

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА В ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ И РАННЕМ РЕАКТИВНОМ ПЕРИОДАХ ОБЩЕЙ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЫ У КРЫС

Наталья Александровна Лычева^{1,2*}, Игорь Ильич Шахматов^{1,2},
Светлана Валерьевна Москаленко¹

¹Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул, Россия;

²Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины, г. Барнаул, Россия

Поступила 19.06.2017; принята в печать 04.07.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-989

Цель. Изучить состояние системы гемостаза в гипотермический и постгипотермический периоды у крыс.

Методы. В исследовании использованы крысы-самцы линии Wistar (53 особи). Животные экспериментальной группы подвергались однократному иммерсионному охлаждению в воде температурой 5 °С до достижения глубокой степени гипотермии, контрольную группу животных помещали в воду температурой 30 °С. У животных первой группы забор крови осуществляли сразу по достижении глубокой степени гипотермии, во второй группе — через 24 ч после прекращения охлаждения.

Результаты. Сравнительный анализ результатов показал, что сразу по окончании однократного холодого воздействия произошло значимое повышение агрегационной активности тромбоцитов, а также появление в кровотоке маркеров тромбинемии и угнетение активности фибринолитической системы. Через сутки после опытного воздействия указанные параметры возвращались к исходным значениям. При оценке активности внешнего и внутреннего путей свёртывания сразу после прекращения охлаждения было установлено развитие гипокоагуляции как по данным рутинных тестов, так и по данным тромбозластограммы. По истечении суток гипокоагуляция, регистрируемая сразу по достижении ректальной температуры искомой величины, сохранялась. Таким образом, по истечении суток после прекращения холодого воздействия большинство показателей системы гемостаза, отклонившихся от нормального уровня сразу по завершении эксперимента, нормализовались. Отставленный эффект гипотермии при данном режиме холодого воздействия проявлялся лишь гипокоагуляционными сдвигами на начальных этапах свёртывания.

Вывод. Признаки нарушения гемостазиологических свойств крови, зафиксированные сразу после прекращения охлаждения, через сутки исчезают, и в кровотоке сохраняется только гипокоагуляция.

Ключевые слова: гипотермия, холодовая травма, гемостаз, тромбообразование.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE HEMOSTASIS SYSTEM STATE DURING HYPOTHERMIC AND EARLY REACTIVE PERIODS OF GENERAL FREEZE INJURY IN RATS

N.A. Lycheva^{1,2}, I.I. Shakhmatov^{1,2}, S.V. Moskalenko¹

¹Altai State Medical University, Barnaul, Russia;

²Scientific Research Institute of Physiology and Basic Medicine, Barnaul, Russia

Aim. To study the hemostasis system state in rats during hypothermic and post-hypothermic periods.

Methods. Male Wistar rats (53 individuals) were used in the study. The animals from the experimental group underwent single immersion cooling in water at a temperature of 5 °C until profound hypothermia was reached, the control group of the animals was placed in water at a temperature of 30 °C. From the animals of the first group, blood was taken immediately after reaching profound hypothermia and from the second group — 24 hours after cooling was stopped.

Results. Comparative analysis of the results showed that immediately after the end of a single cold exposure, significant increase in platelet aggregation activity occurred, as well as appearance of thrombinemia markers in the bloodstream and inhibition of fibrinolytic system activity. 24 hours after the experimental exposure, these parameters returned to the initial values. When assessing the activity of external and internal ways of coagulation immediately after the termination of cooling, development of hypocoagulation was established, both with routine tests and from thromboelastography. After 24-hour period, hypocoagulation, recorded immediately after reaching the sought rectal temperature, persisted. Thus, after the end of a 24-hour period after cold exposure termination, most of the parameters of hemostatic system that had deviated immediately after the end of the experiment, returned to the normal level. The delayed effect of hypothermia in such cold exposure regimen manifested only by hypocoagulative shift at the initial stages of coagulation.

Conclusion. Signs of abnormal hemostasiological blood properties, recorded immediately after the cooling termination, disappear within 24 hours, and only hypocoagulation persists in the blood.

Keywords: hypothermia, freeze injury, hemostasis, thrombus formation.

В естественных условиях при общем переохлаждении повреждающее действие холода на ткани вызывает комплексную ответную реакцию организма. В форми-

рование срочного ответа на холод вовлекаются все органы и системы. При этом основным компонентом, обеспечивающим адекватность трофики тканей для сохранения функционирования организма, служит система гемостаза.

Показано, что выраженность ответной реакции со стороны системы гемостаза зависит от множества факторов, определяющих из которых — уровень температуры тела, достигнутый в ходе гипотермии [1, 2]. При этом регистрируют как гипокоагуляционные нарушения в системе гемостаза [3], так и гиперкоагуляционные сдвиги, вплоть до развития синдрома диссеминированного внутрисосудистого свёртывания [4].

В патофизиологическом течении холодной травмы выделяют собственно гипотермический и постгипотермический периоды. Гипотермический период характеризуется развитием декомпенсаторных изменений в организме животного, постгипотермический период — формированием и манифестацией травматических последствий действия общего переохлаждения на организм [5–7].

По статистическим данным, самое большое количество летальных исходов регистрируют в первые 26 ч после возвращения температуры тела к нормальным значениям, то есть в раннем реактивном периоде. Прогнозирование возможных нарушений со стороны системы гемостаза, развивающихся сразу после прекращения охлаждения и по истечении 24 ч, позволит минимизировать последствия повреждающего действия гипотермии на организм.

Вышеизложенное определило цель настоящей работы — изучение состояния системы гемостаза в гипотермический и постгипотермический периоды у крыс.

Исследования выполнены на 53 крысах-самцах линии Wistar с массой тела 300 ± 15 г. Иммерсионную гипотермию моделировали путём помещения животных, находящихся в индивидуальных клетках, в воду температурой 5°C при температуре воздуха 7°C . Критерием прекращения воздействия служило достижение экспериментальными животными ректальной температуры $20\text{--}23^\circ\text{C}$, что соответствовало глубокой степени гипотермии. Время экспозиции было индивидуальным и составляло 5 ± 3 мин.

Контролем служила кровь 20 животных, полученная после того, как их на фоне предварительной наркотизации в индивидуальных клетках помещали в воду температурой 30°C и при температуре воздуха $22\text{--}25^\circ\text{C}$. Время экспозиции соответствовало времени охлаждения животных опытной группы.

В дальнейшем все животные были поделены на четыре группы. У животных первой группы (первая контрольная) забор кро-

ви осуществляли сразу после извлечения из воды, у животных второй группы (первая опытная) — сразу по достижении глубокой степени гипотермии. В третьей группе кровь забирали через 24 ч после извлечения из воды (вторая контрольная). В четвёртой группе забор крови осуществляли через 24 ч после прекращения охлаждения (вторая опытная).

Забор крови у всех групп животных выполняли на фоне наркотизации путём внутривентриального введения раствора золетил-ла в дозе $5\text{ мг}/100\text{ г}$.

У всех животных исследовали показатели тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза, а также антикоагулянтную и фибринолитическую активность плазмы крови с помощью наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия). Индуцированную агрегацию тромбоцитов проводили по G.V.R. Born (1962) на агрегометре «Биола» (Россия), в качестве индуктора использовали раствор аденозиндифосфата в концентрации $10\text{ мкг}/\text{мл}$. Тромбоэластometriю выполняли на приборе «Rotem» (Pentapharm GmbH, Германия) с использованием реагента «Natem», в состав которого входит кальция хлорид.

Кровь для исследования в объёме 5 мл получали путём забора из печёночного синуса в полистироловый шприц, содержащий $0,11\text{ М}$ ($3,8\%$) раствора натрия цитрата (соотношение крови и цитрата $9:1$).

До проведения эксперимента на протяжении недельной адаптации к условиям вивария все крысы находились в стандартных условиях содержания согласно требованиям «Надлежащей лабораторной практики» (GLP — от англ. Good Laboratory Practice). Использование крыс в экспериментах осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в эксперименте и Директивами $86/609/\text{ЕЕС}$ [8]. Обезболивание и умерщвление животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Сравнение полученных результатов осуществляли путём вычисления медианы (Me) и межквартильного размаха (25 и 75%). Статистический анализ выполнен с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни на персональном компьютере с применением пакета прикладных статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Критический уровень значимости при проверке статистических ги-

Результаты исследования показателей системы гемостаза у крыс после достижения ректальной температуры 20–23 °С сразу и по истечении 24 ч

Параметр	Контроль ₁ (n=10)	Опыт ₂ (n=10)	Контроль ₃ (n=10)	Опыт ₄ (n=23)	p
Количество тромбоцитов, ×10 ⁹ /л	529,5 [505,5÷562,0]	572 [552,5÷638,0]	504 [497,0÷558,5]	534,5 [519,0÷563,5]	p ₁₋₂ >0,05 p ₃₋₄ >0,05
Агрегация, отн.ед.	5,6 [2,9÷13,5]	47,7 [31,6÷72,7]	16,4 [12,8÷29,9]	22,7 [9,1÷25,2]	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ >0,05
Силиконовое время, с	136 [108,7÷163,0]	137 [109,0÷157,5]	240 [209,0÷252,5]	235 [217,7÷252,5]	p ₁₋₂ >0,05 p ₃₋₄ >0,05
АПТВ, с	11,2 [10,5÷11,3]	19 [17,3÷23,5]	15,3 [14,9÷18,3]	26,5 [25,6÷27,2]	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ <0,05
Протромбиновое время, с	23,2 [21,9÷24,3]	27,1 [24,7÷28]	23,9 [21,7÷25,5]	31 [27,9÷33,1]	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ <0,05
РФМК, мг/100 мл	3 [3,0÷3,0]	3 [3,0÷4,45]	3 [3,0÷3,0]	3 [3,0÷3,0]	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ >0,05
Фибриноген, г/л	2,1 [2,1÷2,2]	2,4 [2,1÷2,7]	2,2 [2,0÷2,5]	2 [1,9÷2,1]	p ₁₋₂ >0,05 p ₃₋₄ >0,05
ВПФМ, г	1,9 [1,9÷2,1]	1,7 [1,5÷1,8]	2,3 [2,3÷2,3]	1,9 [1,7÷2,2]	p ₁₋₂ >0,05 p ₃₋₄ >0,05
АТ III, %	118 [118,0÷118,0]	90,9 [79,2÷126,3]	110 [103,6÷117,0]	101,9 [94,2÷103,3]	p ₁₋₂ >0,05 p ₃₋₄ >0,05
Эгглобулиновый фибринолиз, мин	447 [360,0÷558,0]	1248 [560÷1286,5]	340 [300,0÷415,0]	231 [230,0÷273,0]	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ >0,05
СТ, с	206 [161,0÷231,0]	246 [213,2÷264,5]	227,5 [221,2÷237,5]	275 [250,0÷297,0]	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ <0,05
CFT, с	72 [58,2÷85,0]	72 [63,0÷117,0]	72,5 [60,5÷81,5]	81 [71,0÷93,0]	p ₁₋₂ >0,05 p ₃₋₄ >0,05
ML, %	15 [11,0÷22,0]	0 [0,0÷0,0]	27,5 [17,2÷47]	34 [27,0÷55,0]	p ₁₋₂ <0,05 p ₃₋₄ >0,05

Примечание: данные представлены в виде Me — медиана выборки; [25÷75] — процентилю выборки; n — число наблюдений; p — уровень статистической значимости различий сравниваемых показателей; _{1,2} кровь животных сразу после извлечения из камеры; _{3,4} кровь животных через 24 ч после извлечения из камеры; АПТВ — активированное парциальное тромбластиновое время; РФМК — растворимые фибрин-мономерные комплексы; ВПФМ, г — время полимеризации растворимых фибрин-мономерных комплексов; АТ III — антитромбин III; СТ — время коагуляции; CFT — время образования сгустка; ML — максимальный лизис.

потез в данном исследовании принимали равным 0,05.

Полученные данные представлены в табл. 1.

Сравнительный анализ результатов показал, что сразу по окончании однократного холодного воздействия происходило значимое повышение агрегационной активности тромбоцитов в 8,5 раза (p < 0,05). Через сутки после опытного воздействия агрегационная активность тромбоцитов приходила в норму и не отличалась от значений в контрольной группе.

Аналогичные изменения зарегистрированы и при оценке концентрации растворимых фибрин-мономерных комплексов. Так, сразу после извлечения животных из холодной воды в крови появлялись маркеры

тромбинемии. По истечении же суток данный показатель уже не отличался от показателей контрольной группы.

Анализ активности фибринолитической системы также демонстрировал стабилизацию этого параметра по истечении суток. Так, сразу после извлечения экспериментальных животных из камеры наблюдалось угнетение активности фибринолитической системы как по данным теста спонтанного лизиса эгглобулинов (в 3 раза, p < 0,05), так и при анализе показателя ML тромбоэластограммы, характеризующего процент лизиса сгустка. Через сутки после прекращения экспериментального воздействия фибринолитическая активность возвращалась к нормальному уровню.

При оценке активности внешнего и вну-

тренного путей свёртывания крови сразу после прекращения охлаждения было установлено увеличение показателя протромбинового времени на 16% ($p < 0,05$) и активированного парциального тромбопластинового времени в 1,6 раза ($p < 0,05$). По истечении суток гипокоагуляция, регистрируемая по показателям активированного парциального тромбопластинового и протромбинового времени сразу по достижении ректальной температуры искомой величины, сохранялась.

Таким образом, по истечении суток после прекращения холодого воздействия большинство показателей системы гемостаза, отклонившихся от нормального уровня сразу по завершении эксперимента, нормализовалось. Отставленный эффект гипотермии при данном режиме холодого воздействия проявлялся лишь гипокоагуляционными сдвигами на начальных этапах свёртывания.

Охлаждение водой характеризуется контактом всей поверхности тела животного с охлаждающей средой, что сопровождается одномоментным спазмом периферических сосудов и равномерным снижением кровотока в поверхностных тканях [2, 9–11]. Столь мощное воздействие стрессора сопровождается выбросом в кровотоки адреналина и, соответственно, активацией процессов свёртывания [12–14]. При дальнейшем действии гипотермического фактора происходит снижение активности ферментов, что сопровождается развитием вторичной гипокоагуляции.

В нашем исследовании достижение глубокой степени гипотермии сопровождалось гиперагрегацией и тромбинемией на фоне гипокоагуляции. В то же время локальных травм, которым сопутствует нарушение морфологической структуры ткани, при этом не наблюдается. После извлечения животных из воды происходило восстановление микроциркуляции, однако в силу отсутствия локальных повреждений активаторы свёртывания распределялись равномерно по всему кровотоку, что не вызывало активации свёртывания.

Также через сутки нами было показано возвращение фибринолитической активности плазмы крови к исходному уровню, что тоже отражает развитие компенсаторных изменений в системе гемостаза. Кроме того, можно предположить, что непродолжительное действие гипотермии не успевало привести к развитию функциональных

изменений в работе внутренних органов (полиорганной недостаточности) и способствовало восстановлению гемостазиологических параметров через сутки.

ВЫВОДЫ

1. Изучено состояние системы гемостаза в гипотермический и постгипотермический периоды у крыс. Показано развитие тромбинемии в гипотермический период.

2. Установлено, что в раннем реактивном периоде общей холодовой травмы у крыс сохраняются гипокоагуляционные изменения.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Голохваст К.С. Аспекты механизма влияния низких температур на человека и животных. *Вестн. нов. техн. мед. технол.* 2011; 18 (2): 486–489. [Golokhvast K.S. Aspects of the mechanism of low temperature effect upon human beings and animals. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy.* 2011; 18 (2): 486–489. (In Russ.)]
2. Bouchama A. Pathogenetic mechanisms of heatstroke and novel therapies. *Crit. Care.* 2012; 16 (2): 17–20. DOI: 10.1186/cc11265.
3. Gong P., Zhang M.Y., Zhao H. et al. Effect of mild hypothermia on the coagulation-fibrinolysis system and physiological anticoagulants after cardiopulmonary resuscitation in a porcine model. *PLoS One.* 2013; 8 (6): e67476. DOI: 10.1371/journal.pone.0067476.
4. Румянцев Г.В. Динамика теплового обмена у крыс при выходе из состояния искусственной глубокой гипотермии. *Рос. физиол. ж. им. И.М. Сеченова.* 2007; 93 (11): 1326–1331. [Rumyantsev G.V. Dynamics of the heat exchange in rats upon getting out of the state of artificial hypothermia. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova.* 2007; 93 (11): 1326–1331. (In Russ.)]
5. Fisher B. Rewarming following hypothermia of two to twelve hours. Some metabolic effects. *Ann. Surg.* 1958; 148 (1): 32–43. DOI: 10.1097/0000658-195807000-00003.
6. Jiang S. Potential role of therapeutic hypothermia in the salvage of traumatic hemorrhagic shock. *Crit. Care.* 2013; (17): 318–322. DOI: 10.1186/cc12559.
7. Ledingham I.Mc.A. Treatment of accidental hypothermia: a prospective clinical study. *British Med. J.* 1980; (4): 1102–1106. DOI: 10.1136/bmj.280.6222.1102.
8. *European Convention for the Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.* Strasburg: Council of Europe. 1986; 51 p.
9. Clinical hypothermia temperatures increase complement activation and cell destruction via the classical pathway. *J. Translational Med.* 2014; 12: 181. DOI: 10.1186/1479-5876-12-181.
10. Foulis A.K. Morphological study of the relation

between accidental hypothermia and acute pancreatitis. *J. Clin. Pathol.* 1982; 35: 1244–1248. DOI: 10.1136/jcp.35.11.1244.

11. Cavallaro G., Filippi L., Raffaelli G. et al. Heart rate and arterial pressure changes during whole-body deep hypothermia. *ISRN Pediatrics*. 2013; 2013: 140213. DOI: 10.1155/2013/140213.

12. Cooke R. The role of the myosin ATP-ase activity

in adaptive thermogenesis by skeletal muscle. *Biophys. Rev.* 2011; (3): 33–45. DOI: 10.1007/s12551-011-0044-9.

13. Kiyatkin E.A. Brain temperature homeostasis: physiological fluctuations and pathological shifts. *Front Biosci.* 2010; 15: 73–92. DOI: 10.2741/3608.

14. Liu S. Strategies for therapeutic hypometabothemia. *J. Exp. Stroke Transl. Med.* 2012; 5 (1): 31–42. DOI: 10.6030/1939-067X-5.1.31.

УДК 615.277.3: 615.036.8: 57.085.23

© 2017 Дунаев П.Д. и соавторы

ПОЛУЧЕНИЕ ИМАТИНИБ-РЕЗИСТЕНТНОГО СУБКЛОНА КЛЕТОК ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНОЙ СТРОМАЛЬНОЙ ОПУХОЛИ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ

Павел Дмитриевич Дунаев, Сергей Васильевич Бойчук*, Айгуль Рафиковна Галембикова, Рамиль Рамисович Хуснутдинов

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Поступила 04.07.2017; принята в печать 25.07.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-993

Цель. Получить клон иматиниб-резистентных клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) и оценить его чувствительность к химиопрепаратам различных групп.

Методы. Для получения иматиниб-резистентного клона опухолевые клетки линии ГИСО T1 культивировали в присутствии постепенно увеличивающихся доз иматиниба в течение 18 мес. Каждые 3 мес проводили сравнительную оценку чувствительности клеток ГИСО T1 к иматинибу с помощью колориметрического MTS-теста. Уровень экспрессии белков, служащих маркерами апоптоза, оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител. После получения клона клеток ГИСО T1 с признаками резистентности к таргетному препарату иматинибу оценивали его чувствительность к химиопрепаратам различных групп (доксорубину, этопозиду, винбластину, паклитакселу, цисплатину). Чувствительность иматиниб-резистентных клеток ГИСО T1 к химиопрепаратам, а также уровень экспрессии белков, служащих маркерами апоптоза, оценивали с помощью колориметрического MTS-теста и методом иммуноблоттинга.

Результаты. Через 18 мес культивирования клеток ГИСО T1 в присутствии постепенно возрастающих концентраций иматиниба в клетках были обнаружены признаки резистентности к данному препарату. Полученный субклон опухолевых клеток ГИСО T1-IM-108R был чувствителен ко всем использованным химиопрепаратам. Наибольший цитостатический эффект в отношении иматиниб-резистентных клеток ГИСО T1-IM-108R был обнаружен у доxorубина, винбластина и этопозиды.

Вывод. Иматиниб-резистентные клетки ГИСО T1 обладают чувствительностью к химиопрепаратам различных групп; полученный субклон клеток ГИСО T1-IM-108R может быть использован при проведении скрининга наиболее эффективных в отношении ГИСО химиопрепаратов и вновь синтезированных соединений.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли, резистентность, клонирование опухолевых клеток, химиопрепараты, иматиниб.

ESTABLISHMENT OF IMATINIB-RESISTANT GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR CELL SUBLINE AND INVESTIGATION OF ITS SENSITIVITY TO THE CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

P.D. Dunaev, S.V. Boichuk, A.R. Galembikova, R.R. Khusnutdinov

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Aim. To establish the subline of imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor (GISTs) cells and to evaluate its sensitivity to various types of chemotherapeutic agents.

Methods. To establish imatinib-resistant subline, tumor cells of GIST T-1 line were cultured with gradually increasing doses of imatinib for 18 months. Sensitivity of GIST T-1 cells to imatinib was comparably evaluated every 3 months by using MTS-based colorimetric assay. Level of expression of proteins serving as apoptotic markers, was examined by Western blotting with appropriate monoclonal antibodies. After establishment of GIST T-1 cell line with the signs of resistance to target medication imatinib, its sensitivity to various groups of chemotherapy (doxorubicin, etoposide, vinblastine, paclitaxel and cisplatin) was evaluated. Sensitivity of imatinib-resistant GIST T-1 cells to chemotherapy as well as the level of expression of proteins serving as apoptotic markers, was evaluated by using MTS-based colorimetric assay and Western blotting.

Results. After 18 month of culturing GIST T1 cells in the presence of gradually increasing doses of imatinib, the signs of resistance to this drug were observed. The obtained subline of GIST T1 IM-108R cells was sensitive to all used chemotherapeutic agents. Doxorubicin, vinblastine and etoposide were found to be the most potent cytostatic agents against imatinib-resistant GIST T1 IM-108R cells.

Conclusion. Imatinib-resistant GIST T1 subline cells are sensitive to various types of chemotherapeutic agents; the established GIST T1 IM-108R cell subline might be further used for screening for the most effective chemotherapeutic agents and novel synthesized compounds.

Keywords: gastrointestinal stromal tumors, resistance, tumor cell cloning, chemotherapeutic agents, imatinib.