

Арокина Н.К., Иванов К.П.

Восстановление респираторной функции организма после холодового угнетения без отогревания

Федеральное государственное бюджетное учреждение НИИ физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

В экспериментах на крысах изучали влияние внутривенного введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ на дыхательную функцию крыс после полного прекращения дыхания при глубокой гипотермии. Показано, что таким методом без применения отогревания можно снизить на $1,5\text{--}2,0^\circ\text{C}$ температурный порог наступления полного холодового паралича дыхательной функции организма. Это подтверждает выдвинутую ранее гипотезу о важной роли нарушения баланса ионов кальция в цитоплазме клеток в развитии патологии организма при глубокой гипотермии. Полученные результаты могут быть использованы при реанимации жертв эксцидентальной гипотермии.

Ключевые слова: гипотермия, восстановление дыхания, ионы кальция, $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$

Arokina N.K., Ivanov K.P.

Restoration of respiratory function of an organism after cold oppressions without warming

FGBUN Institute of physiology of I.P. Pavlov, The Russian Academy of Sciences, 199034, St.-Petersburg, emb. Makarova, 6

In experiments on rats studied influence of intravenous introduction $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ on respiratory function of rats after the full termination of breath at deep hypothermia. It is shown that such method without warming application it is possible to lower on $1,5\text{--}2,0^\circ\text{C}$ a temperature threshold of approach full a cold paralysis of respiratory function of an organism. It confirms the hypothesis put forward earlier about an important role of infringement of balance of ions of calcium in cytoplasm of cells in development of a pathology of an organism at deep hypothermia. The received results can be used at resuscitation of victims accidental hypothermia

Key words: hypothermia, restoration breathing, $[\text{Ca}^{2+}]$, Na_2EDTA

Реанимация переохлажденного организма с применением отогревания довольно опасная процедура и часто заканчивается гибелью организма. Поэтому представляется важной разработка других методов выведения организма из глубокой гипотермии, когда функции дыхательного и сосудодвигательного центров головного мозга значительно угнетены. Охлаждение тела угнетает деятельность АТФазы — фермента участвующего в синтезе АТФ [1]. Возникает недостаток энергии, что тормозит процесс выведения из клетки избытка ионов кальция. Транспорт одного иона кальция стоит расщепления одной молекулы АТФ [2], это очень большой расход энергии. Накопление Ca^{2+} в цитоплазме, как известно, дезорганизует метаболизм клетки. Имеются данные, что толерантность животных к холоду повышается при уменьшении содержания ионов кальция в крови [3]. На основе этих фактов в экспериментах на крысах мы разработали метод активизации терморегуляторной и дыха-

тельной функций при гипотермии, не используя отогревание. Внутривенное введение охлажденным животным небольшой дозы (0,013—0,016 ммоль) динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты ($\text{Na}_2\text{ЭДТА}$) снизило уровень $[\text{Ca}^{2+}]$ в крови крыс на 15—30% и вызвало усиление холодовой дрожи, повышение частоты и амплитуды дыхания [4—7].

Ранее нами показана возможность восстановления дыхания у крыс после его длительной остановки при температуре тела $15,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$ и мозга $16,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$ [8].

Цель исследования — выяснение являются ли эти температуры предельными для сохранения функций дыхательного центра, и возможно ли восстановление дыхания с помощью введения в кровяное русло $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ при более низких температурах тела и мозга.

Методика

Опыты проводились на 13 белых крысах-самцах Вистар массой 320 ± 15 г. После наркотизации (небутал, 40 мг/кг, внутривенно) животные фиксировались на специальном станке. В бедренные вены и артерию вводились полиэтиленовые катетеры для

Для корреспонденции: Арокина Надежда Константиновна, д.биол.н., б/зв, ст. науч. сотр., группа физиологии терморегуляции и биоэнергетики ИФ РАН, e-mail: termo@pavlov.infran.ru

инъекций, взятия проб крови, измерения кровяного давления. Температуру в прямой кишке и в области продолговатого мозга (на глубине 7 мм) измеряли с помощью медно-константановых термопар. Через 2—2,5 ч после операции крыс погружали в холодную воду (9—10°C), голова находилась над уровнем воды. Регистрировали пневмограмму (угольный датчик), электрокардиограмму (ЭКГ), кровяное давление.

Через 2—3 мин после остановки дыхания крыс извлекали из воды и для дополнительного снижения температуры тела их накрывали мокрой тканью и кусочками льда при температуре воздуха в комнате 18—20°C. Через 6—8 мин после извлечения из воды животным опытной группы ($n = 6$) через бедренную вену в течение 4 мин в кровь вводили 1 мл 0,5% раствора $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ (0,0135 ммоль). В контрольных опытах ($n = 7$) через 2—3 мин после остановки дыхания животное извлекали из воды и регистрировали физиологические параметры до гибели крыс.

Концентрацию ионов кальция в цельной крови определяли методом прямой потенциометрии пленочными кальций-селективными электродами на основе диоктилфенилфосфорной кислоты. Пробы крови (по

0,3 мл) брали до охлаждения животных, сразу после извлечения из воды, на 8-й и на 60-й мин после начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica», вычисляли средние значения (M), ошибку среднего (m); значимость различий определяли по критерию Вилкоксона (ρ_w).

Результаты и обсуждение

Время охлаждения крыс составляло 72 ± 11 мин. После извлечения крыс из воды температура тела и мозга продолжала понижаться. В табл. 1 приведены физиологические параметры для всех исследованных крыс до охлаждения и при остановке дыхания.

У животных опытной группы ($n = 6$) к 8-й мин после начала инъекции $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ содержание Ca^{2+} в крови снизилось на 28% от уровня измеренного до введения препарата, что сопровождалось восстановлением и постепенным учащением дыхания (табл. 2). При этом температура мозга и в прямой кишке были на 1,5—2,0°C ниже, чем при остановке дыхания ($\rho_w < 0,05$).

Таблица 1

Физиологические параметры крыс до охлаждения в воде и при остановке дыхания ($n = 13$)

Этап опыта	Ректальная температура, °C	Температура мозга, °C	Артериальное давление, мм рт.ст.	Частота дыхания, циклов/мин	Частота сердечных сокращений, уд./мин	[Ca ²⁺] в крови, ммоль/л
Исходные	$36,7 \pm 0,5$	$36,2 \pm 0,4$	94 ± 7	88 ± 2	475 ± 10	$1,03 \pm 0,02$
Остановка дыхания	$14,8 \pm 0,5$	$16,0 \pm 0,3$	37 ± 5	0	42 ± 4	
Перед введением $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	$13,5 \pm 0,4$	$15,2 \pm 0,3$	26 ± 4	0	36 ± 2	$1,21 \pm 0,03$

Таблица 2

Физиологические параметры крыс через разное время после начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ ($n = 6$)

Время от начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, мин	Ректальная температура, °C	Температура мозга, °C	Артериальное давление, мм рт.ст.	Частота дыхания, циклов/мин	Частота сердечных сокращений, уд./мин	[Ca ²⁺] в крови, ммоль/л
8	$12,8 \pm 0,5$	$14,8 \pm 0,3$	28 ± 5	5 ± 2	40 ± 4	$0,87 \pm 0,05$
20	$12,3 \pm 0,6$	$14,7 \pm 0,4$	35 ± 3	7 ± 1	45 ± 5	
40	$12,4 \pm 0,7$	$14,8 \pm 0,4$	33 ± 3	10 ± 2	49 ± 4	
60	$12,2 \pm 0,7$	$14,9 \pm 0,3$	43 ± 6	12 ± 3	57 ± 7	$1,07 \pm 0,04$

Таблица 3

Физиологические параметры контрольных крыс через разное время после извлечения из воды ($n = 7$)

Время от извлечения из воды, мин *	Ректальная температура, °C	Температура мозга, °C	Артериальное давление, мм рт.ст.	Частота дыхания, циклов/мин	Частота сердечных сокращений, уд./мин	[Ca ²⁺] в крови, ммоль/л
8(+6)	$13,4 \pm 0,6$	$14,8 \pm 0,2$	16 ± 6	0	21 ± 5	$1,26 \pm 0,04$
20(+6)	$13,3 \pm 0,7$	$14,9 \pm 0,5$	5 ± 2	0	14 ± 6	
40(+6)	$13,2 \pm 0,6$	$14,7 \pm 0,5$	0	0	0	

Примечание. * — время регистрации физиологических параметров соответствует времени в табл. 2 для опытных крыс, с учетом 6 мин от момента извлечения животных из воды до начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$



Регистрация частоты сердечных сокращений («ЭКГ») и дыхания в одном из опытов:

1 – 8-я мин от начала введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$: Тр 11,6; Тм 14,8; ЧД 0; ЧСС 35; АД 10;

2 – 20-я мин: Тр 10,5; Тм 15,3; ЧД 10; ЧСС 54; АД 22;

3 – 40-я мин: Тр 11,5; Тм 15,4; ЧД 16; ЧСС 58; АД 38;

4 – 60-я мин: Тр 13,2; Тм 15,6; ЧД 24; ЧСС 63; АД 66.

Тр – температура в прямой кишке, °С; Тм – температура мозга, °С; ЧД – частота дыхания, циклов/мин; ЧСС – частота сердечных сокращений, уд./мин; АД – артериальное давление, мм рт.ст. Внизу – время (с).

Первые дыхательные движения появлялись через 4—6 мин после внутривенного введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$. Поскольку дыхание отсутствовало у крыс до введения препарата, общее время отсутствия дыхательных движений составило 13 ± 3 мин. Концентрация ионов кальция в крови крыс через час после введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ была ниже уровня ($p_w < 0,01$), который наблюдался сразу после остановки дыхания, но примерно соответствовала уровню $[\text{Ca}^{2+}]$, измеренному до охлаждения. Через 3 ч после извлечения из воды у опытной группы крыс ректальная температура была $13,4 \pm 0,6^\circ\text{C}$, мозга $16,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$, артериальное давление 50 ± 6 мм рт.ст., частота дыхания 28 ± 7 циклов/мин, частота сердечных сокращений 63 ± 5 уд./мин. Все эти животные выжили путем саморазогревания. На рисунке представлены записи пневмограммы и электрокардиограммы для одной из крыс, сделанные через 8, 20, 40 и 60 мин после введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$.

У контрольных животных ($n = 7$) после остановки дыхания и извлечения их из воды дыхание не восстановилось, артериальное давление уже к 20-й мин упало почти до нуля, крысы погибли (табл. 3).

Проведенные исследования выявили, что животные после внутривенного введения $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ восстанавливают дыхание даже при более низкой температуре мозга ($14,7 \pm 0,4^\circ\text{C}$) и в прямой кишке ($12,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$), чем в момент остановки дыхания ($16,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$ и $14,8 \pm 0,5^\circ\text{C}$ соответственно). В одном из опытов физиологические параметры поддерживались на высоком уровне при температуре тела около 10°C . Контрольные животные через 30—40 мин от момента остановки дыхания погибли. С помощью введения животным в кровяное русло $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ нам удалось при смертельной температуре тела ($10—13^\circ\text{C}$) и мозга ($14—15^\circ\text{C}$) для млекопитающего животного поддерживать определенный уровень легочного дыхания, кровяного давления и частоты сокращения сердца в течение нескольких часов.

С научной точки зрения эти результаты интересны и заслуживают дальнейших исследований, поскольку, снижая уровень $[\text{Ca}^{2+}]$ в крови, удается отодвигать нижнюю температурную границу жизни в сторону более низких температур. Известно, что некоторые млекопитающие («зимнеспящие») имеют механизмы защиты клеток от кальциевой перегрузки, возникающей при гипоксии и гипотермии; они сохраняют дыхание, работу сердца при температурах близких к 0°C [9, 10]. Нам удалось найти способ стимулировать дыхание и поддерживать работу сердца без применения согревания тела у незимнеспящих животных. Опасность согревания переохлажденного организма состоит в том, что при повыше-

нии температуры тела быстро возрастает потребность тканей организма, особенно мозга и сердца, в энергии. Однако при отсутствии дыхания и ослабления деятельности сердца повышение снабжения тканей энергией невозможно. Наш подход основан на том, что раствор $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ образует комплексное соединение с ионами кальция, уменьшает их концентрацию в крови и, соответственно, в клетках. А это, как мы полагаем, замедляет патологическое повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция выше базового уровня, замедляя тем самым развитие холодового стресса в клетках головного мозга. Нарушения обмена Ca^{2+} в клетках играют важнейшую роль в развитии патологии и гибели организма при гипотермии [1].

Известно, что $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ образует комплексы и с ионами магния, имеющими важное физиологическое значение, но ионы кальция связываются в первую очередь [11]. Мы не измеряли концентрацию ионов магния в крови, но полагаем, что вводимые нами дозы $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ не приводили к критическому снижению концентрации ионов магния в крови, что могло вызвать развитие аритмии, замедление дыхания и его остановку. В наших опытах наблюдалось повышение частоты дыхания, нормализация работы сердца, что доказывает эффективность применения динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты для восстановления дыхания при глубокой гипотермии. Кроме того, ранее нами была выявлена корреляция активизации дыхания с понижением $[\text{Ca}^{2+}]$ в крови [6].

В дальнейшем мы планируем продолжить поиск способов еще большего снижения температурного порога прекращения дыхания, поскольку это позволит разрабатывать методы реанимации человека при очень сильной степени охлаждения. Полученные результаты уже сейчас имеют важное практическое значение, и наш метод может быть рекомендован для поддержания жизни у жертв эксцидентальной гипотермии.

Список литературы

1. Hochachka P.W., Somero G.N. *Strategies of biochemical adaptation*. W.B. Sanders Company. London. 1973.
2. Carafoli E. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Ann. Rev. Physiol.* 199; Vol. 53: 531—47.
3. Hochachka P.W. Defence strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*. 1986; 231 (4755): 234—41.
4. Иванов К.П., Арокина Н.К., Волкова М.Ф. и др. Блокада механизмов холодового паралича физиологических функций. *Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова*. 2000; 86 (6): 692—702.

5. Иванов К.П. Проблема восстановления физиологических функций у человека при глубокой эксиден- тальной гипотермии (к вопросу о пределах физиологи- ческой адаптации). *Физиология человека*. 2002; 28 (3): 123–30.

6. Федоров Г.С., Арокина Н.К., Иванов К.П. Механиз- мы угнетения физиологических функций при гипотермии и способ их стимуляции без отогревания тела. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2006; 92 (11): 1373–81.

7. Ivanov K.P. Restoration of vital activity of cooled ani- mals without rewarming the body. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009; 105 (1): 5–12.

8. Иванов К.П., Арокина Н.К., Федоров Г.С. Холо- довая патология и экспериментальная терапия глубокой гипотермии. *Патол. физиол. и exper. тер.* 2011; 4: 55–9.

9. Boutilier R.G. Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J. Exp. Biol.* 200; — Vol. 204 (Pt 18): \6 P. 3171181.

10. Carey H.V., Andrews M.T., Martin S.L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev.* 2003; Vol. 83: 1153–81.

11. Ляндберг Р.А., Саушкина Л.Н. *Лабораторный прак- тикум по общей и неорганической химии*. 2008; Ч.1, с. 37.

Поступила 04.02.13
Received 04.02.13

Сведения об авторах:

Иванов Кирилл Павлович — д.м.н., профессор, гл. науч. сотр., научный руководитель группы физиологии терморегуляции и биоэнергетики, заслуженный деятель науки РФ, ИФ РАН