ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОГО И МНОГОКРАТНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ СИЛЬНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА У КРЫС

Светлана Валерьевна МОСКАЛЕНКО¹, Игорь Ильич ШАХМАТОВ^{1,2}, Юлия Алексеевна БОНДАРЧУК^{1,2}, Оксана Михайловна УЛИТИНА^{1,2}, Ольга Васильевна АЛЕКСЕЕВА^{1,2}

¹ Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России 656038, Барнаул, просп. Ленина, 40

² НИИ физиологии и фундаментальной медицины, 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4

Цель исследования — провести анализ состояния реакции системы гемостаза крыс на однократное и многократное воздействие гипоксической гипоксии сильной интенсивности. Материал и методы. В работе использовались 40 самцов крыс линии Вистар. Животные подвергались однократной или ежедневной многократной гипоксической гипоксии посредством «подъема» в барокамере в течение 1 ч. Гипоксическая гипоксия моделировалась при помощи барокамеры приточно-вытяжного типа. Создаваемое в барокамере разряжение воздуха в режиме тренировки соответствовало подъему на «высоту» 7000 м над уровнем моря (41,105 кПа; 308,3 мм рт. ст., гипоксия сильной интенсивности). Результаты и их обсуждение. Однократное воздействие гипоксической гипоксии сильной интенсивности характеризуется состоянием тромботической готовности (на основании выявленной гиперкоагуляции и высокого уровня маркеров внутрисосудистого свертывания крови). По данным тромбоэластографии зафиксировано укорочение времени начала образования сгустка (СТ), увеличение угла α° и максимальной плотности сгустка (МСF). После завершения 30-дневного цикла гипоксии сильной интенсивности отмечается активация системы тромбоцитарного звена системы гемостаза, гиперкоагуляция по внутреннему пути свертывания при исчезновении признаков тромбинемии. Кроме того, обнаружено увеличение антитромбинового резерва плазмы крови в группе опытных животных. По результатам тромбоэластограммы зарегистрировано удлинение времени образования сгустка (СFT).

Ключевые слова: гипоксическая гипоксия, гемостаз, тромбоэластография.

Гипоксия — одно из самых распространенных патологических состояний, связанных с дефицитом кислорода в окружающей клетку среде и являющихся причиной широкого спектра функциональных и метаболических нарушений в организме. Исследование влияния длительной гипоксии на организм человека и животных до сих пор является одной из важнейших проблем физиологии и медицины, приобретающей особую актуальность в связи с тем, что состояние гипоксии, помимо целого ряда заболеваний, имеет место и в физиологии спорта, а также при освоении различных сред обитания.

Адаптация к гипоксии — сложный и многогранный процесс, в который вовлекаются по сути дела все органы и системы организма и, прежде всего, система крови [3]. Установлено, что в ответ на острую гипоксию происходят фазные изменения в системе гемостаза. Первичной реакцией системы коагуляционного звена системы гемостаза является гиперкоагуляция, однако более продолжительное пребывание на высоте приводит к развитию гипокоагуляции, обусловленной потреблением факторов свертывания [7].

Ранее было изучено влияние на систему крови гипоксической гипоксии ($\Gamma\Gamma$) низкой (4000 м), средней (5000 м) и умеренно сильной (6000 м) интенсивности [2, 6]. Однако, что касается гипоксии сильной (7000 м) и тяжелой (8000 м) интенсивности, в литературе в основном представлены данные по гемореологии крови [5], не затрагивающие, в частности, систему гемостаза. В связи с

Москаленко С.В. – преподаватель кафедры нормальной физиологии, e-mail: sunrisemsv@gmail.com.

Шахматов И.И. — д.м.н., проф., старший научный сотрудник, e-mail:iish59@yandex.ru.

Бондарчук Ю.А. – к.м.н., доцент, младший научный сотрудник, e-mail: bondarchuk2606@yandex.ru

Улитина О.М. – к.б.н., доцент, младший научный сотрудник, e-mail: oulitina@mail.ru

Алексеева О.В. – к.м.н., доцент, младший научный сотрудник, e-mail: alekseeva0506@mail.ru

вышеизложенным целью настоящей работы явилось изучение состояния системы гемостаза в ответ на однократное и ежедневное многократное воздействие гипоксической гипоксии сильной интенсивности

МАТЕРИАЛ И МЕТОЛЫ

Исследования выполнены на 40 половозрелых самцах крыс линии Wistar массой 254.0 ± 36.0 г. Все экспериментальные животные были разделены на четыре группы: две контрольные и две опытные группы по 10 особей в каждой. 1-я опытная группа подвергалась однократному воздействию ГГ в барокамере приточно-вытяжного типа в течение 1 ч при разрежении 41,105 кПА (308,3 мм рт. ст.), что соответствовало подъему на высоту 7000 м, при этом 1-я контрольная группа находилась в течение того же времени в барокамере в условиях обычного атмосферного давления; 2-я опытная группа подвергалась 30-кратному ежедневному воздействию ГГ в течение 1 ч на «высоте» 7000 м, в то время как 2-я контрольная группа находилась ежедневно в течение 1 ч на протяжении 30 дней в барокамере в условиях обычного атмосферного давления.

Режим гипоксического воздействия был основан на литературных данных: согласно Н.И. Мамадалиевой и соавт. [4], моделирование «подъема на высоту» 4000 и 5000 м соответствует гипоксии низкой и средней интенсивности, «на высоте» 6000 и 7000 м создаются условия гипоксии умеренно сильной и сильной интенсивности, а моделирование «подъема» на высоту 8000 м соответствует гипоксии тяжелой интенсивности.

До начала проведения эксперимента на протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания. Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте, и Директивами 86/609/ЕЕС. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [8].

Кровь для исследования забирали сразу после окончания однократного (1-я опытная группа) либо 30-го экспериментального воздействия (2-я опытная группа), у крыс контрольных групп – сразу после окончания однократного или многократного нахождения в барокамере в условиях обычного атмосферного давления. Кровь забирали под эфирным наркозом из печеночного синуса в объеме 5 мл. Все пробы крови стабилизировали 3,8%-м раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 [1].

Комплекс методик, позволяющий оценить состояние системы гемостаза, включал исследование агрегационной способности тромбоцитов, коагуляционного звена гемостаза, а также антикоагулянтной и фибринолитической активности крови. В качестве реагентов для оценки системы гемостаза были выбраны диагностические наборы фирмы «Технология-Стандарт» (Россия) с использованием коагулометра «Минилаб» (Россия), «Thrombostat 2» (Behnk Electronik, Германия). Количество тромбоцитов периферической крови подсчитывали при помощи гематологического анализатора Drew3-PAC (Drew Scientific, Великобритания). Агрегационную активность тромбоцитов оценивали при помощи агрегометра «Биола» (Россия). Уровень антитромбина III определяли с использованием спектрофотометра СФ-46 (Россия).

Кроме того, в данной работе для оценки системы гемостаза использовался интегральный метод исследования — тромбоэластография. Тромбоэластограммы записывали с использованием активатора «Start-tem» на аппарате Rotem® Gamma (Pentapharm GmbH, Германия).

В ходе расшифровки тромбоэластограммы учитывались следующие показатели.

Время начала образования сгустка (СТ) описывает время от начала анализа до распознаваемого начала формирования сгустка посредством добавления активатора (реагенты и кальций). СТ является важным параметром активизации показателей свертывания, а также их баланса с соответствующими ингибиторами.

Время образования сгустка (CFT) отображает кинетику образования стойкого сгустка из тромбоцитов и фибрина, зависит в основном от количества тромбоцитов и, особенно, от их участия в формировании сгустка, а также от содержания фибриногена и его склонности к полимеризации.

Угол альфа (α) — угол, построенный по касательной к тромбоэластограмме из точки начала образования сгустка, отображает скорость роста фибриновой сети и ее структурообразование (увеличение прочности сгустка).

Максимальная плотность сгустка (МСF) представляет собой максимальную величину амплитуды формирования сгустка, достигнутую к моменту, когда активируется процесс фибринолиза, является одним из наиболее важных параметров в тромбоэластометрии.

Максимальный лизис (ML) соответствует максимальной интенсивности фибринолиза, обнаруженной в течение анализа, и определяется как нахождение самой низкой амплитуды после достижения МСF.

Все цифровые данные, полученные в ходе исследования, подвергались статистической обработке. Результаты представлены в виде Ме [25÷75 %], где Ме — медиана в выборочной совокупности, [25÷75 %] — 25-й и 75-й перцентиль. Достоверность различий оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна — Уитни. Различия считались статистической значимыми при p < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ результатов исследования показателей системы гемостаза, зарегистрированных после однократного и многократного воздействия ГГ, приведен в таблице, из которой видно, что после однократного воздей-

ствия ГГ в плазме крови регистрировалась активация сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза, характеризующаяся повышением АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на 43,8 % (p < 0,001). В коагуляционном звене гемостаза отмечалась гиперкоагуляция по внутреннему пути, что проявлялось в укорочении активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ) на 7,7 % (p < 0,01). На конечном этапе свертывания крови также регистрировалась гиперкоагуляция, что характеризовалось укорочением времени полимеризации фибрин-мономерных комплексов (ВПФМ) на 15,4 % (p < 0,001).

Результаты тромбоэластографии также подтверждали выявленные клоттинговыми методиками гиперкоагуляционные сдвиги, что проявлялось в укорочении СТ на 17,2 % (p < 0,001) на фоне увеличения угла α на 15,8 % (p < 0,05) и максимальной плотности сгустка (MCF) на 11,9 %

Таблица Показатели системы гемостаза плазмы крови крыс после однократного и многократного воздействия гипоксической гипоксии

Показатель	Однократное воздействие ГГ		30-кратное воздействие ГГ	
	Контроль 1	Опыт 1	Контроль 2	Опыт 2
Содержание тромбоцитов, ×109/л	473,0 [464,5÷489,8]	492,5 [456,8÷507,5]	495,0 [487,0÷498,0]	508,5 [502,5÷515,0]
Индуцированная АДФ агрегация тромбоцитов, макс. значение	27,4 [23,9÷28,9]	39,4*** [37,6÷40,5]	21,7 [21,3÷22,9]	26,1*** [24,8÷27,4]
АПТВ, с	18,1 [17,7÷18,8]	16,7** [15,5÷17,2]	16,0 [15,7÷16,4]	14,6*** [12,6÷15,3]
Тромбиновое время, с	46,7 [45,2÷48,0]	43,1 [40,7÷45,7]	42,7 [39,8÷43,6]	41,9 [39,8÷44,0]
ВПФМ, с	59,1 [56,9÷61,0]	50,0*** [49,2÷52,0]	62,5 [60,8÷63,1]	61,9 [60,3÷64,7]
Содержание фибриногена, г/л	2,9 [2,8÷2,9]	2,3*** [2,3÷2,3]	3,0 [2,8÷3,2]	3,7** [3,5÷3,9]
Содержание РФМК, мг/100 мл	3,0 [3,0÷3,1]	4,5*** [4,0÷5,4]	3,0 [3,0÷3,0]	3,0 [3,0÷3,1]
Содержание антитромбина III, %	94,5 [88,8÷97,3]	89,0 [84,0÷90,7]	102,5 [99,8÷104,1]	113,6** [110,9÷115,5]
Антитромбиновый резерв плазмы, %	87,9 [84,4÷92,4]	73,7*** [71,9÷83,0]	84,3 [82,0÷87,5]	91,6*** [89,4÷96,4]
Спонтанный эуглобулиновый фибринолиз, мин	600,0 [570,0÷630,0]	540,0 [532,5÷637,5]	615,0 [570,0÷660,0]	465,0* [450,0÷480,0]
CT, c	292,0 [286,7÷298,9]	244,0*** [238,5÷256,9]	284,0 [278,9÷297,2]	288,0 [282,0÷296,2]
α, град	58,0 [54,6÷62,8]	67,0* [64,3÷72,7]	74,0 [70,2÷76,5]	74,0 [66,4÷77,8]
CFT, c	118,0 [114,2÷122,4]	126,0 [122,4÷132,0]	116,0 [114,4÷120,6]	131,0* [126,6÷137,6]
MCF, MM	73,0 [69,8÷77,9]	82,0*** [76,5÷84,6]	78,0 [72,5÷82,3]	76,0 [72,3÷86,4]
ML, %	1,0 [0,8÷1,0]	1,0 [0,7÷1,0]	1,0 [0,8÷1,0]	1,0 [1,0÷1,0]

Примечание. Обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей группы контроля: * – при p < 0.05; ** – при p < 0.01; *** – при p < 0.001.

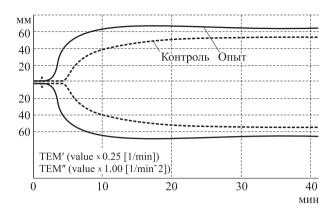


Рис. 1. Тромбоэластограммы крыс после однократного гипоксического воздействия сильной интенсивности (7000 м) в течение 1 ч

(p < 0.001). В качестве примера интегральных изменений со стороны системы гемостаза, зарегистрированных при описываемом воздействии, представлены тромбоэластограммы, полученные у животных из контрольной и опытной групп (рис. 1). Кроме того, зафиксировано уменьшение количества фибриногена на 20.7% (p < 0.001), увеличение содержания РФМК на 50% (p < 0.001), а также снижение антитромбинового резерва плазмы крови на 16.2% (p < 0.001).

Анализ результатов экспериментов показал, что реакцией системы гемостаза на однократное воздействие ГГ сильной интенсивности является выраженная активация сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза, сопровождающаяся признаками развития состояния тромботической готовности (на основании выявленной гиперкоагуляции и высокого уровня маркеров внутрисосудистого свертывания крови, а также снижения антикоагулянтного резерва плазмы крови [1]). Таким образом, со стороны системы гемостаза в ответ на однократное общее воздействие ГГ сильной интенсивности отмечалось резкое смещение гемостатического потенциала в сторону тромбинемии, что может быть расценено как дистрессорный ответ.

Состояние системы гемостаза, зарегистрированное после 30-кратного воздействия ГГ, характеризовалось активацией сосудисто-тромбоцитарного звена, что проявлялось повышением агрегационной активности тромбоцитов на 20,3% (p < 0,001). Со стороны плазменного гемостаза отмечалась гиперкоагуляция по внутреннему пути (укорочение АПТВ на 8,8%, p < 0,001), кроме того, было зафиксировано повышение концентрации фибриногена на 23,3% (p < 0,01). Как видно из таблицы, гепарин-кофакторная активность антитромбина III в тромбин-гепариновом тесте (антитромбиновый резерв плазмы) увели-

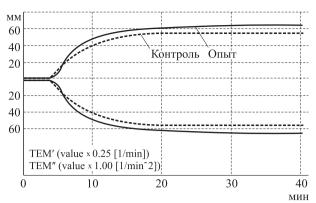


Рис. 2. Тромбоэластограммы крыс после многократного гипоксического воздействия сильной интенсивности (7000 м) в течение 1 ч

чивалась на 8,7 % (p < 0,001). Уровень антикоагулянта антитромбина III повышался на 10,8 % (p < 0,01), а фибринолитическая активность, оцениваемая по спонтанному лизису эуглобулинов, увеличивалась на 24,4 % (p < 0,05). По результатам тромбоэластограммы зарегистрировано удлинение СFT на 12,9 % (p < 0,05). В качестве примера представлены тромбоэластограммы, полученные у животных из контрольной и опытной групп (рис. 2).

В отличие от реакции системы гемостаза на однократное воздействие ГГ, состояние системы гемостаза, зарегистрированное после окончания 30-дневного цикла воздействия ГГ сильной интенсивности, характеризуется менее выраженной активацией сосудисто-тромбоцитарного звена при сохраняющейся гиперкоагуляции по внутреннему пути свертывания. При этом обнаруженная на этом этапе гиперкоагуляция по внутреннему пути свертывания плазмы крови компенсировалась выраженной активацией фибринолитической системы крови. Стоит также учитывать, что после 30-кратного воздействия ГГ отсутствует повышение маркера внутрисосудистого свертывания – содержания РФМК в плазме крови. Кроме того, на фоне менее выраженных по сравнению с однократным воздействием гиперкоагуляционных сдвигов отмечался рост антикоагулянтной активности плазмы крови.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что к 30-му дню гипоксических воздействий практически исчезали все признаки состояния тромботической готовности, регистрируемой сразу по окончании однократной ГГ сильной интенсивности. Анализ полученных данных позволяет охарактеризовать состояние системы гемостаза после 30-кратных ежедневных тренировок ГГ как проявление долговременной адаптации к данному виду стрессора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реакцией системы гемостаза на однократное воздействие ГГ сильной интенсивности является активация сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного звеньев гемостаза, сопровождающаяся признаками развития состояния тромботической готовности. В ходе ежедневных гипоксических тренировок исчезают признаки тромботической готовности, зафиксированные при однократном воздействии, регистрируется рост фибринолитической и антикоагулянтной активности крови. Полученные данные позволяют сделать вывод, что ежедневное применение тренировочного режима ГГ сильной интенсивности в течение 30 дней способствует повышению резистентности организма к дефициту кислорода и снижает риск развития тромбообразования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Баркаган З.С., Момот А.П.* Диагностика и контролируемая терапия нарушений. М.: Ньюдиамед-АО, 2001. 306 с.
- 2. Горошинская И.А., Немашкалова Л.А., Сорокина И.В. Влияние пиразидола на состояние животных и содержание моноаминов при периодической

- гипобарической гипоксии // Физиол. журн. 1993. (10). 67–73.
- 3. Макаренко А.Н., Карандеева Ю.К. Адаптация к гипоксии как защитный механизм при патологических состояниях // Вісн. пробл. біол. і мед. 2013. (2). 27–33.
- 4. Мамадалиева Н.И., Саатов Т.С., Хайбуллина З.Р., Умеров О.И. Влияние фармакоррекции на активность ферментов защиты от активных форм кислорода в сердце при адаптации к гипоксии различной интенсивности и длительности // Вестн. НГПУ. 2014. (1). 221–229.
- 5. Черешнев В.А., Юшков Б.Г., Климин В.Г., Лебедева Е.В. Иммунофизиология. Екатеринбург: УрО РАН. 2002. 260 с.
- 6. Шахматов И.И., Вдовин В.М., Бондарчук Ю.А., Алексеева О.В., Киселев В.И. Гипоксическая гипоксия как фактор, активирующий систему гемостаза // Бюл. сиб. мед. 2007. (1). 67–73.
- 7. Шахматов И.И., Киселев В.И., Вдовин В.М. Состояние системы гемостаза при различных видах гипоксического воздействия // Бюл. СО РАМН. 2010. 30. (2). 131–137.
- 8. Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations of the member states regarding the protection of animals used for experimental and other purposes // Official Journal of the European Communities. 1986. L358. 1–29.

EFFECT OF SINGLE AND MULTIPLE IMPACT OF HYPOXIC HYPOXIA OF STRONG INTENSITY ON THE STATE OF THE HEMOSTATIC SYSTEM IN RATS

Svetlana Valer'yevna MOSKALENKO¹, Igor Il'yich SHAKHMATOV¹², Yuliya Alekseevna BONDARCHUK¹², Oksana Mikhaylovna ULITINA¹², Olga Vasilevna ALEKSEEVA¹²

¹ Altai State Medical University of Minzdrav of Russia 656038, Barnaul, Lenin av., 40

The aim of the study was to analyze the state of the reaction of the hemostasis system in rats to a single and multiple exposures to hypoxic hypoxia of strong intensity. **Material and methods.** Male rats (40 individuals) of the Wistar line were used in the work. Animals have been subjected to a single / daily multiple hypoxic hypoxia by chamber ascent for 1 hour. Hypoxic hypoxia was modeled with the input-outlet chamber. The air discharge created in the pressure chamber in the training mode corresponded to the liftoff to the «height» of 7000 m above sea level (41.105 kPa, 308.3 mm Hg, hypoxia of strong intensity). **Results and discussion.** A single exposure to the strong intensity of hypoxic hypoxia is characterized by the state of thrombotic readiness (based on the revealed hypercoagulation and high level of markers of intravascular coagulation). The shortening of clot formation start time, increase in the α angle and the maximum bunch density were revealed according to the thromboelastography data. The activation of hemostasis system thrombocytic part, hypercoagulation through the internal clotting path with the thrombinemia signs disappearance have been revealed after completion of the 30-day cycle of severe intensity hypoxia. In addition, the increase in the blood plasma antithrombin reserve was found in the group of experimental animals. The lengthening of clot formation time was recorded by the thromboelastogram results.

Key words: hypoxic hypoxia, hemostasis, thromboelastography.

Moskalenko S.V. – lecturer of the chair for normal physiology, e-mail: sunrisemsv@gmail.com

Shakhmatov I.I. – doctor of medical sciences, professor, senior researcher, e-mail: iish59@yandex.ru

Bondarchuk Yu.A. – candidate of medical sciences, associate professor, junior researcher,
e-mail: bondarchuk2606@yandex.ru

Uliting O.M. — candidate of biological sciences, associate professor, junior researcher.

Ulitina O.M. – candidate of biological sciences, associate professor, junior researcher, e-mail: oulitina@mail.ru

Alekseeva O.V. – candidate of medical sciences, associate professor, junior researcher, e-mail: alekseeva0506@mail.ru

² Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine 630117, Novosibirsk, Timakov str., 4