ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

ORIGINAL STUDY

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ И ГЕМОСТАЗА В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ПОСЛЕ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ У КРЫС

© Н.А. Лычева, И.И. Шахматов, А.В. Седов, Д.А. Макушкина, В.М. Вдовин

ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, Барнаул, Россия

Гипотермия оказывает генерализованное воздействие на организм, с вовлечением в ответную реакцию всех органов и систем. Показано, что действие гипотермии способствует развитию полиорганной недостаточности, что делает важным и актуальным проблему изучения действия гипотермии на состояние системы гемостаза и микроциркуляторного русла (МЦР). ***Цель.*** Изучить состояние системы гемостаза и МЦР в различные периоды действия умеренной гипотермии у крыс. ***Материалы и методы.*** Исследование выполнено на 50 крысах-самцах линии Wistar. У животных исследовалось состояние МЦР с помощью лазерной допплеровской флоуметрии, состояние системы гемостаза – с помощью рутинных методик и тромбоэластографии. Статистический анализ выполнен с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США); рассчитывался непараметрический критерий Манна-Уитни. ***Результаты.*** Сразу по достижении умеренной степени гипотермии наблюдалось развитие вазодилатации, свидетельствующее о декомпенсаторном состоянии экспериментальных животных. Наибольший риск развития гемодинамических расстройств наблюдается через 5 дней после прекращения охлаждения и характеризуется массивным снижением тонуса сосудов с интенсификацией гемодинамики, на фоне появления в кровотоке маркеров тромбинемии и выраженном угнетении фибринолиза. Усиление гемодинамики в нутритивном бассейне на фоне прогрессирования состояния тромботической готовности является мощнейшим фактором развития тромбоза и полиорганной недостаточности. По истечении 2 недель с момента восстановления температуры тела наблюдается вазоспазм, что свидетельствует о глубокой модуляции сосудистого русла и сохранении симпатической импульсации на высоком уровне, а также о повышении жесткости сосудистой стенки. Прогрессирование воспалительной реакции подтверждается нарастающей концентрацией фибриногена. ***Заключение.*** Достижение умеренной степени гипотермии оказывает выраженное модулирующее влияние на систему микроциркуляции. Установленные закономерности позволяют сформировать четкое представление о течение и развитии патологической реакции в организме пострадавших и дать рекомендации по применению фармакологических препаратов для проведения превентивной терапии. Так, установлен период, в котором развитие состояния тромботической готовности максимально, и требуется применение антикоагулянтных и антиагрегантных препаратов, а также средств, улучшающих реологию крови.

Ключевые слова*: гипотермия; гемостаз; тромбоз; микроциркуляция; крысы.*

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

CONDITION OF MICROCIRCULATORY AND HEMOSTASIS SYSTEMS IN RATS AFTER MODERATE HYPOTHERMIA

N.A. Lycheva, I.I. Shakhmatov, A.V. Sedov, D.A. Makushkina, V.M. Vdovin

Altai State Medical University, Barnaul, Russia

Hypothermia produces a generalized impact on an organism, with involvement of all organs and systems into the response. It was shown that hypothermia promotes multi-organ dysfunction syndrome, which makes it important to study the influence of hypothermia on condition of hemostasis and microcirculatory systems. ***Aim.*** To study the condition of the hemostasis system and the microcirculatory bed in different periods of moderate hypothermia in rats. ***Materials and Methods.*** The current study was performed on 50 male Wistar rats. Condition of microcirculatory blood stream in all animals was assessed with laser Doppler flowmetry. Condition of hemostasis system was studied according to routine protocols and an integrated method of examination – thromboelastography. Statistical analysis was performed using Statistica 6.0 software package (StatSoft, USA) with calculation of Mann-Whitney nonparametric test. ***Results.*** Analysis of the experimental data showed that moderate hypothermia produced a pronounced modulating influence on the microcirculatory system. Vasodilatation occurred immediately after reaching the stage of hypothermia, suggesting the beginning of decompensation in the experimental animals. The highest risk for hemodynamic pathologies was observed 5 days after cessation of cooling and was characterized by a massive reduction in the vascular tone, intensification of hemodynamics against the background appearance of thrombinemia markers in the blood stream and pronounced inhibition of fibrinolysis. Enhanced hemodynamics of the nutritional vascular bed with the underlying progressive prothrombotic condition is a potent risk factor for thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. Vasospasm that developed 2 weeks after recovery of the body temperature, indicated a profound modulation of vasculature and preservation of high-level sympathetic input, as well as increasing rigidity of blood vessel walls. Rising fibrinogen concentrations confirm a progressive inflammatory reaction. ***Conclusion.*** A moderate degree of hypothermia produces a pronounced modulating effect on the microcirculation. The established regularities make it possible to form a clear understanding of the course and development of the pathological reaction in the body of victims and to give recommendations on the use of pharmacological medicine for preventive therapy. Thus, a period has been established when thrombotic readiness is maximal, and use of anticoagulant and antiplatelet drugs is required, together with drugs that improve rheological properties of blood.

Keywords*: hypothermia; hemostasis; thrombosis; microcirculation; rats.*

Гипотермия оказывает генерализованное воздействие на организм, выступая не только в качестве естественного фактора внешней среды, но и искусственно создаваемой среды, используемой в практической медицине. Воздействие холода может выступать в качестве повреждающего фактора, вызывая развитие деструктивных процессов в тканях разной степени [1-3]. В практической медицине гипотермия является обязательным условием при проведении операций на открытом сердце, а также важным компонентом комплексной терапии ряда неотложных состояний, среди которых черепно-мозговые травмы, ишемические и геморрагические повреждения мозга [4,5]. В формировании острой ответной реакции на холод вовлекаются все органы и системы. При этом основными компонентами, обеспечивающими адекватность трофики тканей, являются микроциркуляторное русло (МЦР) и система гемостаза.

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

При развитии общей непреднамеренной гипотермии выделяют следующие периоды: *компенсаторный*, в котором наблюдается активация процессов теплообразования, и интенсивности их достаточно для поддержания постоянной температуры тела; собственно *гипотермический* период, в котором наблюдаются декомпенсаторные изменения, приводящие к потере тепла организмом; *постгипотермический* период, длящийся от момента прекращения охлаждения до истечения 2-х сут; *восстановительный* период, характеризующийся восстановлением кровотока в поврежденных участках, и период *отдаленных последствий*, в котором происходят модификационные и компенсаторные изменения систем организма. Показано, что действие гипотермии способствует развитию полиорганной недостаточности [1].

Немаловажным является изучение состояния МЦР и системы гемостаза в постгипотермический период, характеризующийся формированием и манифестацией травматических последствий действия общего переохлаждения на организм [5-7]. Прогнозирование возможных нарушений со стороны МЦР и системы гемостаза, развивающихся после прекращения охлаждения, позволит минимизировать последствия повреждающего действия гипотермии на организм.

Цель – изучить состояние системы гемостаза и микроциркуляторного русла в различные периоды действия умеренной гипотермии у крыс.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 50 крысах-самцах линии Wistar, массой 300±15 г. Моделирование общей управляемой иммерсионной гипотермии осуществлялось путем охлаждения животных в воде температурой 5°С при температуре воздуха 7°С на фоне предварительной наркотизации. Критерием прекращения воздействия служило достижение экспериментальными животными ректальной температуры 27-30°С. Время экспозиции было индивидуальным и составило 5±3 минуты.

Контролем служила кровь 25 животных, полученная после того, как они на фоне предварительной наркотизации в индивидуальных клетках помещались в воду температурой 30°С при температуре воздуха 22-25°С. Время экспозиции соответствовало времени охлаждения животных опытной группы.

Животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения раствора золетила в дозе 0,05 мл/кг, после чего у всех животных проводили анализ состояния МЦР. Далее животных охлаждали до указанной температуры, после чего вновь регистрировали параметры МЦР.

В дальнейшем все животные были поделены нами на группы. У 1-й группы (n=10) животных анализ состояния МЦР и забор крови осуществлялся сразу по достижении умеренной степени гипотермии. Во 2-ой группе (n=10) – через 2 дня, в 3-й группе (n=10) – через 5 дней, в 4-й группе (n=10) – через 10 дней, в 5-й группе (n=10) – через 14 дней после прекращения охлаждения.

У всех животных исследовались показатели тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, а также антикоагулянтная и фибринолитическая активность плазмы крови с помощью наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия). Индуцированную агрегацию тромбоцитов проводили по G.V.R. Born (1962) на агрегометре «Биола» (ООО НПФ «Биола», Россия); в качестве индуктора использовался раствор аденозиндифосфата (АДФ) концентрацией 10 мкг/мл. Тромбоэластометрия выполнялась на приборе «Rotem» (Pentapharm GmbH, Германия) с использованием диплосистем, реагентов и контрольных материалов, предлагаемых его производителем. Для проведения теста был использован реагент «Natem», в состав которого входит хлорид кальция. Кровь для исследования в объеме 5 мл получали путем забора из печеночного синуса в полистироловый шприц, содержащий 0,11 М (3,8%) раствора цитрата натрия (соотношение крови и цитрата 9:1).

Для изучения состояния МЦР использовалась лазерная доплеровская фло-

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

уметрия (ЛДФ). Методика ЛДФ проводилась на аппарате ЛАКК-02 (НПО Лазма, Россия), при этом регистрировали основные параметры микроциркуляции, а также проводили анализ амплитудно-частотного спектра колебаний кровотока. Головка оптического зонда фиксировалась в основании хвоста экспериментального животного. Длительность записи ЛДФ-граммы составила 7 минут.

До проведения эксперимента на протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания согласно требованиям Правил надлежащей лабораторной практики (от англ. *Good Laboratory Practice* – GLP). Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте и Директивами – 86/609/EEC [8]. 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 (Stat Soft Inc., США). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования показателей системы гемостаза у животных контрольной и всех экспериментальных групп представлены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели системы гемостаза у крыс исходно и в различные периоды постгипотермии

Параметр	Контроль	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа
Тромбоциты, 10^9/л	511 [502÷554]	715 [704÷719]*	459 [402÷469]#	459 [279÷623]	586 [518÷654]	737 [704÷751]*
АДФ-индуцированная агрегация, отн. ед	10,2 [6,7÷12,3]	1,26 [1,0÷5,12]*	23,8 [20,3÷24,9]*#	17,9 [13,1÷25,1]*	26,6 [21,2÷33,1]*	8,48 [5,3÷12,4]#
Фибриноген, г/л	2,1 [2,1÷2,2]	2,3 [1,8÷2,3]	2,6 [2,5÷2,7]*	2,5 [2,3÷2,5]*	2,45 [2,3÷2,5]*	2,8 [2,8÷2,9]*#
РФМК, мг/100 мл	3,0 [3,0÷3,0]	3,0 [3,0÷3,0]	3,0 [3,0÷5,3]*#	28 [15,5÷28]*#	3,0 [3,0÷3,0]#	3,0 [3,0÷3,5]
ВПФМ, r	1,8 [1,6÷2,1]	1,2 [1,1÷1,3]*	0,89 [0,8÷1,1]*#	0,77 [0,63÷0,79]*#	1,095 [09÷1,2]*	0,94 [0,8÷0,9]*
Антитромбин III, %	116,5 [114,0÷117,0]	70,0 [47,3÷100,0]*	103,2 [97,5÷115,4]#	90,0 [82,4÷97,1]	82,1 [70,4÷89,1]*	75,4 [70,4÷78,1]*#
Эуглобулиновый фибринолиз, мин	558,0 [360,0÷558,0]	1248 1212,0÷1248,0]*	454,0 [400,0÷512,0]#	700,0 [670,1÷785,2]*#	815,0 [782,4÷870,1]*	870,0 [890,4÷910,1]*#
CT, с	259,0 [227,0÷279,0]	218,0 [207,0÷236,0]*	179,5 [171,0÷181,0]*#	127,0 [71,0÷166,0]*#	187,5 [132,7÷208,7]*	233,0 [196,0÷267,0]*
CFT, с	98,0 [82,0÷118,0]	102,0 [70,0÷103,0]	69,0 [60,0÷71,0]*#	49,0 [46,0÷56,0]*#	51,0 [49,0÷58,0]*	91,0 [86,0÷111,0]
ML, %	15,0 [0,0÷20,0]	5,0 [1,0÷9,0]*	15,0 [3,0÷24,0]#	1,0 [1,0÷5,5]*#	2,0 [2,0÷2,1]*	2,0 [0,9,0÷3,1]*

Примечания: данные представлены в виде Me – медиана выборки, […÷…] – 25 и 75 процентили выборки; * – статистически значимые различия между исследуемой и контрольной группами ($p<0,05$); # – статистически значимые различия между исследуемой и предшествующей экспериментальной группами ($p<0,05$); РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы, ВПФМ – время полимеризации фибрин-мономерных комплексов, r – отношение времени полимеризации фибрин-мономерных комплексов в плазме экспериментальных животных к времени полимеризации фибрин-мономерных комплексов в плазме интактных животных, CT – время коагуляции, CFT – время формирования сгустка, ML – максимальный лизис

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

Как следует из данных представленных в таблице сразу после прекращения охлаждения в кровотоке животных регистрировалось увеличение количества тромбоцитов на 39% (p<0,05) при снижении их агрегационной способности в 8 раз (p<0,01). Кроме того, достижение умеренной степени гипотермии сопровождалось гиперкоагуляцией, которая подтверждалась как данными тромбоэластограммы (показатель времени коагуляции (СТ) уменьшался на 16%, p<0,05), так и укорочением времени полимеризации фибрин-мономернх комплексов на 35% (p<0,05). Зафиксированная гиперкоагуляция усугублялась выраженным (на 40%, p<0,05) снижением активности антитромбина III на фоне угнетения фибринолитической активности плазмы крови в 2 раза (p<0,01).

Через 48 ч после прекращения охлаждения в кровотоке животных регистрировалось снижение количества тромбоцитов на 35% (p<0,05), при увеличении их агрегационной способности в 18 раз от показателя зафиксированного сразу после прекращения охлаждения (p<0,05). Гиперкоагуляция, зарегистрированная у экспериментальных животных 1-й группы, сохранялась. Кроме того, регистрировалось увеличение количества фибриногена, сопровождавшееся ростом концентрации растворимых фибрин-мономерных комплексов (РФМК). Состояние животных усугублялось значимым укорочением времени образования сгустка (на 31%, p<0,05) и времени полимеризации фибрин-мономерных комплексов (ВПФМ) (на 30%, p<0,05).

По прошествии 5 дней в кровотоке животных 3-й группы регистрировалось состояние тромботической готовности, характеризовавшееся сохранением высокой агрегационной способности тромбоцитов, резко возросшей концентрацией РФМК (в 9 раз, p<0,01) на фоне прогрессирующего укорочения времени их полимеризации. Кроме того, прогрессировала гиперкоагуляция, что характеризовалось уменьшением времени коагуляции, по данным тромбмоэластограммы – в 1,5 раза от показателя зафиксированного во 2-й экспериментальной группе соответственно (p<0,01). Также на высоком уровне сохранялась концентрация фибриногена. Состояние экспериментальных животных усугублялось выраженным угнетением активности фибринолитической системы в 4 раза по данным тромбоэластограммы (p<0,01).

При оценке состояния системы гемостаза по истечении 10 дней было зафиксировано сохранение гиперагрегации, гиперкоагуляции и уменьшение времени тромбообразования, что подтверждалось данными тромбоэластограммы (уменьшение времен коагуляции и формирования сгустка на 30 и 50% соответственно, p<0,05) и укорочением времени полимеризации фибрин-мономерных комплексов на 40% (p<0,01). Кроме того, на высоком уровне оставалась концентрация фибриногена (p<0,05). Активность фибринолической системы также была угнетена (p<0,05). В тоже время концентрация маркеров тромбинемии возвращалась к исходным значениям.

При оценке состояния системы гемостаза по прошествии 14 дней после прекращения воздействия регистрировалось увеличение количества тромбоцитов на 44% (p<0,05), при снижении их агрегационной активности и возвращении параметра к исходным значениям. В тоже время регистрировалось увеличение концентрации фибриногена на 15% (p<0,05). Напряжение в системе гемостаза подтверждается сохранившемся укорочением времени полимеризации фибрин-мономерных комплексов в 2 раза (p<0,01). Кроме того, наблюдалось угнетение активности антикоагулянтной и фибринолитической систем плазмы крови на 36% (p<0,05) и на 55% (p<0,05) соответственно.

Результаты исследования показателей МЦР, зарегистрированные в указанные периоды гипотермии и постгипотермии у крыс, представлены в таблице 2.

При оценке состояния МЦР сразу после прекращения охлаждения было зафиксировано увеличение в 2 раза (p<0,01) показателей микроциркуляции и флакса.

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

Таблица 2

Показатели МЦР у крыс исходно и в различные периоды постгипотермии

Параметр	Исходно	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа
ПМ, пф.ед.	6,6 [4,2÷8,5]	11,6 [10,7÷13,5]*	1,9 [1,8÷3,6]*#	7,1 [6,5÷7,4]#	1,1 [0,8÷1,6]*#	1,8 [1,5÷6,6]*
СКО (σ), пф. ед.	3,1 [2,1÷4,2]	6,54 [4,6÷9,1]*	1,8 [1,4÷3,1]*	2,3 [1,7÷4,0]*#	0,9 [0,7÷1,9]*#	0,9 [0,5÷1,3]*
Эндотелиальные волны, пф. ед.	9,01 [4,5÷18,1]	14,9 [10,1÷22,1]*	8,09 [2,1÷8,5]#	14,9 [5,5÷28,8]*#	3,1 [2,6÷8,0]*#	2,76 [1,6÷3,3]*
Вазомоторные волны, пф. ед.	10,04 [3,5÷17,1]	12,7 [10,6÷20,5]*	7,5 [2,1÷8,09]#	9,5 [4,4÷29,9]#	2,3 [2,1÷5,9]*#	2,3 [1,5÷2,4]*
Дыхательные волны, пф. ед.	7,2 [2,7÷11,2]	8,89 [5,1÷15,3]*	1,74 [1,1÷3,9]*#	6,5 [3,0÷12,3]*#	1,24 [1,1÷3,06]*#	0,7 [0,7÷1,0]*
Пульсовые волны, пф. ед.	3,25 [1,4÷4,7]	4,3 [2,7÷5,6]	0,71 [0,6÷1,6]*#	1,89 [0,8÷6,5]#	0,48 [0,4÷0,7]*#	0,43 [0,4÷0,5]*

Примечания: данные представлены в виде Me – медиана выборки, […÷…] – 25 и 75 процентили выборки; * – статистически значимые различия между исходными и регистрируемыми параметрами ($p<0,05$); # – статистически значимые различия между исследуемой и предшествующей экспериментальной группами ($p<0,05$); ПМ – показатель микроциркуляции, СКО (σ) – флакс, среднеквадратичное отклонение амплитуд колебаний кровотока, пф. ед. – перфузионные единицы

Со стороны активных механизмов контроля микроциркуляции было установлено увеличение амплитуд эндотелиальных волн в 1,5 раза ($p<0,01$) и незначительное увеличение амплитуд вазомоторных волн на 25% ($p<0,05$). Также регистрировалось увеличение дыхательных волн на 23% ($p<0,05$).

По истечении 2 дней после прекращения охлаждения регистрировалось резкое снижение показателя микроциркуляции в 3,5 раза ($p<0,01$). Кроме того, регистрировалось уменьшение амплитуд эндотелиальных и вазомоторных волн на 50% и 40% ($p<0,05$) соответственно. Кроме того, регистрировалось снижение амплитуд дыхательных и пульсовых волн в 5 и 6 раз соответственно ($p<0,01$).

По истечении 5 дней (3-я экспериментальная группа) мы регистрировали увеличение показателя перфузии относительно зафиксированного значения во 2-ой группе в 3,7 раза ($p<0,01$). Увеличение показателя микроциркуляции сопровождалось незначительным увеличением показателя флакса на 27% ($p<0,05$). Кроме того, регистрировалось увеличение амплитуд эндотелиальных волн в 1,8 раза ($p<0,01$) и вазомоторных волн на 26% ($p<0,05$). Со стороны пассивных механизмов контроля микроциркуляции регистрировалось увеличение амплитуд дыхательных и пульсовых волн в 3,7 раза и 2,5 раза соответственно ($p<0,01$). По истечении 10 дней (4-ая экспериментальная группа) мы вновь регистрировали снижение показателя микроциркуляции и уменьшение показателя флакса в 6,5 и 2,5 раза соответственно ($p<0,01$). Также было зафиксировано снижение амплитуды эндотелиальных и вазомоторных волн в 5 и 4 раза соответственно ($p<0,01$). Кроме того, регистрировалось содружественное снижение амплитуды дыхательных (в 5 раз, $p<0,01$) и пульсовых волн (в 4 раза, $p<0,01$).

По истечении 2 недель (5-я экспериментальная группа) мы регистрировали сохранившийся на низком уровне показатель микроциркуляции и низкий показатель флакса. Также оставались низкими амплитуды эндотелиальных и вазомоторных волн. На прежнем низком уровне также оставались амплитуды дыхательных и пульсовых волн.

Таким образом, было продемонстрировано, что под действием анестезии у

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

экспериментальных животных утрачивается активный контроль терморегуляторных механизмов. Начальная фаза гипотермии сопровождается уменьшением температурного порога в гипоталамусе, в ответ на это центр терморегуляции усиливает периферический ток крови (при нормальных условиях механизм защита от перегрева) [9,10]. Кроме того, непосредственное воздействие общего анестетика на прекапилляры увеличивает ток крови к поверхностным тканям, вызывая перераспределение тепла от внутренних органов к периферическим тканям [2,11]. В клинической практике возникшая гипотермия контролируется и сопровождается медицинским пособием с применением соответствующих препаратов, в тоже время при бесконтрольном развитии гипотермии развивается декомпенсация, сопровождающаяся прогрессирующим снижением температуры [6,12].

В ходе достижения умеренной степени гипотермии у животных развивается вазодилатация, обусловленная как возможным первичным действием наркоза на прекапилляры, так и выбросом в кровоток оксида азота, в результате интенсификации кровообращения и увеличения напряжения сдвига на сосудистую стенку [10,13]. Выбросом оксида азота объясняется увеличение амплитуды эндотелиальных волн и снижение агрегационной активности тромбоцитов. На фоне развития вазодилатации увеличивается объем крови в МЦР, что сопровождается увеличением показателя микроциркуляции. Увеличение флакса обусловлено более интенсивным функционированием механизмов активного контроля микроциркуляции и свидетельствует о глубокой модуляции кровотока [5,9,14]. Увеличению показателя флакса также способствует рост амплитуды дыхательных волн, вызванный в свою очередь, как увеличением микроциркуляторного давления, так и развившейся вазодилатацией. На фоне роста показателя микроциркуляции увеличение амплитуды дыхательных волн свидетельствует о снижении тонуса венулярных сосудов, об ухудшении оттока крови и развитии застойных явлений в микроциркуляторном русле [15,16]. Развитие неблагоприятных гемодинамических сдвигов у экспериментальных животных в данный период усугубляется развитием гиперкоагуляционных изменений со стороны системы гемостаза. Множество клинических работ характеризуют гипотермию как фактор развития тромбоза у пострадавших [10,12,17]. Так, при исследовании людей, подвергшихся гипотермическому воздействию, отмечено развитие полицитемии и гиперкоагуляционных сдвигов, обусловленных гемоконцентрацией вследствие увеличения проницаемости сосудов [18]. При исследовании крыс, достигших ректальной температуры +28...+32°С, регистрируется возросшая концентрация ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), оказывающего протромботический эффект, максимальная концентрация которого достигается при +31°С [16]. Аналогичные изменения были обнаружены в экспериментах на мышах при охлаждении до +31ºС. В ходе экспериментов было показано значимое увеличение концентрации PAI-1, что расценивалось как возросший риск развития тромбоза у экспериментальных животных [16,17]. Также, при общей непреднамеренной гипотермии у людей, достигших +30°С в течение 30 мин, отмечено угнетение активности тканевого активатора плазминогена (t-PA), сопровождающееся депрессией фибринолиза [16]. В тоже время, описанные протромботические изменения в системе гемостаза являются целесообразной реакцией организма. Так, при гипотермии происходит «физиологическая ампутация» с последующим развитием ишемических поражений в переохлажденных конечностях, высокий коагуляционный статус и депрессия фибринолиза обеспечивают отграничение пораженного участка, в то время как гипоагреация способствует сохранению реологических свойств крови при развившейся гемоконцентрации.

В клиническом течении гипотермии выделяют постгипотермический период,

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

характеризующийся формированием и манифестацией травматических последствий действия общего переохлаждения на организм [18]. По статистическим данным, самое большое число летальных исходов регистрируется в первые 48 ч. после возращения температуры тела к нормальным значениям [1].

По истечении 2-х сут с момента прекращения охлаждения нами зарегистрировано выраженное снижение амплитуд волн всех частотных диапазонов, что свидетельствует о развитии массивного вазоспазма [10]. На фоне предварительного охлаждения развитие вазоспазма уменьшает несоответствие между потребностью в кислороде и объемом поступающего кислорода к тканям, что показано в исследованиях на собаках и на людях [5]. Увеличение тонуса и развитие спазма сосудов объясняется возросшей симпатической импульсацией в постгипотермическом периоде, вызванной активацией стресс-реакции, это приводит к увеличению напряжения в гладкомышечных клетках сосудистой стенки. Сформировавшийся спазм приводит к обеднению нутритивного кровотока, развитию ишемии и снижению показателя перфузии [19]. Первичное нарушение микроциркуляции, способствующее увеличению сопротивления току крови, вследствие вазоспазма является причиной вторичных нарушений в системе гемостаза. Вазоспазм, ишемические явления, а также непосредственное действие гипотермии на организм стимулируют выброс в кровоток провоспалительных цитокинов, обладающих мощным прокоагулянтным действием [18]. Так, показано, что в первые 24-48 ч регистрируется максимально возможный уровень фактора некроза опухоли (TNFα), интерлейкинов 6 и 18 (IL-6, IL-18), обладающих мощным прокоагулянтным действием [16]. Дополнительным стимулятором процессов свертывания крови является развивающийся в постгипотермическом периоде ацидоз [5]. В нашем исследовании активация системы свертывания подтверждается развитием состояния тромботической готовности у экспериментальных животных, которое характеризуется гиперагрегацией, гиперкоагуляцией, появлением в кровотоке растворимых фибрин-мономерных комплексов и укорочением времени их самосборки. Кроме того, по данным тромбоэластограммы регистрировалось укорочение времени образования сгустка. В пользу предположения о развитии острой фазы воспалительной реакции говорит начальное увеличение концентрации фибриногена.

По истечении 5 сут нами регистрировалось критическое состояние системы микроциркуляции экспериментальных животных. Так, мы наблюдали увеличение показателя микроциркуляции на фоне увеличения амплитуд волн всего частотного диапазона. Содружественное увеличение амплитуд пульсовых и дыхательных волн свидетельствует об интенсификации кровообращения, а увеличение амплитуд эндотелиальных и вазомоторных волн – о развитии вазодилатации [5]. В тоже время со стороны системы гемостаза регистрировалась еще более выраженная гиперкоагуляция и полная блокада фибринолиза по данным тромбоэластограммы. Существенное (в 9 раз) увеличение концентрации в плазме крови растворимых фибрин-мономерных комплексов, уменьшение времени их полимеризации на фоне сохранившейся на высоком уровне концентрации фибриногена существенно увеличивает риск развития тромбоза у экспериментальных животных. Воспроизведенная нами модель гипотермии характеризуется резким охлаждением экспериментального животного, и полным контактом тела с охлаждающей средой, что исключает формирование локальных поражений и участков некроза, но приводит к циркуляции в организме холодной крови и способствует развитию ишемических явлений в тканях экспериментальных животных [12]. Развитие состояния тромботической готовности после действия гипотермии, по-видимому, объясняется планомерным нарастанием воспалительной реакции и прогрессирующим по-

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

вреждением эндотелия [10]. Кроме того, в данный временной период установлено снижение активности протеина С, выполняющего антикоагулянтную функцию [17]. Наконец, по данным различных авторов регистрировалось увеличение концентрации молекул адгезии сосудистого типа (VCAM-1) и межклеточной молекулы адгезии (ICAM), также и моноцитарного хемотоксического фактора, при этом снижалась концентрация интерлейкина 10 (IL-10) [16].

Отсутствие компенсаторных изменений со стороны фибринолитической системы свидетельствует о глубокой модификации МЦР и рассогласованности баланса про- и антикоагулянтных систем организма [20].

Усиление гемодинамики в нутритивном бассейне на фоне прогрессирования состояния тромботической готовности является мощнейшим фактором развития тромбоза и полиорганной недостаточности.

По истечении 10 дней нами вновь было установлено снижение перфузии ткани кровью, обусловленное развитием вазоспазма. Со стороны системы гемостаза также сохранялись гиперкоагуляционные сдвиги, характеризовавшиеся гиперагрегацией, на фоне укорочения времени тромбообразования и угнетения фибринолиза, что подтверждало опасность развития тромботических осложнений. Согласно данным, представленным в литературе, указанный временной интервал соответствует восстановительному периоду холодовой травмы и при отсутствии значимых поражений характеризуется восстановлением кровотока [5,14]. Анализ экспериментальных данных свидетельствует о развитии деструктивный изменений в МЦР на фоне достижения умеренной степени гипотермии [11]. Сохранение вазоспазма обусловлено, по-видимому, высоким уровнем симпатической импульсации [1]. По данным ряда авторов пусковым механизмом в формировании гемостазиологических расстройств в данный период является появление, а затем и сохранение на высоком уровне, в кровотоке десквамированных эндотелиоцитов [14,18].

По истечении 2-х недель после прекращения охлаждения как общее состояние микрокротовотока, так и амплитудно-частотного спектра МЦР не изменялись. При анализе литературных данных установлено, что длительное уменьшение перфузии ткани, на фоне уменьшения амплитуды волн всех частотных диапазонов, свидетельствует об увеличении жесткости сосудистой стенки [4]. Это совпадает и с данными гистологических исследований, в которых показано увеличение толщины интима-медиа в сосудах мышечного типа [7]. В тоже время, возможность развития гемостазиологических нарушений не только сохранялась, но и усиливалась в виду возросшей концентрации фибриногена и снижении активности антикоагулянтной системы [16].

Заключение

При анализе полученных экспериментальных данных установлено, что достижение умеренной степени гипотермии оказывает выраженное модулирующее влияние на систему микроциркуляции. Сразу по достижении указанной степени гипотермии наблюдалось развитие вазодилатации, свидетельствующее о декомпенсаторном состоянии экспериментальных животных.

Наибольший риск развития гемодинамических расстройств, лежащих в основе полиорганной недостаточности, наблюдается через 5 дней после восстановления температуры тела (согревания) и характеризуется массивным снижением тонуса сосудов с интенсификацией гемодинамики, на фоне появления в кровотоке маркеров тромбинемии и выраженном угнетении фибринолиза. Усиление гемодинамики в нутритивном бассейне на фоне прогрессирования состояния тромботической готовности является мощнейшим фактором развития тромбоза и полиорганной недостаточности.

По истечении 2 недель с момента восстановления температуры тела наблюдается вазоспазм, что свидетельствует о глубокой модуляции сосудистого русла и сохранении симпатической импульсации на высоком уровне, и свидетельствует о

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

повышении жесткости сосудистой стенки. Прогрессирование воспалительной реакции подтверждается нарастающей концентрацией фибриногена.

Установленные закономерности позволяют сформировать четкое представление о течение и развитии патологической реакции в организме пострадавших и дать рекомендации по применению фармакологических препаратов для проведения превентивной терапии. Так, установлен период, в котором развитие состояния тромботической готовности максимально, и требуется применение антикоагулянтных и антиагрегантных препаратов, а также средств, улучшающих реологию крови.

Литература

1. Потапов А.Ф., Алексеев Р.З., Евграфов С.Ю. Эфферентная терапия в комплексном лечении холодовой травмы, осложненной синдромом полиорганной недостаточности // Якутский медицинский журнал. 2012. №2(38). С. 114-118.
2. Bouchama A. Pathogenetic mechanisms of heatstroke and novel therapies // Critical Care. 2012. Vol. 16, Suppl. 2. P. 17-20. doi:10.1186/cc11265
3. Shah T.A., Mauriello C.T., Hair P.S., et al. Clinical hypothermia temperatures increase complement activation and cell destruction via the classical pathway // Journal of Translational Medicine. 2014. Vol. 12. P. 181-187. doi:10.1186/1479-5876-12-181
4. Corry J.J. Use of hypothermia in the intensive care unit // World Journal of Critical Care Medicine. 2012. Vol. 1(4). P. 106-122. doi:10.5492/wjccm.v1.i4.106
5. Buijsa E.A.B., Verboom E.M., Topb A.P.C., et al. Early microcirculatory impairment during therapeutic hypothermia is associated with poor outcome in post-cardiac arrest children: A prospective observational cohort study // Resuscitation. 2014. Vol. 85. P. 397-404. doi:10.1016/j.resuscitation.2013.10.024
6. Brändström H., Eriksson A., Giesbrecht G., et al. Fatal hypothermia: an analysis from a sub-arctic region // International Journal of Circumpolar Health. 2012. Vol. 71, №1. P. 18502. doi:10.3402/ijch.v71i0.18502
7. Fujita M., Wei E.P., Povlishock J.T. Intensity- and Interval-Specific Repetitive Traumatic Brain Injury Can Evoke Both Axonal and Microvascular Damage // Journal of Neurotrauma. 2012. Vol. 29. P. 2172-2180. doi:10.1089/neu.2012.2357
8. Council Directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC) // Official Journal of the European Communities. № L 358. P. 1-28.
9. Coyan G., Moncure M., Thomas J., et al. Induced Hypothermia During Resuscitation From Hemorrhagic Shock Attenuates Microvascular Inflammation in the Rat Mesenteric Microcirculation // Shock. 2014. Vol. 42(6). P. 518-524. doi:10.1097/shk.0000000000000241
10. Koopmans M., Kuiper M.A., Endeman H., et al. 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. P. 14-18. doi:10.1016/j.resuscitation.2014.09.025
11. Horosz B., Malec-Milewska M. Inadvertent intraoperative hypothermia // Anaesthesiology Intensive Therapy. 2013. Vol. 45(1). P. 38-43. doi:10.5603/ait.2013.0009
12. Morley D., Yamane K., O'Malley R., et al. Rewarming for accidental hypothermia in an urban medical center using extracorporeal membrane oxygenation // American Journal of Case Reports. 2013. Vol. 14. P. 6-9. doi:10.12659/AJCR.883728
13. Carnevali L., Mastorci F., Audero E., et al. Stress-Induced Susceptibility to Sudden Cardiac Death in Mice with Altered Serotonin Homeostasis // PLoS ONE. 2012. Vol. 7, №7. P. e41184. doi:10.1371/journal.pone.0041184
14. Scaravilli V., Bonacina D., Citerio G. Rewarming: facts and myths from the systemic perspective // Critical Care. 2012. Vol. 16 (Suppl 2). P. 25-31. doi:10.1186/cc11283
15. Beyer A.M., Freed J.K., Durand M.J., et al. Critical Role for Telomerase in the Mechanism of Flow-Mediated Dilation in the Human Microcirculation // Circulation Research. 2016. Vol. 18. P. 856-866. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307918
16. Lindenblatt N., Menger M.D., Klar E., et al. Systemic hypothermia increases PAI-1 expression and accelerates microvascular thrombus formation in endotoxemic mice // Critical Care. 2014. Vol. 10. P. 1-9. doi:10.1186/cc5074
17. Forman K.R., Wong E., Gallagher M., et al. Effect of temperature on thromboelastography (TEG) and implications for clinical use in neonates undergoing therapeutic hypothermia // Pediatric Research. 2014. Vol. 75, №5. P. 663-669. doi:10.1038/pr.2014.19
18. Bisschops L.A., van der Hoeven J.G., Mollnes T.E., et al. Seventy-two hours of mild hypothermia after cardiac arrest is associated with a lowered inflammatory response during rewarming in a prospective observational study // Critical Care. 2014. Vol. 18, №5. P. 1-8. doi:10.1186/preaccept-1923890821130266
19. Шапкин Ю.Г., Стекольников Н.Ю., Капралов С.В. Раннее прогнозирование жизнеспособности тканей при глубоком отморожении // Есте-

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

ственные и технические науки. 2011. №6(56). С. 213-217.
20. Kander Th., Dankiewicz J., Friberg H., et al. Platelet aggregation and clot formation in comatose survivors of cardiac arrest treated with induced hypothermia and dual platelet inhibition with aspirin and ticagrelor; a prospective observational study // Critical Care. 2014. Vol. 30, №18. P. 1-9. doi:10.1186/s13054-014-0495-z

References

1. Potapov AF, Alexeev RZ, Evgrafov SYu. Efferent therapy in treatment of cold injury, complicated by multiple organ dysfunction syndrome. *Yakut Medical Journal*. 2012;2(38):114-8.
2. Bouchama A. Pathogenetic mechanisms of heatstroke and novel therapies. *Critical Care.* 2012; 16(Suppl 2):17-20. doi:10.1186/cc11265
3. Shah TA, Mauriello CT, Hair PS, et al. Clinical hypothermia temperatures increase complement activation and cell destruction via the classical pathway. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12: 181-7. doi:10.1186/1479-5876-12-181
4. Corry JJ. Use of hypothermia in the intensive care unit. *World Journal of Critical Care Medicine*. 2012; 1(4):106-22. doi:10.5492/wjccm.v1.i4.106
5. Buijsa EAB, Verboom EM, Topb APC, et al. Early microcirculatory impairment during therapeutic hypothermia is associated with poor outcome in post-cardiac arrest children: A prospective observational cohort study. *Resuscitation.* 2014;85:397-404. doi:10.1016/j.resuscitation.2013.10.024
6. Brändström H, Eriksson A, Giesbrecht G, et al. Fatal hypothermia: an analysis from a sub-arctic region. *International Journal of Circumpolar Health.* 2012;71(1):18502. doi:10.3402/ ijch.v71i0.18502
7. Fujita M, Wei EP, Povlishock JT. Intensity- and Interval-Specific Repetitive Traumatic Brain Injury Can Evoke Both Axonal and Microvascular Damage. *Journal of Neurotrauma.* 2012;29:2172-80. doi:10.1089/neu.2012.2357
8. Council Directive of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC). *Official Journal of the European Communities.* № L 358. P. 1-28.
9. Coyan G, Moncure M, Thomas J, et al. Induced Hypothermia During Resuscitation From Hemorrhagic Shock Attenuates Microvascular Inflammation in the Rat Mesenteric Microcirculation. *Shock.* 2014;42(6): 518-24. doi:10.1097/shk.0000000000000241
10. Koopmans M., Kuiper M.A., Endeman H., et al. 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;86:14-8. doi:10.1016/j.resuscitation.2014.09.025
11. Horosz B, Malec-Milewska M. Inadvertent intraoperative hypothermia. *Anaesthesiology Intensive Therapy.* 2013;45(1):38-43. doi:10.5603/ait.2013.0009
12. Morley D, Yamane K, O'Malley R, et al. Rewarming for accidental hypothermia in an urban medical center using extracorporeal membrane oxygenation. *American Journal of Case Reports.* 2013;14:6-9. doi:10.12659/AJCR.883728
13. Carnevali L, Mastorci F, Audero E, et al. Stress-Induced Susceptibility to Sudden Cardiac Death in Mice with Altered Serotonin Homeostasis. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e41184. doi:10.1371/journal.pone.0041184
14. Scaravilli V, Bonacina D, Citerio G. Rewarming: facts and myths from the systemic perspective. *Critical Care.* 2012;16(Suppl 2):25-31. doi:10.1186/cc11283
15. Beyer AM, Freed JK, Durand MJ, et al. Critical Role for Telomerase in the Mechanism of Flow-Mediated Dilation in the Human Microcirculation. *Circulation Research.* 2016;18:856-66. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307918
16. Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, et al. Systemic hypothermia increases PAI-1 expression and accelerates microvascular thrombus formation in endotoxemic mice. *Critical Care.* 2014;10:1-9. doi:10.1186/cc5074
17. Forman KR, Wong E, Gallagher M, et al. Effect of temperature on thromboelastography (TEG) and implications for clinical use in neonates undergoing therapeutic hypothermia. *Pediatric Research.* 2014; 75(5):663-9. doi:10.1038/pr.2014.19
18. Bisschops LA, van der Hoeven JG, Mollnes TE, et al. Seventy-two hours of mild hypothermia after cardiac arrest is associated with a lowered inflammatory response during rewarming in a prospective observational study. *Critical Care.* 2014;18(5):1-8. doi:10.1186/preaccept-1923890821130266
19. Shapkin YuG, Stekol'nikov NYu, Kapralov SV. Ranneye prognozirovaniye zhiznesposobnosti tkaney pri glubokom otmorozhenii. *Estestvennyye i tekhnicheskiye nauki.* 2011;6(56):213-7.
20. Kander Th, Dankiewicz J, Friberg H, et al. Platelet aggregation and clot formation in comatose survivors of cardiac arrest treated with induced hypothermia and dual platelet inhibition with aspirin and ticagrelor; a prospective observational study. *Critical Care.* 2014;30(18):1-9. doi:10.1186/ s13054-014-0495-z

Дополнительная информация [Additional Info]

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта №16-34-60054/15 мол_а_дк. [**Financing of study.** The study was performed with financial support Russian Foundation for Basic Research, Research project №16-34-60054/15 mol_a_dk.]

DOI:10.23888/PAVLOVJ2019272160-171

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи. [**Conflict of interests.** The authors declare no actual and potential conflict of interests which should be stated in connection with publication of the article.]

Участие авторов. Лычева Н.А. – концепция и дизайн исследования, Шахматов И.И. -редактирование, Седов А.В., Макушкина Д.А.- сбор и обработка материала, Вдовин В.М. – статистическая обработка, написание текста. [**Participation of authors.** N.A. Lycheva – concept and design of the study, I.I. Shakhmatov – editing, A.V. Sedov, D.A. Makushkina – collection and processing of the material, V.M. Vdovin – statistical processing, writing the text.]

Информация об авторах [**Authors Info**]

***Лычева Наталья Александровна** – к.б.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, Барнаул, Россия. [**Natalia A. Lycheva** – PhD in Biological Sciences, Associate Professor, Senior Researcher of the Laboratory for Biomedical Research, Altai State Medical University, Barnaul, Russia.]
SPIN: 7646-0875, ORCID ID: 0000-0002-6488-340X, Researcher ID: B-4683-2019. E-mail: natalia.lycheva@yandex.ru

Шахматов Игорь Ильич – д.м.н., доцент, заведующий кафедрой нормальной физиологии, ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, Барнаул, Россия. [**Igor I. Shakhmatov** – MD, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Normal Physiology, Altai State Medical University, Barnaul, Russia.]
SPIN: 1574-4980, ORCID ID: 0000-0002-4606-3627, Researcher ID: B-4629-2019.

Седов Антон Вячеславович – студент лечебного факультета, ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, Барнаул, Россия. [**Anton V. Sedov** – Student of the Medical Faculty, Altai State Medical University, Barnaul, Russia.]
SPIN: 7808-4155, ORCID ID: 0000-0003-3200-9117, Researcher ID: O-6071-2018.

Макушкина Дарья Александровна – студент лечебного факультета, ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, Барнаул, Россия. [**Daria A. Makushkina** – Student of the Medical Faculty, Altai State Medical University, Barnaul, Russia.]
SPIN: 2693-6005, ORCID ID: 0000-0002-7264-6412, Researcher ID: O-6080-2018.

Вдовин Вячеслав Михайлович – к.м.н., доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии, ФГБОУ ВО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России, Барнаул, Россия. [**Vyacheslav M. Vdovin** – MD, PhD, Associate Professor, Head of the Department of Pathological Physiology, Altai State Medical University, Barnaul, Russia.]
SPIN: 5885-4504, ORCID ID: 0000-0002-4606-3627, Researcher ID: B-4400-2019.

Цитировать: Лычева Н.А., Шахматов И.И., Седов А.В., Макушкина Д.А., Вдовин В.М. Состояние систем микроциркуляции и гемостаза в различные периоды после умеренной гипотермии у крыс // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2019. Т. 27, №2. С. 160-171. doi:10.23888/PAVLOVJ 2019272160-171

To cite this article: Lycheva NA, Shakhmatov II, Sedov AV, Makushkina DA, Vdovin VM. Condition of microcirculatory and hemostasis systems in rats after moderate hypothermia. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald.* 2019;27(2):160-71. doi:10.23888/PAVLOVJ 2019272160-171

Поступила/Received: 30.11.2018
Принята в печать/Accepted: 17.06.2019