системы гемостаза и диагностика нарушений гемокоагуляции: учебное пособие / Г.Ю. Стручко. – Ставрополь: Медицина, 2009. – 64 с.
6. Hambleton J. Coagulation: Consultative Hemostasis // Hematology. - 2002. – Vol. 2. – P. 335-353.
7. Roussakow S. The History of Hyperthermia Rise and Decline / Conference Papers in Medicine. – 2013. - Vol. 13. - P.