

Сравнительный анализ воздействия экспериментальных моделей светового десинхроноза на агрегационную активность тромбоцитов

© О.В. Злобина, В.Ф. Киричук, С.С. Пахомий[✉], А.Н. Иванов, Е.С. Терехина, Н.В. Шляпников, И.О. Бугаева

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского,
410012 Саратов, Россия

[✉] e-mail: spakhomy03@gmail.com

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

В окончательной редакции 24.01.2023 г.

Принята к публикации 27.01.2023 г.

Исследовано влияние различных моделей искусственного светового воздействия на агрегационную активность тромбоцитов белых крыс-самцов с использованием непрерывной модели освещения Light-Light (LL) и моделей с чередованием светлого и темного режима Light-Dark (12:10) и Light-Dark (18:6). Анализ агрегационной активности тромбоцитов проводили с помощью компьютеризированного анализатора агрегации 230LA „Biola“, используя методику В.А. Габбасова. Установлено, что при световом воздействии в организме лабораторных животных происходит повышение агрегационной активности тромбоцитов, сопровождающееся ростом показателей кривой средневзвешенного радиуса и параметров кривой светопропускания. Изменение циркадных ритмов в виде нарушенного фотопериодизма приводит к повышению агрегационной активности тромбоцитов и провоцирует развитие микроциркуляторных нарушений. Наиболее выраженные изменения со стороны микроциркуляторного русла к 10-м суткам эксперимента формируются при использовании модели Light-Dark (18:6).

Ключевые слова: агрегация тромбоцитов, циркадные ритмы, световое воздействие, нарушения фотопериодизма, микроциркуляторные нарушения.

DOI: 10.21883/OS.2023.06.55923.116-23

Введение

Вынужденное воздействие искусственного освещения в темное время суток всё сильнее изменяет образ жизни современного человека. Актуальность данной проблемы особенно высока для лиц с ненормированным рабочим графиком, работающих сверхурочно и в ночные смены, а также регулярно меняющих часовые пояса [1,2]. Неравномерное и неестественное чередование циклов сна и бодрствования может спровоцировать как структурные, так и функциональные изменения в организме, значительно увеличивая риск развития эндокринной и сердечно-сосудистой патологии [3–6].

Световой десинхроноз, характеризующийся нарушением циркадных ритмов, является важнейшим стрессогенным фактором. При развитии стресс-реакции в крови наблюдается уменьшение концентрации мелатонина и повышение титра адренкортикотропного гормона и катехоламинов, что приводит к запуску каскада реакций со стороны системы микроциркуляции [7,8]. В микроциркуляторном русле происходит спазм сосудов и развивается феномен централизации кровотока. Снижение уровня мелатонина в крови приводит к повышению функциональной активности тромбоцитов и нарушению микроциркуляции и гемокоагуляции. Стресс-индуцированный срыв ауторегуляторных и адаптационных механизмов может привести к нарушению кровообращения прежде всего в сосудах микроциркуляторного русла [9–15].

Длительность периода светового воздействия, тип режима освещения и его мощность непосредственно влияют на степень выраженности изменений микроциркуляторного русла. В серии экспериментов на лабораторных животных было показано, что моделирование режима непрерывного искусственного освещения (модель Light-Light) приводит к увеличению агрегационной активности тромбоцитов в сосудах микроциркуляторного русла и развитию наиболее выраженных изменений в паренхиматозных органах. Применение режима Light-Dark (12:12), предполагающего наличие тусклого освещения в темное время, приводило к нарушениям сна у крыс [1]. В исследовании [16,17] было установлено, что при длительном пребывании (на протяжении 4–6 недель) в условиях режима освещения Light-Dark (10:10), предполагающего 10 h периода света и 10 h темноты, в организме лабораторных мышей развиваются метаболические нарушения, приводящие к увеличению массы тела и повышению концентрации в плазме крови инсулина и триглицеридов.

Однако до настоящего времени остаются не изученными вопросы влияния удлиненного фотопериода с использованием различных режимов чередования освещения модели Light-Dark на агрегационную активность тромбоцитов, а также сопоставление подобных изменений с круглосуточной моделью освещения. Целью данного исследования явился сравнительный анализ выраженности воздействия различных режимов непрерывного и чередующегося искусственного освещения (модели Light-Light,

Light-Dark 12:10 и Light-Dark 18:6) на агрегационную активность тромбоцитов крыс-самцов в эксперименте.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование выполнено на базах центральной научно-исследовательской лаборатории Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского и лаборатории гемостаза кафедры нормальной физиологии имени И.А. Чувеского. Экспериментальное исследование проведено на 48 белых беспородных крысах-самцах с массой 250 г, в соответствии с Европейской конвенцией защиты позвоночных животных для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986) и „International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals“ (2012), а также с одобрения этического комитета ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава РФ (протокол № 4 от 06.12.2016 г.).

Лабораторные животные были распределены на 4 группы: три — опытные, одна — контрольная, в каждой по 12 особей. Экспериментальные животные подвергались круглосуточному искусственному световому воздействию в режиме Light-Light (24L:0D), а также чередованию светового и темного режимов с применением моделей Light-Dark (12:10) и Light-Dark (18:6) в течение 10 суток. Модель Light-Light предполагает непрерывное искусственное световое воздействие с интенсивностью 300 лк в светлое и 500 лк в темное время суток. Режимы Light-Dark предполагают 18 h или 12 h непрерывного светового воздействия с интенсивностью освещения 500 лк и 6 h или 10 h режима темного времени соответственно [18]. Эксперимент проводился в осенний период. Животные контрольной группы находились в условиях естественного фотопериода в течение 10 суток. Все группы экспериментальных животных имели одинаковый свободный доступ к воде и пище.

Исследование функциональной активности тромбоцитов проводили по методу З.А. Габбасова и соавт. [19] с использованием компьютеризированного двухканального лазерного анализатора агрегации 230LA „Biola“ (НФП „Биола“, Россия), не позднее 3 h с момента забора крови. Забор крови производили пункцией из правых отделов сердца у животных, выведенных из эксперимента путем введения внутримышечно комбинации Телазола (Zoetis Inc, США) в дозе 0.1 ml/kg и Ксиланита (Нита-Фарм, Россия) в дозе 0.1 ml/kg. В качестве антикоагулянта использовался 0.2% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Лазерный анализатор агрегации исследует процесс агрегации тромбоцитов на основании регистрации изменений светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы (турбидометрический метод) и флуктуаций светопропускания плазмы, вызванных случайным изменением количества и размера тромбоцитов и их агрегатов в тонком лазерном оптическом канале. Относительная дисперсия

таких флуктуаций пропорциональна среднему размеру агрегатов и используется для исследования кинетики агрегации. Калибровку прибора проводили для каждого животного путем регистрации светопропускания бедной тромбоцитами плазмы (результат принимали за 100%) и обогащенной тромбоцитами плазмы с добавлением 10 μ l 100 mM раствора ЭДТА (полученные данные оценивали в качестве 0). Средневзвешенный радиус обогащенной тромбоцитами плазмы принимался за 1 условную единицу. Измерение агрегации тромбоцитов в обогащенной тромбоцитами плазме объемом 300 μ l проводилось при соблюдении условий термостатирования 37°C в рабочем гнезде агрегометра и скорости перемешивания 800 rpm. Регистрация процесса агрегации тромбоцитов осуществлялась на основании данных кривой светопропускания и кривой средневзвешенного радиуса, отображаемых на экране монитора компьютера, сопряженного с агрегометром [20].

Динамику изменений агрегационной активности кровяных пластинок оценивали с помощью показателей кривой средневзвешенного радиуса тромбоцитов и кривой светопропускания. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовался раствор АДФ (НПО „РЕНАМ“, Россия) в концентрации 2.5 mmol/ml.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ „STATISTICA 10.0“ (StatSoft, США). В случае отличия распределения значений в выборке от нормального вычисляли медиану и квартили. При оценке значимости различий использовался U-критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали изменения при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

На 10-е сутки эксперимента во всех моделях светового воздействия наблюдается увеличение показателей кривой средневзвешенного радиуса по сравнению с группой контроля (рис. 1–4).

Наиболее выраженные изменения наблюдались в группах с режимом освещения LD 18:6: максимальный размер образующихся тромбоцитарных агрегатов составил 10.8 arb.units [9.1;12.9], максимальная скорость образования наибольших тромбоцитарных агрегатов — 19.4 arb.units [15.9;24.9], что на 75% превышало показатели по сравнению с контрольной группой.

В модели LL отмечалось увеличение на 15% времени достижения максимального размера тромбоцитарных агрегатов и на 8% времени достижения максимальной скорости образования тромбоцитарных агрегатов по сравнению с группой контроля. В группе с моделированием режима LD 12:10 была также выявлена тенденция к росту показателей кривой средневзвешенного радиуса, однако достоверных изменений по сравнению с контрольной группой не обнаружено.

Среди показателей кривой светопропускания наибольший достоверный рост показателей отмечался в группе

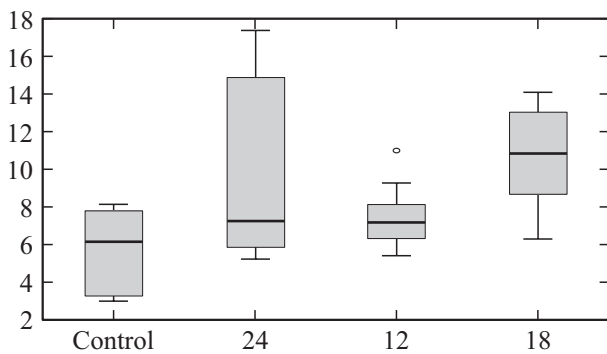


Рис. 1. Максимальный размер образующихся тромбоцитарных агрегатов, arb. units, для контрольной группы и групп, получавших световое воздействие в течение 24, 12, 18 h.

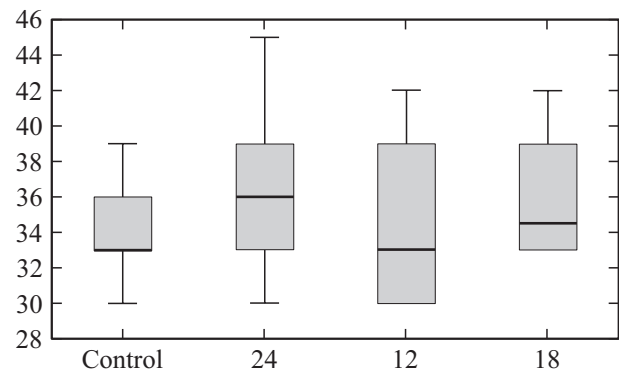


Рис. 4. Время достижения максимальной скорости образования наибольших тромбоцитарных агрегатов, s, для контрольной группы и групп, получавших световое воздействие в течение 24, 12, 18 h.

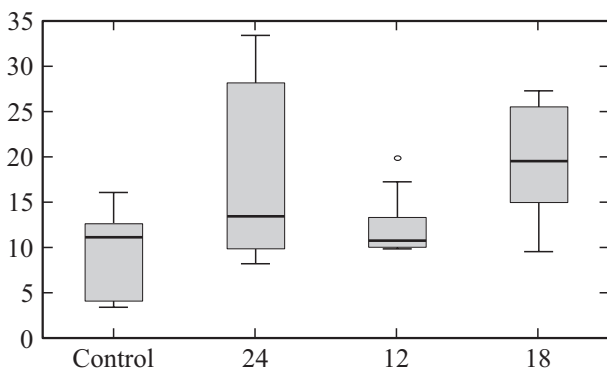


Рис. 2. Максимальная скорость образования наибольших тромбоцитарных агрегатов, arb. units, для контрольной группы и групп, получавших световое воздействие в течение 24, 12, 18 h.

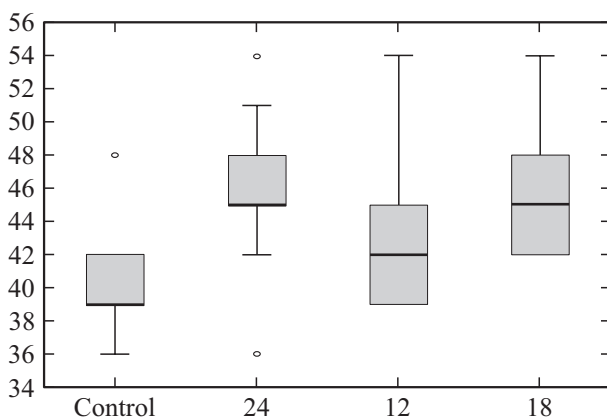


Рис. 3. Время достижения максимального размера образующихся тромбоцитарных агрегатов, s, для контрольной группы и групп, получавших световое воздействие в течение 24, 12, 18 h.

LD 12:10 (рис. 5–8). В данной группе максимальная степень агрегации составила 67.4% [64.3;71.7], максимальная скорость агрегации 91.4% [89.8; 101], что превысило показатели в контрольной группе на 56% и 65% соответственно.

В модели LL также отмечается значительный прирост показателей. наблюдается увеличение максимальной скорости агрегации на 42%, скорости достижения максимальной степени агрегации на 12%, а также тенденция к увеличению максимальной степени агрегации на 34%. В модели LD 18:6 отмечается лишь умеренное увеличение показателей кривой. Время достижения максимальной скорости агрегации существенно не менялось во всех моделях по сравнению с контрольными значениями.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о негативном влиянии светового десинхроноза на агрегационную активность тромбоцитов. Экспериментально установлено, что длительное пребывание лабораторных крыс в условиях нарушенного фотопериодизма провоцирует развитие стрессовых реакций и активацию проагрегантных процессов [21,22].

Агрегация тромбоцитов является сложным процессом, в развитии которого играют роль самые различные проагрегантные (тромбин, тромбоксан A2, эпинефрин, коллаген и другие) и антиагрегантные факторы (оксид азота, простациклины), а также гликопротеиновые рецепторы пластинок. Наиболее важное значение отводится балансу между простациклином эндотелия сосудов и тромбоксаном A2 тромбоцитов. При повышении агрегационной активности происходит сдвиг в сторону тромбоксана A2 [21,23]. Развитие данного состояния возможно в результате стрессовых реакций в ответ на длительное световое воздействие. Ключевым звеном развития стрессорной реакции является мелатонин — один из главных регуляторных гормонов циркадных ритмов. Рядом исследований было доказано, что уровень концентрации мелатонина в тканях зависит напрямую от уровня облученности во время сна. Например, световое воздействие с интенсивностью 500 лк провоцирует нарушение синтеза гормона пинеалоцитами эпифиза у лабораторных животных [23]. Недостаточная продукция мелатонина влечет за собой нарушение биоритмики организма и развитие стрессорной реакции.

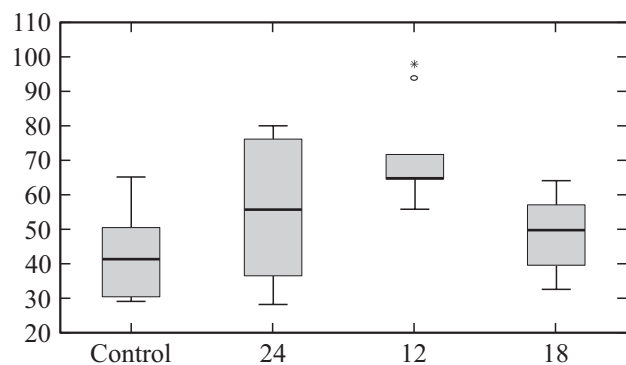


Рис. 5. Максимальная степень агрегации, %, для контрольной группы и групп, получавших световое воздействие в течение 24, 12, 18 h.

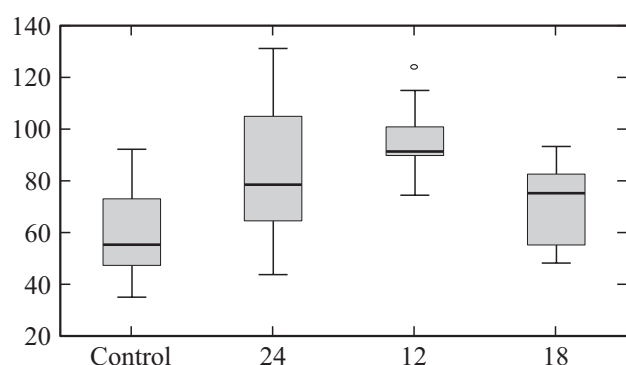


Рис. 6. Максимальная скорость агрегации, % min, для контрольной группы и групп, получавших световое воздействие в течение 24, 12, 18 h.

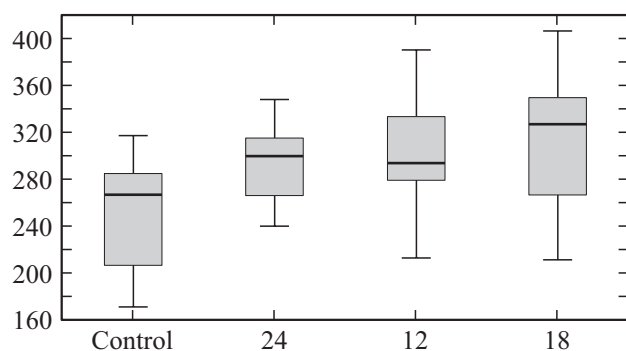


Рис. 7. Скорость достижения максимальной степени агрегации, s, для контрольной группы и групп, получавших световое воздействие в течение 24, 12, 18 h.

Активация симпатoadrenalовой системы в ответ на стресс запускает целый каскад проагрегантных явлений в организме. Повышение уровня катехоламинов и последующее развитие оксидативного стресса организма провоцирует не только дестабилизацию мембран тромбоцитов, что способствует их активации и увеличению концентрации тромбоксана А₂, но и выделение ряда провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1 β . Это в

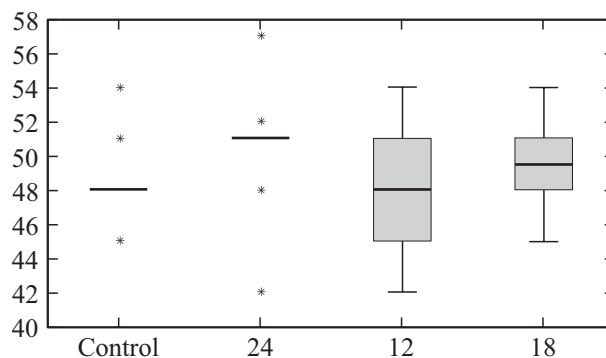


Рис. 8. Время достижения максимальной скорости агрегации, s, для контрольной группы и групп, получавших световое воздействие в течение 24, 12, 18 h.

свою очередь способствует развитию низкоинтенсивного воспаления эндотелия сосудов с выделением ряда вазоконстрикторных и проагрегантных веществ. Повышение адгезивной и агрегативной активности тромбоцитов может привести к тромбообразованию в сосудах капиллярного типа с развитием ишемии и последующего некроза тканей, что является одной из ключевых причин цереброваскулярной патологии и инфаркта миокарда [24,25].

На 10-е сутки эксперимента во всех моделях выявлены изменения тромбоцитарной активности в сторону гиперагрегации. Наибольшее увеличение проагрегантной способности тромбоцитов наблюдается у крыс в модели LD 18:6 по данным кривой средневзвешенного радиуса, однако по показателям кривой светопропускания наиболее достоверное увеличение наблюдается у животных модели LD 12:10. Поскольку методика флукуаций светопропускания обладает более высокой чувствительностью, нежели методика Борна, все же следует заключить о более выраженных нарушениях агрегации тромбоцитов у крыс модели 18:6, в связи с более выраженными процессами срочной адаптации и последующим истощением организма [15,22,26].

Заключение

Полученные результаты эксперимента по содержанию крыс в условиях искусственного освещения с использованием моделей LL, LD 12:10 и LD 18:6 позволяют сделать вывод, что световая депривация запускает стрессовую реакцию в организме и провоцирует повышение активности тромбоцитов, приводя к развитию патологии микроциркуляторного русла. У животных на 10-е сутки пребывания под воздействием светового десинхроноза отмечено существенное нарастание тромбоцитарной активности, что свидетельствует о развитии процессов срочной адаптации организма. Наиболее выраженные изменения наблюдаются в группе с моделированием режима освещения LD 18:6. Таким образом, нахождение в условиях постоянного светового воздействия и нарушенного фотопериодизма является мощным стрессогенным

фактором, которое вызывает увеличение агрегационной активности тромбоцитов и провоцирует развитие патологии микроциркуляторного русла.

Финансирование работы

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Министерства здравоохранения РФ по теме „Разработка математической модели для оценки скорости трансформации функциональных изменений в целостном организме при световом десинхронозе в необратимые морфологические изменения органов-мишеней в эксперименте“.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] D.J. Stenvers, R. van Dorp, E. Foppen, J. Mendoza, A.-L. Opperhuizen, E. Fliers, P.H. Bisschop, J.H. Meijer, A. Kalsbeek, T. Deboer. *Sci. Rep.*, **6**, 35662 (2016). DOI: 10.1038/srep35662
- [2] Y. Cho, S.H. Ryu, B.R. Lee, K.H. Kim, E. Lee, J. Choi. *Chronobiol. Internat.*, **32** (9), 1294–1310 (2015).
- [3] J. Cedernaes, N. Waldeck, J. Bass. *Genes. Dev.*, **33** (17–18), 1136–1158 (2019). DOI: 10.1101/gad.328633.119
- [4] C.E. Koch, B. Leinweber, B.C. Drenth. *Neurobiol. Stress.*, **6**, 57–67 (2017). DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.09.001
- [5] J.O. Early, A.M. Curtis. *Seminars in Immunology, Immunometabolism*, **28** (5), 478–490 (2016). DOI: 10.1016/j.smim.2016.10.006
- [6] В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова, А.В. Букалев. *Вопр. онкол.*, **60** (2), 15–27 (2014).
- [7] А.А. Зарипов, К.В. Янович, Р.В. Потапов, А.А. Корнилова. *Соврем. пробл. науки и образования*, **3**, 25–29 (2015).
- [8] К.И. Журкин, О.В. Злобина, А.Н. Иванов, И.О. Бугаева. *Тромбоз, гемостаз и реология*, **3** (67), 164–166 (2016).
- [9] О.В. Злобина, С.С. Пахомий, И.О. Бугаева, Г.Н. Маслякова, А.Н. Иванов. *Вестник новых мед. тех. Электр. изд.*, **5**, 245–249 (2018).
- [10] Н.Е. Терешкина, О.В. Злобина, А.Н. Иванов, А.А. Долгов. *Регионарное кровообр. и микроцирк.*, **3** (67), 129–134 (2018). DOI: 10.24884/1682-6655-2018-17-3-129-134
- [11] О.В. Злобина, И.О. Бугаева, С.С. Пахомий, А.Н. Иванов, Ю.А. Слюсаренко, Е.Д. Усольцева. *Вестник новых мед. тех. Электр. изд.*, **5**, 250–254 (2018).
- [12] L.K. Fonken et al. *PNAS.*, **107**, 18664–18669 (2010).
- [13] C.P. Coomans et al. *FASEB J.*, **27**, 1721–1732 (2013).
- [14] L.P. Casiraghi, A. Alzamendi, A. Giovambattista, J. Chiesa, A.D. Golombek. *Physiological Reports.*, **4** (8), 12743 (2016). DOI:10.14814/phy2.12743
- [15] О.В. Злобина, В.Ф. Киричук, С.С. Пахомий, А.Н. Иванов, А.Ю. Каретникова, Е.С. Терехина, Н.В. Шляпников, И.О. Бугаева. *Опт. и спектр.*, **129** (6), 711–716 (2021). DOI: 10.21883/OS.2021.06.50981.11-21
- [16] I.N. Karatsoreos, S. Bhagat, E.B. Bloss, J.H. Morrison, B.S. McEwen. *PNAS.*, **108**, 1657–1662 (2011). DOI: 10.1073/pnas.1018375108
- [17] D.J. Phillips, M.I. Savenkova, I.N. Karatsoreos. *Brain, Behavior and Immunity*, **47**, 14–23 (2015). DOI: 10.1016/j.bbi.2014.12.008
- [18] В.Н. Морозов, А.А. Хадарцев. *Вестник новых мед. тех.*, **1**, 15–17 (2010).
- [19] З.А. Габбасов, Е.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов, Е.Я. Позин, Р.А. Маркосян. *Лаб. дело.*, **10**, 15–18 (1989).
- [20] В.В. Панюшкин, Е.А. Рожкова, Е.А. Турова, А.С. Гозулов, Р.Д. Сейфулла. *Вест. спорт. науки*, **2**, 25–30 (2013).
- [21] В.Ф. Киричук, В.М. Романова, О.В. Злобина, И.О. Бугаева, А.Ю. Каретникова, Е.С. Терехина, Н.В. Шляпников. *Сиб. науч. мед. журн.*, **40** (3), 21–27 (2020). DOI: 10.15372/SSMJ20200303
- [22] Е.В. Костенко, Т.М. Маневич, Н.А. Разумов. *Леч. дело*, **17** (2), 104–116 (2013).
- [23] H. Chen. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, **134**, 32–37 (2018).
- [24] С.А. Поленов. *Рег. кровообр. и микроцирк.*, **1**, 5–19 (2008).
- [25] И.Г. Ованесян, Р.А. Ованесян. *Журн. невр. и псих. им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски*, **116** (12–2), 7–9 (2016).
- [26] P. Poredos, M.K. Jezovnik. *Angiology*, **7** (69), 564–567 (2017).