

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕННЫХ ФУНКЦИЙ КРЫС ПОСЛЕ КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ПОГРУЖЕНИЕМ В ЛЕДЯНУЮ ВОДУ

© 2021 г. Е.Л. Гагаринский, А.С. Аверин

Институт биофизики клетки РАН — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: E.L.Gagarinskiy@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.09.2021 г.

После доработки 13.09.2021 г.

Принята к публикации 17.09.2021 г.

Исследованы допустимые временные границы, при которых возможно самовосстановление жизненных функций крыс после нахождения в состоянии клинической смерти в условиях сверхглубокой гипотермии при температуре ниже 10°C. Показано, что превышение 35-минутного интервала времени в состоянии клинической смерти приводит к гибели животных в результате нарастающей гипоксии организма. Частичное купирование гипоксии с помощью постоянно проводимой сердечно-легочной реанимации в процессе нахождения животного в ледяной воде пролонгирует максимальный срок клинической смерти до 60 мин. Предельные цифры клинической смерти согласуются с литературными данными, полученными на лабораторных животных, а также коррелируют с наблюдениями по спасению людей, утонувших в холодный период года. Возможно, предельные показатели клинической смерти являются схожими для разных видов млекопитающих. В этом случае можно прогнозировать, что проведение реанимационных мероприятий при нахождении в состоянии клинической смерти свыше 70–75 мин при утоплении в ледяной воде будет нецелесообразным.

Ключевые слова: сверхглубокая гипотермия, массаж сердца, сердечно-легочная реанимация.

DOI: 10.31857/S0006302921060168

Согласно мировой статистике, утопление является второй ведущей причиной неестественной смерти после травм, вызванных дорожно-транспортными происшествиями. Большинство случаев приходится на теплый период времени в странах [1]. Погодные условия оказывают значительное влияние на шанс спасения пострадавших: если при утоплении в теплой воде счет идет на минуты, то в холодный период времени у пострадавших появляется шанс на спасение при длительной клинической смерти. В современной медицине одной из проблем реанимации людей, погибших на открытой воде в холодный период, остается поиск максимальной продолжительности клинической смерти, которая еще позволяет вернуться к нормальному функционированию организма и в течение которой имеет смысл проводить сердечно-легочную реанимацию (СЛР). Данные о максимальном времени от момента клинической смерти до начала проведения ре-

анимационных мероприятий колеблются от 25 до 60 мин, так как при утоплении в холодной воде гипотермия позволяет защитить организм пострадавшего от гипоксических повреждений [2, 3]. При этом с постепенным понижением температуры тела увеличивается степень защиты от гипоксических повреждений. Однако области низких температур, соответствующих 20–30°C для глубокой [4] и <20°C для сверхглубокой гипотермии [5], могут индуцировать патологические процессы, приводящие к тяжелым нарушениям работы внутренних систем организма: повышению внутричерепного давления [6], сердечной патологии [7], повреждению почек [8]. Помимо данных осложнений избыточная пролонгация клинической смерти в конце концов приводит к возникновению гипоксических повреждений, которые сопровождаются серьезными неврологическими последствиями.

Целью настоящего исследования было определить максимальную продолжительность клинической смерти крыс в условиях сверхглубокой гипотермии, при которой еще возможно само-

Сокращения: СЛР — сердечно-легочная реанимация, ИВЛ — искусственная вентиляция легких, ЭКГ — электрокардиограмма.

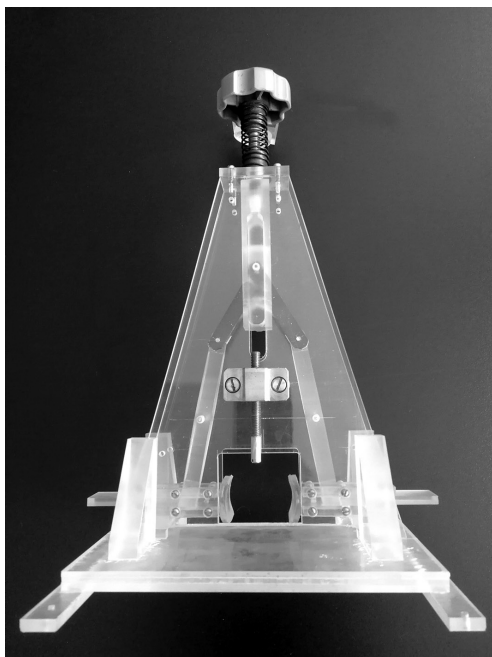


Рис. 1. Опытная установка для проведения непрямого массажа сердца у мелких грызунов с регулируемой глубиной сжатия грудной клетки.

восстановление жизненных функций, а также возможное пролонгирование этого периода в модельном эксперименте при сердечно-легочной реанимации с использованием аппарата непрямого массажа сердца и искусственной вентиляции легких, проводимой на протяжении всего периода утопления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на половозрелых самцах крыс линии Вистар массой 230 ± 25 г ($n = 28$).

После наркотизации эфиром крыс фиксировали на операционном столике и проводили интубацию трубками диаметром 1.8–2.2 мм с последующим подключением к аппарату искусственной вентиляции легких (ИВЛ) ЭПМ-2 (Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Россия). Для отслеживания температуры тела животных использовали электронный термометр Актаком-АТТ (АТТ, Тайвань), датчик вводили ректально на глубину 4 см. Количество вдохов в минуту задавали в зависимости от текущей температуры тела животного, от 80 вд./мин при 37°C до 20 вд./мин при достижении температуры тела ниже 10°C , объем дыхания высчитывали из расчета 1 мл на 100 г. крысы. В процессе охлаждения регистрировали электрокардиограмму (ЭКГ) в первом стандартном отведении при помощи ветеринарного монитора IM-10 (ZooMed, Китай).

В исследовании для введения крыс в состояние сверхглубокой гипотермии использовали быстрое охлаждение поверхности тела путем погружения в ванну с циркулирующей холодной ($+1^\circ\text{C}$) водой, для регуляции температуры воды на разных этапах эксперимента использовался криотермостат Ministat 230w (Huber, Германия).

Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии в нашем исследовании отсчитывали по достижении животными ректальной температуры, равной 10°C , при которой происходила естественная остановка сердца у контрольной группы животных. Исследование проводили на четырех группах крыс:

I группа — контроль (6 крыс), без использования СЛР, скорость отогрева $1.2^\circ\text{C}/\text{мин}$. Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии — от 30 до 40 мин.

II группа — контроль (6 крыс), без использования СЛР, скорость отогрева $0.6^\circ\text{C}/\text{мин}$. Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии — от 50 до 60 мин.

III группа — опыт (8 крыс), с использованием СЛР, скорость отогрева $0.6^\circ\text{C}/\text{мин}$. Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии — от 50 до 60 мин.

IV группа — опыт (8 крыс), с использованием СЛР, скорость отогрева $0.6^\circ\text{C}/\text{мин}$. Время нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии — от 70 до 80 мин.

В контрольной серии экспериментов после достижения температуры ниже 10°C и полной остановки сердечной активности на мониторе ЭКГ аппарат ИВЛ отключали. В опытной серии аппарат ИВЛ работал на протяжении всего времени эксперимента и осуществлялся непрямой массаж сердца. Для поддержания сердцебиения нами была изготовлена опытная установка для наружного массажа сердца и легких млекопитающих с учетом их анатомических особенностей (рис. 1). Массаж начинали проводить при достижении температуры тела крыс, равной 10°C , частота массажа соответствовала 6 ударам в минуту. Отогревание животного осуществляли путем контролируемого повышения температуры воды при помощи криотермостата (с учетом инерционности системы отогрев начинали при температуре $5 \pm 0.5^\circ\text{C}$).

Крыс извлекали из воды на основании ряда показателей: подъем ректальной температуры выше 26°C , увеличение частоты сердечных сокращений выше 350 ударов в минуту, появление признаков двигательной активности. Одновременно с извлечением крысы проводили процедуру отключения от аппаратов ИВЛ, ЭКГ и удаляли ректальный термометр.

Окончательное согревание проводили путем обдувания животного горячим воздухом ($t = 45^\circ\text{C}$)

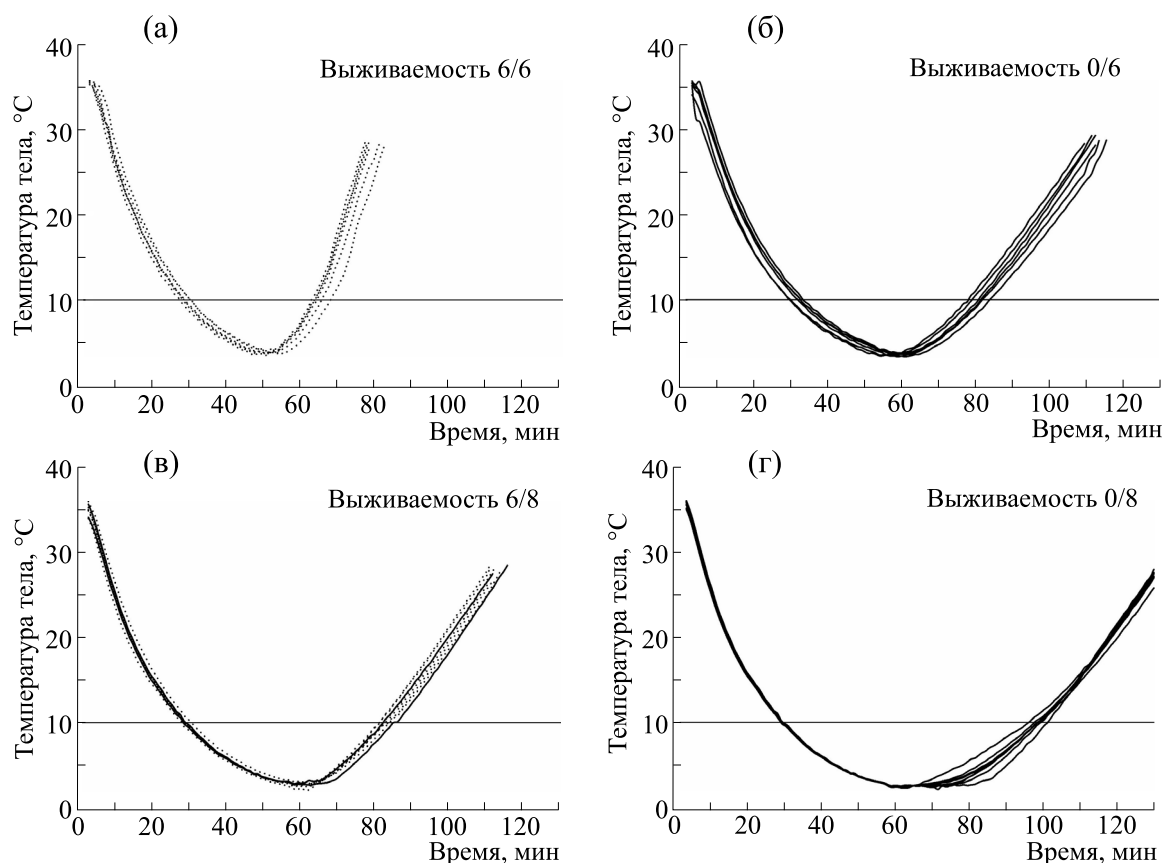


Рис. 2. Результаты измерения ректальной температуры крыс, подвергнутых сверхглубокой гипотермии: (а) — группа I (контроль, 6 крыс), без использования СЛР, скорость отогрева $1.2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, время гипотермии от 30 до 40 мин; (б) — группа II (контроль, 6 крыс), без использования СЛР, скорость отогрева $0.6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, время гипотермии от 50 до 60 мин; (в) — группа III (опыт, 8 крыс), с использованием СЛР, скорость отогрева $0.6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, время гипотермии от 50 до 60 мин; (г) — группа IV (опыт, 8 крыс), с использованием СЛР, скорость отогрева $0.6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, время гипотермии от 70 до 80 мин. Точечный пунктир — выжившие животные, сплошные линии — погибшие животные.

с использованием бытового фена. Полностью восстановивших жизнедеятельность животных возвращали в виварий и наблюдали за ними в течение месяца. Крыс содержали в стандартных клетках с кормом и водой *ad libitum* в условиях 12-часового цикла дня и ночи.

Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., США); данные выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продолжительность обратимой сверхглубокой гипотермии без использования сердечно-легочной реанимации. С целью определения максимально допустимого времени клинической смерти при утоплении в ледяной воде изучали три временных интервала: 1-й — 30–40 мин; 2-й — 50–60 мин и 3-й — 70–80 мин. Таким образом шаг между интервалами составлял 10 мин.

В экспериментах по обратимой сверхглубокой гипотермии без использования СЛР животных охлаждали до 3°C . Изменения ректальной температуры крыс во время охлаждения и последующего нагрева показаны на рис. 2. Скорость нагрева составляла $0.6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, за исключением временного интервала клинической смерти — от 30 до 40 мин, когда она была увеличена до $1.2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для достижения требуемой продолжительности.

Сердечная деятельность группы I крыс, охлажденных до температуры 3°C и находившихся в состоянии клинической смерти при сверхглубокой гипотермии в течение 34.8 ± 1.4 мин (рис. 2а), самопроизвольно восстановилась при повышении ректальной температуры выше 10°C . Сердечная деятельность группы II крыс, в которой животных подвергали воздействию температуры ниже 10°C в течение 50.8 ± 2.5 мин (рис. 2б), не восстановилась.

Продолжительность обратимой сверхглубокой гипотермии с использованием сердечно-легочной



Рис. 3. Изменения электрокардиограммы и частоты сердечных сокращений (ЧСС) в процессе погружения животного в состояние сверхглубокой гипотермии и последующего отогревания. * — Электрокардиограмма, снятая за 10 мин до начала эксперимента; ** — электрокардиограмма, снятая спустя 24 ч после восстановления жизненных функций животного.

реанимации. На основании результатов, полученных в контрольных группах I и II, была предложена экспериментальная модель непрерывного использования СЛР в ходе утопления с целью определения основной причины гибели животных («холодовые» повреждения либо гипоксические повреждения), а также максимального предела клинической смерти в состоянии сверхглубокой гипотермии.

Сердечная деятельность группы III крыс, охлажденных до температуры 3°C и находившихся в состоянии клинической смерти при постоянно проводимой СЛР в течение 57.8 ± 1.3 мин (рис. 2в), самопроизвольно восстановилась при повышении ректальной температуры выше 10°C. Сердечная деятельность группы IV крыс, в которой животных подвергали воздействию температуры ниже 10°C в течение 71.9 ± 1.7 мин (рис. 2г) при проводимой СЛР, не восстановилась.

Электрокардиограмма и частота сердечных сокращений животных, подвергнутых обратимой сверхглубокой гипотермии. Изменения частоты сердечных сокращений во время охлаждения и последующего нагрева, а также пример характерной электрокардиограммы приведены на рис. 3. В ходе эксперимента при снижении температуры наблюдали выраженную брадикардию, вызванную снижением скорости спонтанной диастолической реполяризации в клетках водителя ритма. Также по мере снижения температуры тела на электрокардиограммах регистрировали характерную для состояния гипотермии волну Осборна, следующую за комплексом QRS, которая является маркером риска фибрилляции желудочков с последующей асистолией. В процессе отогревания наблюдали постепенное восстановление исходной картины электрокардиограммы.

Данные эксперименты показывают, что при превышении 35-минутного интервала времени в состоянии клинической смерти (группа II, 0

(6) животных) гибель животных наступает в результате необратимых гипоксических нарушений организма. Если частично купировать гипоксические нарушения с помощью постоянной СЛР, то максимальный срок клинической смерти пролонгируется примерно в два раза, до 60 мин (группа III, 6 (8) животных). После 70 минут клинической смерти животные также не выживают, по-видимому, в связи с необратимыми нарушениями, вследствие «холодового» воздействия. Полученные данные позволяют прогнозировать, что не имеет смысла продолжать реанимационные мероприятия при продолжительности клинической смерти свыше 70 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Продолжительность клинической смерти, предельная для успешного восстановления жизненных функций охлажденных крыс, была оценена в работе [9]. Было показано, что крысы, которых подвергали 60-минутной сверхглубокой гипотермии с использованием технологии EPR (технология EPR (Emergency Preservation and Resuscitation) позволяет вводить пациентов в состояние сверхглубокой гипотермии до температуры 10°C методом замены крови холодными плевгическими растворами, что защищает органы от повреждающего действия, вызванного обширной ишемией на фоне серьезных травм), полностью восстанавливали свою жизнедеятельность. Схожие результаты по продолжительности клинической смерти были получены в работе [10]. В ней наибольшая продолжительность клинической смерти крыс в состоянии сверхглубокой гипотермии также не превышала 60 мин. Увеличение времени нахождения в состоянии сверхглубокой гипотермии свыше 60 мин приводило к гибели животных в обоих приведенных исследованиях.

В нашем исследовании в контрольных группах максимальная продолжительность обратимой клинической смерти составила 35 мин. Почти двукратная разница в длительности может быть объяснена, если принять во внимание использование в обоих исследованиях технологий защиты от гипоксии при охлаждении.

Гипоксия на фоне гипотермии приводит к непосредственному повреждению сердечной ткани и ткани мозга. Каскад патологических реакций включает нарушение работы Na^+/K^+ -насоса, накопление внутриклеточного Ca^{2+} , отек, ацидоз, а также повышение образования активных форм кислорода, вызывающих дисфункцию липидов (перекисное окисление липидов), белков, углеводов и нуклеиновых кислот [11–13].

В работе [10] перед охлаждением животных применяли метод гиперкапнии, что повышало устойчивость крыс к гипоксии. Гиперкапния до

или во время начальных стадий охлаждения у крыс активирует защитные механизмы, аналогичные тем, которые существуют у зимоспящих животных [12]. Данный метод в сочетании с гипотермией позволяет вызвать состояние холодного наркоза, что значительно снижает интенсивность метаболизма и приводит к нулевым значениям электрической активности мозга уже при достижении температур в интервале от 14 до 20°C [14]. Подавление нейронной активности, в свою очередь, повышает толерантность мозга к гипоксии на ранних стадиях охлаждения [15], что позволяет увеличить безопасное время обратимой сверхглубокой гипотермии. В работе [9] предельные границы обратимой клинической смерти пролонгировали за счет полной замены крови консервирующим раствором. Технология EPR, поддерживающая организм в состоянии сверхглубокой гипотермии, облегчает отслеживание гипоксических осложнений за счет постоянного мониторинга состояния сердечно-сосудистой системы и их купирование путем поддерживающей терапии [16].

В нашем исследовании максимальная продолжительность обратимой клинической смерти в условиях постоянной сердечно-легочной реанимации составила 60 мин. Использование метода СЛР при гипотермии позволяет сохранить приток кислорода к мозгу и сердцу. Сердце извлекает почти весь кислород из получаемой крови даже в условиях измененного коронарного кровотока на фоне гипотермии [17, 18]. Мозг имеет самые высокие метаболические потребности в организме. При массе всего 2% от общего веса тела на мозговой кровоток приходится примерно 15% процентов сердечного выброса, а потребление кислорода составляет до 20% от общего потребления организма [19]. Гипотермия в значительной мере снижает влияние гипоксии как на центральную нервную систему, так и на другие системы организма. Снижение температуры тела человека на 10°C уменьшает уровень ферментативной активности на 50% [20], потребление кислорода мозгом уменьшается в 1.8–3.5 раза [21, 22]. Вместе гипотермия и СЛР обеспечивают приемлемую защиту тканей мозга от гипоксии.

Однако при пролонгированной клинической смерти появляются дополнительные повреждающие факторы. Так, пролонгация клинической смерти сопровождается нарушением транспортной функции крови. Описаны такие явления, как повышение вязкости, коагулопатия, скопления эритроцитов, что в конечном итоге может приводить к образованию тромбов в капиллярах головного мозга [16]. В работе [23] было показано, что общее обескровливание организма, охлажденного до 5°C, приводит к лучшему результату выживаемости по сравнению с меньшей степенью гемоделиции. Но продолжительность клинической

смерти, по-видимому, не лимитируется только лишь нарушением функции крови. В работе [9] было отмечено, что преодоление 75-минутного интервала клинической смерти в состоянии сверхглубокой гипотермии при использовании EPR приводит к неизбежной гибели крыс в связи с повреждением почек и полиорганной недостаточностью. При этом данные явления наблюдали в условиях полной замены крови. Таким образом, экспериментальные и литературные данные подтверждают, что длительность клинической смерти в условиях сверхглубокой гипотермии не должна превышать 70–75 мин для возможности успешной реанимации. При этом генезис того, что мы условно обозначили как «холодовые» повреждения, не вполне понятен и требует дальнейших изысканий.

Можно ли экстраполировать полученные нами данные на человека? Ретроспективное исследование по реанимации утонувших в водоемах Нидерландов детей показало, что хороший неврологический исход более вероятен, когда возвращение спонтанного кровообращения происходит в течение 30 мин после начала реанимационных мероприятий. При этом утопление в холодный период повышало шансы благоприятного исхода [24] при общем времени клинической смерти до 25 мин. В уже упомянутых ранее ретроспективных работах по спасению людей, утонувших в холодный период года, максимально возможное время клинической смерти, после которого была осуществлена успешная реанимация, варьировало в пределах от 25 мин [3] до 60 мин [2]. Предельные цифры клинической смерти согласуются с нашими результатами и литературными данными, полученными на лабораторных животных. Возможно, предельные показатели клинической смерти являются схожими для разных видов млекопитающих. Если это так, то проведение реанимационных мероприятий сверх временного показателя 70–75 мин можно признать нецелесообразным.

Ограничением данной работы является отсутствие данных о восстановлении электрической активности мозга и оценки когнитивных функций у крыс, подвергнутых сверхглубокой гипотермии, что может стать предметом дальнейших исследований.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность В.К. Утешеву за помощь в постановке экспериментов и Е.Е. Фесенко (мл.) за ценные советы по содержанию статьи и редакторскую правку при подготовке текста рукописи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных (2010/63/EU) и в соответствии с требованиями комиссии по этике ИБК РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E. Carter and R. Sinclair, *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* **11** (6), 210 (2011).
2. J. Hilmo, T. Naesheim, and M. Gilbert, *Resuscitation* **85** (9), 1204 (2014).
3. P. Suominen, C. Baillie, et al., *Resuscitation* **52** (3), 247 (2002).
4. J. W. Fehrenbacher, H. Siderys, et al., *J. Thoracic Cardiovasc. Surg.* **140** (6S), 154 (2010).
5. S. A. Tisherman, H. B. Alam, et al., *J. Trauma Acute Care Surg.* **83**, 803 (2017).
6. В. К. Мазалов, О. В. Вязовская, С. Е. Овсянников и А. М. Компаниец, *Вестн. Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, серия биология*, № 7 (814), 161 (2008).
7. A. Chockalingam, A. Mehra, et al., *Chest* **138** (1), 198 (2010).
8. D. Lindenblatt, E. Fischer, et al., *EJNMMI Res.* **4** (1), 54 (2014).
9. T. Drabek, J. Stezoski, et al., *Resuscitation* **75**, 114 (2007).
10. Р. Анджус и Н. Хозич. *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **9**, 38 (1965).
11. Н. К. Кличханов, Ж. Г. Исмаилова и др., *Бюл. ВСНЦ СО РАМН* **1** (5), 104 (2016).
12. Д. А. Игнатьев, Л. А. Фиалковская и др., *Радиоэкология* **46** (6), 1 (2006).
13. N. Alva, T. Carbonell, et al., *Resuscitation* **81**, 609 (2010).
14. И. К. Коломийцева и Л. Н. Маркевич, *Докл. РАН* **427** (6), 844 (2009).
15. G. E. Nilsson and P. L. Lutz, *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Compar. Pharmacol.* **105**, 329 (1993).
16. M. J. Taylor, in *Advances in Biopreservation*, Ed. by J. G. Baust, and J. M. Baust (CRC Press, Taylor and Francis Publ., N. Y., 2007), pp. 15–62.
17. P. Black, S. Devanter, et al., *J. Surg. Res.* **20**, 49 (1976).
18. N. Alva, D. Azuara, et al., *Exp. Physiol.* **98** (6), 1115 (2013).
19. X. Q. Niu and X. X. Zhao, *Gen. Mol. Res.* **14** (4), 12595 (2015).
20. D.F. Stowe, S. Fujita, et al., *Anesth. Analg.* **93** (4), 846 (2001).

21. S. A. Bernard and M. Buist, Crit. Care Med. **31**, 2041 (2003).
22. J. N. McCullough, N. Zhang, et al., Ann. Thorac. Surg. **67**, 1895 (1999).
23. P. Sekaran and M. Ehrlich, Anesth. Analg. **92**, 329 (2001).
24. J. K. Kieboom, H. J. Verkade, et al., BMJ Clin. Res. **350** (1), 418 (2015).

Restoration of Vital Functions in Rats after Clinical Death Caused by Cold Water Submersion

E.L. Gagarinsky and A.S. Averin

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The potential interval times within which vital functions in rats can be self-restored after the state of clinical death from ultra-deep hypothermia at temperatures below 10°C have been optimized. It has been shown that the interval of longer than 35-minutes, when the rat is in the state of clinical death, causes the animal's death because of continued fall in the amount of oxygen in the rat body. Partial reversal of tissue hypoxia, which was achieved with the help of continuous cardiopulmonary resuscitation, when the animal was in cold water, extended the time period during which clinical death can be survived up to 60 minutes. The highest score values of clinical deaths in rats under study are consistent with the literature data obtained using laboratory animals, and also correlate with observations concerning cold-water survival of people who were rescued. Probably, the highest clinical death indices are similar for different species of mammals. In this case, it can be supposed that resuscitation measures are inappropriate when rats subjected to cold water immersion are in a state of clinical death for longer than 70–75 minutes.

Keywords: ultra-deep hypothermia, heart massage, cardiopulmonary resuscitation