

© Коллектив авторов, 2018  
УДК 612.017

Цибульников С.Ю.<sup>1,2</sup>, Маслов Л.Н.<sup>1</sup>, Нарыжная Н.В.<sup>1</sup>, Иванов В.В.<sup>3</sup>

## ***Хроническое периодическое воздействие холода не влияет на артериальное давление и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии***

<sup>1</sup> НИИ кардиологии, 634012, г. Томск, Россия, ул. Киевская, д. 111

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, г. Томск, Россия, просп. Ленина, д. 30

<sup>3</sup> Сибирский государственный медицинский университет, 634050, г. Томск, Россия, Московский тракт, д. 2

**Цель:** исследовать периодическое воздействие холода на крыс самцов Вистар. **Методика.** Исследования проводились по двум протоколам (8 ч, +4°C, 4 нед.) и (1,5 ч, +4°C, 4 нед.). Ишемию (45 мин) моделировали путем перевязки левой нисходящей коронарной артерии, с последующей реперфузией (120 мин). Выявление зоны некроза и зоны риска проводили по методу J. Neckar и соавт. Определяли уровень кортизола и кортикостерона иммуноферментным методом. **Результаты.** Было установлено, что периодическое воздействие холода не является хроническим стрессом. Было показано, что периодическое воздействие холода на организм крыс не влияет на показатели гемодинамики и устойчивость сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии. **Заключение.** Периодическое воздействие холода на организм крыс не влияет на показатели гемодинамики и устойчивость сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии.

**Ключевые слова:** стресс; холод; адаптация; сердце; ишемия.

**Для цитирования:** Цибульников С.Ю., Маслов Л.Н., Нарыжная Н.В., Иванов В.В. Хроническое периодическое воздействие холода не влияет на артериальное давление и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 17–21.  
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.17-21

**Для корреспонденции:** Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (РНФ) грант 14-15-00008.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.03.2017

Tsibulnikov S.Yu.<sup>1,2</sup>, Maslov L.N.<sup>1</sup>, Naryzhnaya N.V.<sup>1</sup>, Ivanov V.V.<sup>3</sup>

## ***Chronic intermittent cold exposure does not influence blood pressure and resistance of the heart to ischemia and reperfusion***

<sup>1</sup> Research Institute of Cardiology, Kievskaya Str. 111, Tomsk 634012, Russia

<sup>2</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, Prospekt Lenina 30, Tomsk 634050, Russia

<sup>3</sup> Siberian State Medical University, Moskovsky Trakt 2, Tomsk 634050, Russia

**Objective:** To study the effect of periodic cold exposure on Wistar male rats. **Methods:** The study was conducted according to two protocols: 8 h at +4°C for 4 weeks and 1.5 h at +4°C for 4 weeks. Ischemia (45 min) was induced by ligation of the left descending coronary artery followed by reperfusion (180 min). Necrosis zone and area at risk were detected according to the method described by J. Neckar et al. Concentrations of cortisol and corticosterone were measured using the enzyme immunoassay. **Results:** The intermittent cold exposure was shown not to be chronic stress. The intermittent action of cold on the body of rats did not influence hemodynamic parameters or resistance of the heart to the detrimental effect of ischemia and reperfusion. **Conclusion:** The intermittent cold exposure of rats did not influence hemodynamic parameters or resistance of the heart to the detrimental effect of ischemia and reperfusion.

**Keywords:** stress; cold; adaptation; heart; ischemia.

**For citation:** Tsibulnikov S.Yu., Maslov L.N., Naryzhnaya N.V., Ivanov V.V. Chronic periodic cold exposure had no affect the blood pressure and stability of heart to action ischemia and reperfusion. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2018; 62(1): 17–21. (in Russ.). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.17-21

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments.** This work was supported by the Russian Science Foundation (RNF) grant 14-15-00008.

**Information about authors:**

Tsibulnikov Sergey, <http://orcid.org/orcid.org/0000-0003-1534-2516>

Maslov Leonid, <http://orcid.org/orcid.org/0000-0002-6020-1598>

Natalia Naryzhnaya, <http://orcid.org/orcid.org/0000-0003-2264-1928>

Vladimir Ivanov, <http://orcid.org/orcid.org/0000-0003-3326-729X>

**Received** 10.03.2017

## Введение

Известно, что длительное пребывание пришлого населения в условиях Заполярья ведет к росту сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Так, заболеваемость артериальной гипертонией среди мигрантов на Крайнем Севере возрастает по мере увеличения длительности проживания в Заполярье и достигает 61% у людей, проживших в этом регионе более 15 лет [2]. Заболеваемость острым инфарктом миокарда (ОИМ) у мигрантов, прибывших на Крайний Север, резко возрастает после 7—10 лет пребывания в Заполярье [3]. Среди больных ОИМ в Норильске лица молодого возраста (менее 44 лет) составляют 24% [4]. Важно отметить, что повышенная частота ОИМ и гипертонии у мигрантов на Крайнем Севере может быть связано не только с холодом, но и с другими факторами среды, как, например, полярный день/полярная ночь, а также со сменой образа жизни.

Экспериментальные исследования свидетельствуют, что длительное холодное воздействие может оказать негативное влияние на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у подопытных животных. Так, ещё в 1956 г. было показано, что 20-дневная адаптация крыс к непрерывному воздействию холода (+5°C) приводит к увеличению у них артериального давления (АД) [5]. В 1990 г. O. Shechtman и соавт. [6] установили, что гипертензивный эффект адаптации (+5°C, 39 сут.) сохраняется, по меньшей мере, в течение 30 сут. после помещения крыс в комнатную температуру. Однако эти данные касаются только длительного непрерывного воздействия холода. Между тем, люди, работающие на Крайнем Севере, подвергаются периодическому воздействию низких температур, которое вызывает у них гипертоническую болезнь [2]. Как влияет подобное воздействие на АД у подопытных животных, до настоящей работы было не известно. Нет данных о том, как периодическая холодная экспозиция изменяет устойчивость сердца к ишемии и реперфузии. Установлено, что адаптация крыс к периодическому действию холода (1—2°C, 3 ч, 5 раз в неделю) в течение 60 сут. не влияет на аритмогенный эффект кратковременной коронароокклюзии и реперфузии у крыс [7]. Однако было неизвестно, может ли пери-

одическая холодная экспозиция усугубить некроз кардиомиоцитов, вызванный ишемией и реперфузией сердца.

*Цель работы:* оценить влияние периодического воздействия холода на артериальное давление и устойчивость сердца к действию ишемии и реперфузии.

## Методика

Исследование выполнено на крысах-самцах Вистар массой 200—220 г. Использовали 2 протокола исследований. В первом случае животных подвергали воздействию температуры +4°C по 8 ч ежедневно в течение 4 нед. [8]. Согласно второму протоколу, крысы находились в холодильной камере при +4°C по 1,5 ч ежедневно в течение 28 сут. [9]. В группу контроля включены животные массой 200–220 г, которые находились при температуре +24°C. Коронароокклюзию моделировали через 24 ч после прекращения холодного воздействия.

Для моделирования коронароокклюзии крысы были наркотизированы  $\alpha$ -хлоралозой (50 мг/кг, внутрибрюшинно, Sigma) и подключены к аппарату искусственной вентиляции легких «SAR-830 Series» (CWE Inc. США). Коронароокклюзию и реперфузию осуществляли по методу J.E. Schultz и соавт. [10]. Правая сонная артерия была канюлирована для измерения артериального давления (АД), которое регистрировали с помощью датчика давления SS13L (Biopac System Inc., Goleta, Калифорния, США), сопряженного с аппаратом для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Этот же аппарат использовали для записи ЭКГ. После 45 мин ишемии лигатуру ослабляли и восстановление кровотока подтверждали появлением эпикардальной гиперемии. Продолжительность реперфузии составляла 2 ч. Регистрацию ЭКГ осуществляли во время периода ишемии и в течение 30 мин после возобновления коронарного кровообращения с помощью аппарата для электрофизиологических исследований MP35 (Biopac System Inc., Goleta, США). Запись и обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W компании Biopac System Inc., (Goleta, США).

При оценке нарушений ритма сердца принимали во внимание только желудочковые формы аритмий:

- единичные желудочковые экстрасистолы (6—16 за 10 мин);
- множественные желудочковые экстрасистолы (более 16 за 10 мин или 3—4 следующих друг за другом преждевременных сокращения);
- желудочковая тахикардия (более 4 последовательных желудочковых экстрасистол);
- желудочковая фибрилляция.

Выявление зоны некроза и зоны риска проводили по методу J. Necka и соавт. [11]. Зоной риска принято называть миокард, подвергшийся ишемии-реперфузии. После реперфузии сердца удаляли из грудной клетки и промывали с помощью шприца через канюлированную аорту физиологическим раствором, содержащим 125 МЕ/мл гепарина. Для определения области риска (ОР) лигатуру вновь затягивали и миокард окрашивали струйно через аорту 5% перманганатом калия. После промывки с помощью слайсера HSRA001-1 (Zivic Instruments, Pittsburgh, США) делались срезы сердца толщиной в 1 мм перпендикулярно к продольной оси. Область риска не окрашивалась перманганатом калия. Зона некроза выделялась из зоны риска путем окрашивания 1%-ным раствором 2,3,5-трифенил тетразолия хлорида в течение 30 мин при 37°C. Некротизированный миокард не окрашивался, поскольку в погибших кардиомиоцитах отсутствовали дегидрогеназы. После окончания окраски срезы помещали в 10% раствор формальдегида на 1 сут. На следующий день после окрашивания правый желудочек удалялся и срезы сканировались с обеих сторон сканером HP Scanjet C4050. Размер области риска и зоны инфаркта (ЗИ) определяли компьютеризированным планиметрическим методом. Размер зоны инфаркта выражался в процентах от размера зоны гипоперфузии (область риска), как соотношение ЗИ/ОР.

В отдельную серию экспериментов было включено 12 адаптированных и 15 контрольных крыс, которых использовали для определения уровня гормонов, надпочечников, селезенки, тимуса. Одним из показате-

лей адаптации к холоду у животных является относительное увеличение массы бурого жира [12, 13], поэтому у адаптированных животных взвешивали межлопаточный бурый жир.

Непосредственно после декапитации, которую осуществляли под эфирным наркозом, у крыс забирали кровь, которую центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 3000 об/мин. Полученную сыворотку крови замораживали в морозильной камере (при -18°C) и хранили до 2 нед. Измерение уровня кортикостерона проводили иммуоферментным методом набором «Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA» RE52211 (IBL International GmbH, Германия) на микропланшетном ридере «Infinite 200 PRO» (Tecan GmbH, Австрия). Измерение уровня кортизола проводили радиоиммунным методом с помощью набора «Cortisol RIA KIT» IM1841 (Beckman Coulter, Immunotech, Прага, Чехия). Радиоактивность проб определяли с помощью многоканального радиометра РИГ-12 «Прогресс-РИА» (Россия, Санкт-Петербург).

*Статистическая обработка данных.* Количественные значения выражали как среднее арифметическое ( $M$ )  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $SEM$ ). Статистическую значимость антиаритмического эффекта оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ . Метод Манна—Уитни использовали для определения значимости влияния адаптации к холоду на соотношение ЗИ/ОР, уровень гормонов, массу тела крыс и массу бурого жира.

## Результаты и обсуждение

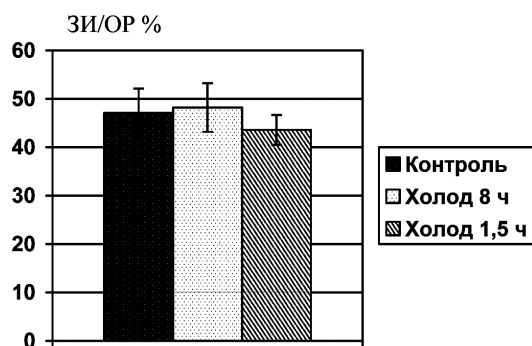
Установлено, что прерывистое воздействие холода (8 ч, +4°C, 4 нед.) вызывает увеличение массы межлопаточного бурого жира в полтора раза по сравнению с интактными животными, изменений массы других органов мы не наблюдали (табл. 1). Уровень кортизола и кортикостерона в сыворотке крови не изменялся относительно показателей интактных крыс (табл. 1). Как известно бурый жир играет важную роль в термогенезе и акклиматизации к холоду [14],

Таблица 1

Морфологические показатели стресс-реакции у крыс ( $M \pm SEM$ )

	Масса крысы, г	Тимус, мг	Н/п, мг	Селезенка, мг	Кортикостерон, нМоль/л	Кортизол, нМоль/л	Бурый жир, мг
Контроль, n = 15	282,6 $\pm$ 9,3	240,5 $\pm$ 13,2	35,6 $\pm$ 2,1	1059,5 $\pm$ 96,1	2568,5 $\pm$ 93,3	58,3 $\pm$ 12,2	300,4 $\pm$ 38,2
Холод 8 ч, n = 12	566,7 $\pm$ 28,9 p<0,01	272,5 $\pm$ 13,7	33,1 $\pm$ 1,1	1052,8 $\pm$ 58,6	2571,5 $\pm$ 98,5	49,7 $\pm$ 5,5	566,66 $\pm$ 28,9*
Холод 1,5 ч, n = 12	311,7 $\pm$ 21,1	244,5 $\pm$ 15,2	34,2 $\pm$ 1,9	1060,2 $\pm$ 64,3	2589,7 $\pm$ 99,8	41,9 $\pm$ 6,1	311,7 $\pm$ 21,02

Примечание. М — среднее значение масс органов; m — ошибка среднего; n — число крыс в группе; p < 0,01 — достоверность относительно интактных животных.



Влияние холодовой адаптации на соотношение ЗИ/ОР у крыс.

поэтому увеличение массы бурой жировой ткани является показателем адаптации к холодному воздействию. Представленные данные свидетельствуют о том, что акклиматизация к холоду произошла, не вызвав стресса. Следовательно, подобное хроническое воздействие (+4°C, 8 ч/сут., 4 нед.) является исключительно адаптивной реакцией на холод.

Мы обнаружили, что кратковременное прерывистое воздействие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) изменений массы бурого жира и других органов не вызывает. Уровень кортизола и кортикостерона в сыворотке крови не изменялся относительно интактных крыс (табл. 1). Поскольку масса бурого жира в этой серии экспериментов не менялась, то можно утверждать, что и адаптация к холоду не происходила. Следовательно, периодическое кратковременное воздействие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) не является ни стрессом, ни адаптацией к холоду. Данные о массе органов и уровне гормонов согласуются с полученными нами ранее результатами [15].

При моделировании коронароокклюзии-реперфузии было показано, что выбранные нами модели адаптации к холоду не оказывают эффекта на частоту возникновения ишемических и реперфузионных желудочковых аритмий (табл. 2).

Кроме того, нами установлено, что адаптация к периодическому действию холода не оказывает влияния на показатели гемодинамики, о чём говорит отсутствие изменений частоты сердечных сокращений и артериального давления. Нельзя исключить того, что обнаруженное нами резкое увеличение массы крыс и содержания бурого жира (табл. 1) было результатом стрессорной активации гормональных систем, которая исчезает при завершении формирования адаптации к холоду.

Как показано на рисунке, у крыс, подвергнутых холодному воздействию по выбранным нами протоколам, индекс ЗИ/ОР не изменялся относительно животных контрольной группы.

Таким образом, длительное прерывистое воздействие холода (8 ч, +4°C, 4 нед.) является исключительно адаптивной реакцией на холод, а кратковременное прерывистое воздействие холода (+4°C, 1,5 ч/сут., 4 нед.) не является ни стрессом, ни адаптацией. Периодическое воздействие холода на организм крыс не влияет на показатели гемодинамики и устойчивость сердца к патогенному действию ишемии и реперфузии. Вместе с тем, исходя из полученных данных, нельзя исключить других возможных перекрестных защитных эффектах адаптации с помощью кратковременных воздействий холода.

Таблица 2

Влияние хронического холодного воздействия на частоту возникновения ишемических и реперфузионных аритмий

Группа	Ишемия								Реперфузия			
	Фаза Ia (1–10 минута)				Фаза Ib (10–20 минута)				БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ
	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ	БЖА	МЖЭ	ЖТ	ЖФ				
Контроль, n = 15	2 (13)	13 (87)	10 (67)	6 (40)	6 (40)	9 (60)	6 (40)	2 (13)	13 (77)	2 (13)	0 (0)	0 (0)
Холод +4°C по 8 ч в день 4 недели (группа сравнения 1), n = 10	1 (10)	9 (90)	8 (80)	4 (40)	4 (40)	6 (60)	6 (60)	1 (13)	8 (80)	2 (20)	0 (0)	0 (0)
Холод +4°C по 1,5 часа ежедневно 4 недели (группа сравнения 2), n = 10	0 (0)	10 (100)	8 (80)	5 (50)	4 (40)	6 (60)	6 (60)	1 (13)	8 (80)	2 (20)	0 (0)	0 (0)

Примечание. БЖА — без желудочковых аритмий; МЖЭ — множественные желудочковые аритмии; ЖТ — желудочковая тахикардия; ЖФ — желудочковая фибрилляция; n — количество животных с нарушением ритма, в скобках указан процент от общего числа животных в группе

## References

1. Maslov L.N., Vychuzhanova E.A., Gorbunov A.S., Tsibul'nikov S.Yu. The role of dyslipidemia in the pathogenesis of vascular events among Arctic populations. *Vestnik RAMN* 2014; (7-8): 133-6. (in Russian)
2. Skavronskaya T.V., Leus A.I., Fedoseeva L.A., Kumarnovskaya T.A., Preobrazhenskiy D.V. The prevalence of hypertension among the workers of the enterprises of the gas industry in the region of the Far North. *Kardiologiya*. 2005; 45(3): 84. (in Russian)
3. Turchinskiy V.I. Cardiac aspects of human adaptation in the Far North. *Vestnik AMN SSSR*. 1979; (6): 23-32. (in Russian)
4. Turchinskiy V.I., Sakharova S.I. The clinical course of myocardial infarction in young people under the conditions of the industrial city of the Far North. *Kardiologiya*. 1979; 19(5): 39-45. (in Russian)
5. Adolph E.F. General and specific characteristics of physiological adaptations. *Am. J. Physiol.* 1956; 184(1): 18-28.
6. Shechtman O., Papanek P.E., Fregly M.J. Reversibility of cold-induced hypertension after removal of rats from cold. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1990; 68(7): 830-5.
7. Barbarash N.A., Khaliulin I.G., Bykova O.V. Adaptation to a periodic load and cold, as a factor in the prevention of cardiac arrhythmias and contractility in acute myocardial ischemia in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 1993; (3): 10-2. (in Russian)
8. van Bergen P., Fregly M.J., Papanek P.E. Effect of a reduction in sodium intake on cold-induced elevation of blood pressure in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992; 200(4): 472-9.
9. Bozhko A.P., Gorodetskaya I.V. Meaning of thyroid hormones in the implementation of the protective effects of cold adaptation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 1994; (4): 29-32. (in Russian)
10. Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J. Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997b; 29: 1355-62.
11. Neckar J., Szarszoi O., Herget J. et al. Cardioprotective effect of chronic hypoxia is blunted by concomitant hypercapnia. *Physiol. Res.* 2003; Vol. 52: 171-5.
12. Lim S., Honek J., Xue Y., Seki T., Cao Z., Andersson P., Yang X., Hosaka K., Cao Y. Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nat. Protoc.* 2012; 7(3): 606-15.
13. Hauton D., May S., Sabharwal R., Deveci D., Egginton S. Cold-impaired cardiac performance in rats is only partially overcome by cold acclimation. *J. Exp. Biol.* 2011; 214(Pt 18): 3021-31.
14. Cannon B., Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 2004; 84(1): 277-359.
15. Maslov LN, Tsibulnikov S.Yu., Naryzhnaya NV, Ivanov VV, Tsibulnikova M.R. Chronic exposure to cold — adaptation without stress. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya*. 2016; (1): 28-31.

## Сведения об авторах:

Цибульников Сергей Юрьевич, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии; Национальный исследовательский Томский политехнический университет, e-mail: tsibulnikov@outlook.com;

Маслов Леонид Николаевич, доктор мед. наук, проф., руководитель лаб. экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии, e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

Нарыжная Наталья Владимировна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. экспериментальной кардиологии, НИИ кардиологии, e-mail: natalynar@yandex.ru;

Иванов Владимир Владимирович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., Сибирский государственный медицинский университет, e-mail: ivanovvv1953@gmail.com