

**Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Минздрав России)
Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 21 Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической
активности лекарственных средств**

Методические рекомендации

ФМБА России МР.21. 44 - 2017

Москва 2017

Предисловие

1. Настоящие рекомендации разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) под редакцией д.м.н., профессора Н.Н. Каркищенко.

Директор – д.м.н., профессор В.Н. Каркищенко.

Заместитель директора по науке – д.м.н., профессор Е.Б. Шустов.

2. Исполнители:

научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор	Н.Н. Каркищенко
директор – доктор медицинских наук, профессор	В.Н. Каркищенко
заместитель директора по научной работе – доктор медицинских наук, профессор	Е.Б. Шустов
начальник научно-организационного отдела – доктор биологических наук	Г.Д. Капанадзе
заведующий лабораторией – кандидат биологических наук	А.О.Ревякин
заведующий лабораторией – кандидат биологических наук	Х.Х. Семенов
научный сотрудник – кандидат биологических наук	В.Ц. Болотова
заведующий лабораторией	М.С. Дуля

3. Рецензенты:

М.Б. Иванов, д.м.н., директор ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»;

А.Н. Петров, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1, тел./факс: (812) 365-06-80, e-mail: institute@toxicology.ru, <http://www.toxicology.ru/>;

С.В. Оковитый, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии МЗ РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова д.4/6, тел. (812) 234-13-29, e-mail: pharmacology.dept@pharminnotech.com, <http://pharm-spb.ru/>.

4. В настоящем документе реализованы требования Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

5. Введение в действие – с момента утверждения.

6. Введены впервые.

Содержание

Предисловие	2
Введение	6
1. Область применения.....	13
2. Аннотация.....	14
3. Нормативные документы	15
4. Обозначения и сокращения.....	17
5. Теоретические основы фармакологических эффектов антигипоксантов	18
6. Методы моделирования гипоксии в биомедицинских исследованиях	24
6.1. Моделирование гипоксии на мелких лабораторных животных	28
6.1.3. Моделирование гиперкапнической гипоксии.....	42
6.1.4. Моделирование респираторной гипоксии.....	42
6.1.5. Моделирование циркуляторной гипоксии.	44
6.1.6. Моделирование острой гемической гипоксии.	47
6.1.7. Моделирование острой гистотоксической гипоксии.	50
6.1.8. Моделирование тканевых гипоксических повреждений в тесте индуцированной гипоксией эмбриональной летальности.....	52
6.1.9. Моделирование локальной гипоксии жизненно важных органов.....	53
6.2. Моделирование гипоксии на крупных животных	56
7. Моделирование гипоксии нагрузки	60
8. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF1α как универсальный маркер развившегося гипоксического состояния	64
9. Критерии тяжести гипоксических состояний в биомедицинских исследованиях	67
10. Референсные (эталонные) препараты для оценки антигипоксической активности лекарственных средств	68
11. Статистическая обработка результатов и популяционный перенос результатов	70
12. Первичная фармакологическая оценка специфической антигипоксической активности	75
13. Расширенное изучение специфичности антигипоксической активности веществ и механизмов их действия	79
14. Изучение общей фармакологической активности новых антигипоксантов, их фармакокинетики и безопасности	81

15. Требования к лабораторным животным. Особенности их содержания	82
Заключение	84
Приложение 1	85
Основные свойства референсных антигипоксантов	85
Актовегин (Солкосерил).....	85
Мексидол.....	85
Пирацетам	87
Триметазидин	89
Библиография	91

Введение

Под термином "гипоксия" (hypoxia – от греч. hupo – ниже и лат. oxi [genium] кислород) понимают недостаточное снабжение тканей организма кислородом или нарушение его утилизации в процессе биологического окисления. В широком толковании этоо термина под гипоксией понимают несоответствие между энерготратами организма и образованием энергии в виде высокоэнергетических фосфатных соединений. Уменьшение содержания кислорода в крови обозначают как гипоксемия.

Общие условия и предрасполагающие к развитию гипоксии факторы следующие:

- у человека и высших животных окислительные реакции, протекающие с участием кислорода, – практически единственный источник энергии для обеспечения функций в физиологических условиях.
- в организме запасы кислорода минимальны. В тканях мозга, например, растворено около 1,5 мл O_2 . Поскольку интенсивность потребления кислорода тканями достаточно высока (мозг человека потребляет 0,65-0,85 мл кислорода в секунду), очевидна высокая вероятность развития гипоксии при ухудшении доставки кислорода из внешней среды к кристам митохондрий, где кислород непосредственно включается в цикл окислительных реакций.
- концентрация кислорода в местах его непосредственного потребления очень мала. Даже в норме в отдельных микрообъемах тканей она близка к нулю и становится нулевой при малейших нарушениях транспорта этого газа.

Доставка кислорода в организм зависит от:

- 1) содержания кислорода во вдыхаемом воздухе;
- 2) вентиляции альвеол;
- 3) условий диффузии кислорода через стенку альвеол;
- 4) кровоснабжения стенок альвеол;
- 5) скорости сатурации гемоглобина крови кислородом;
- 6) формы и положения кривой диссоциации оксигемоглобина;
- 7) скорости кровотока в капиллярах альвеол;

- 8) скорости кровотока (эритроцитов) в микрососудах;
- 9) количества эритроцитов, находящихся в единицу времени в единице длины (объема) микрососудов;
- 10) плотности сети микрососудов;
- 11) величины коэффициента диффузии и тесно связанного с ним коэффициента растворимости кислорода в данной ткани (клетке);
- 12) скорости потребления кислорода данной тканью (клеткой).

Изменение или нарушение любых из этих условий или их комбинаций может вызвать недостаток кислорода в тканях и стать причиной энергетической недостаточности.

Полиэтиологичность развития гипоксии предопределяет необходимость ее классификации. В клинической практике не редко встречаются комбинированные типы гипоксий, сочетающие в себе признаки двух и более ее вариантов. Например, при сочетании дыхательной и сердечной патологии будут отмечаться признаки как гипоксической (снижение насыщения артериальной крови кислородом), так и циркуляторной (количество поступающей в ткани крови не обеспечивает их текущий кислородный запрос).

Детальное этиопатогенетическое разделение многочисленных вариантов физиологической и патологической гипоксии предложено А.З. Колчинской [27], которая на основании анализа изменений процесса массопереноса и утилизации кислорода в различных звеньях системы дыхания выделила такие основные типы гипоксических состояний, как:

- 1) гипоксическая гипоксия, вызванная снижением pO_2 во вдыхаемом воздухе (pIO_2);
- 2) респираторная гипоксия, сопровождающаяся снижением pO_2 в альвеолярном воздухе (pAO_2) и артериальной крови (paO_2) вследствие поражения дыхательных путей и легких при нормальном pIO_2 ;
- 3) анемическая (гемическая) гипоксия – снижение содержания O_2 в артериальной крови либо из-за уменьшения ее кислородной емкости, либо из-за снижения кислородсвязывающих свойств гемоглобина при нормоксическом paO_2 ;

4) циркуляторная гипоксия – снижение скорости доставки O_2 кровью к тканям из-за нарушения циркуляции крови;

5) гипоксия нагрузки – снижение pO_2 в тканях и в венозной крови, возникающее в результате повышения нагрузки на систему дыхания вследствие увеличения потребления O_2 усиленно функционирующими клетками;

6) первичная тканевая гипоксия – кислородное голодание, обусловленное повреждением механизмов утилизации кислорода в клетках при нормальном содержании и напряжении O_2 в цитоплазме.

Независимо от причин гипоксии, ее генез можно представить в виде следующей каскадной схемы (Рис. 1).

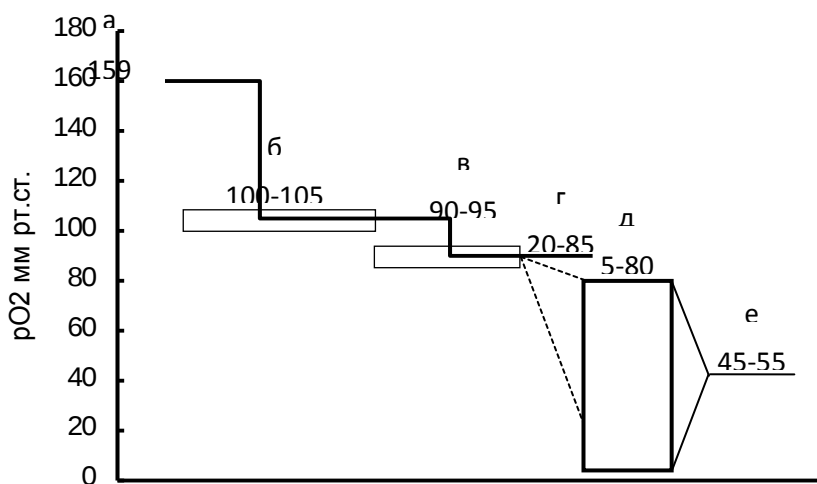


Рис. 1. Каскад pO_2 в различных средах организма человека (по [26]) а – в атмосферном воздухе; б – в альвеолах; в – в артериальной крови; г – в капиллярах; д – в межклеточной жидкости; е – в венозной крови.

Снижение pIO_2 приводит к уменьшению pO_2 в альвеолярном воздухе и артериальной крови, а при недостаточности компенсаторных механизмов – к снижению скорости масс-переноса кислорода артериальной кровью. Снижение скорости поэтапного масс-переноса кислорода к тканям обуславливает падение его напряжения в крови и тканях до уровней, ниже критических, т. е. таких, при которых начинает снижаться скорость потребления кислорода в тканях и развивается вторичная тканевая гипоксия. Ослабление функциональных возможностей кислородтранспортной системы может происходить на любом уровне

каскада транспорта кислорода. Известно, что изменения скорости (мл/мин) либо интенсивности (мл/мин на 1 кг массы тела) поэтапного масс-переноса O_2 , так же как и pO_2 на разных этапах пути кислорода в организме, происходят ступенчато: в легкие поступает в 1 мин больше кислорода, чем в альвеолы; скорость массопереноса pO_2 артериальной кровью меньше скорости поступления его в альвеолы, скорость транспорта кислорода смешанной венозной кровью еще ниже. Так же ступенчато снижается и pO_2 .

Критический уровень pAO_2 в альвеолярном воздухе составляет 33-27 мм рт. ст., в артериальной крови легких – 25-22, в смешанной венозной крови – 20-18, в тканевых капиллярах – 7-4, в митохондриях – 5-2 мм рт. ст. Наиболее чувствительными к гипоксии являются ткани с высоким уровнем потреблением кислорода. Значительная интенсивность окислительных процессов повышает критический уровень pO_2 в тканях. В частности, необратимые повреждения жизненно важных центров головного мозга и гибель организма могут происходить уже при снижении pO_2 в тканях мозга до 16 мм рт. ст., т.е. при еще далеко неполном исчерпании запасов кислорода. В этих условиях напряжение кислорода у венозного конца тканевого сосудистого элемента снижается до нуля, что знаменует полное прекращение дыхания клеток в этих участках мозга. Падение напряжения кислорода ниже критических уровней приводит к снижению скорости потребления кислорода, т.е. к развитию истинного кислородного голодания.

Главным патогенетическим звеном при кислородном голодании тканей любой природы является дефицит энергии в клетках. В основе энергообеспечения клеток лежит тканевое дыхание, которое происходит на внутренней мембране митохондрий и заключается в многоэтапном переносе электронов от субстрата к кислороду, восстанавливающемуся до воды. Параллельно из митохондрий выкачиваются протоны, создавая разность потенциалов на мембране, что используется для аккумуляции высвобождающейся энергии путем синтеза АТФ (окислительное фосфорилирование). Нарушение стройного хода митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, какими бы причинами они не вызывались (недостаток субстратов, дефицит кислорода, разобщение ферментов дыхательной

цепи и т.д.) приводит к истощению запасенной в макроэргических связях энергии, необходимой для поддержания всего разнообразия биохимических реакций живого организма. Повреждающее действие гипоксии усугубляется лавинообразным накоплением недоокисленных продуктов с появлением высокотоксичных свободных радикалов. Продукты перекисного окисления липидов, повреждая мембраны (в том числе – митохондриальные), усугубляют нарушения энергетического обмена, создавая тем самым порочный круг гипоксического повреждения. В условиях интенсивных физических нагрузок возникающий дефицит макроэргов (интенсивное расходование + невозможность ресинтеза со скоростью их потребления) также запускает каскад накопления недоокисленных продуктов, включая продукты перекисного и свободнорадикального окисления.

При любой гипоксии первично развивается угнетение энергетического обмена, которое проявляется уменьшением содержания креатинфосфата (особенно в головном мозге) и АТФ при одновременном увеличении содержания аденозинди- и аденозинмонофосфорных кислот, а также неорганического фосфата. Это приводит к нарушениям мембранного транспорта, процессов биосинтеза и других функций клетки, а также к внутриклеточному лактоацидозу, увеличению внутриклеточной концентрации свободного кальция и активации ПОЛ.

Процесс окислительного фосфорилирования осуществляется в митохондриях в три этапа. На первом этапе донаторами H^+ являются окисляемые субстраты цикла Кребса и пентозного цикла (сукцинат, пируват, глутамат и др.). В качестве акцепторов выступают НАД-зависимые дегидрогеназы. При гипоксии функционирование первого этапа нарушается в первую очередь, а, кроме того, начинает усиленно образовываться ацетальдегид, молекулы которого обладают электрофильным атомом карбонильной группы, содержащим избыточное количество электронов. Ацетальдегид взаимодействует со спиртами, тиолами и аминами с образованием полуацеталей, полукеталей и карбиноламинов. В результате нарушается структура и функция клеточных и субклеточных, в частности - митохондриальных, мембран, хроматина и медиаторных систем. В случае выраженной гипоксии и существенного накопления ацетальдегида, происходит его

взаимодействие с убигидрохиноном (восстановленная форма коэнзима Q), что приводит к повреждению и второго этапа дыхательной цепи.

На втором этапе тканевого дыхания передача H^+ от НАДН осуществляется на флавопротеины, сукцинатдегидрогеназу, а затем на коэнзим Q_{10} и цитохром b. Важно подчеркнуть, что система ферментов второго этапа может принимать H^+ и непосредственно от окисляемых субстратов, главным из которых является сукцинат, через флавопротеины 2-4. Поэтому при гипоксии идет усиленное образование сукцината так называемыми короткими путями: из аспартата, глутамата, γ -аминомасляной кислоты и аланина. Наконец, на третьем этапе процесса окислительного фосфорилирования H^+ поступает в систему цитохромов C и далее на кислород. В результате этих реакций образуются вода и углекислый газ.

Следовательно, при проведении доклинических исследований как гипоксических состояний, так и средств и методов их профилактики и коррекции, необходимо иметь методики, отражающие специфические особенности конкретной разновидности гипоксических состояний. При этом необходимо учитывать, что в силу своих молекулярных механизмов действия лекарственные препараты, влияющие на ранние этапы масс-переноса кислорода не будут оказывать существенного влияния на тканевую утилизацию кислорода, а влияющие на поздние этапы, особенно – митохондриальный участок кислородного каскада, будут оказывать более универсальное антигипоксическое действие.

Несмотря на то, что антигипоксанты как фармакологический класс известны с конца 60-х годов прошлого века [8] в современной клинической медицине они используются крайне редко. Во многом это связано с отсутствием широко распространенных биомедицинских моделей гипоксических состояний, адекватных клинически значимым патологическим процессам и состояниям. Так, практически не реально перенести в клиническую практику результаты исследования антигипоксантов на критической для жизни гипоксии (как гипобарической, так и нормобарической), гиперкапнии, отравлении цианидами и метгемоглобинообразователями, критической кровопотере – а именно эти методы

доклинического изучения антигипоксантов являются основными до настоящего времени [38].

Несколько ближе к клинической практике хирургические методы создания региональной или общей циркуляторной гипоксии (лигирование коронарных, позвоночных и мозговых сосудов, магистральных сосудов конечностей, сосудов брыжжейки кишечника), но они не стандартизированы как методы изучения активности антигипоксантов, а их результаты зависят от вида и качества анестезии, отработанности хирургической техники и навыков оператора, выраженности коллатерального кровотока у животных и широкого круга других причин.

Настоящие рекомендации имеют **целью** унификацию методического подхода в изыскании фармакологических средств, увеличивающих резистентность организма к кислородной недостаточности и ускоряющих процесс постгипоксического восстановления.

Необходимость издания Методических рекомендаций связана с тем, что с момента выхода предыдущих рекомендаций под редакцией Л.Д.Лукьяновой [38] существенно изменились взгляды на место и роль антигипоксантов в клинической практике, расширился арсенал методов моделирования клинически значимых гипоксических состояний, в практику биомедицинских исследований активно внедряются исследования на крупных животных. В доклинических исследованиях более активно используются статистические методы межпопуляционного переноса результатов исследований. Кроме того, для исследователей по разным причинам стали недоступными рекомендованные ранее эталонные антигипоксанты — оксибутират натрия и амтизол. Все это актуализировало необходимость подготовки новых Методических рекомендаций по биомедицинскому (доклиническому) изучению антигипоксической активности лекарственных средств.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя Федерального
медико-биологического агентства


« 29 » 07 М.В. Забелин
2017 г.



Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 21 Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической
активности лекарственных средств**
Методические рекомендации

ФМБА России МР.21. 44 –2017

1. Область применения

Настоящие рекомендации распространяются на порядок выполнения доклинических исследований по изучению антигипоксической активности лекарственных средств.

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области фармакологии, токсикологии, реаниматологии, восстановительной медицины, экспериментальной биологии и медицины, и посвящены стандартизации доклинических (биомедицинских) исследований в области изучения антигипоксической активности лекарственных средств и медицинских технологий, а также разработки новых соединений с потенциально антигипоксической активностью.

Настоящий документ предназначен для применения в учреждениях и предприятиях ФМБА России, осуществляющих деятельность в области разработки новых лекарственных средств и медицинских технологий.

2. Аннотация

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области фармакологии, токсикологии, реаниматологии, восстановительной медицины, экспериментальной биологии и медицины, и посвящены стандартизации доклинических (биомедицинских) исследований в области изучения антигипоксической активности лекарственных средств и медицинских технологий, а также разработки новых соединений с потенциально антигипоксической активностью.

Рекомендации содержат описание методов изучения гипоксии, экспериментальных моделей формирования различных видов гипоксических состояний на мелких и крупных лабораторных животных, критерии тяжести гипоксических состояний, требования к животным и работе с ними, методики статистического популяционного переноса полученных результатов, сравнительной оценки антигипоксической активности лекарственных средств, критерии эффективности их применения в экспериментальных клинических моделях, перечень нормативных документов, основную научно-методическую библиографию.

3. Нормативные документы

Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов, (в ред. Приказа Минсельхоза России от 16.08.2007 №400).

Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasburg, 1986).

Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / Под ред. Л.Д. Лукьяновой. М. 1990. 18 с.

Методические указания по экспериментальной оценке эффективности лекарственных средств, предназначенных для неотложной терапии гипоксического синдрома при интоксикациях высокотоксичными веществами (утверждены Начальником ГВМУ МО РФ 26.02.1997) / Куценко С.А., Смирнов А.В., Федонюк В.П., Муравьев А.В., Криворучко Б.И., Шибанов Е.А., Буслаев Н.Ю., Шустов Е.Б., Першин В.Н., Урюпов О.Ю., Зарубина И.В. / М., 1997. – 29 с.

Методические указания Минздравсоцразвития России от 12.05.2008 «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств».

Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказ Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2.12.2009 № 544-ст).

Правила надлежащей лабораторной практики таможенного союза. Решение Комиссии Таможенного союза от 02.03.1999 № 564.

Правила проведения работ с использованием лабораторных животных (приложение к Приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»

Приказ МЗ СССР 06.07.73 г. № 1045-73 об утверждении санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, Часть 2. М.: Гриф и К, 2012.- 944 с.

СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию, и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Утверждены постановлением Главного Государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 г. № 51.

4. Обозначения и сокращения

D	—	коэффициент детерминации
ВВП	—	время восстановления позы
ВЖ	—	время жизни
ВПП	—	время поддержания позы
ИЗ	—	индекс защиты
ИМ	—	ишемия мозга
ОГГ	—	острая гипобарическая гипоксия
ОГемГ	—	острая гемическая гипоксия
ОГисГ	—	острая гистотоксическая гипоксия
ОНГ	—	острая нормобарическая гипоксия

5. Теоретические основы фармакологических эффектов антигипоксантов

Антигипоксанты – группа лекарственных средств, основные эффекты и механизмы действия которых направлены на повышение переносимости гипоксии. В клинической практике применяются при ишемических состояниях различного генеза (ишемия миокарда, нарушения мозгового или периферического кровообращения, дыхательная недостаточность, шок любого генеза и т.д.). Основными представителями группы являются креатинфосфат, олифен, убихинон (коэнзим Q10), триметазидин, цитохром С, энергостим, актовегин, мексидол и их аналоги. Большое количество лекарственных соединений проявляет в той или иной степени антигипоксическую активность, которая является важной частью их фармакологического действия.

Действие антигипоксантов направлено на коррекцию в условиях гипоксии доставки кислорода к тканям или его утилизации клеткам организма, в результате чего происходит восстановление или снижение нарушений энергосинтезирующей функции, оцениваемой в конечном итоге по содержанию АТФ, а также коррекция энергозависимых процессов в клетке и ее специфической функциональной активности.

Антигипоксанты должны обладать следующими свойствами:

а) оптимизировать защитно-приспособительные реакции организма на всех уровнях систем дыхания и кровообращения и улучшать доставку кислорода к тканям в условиях гипоксии; б) снижать кислородный запрос организма путем более экономного использования энергетических ресурсов; в) сохранять энергетическую функцию клеток за счет активации и оптимизации анаэробных процессов, повышения сопряженности окислительного фосфорилирования и активации глюконеогенеза; г) стабилизировать структуру мембран клеток и субклеточных органелл, сохраняя энергетическую функцию митохондрий [39].

Выделяют следующие направления [11, 22] применения фармакологических средств в целях повышения переносимости человеком гипоксии различного генеза.

1. Улучшение кислородотранспортной функции крови:

– улучшение регионарного кровообращения и микроциркуляции

(компламин, трентал);

- повышение кислородной емкости крови искусственными переносчиками кислорода (перфтордекалин, перфторан) или в результате повышения сродства гемоглобина к кислороду (ацизол);

- усиление процессов отдачи кислорода тканям в результате снижения сродства гемоглобина к кислороду (глицерофосфат кальция, глутатион, реактиваторы холинэстеразы, кавинтон; корректоры дыхательного алкалоза – соли аммония, лимонная и аскорбиновая кислоты, ацетазоламид). Препараты этой группы могут оказывать свой эффект при умеренных степенях гипоксической гипоксии, когда парциальное давление кислорода в альвеолярном воздухе еще достаточно для насыщения гемоглобина (не менее 90 мм рт. ст.), а также при циркуляторной гипоксии [10, 28, 54];

- повышение легочной вентиляции и минутного объема кровообращения (этимизол, кофеин, камфора, эфедрин – препараты клинического применения при гипоксиях, связанных с декомпенсацией кровообращения и угнетением дыхания). В условиях реальной деятельности целесообразность их применения представляется сомнительной, так как при действии пониженного парциального давления кислорода мобилизация резервов сердечно-сосудистой и респираторной систем происходит в первую очередь. Дополнительная стимуляция при этом может быстро привести к истощению функциональных резервов этих системы, повышению кислородного запроса организма и газовому алкалозу, что в свою очередь может провоцировать развитие синдромов декомпенсации [2, 7];

- стимуляция эритропоэза (фолиевая кислота, цианкобаламин, лактат железа, гемостимулин). Эффекты самостоятельного применения этих препаратов отсрочены во времени и незначительны по выраженности защитного эффекта [28, 45, 79], однако могут играть важную роль при адаптации к гипоксии.

2. *Снижение расхода энергии в организме*, которое может достигаться за счет:

- снижения «уровня бодрствования» (снотворные, нейролептические и транквилизирующие средства, средства для наркоза). В реальных условиях могут

применяться для «переживания», т.е. для пассивного выживания в случаях, когда необходимо поддерживать жизнедеятельность на минимальном уровне, но при этом исключается любая деятельность [7];

- активации «антикалоригенной» системы организма, снижающей уровень теплопродукции и связанный с ним контрактильный термогенез [33]. Перспективными в рамках этого направления могут быть α 2-адреномиметики, β -блокаторы, холиномиметики, ГАМК-эргические средства, активаторы дофаминовых и аденозиновых рецепторов, антисеротонинергические средства.

3. *Снижение кислородного запроса тканей*, которое может реализоваться:

- при обратимом снижении «дыхательного контроля», т.е. способности митохондрий клеток отвечать уменьшением дыхания при избытке продуктов деградации АТФ, что приводит к ограничению потребления кислорода в тканях с незначительной функциональной активностью и перераспределению потока дефицитного кислорода в работающие органы – аналоги гутимина, амтизол [5, 9];

- за счет ингибирования нефосфорилирующего (перекисного, микросомального, свободнорадикального) окисления – ионол, токоферол, мексамин, медитан, гутимин, амтизол, эмоксипин [1, 52].

4. *Повышение эффективности использования кислорода для продукции макроэргических соединений* может быть получено в результате:

- предупреждения разобщения окисления и фосфорилирования с помощью препаратов с мембранопротекторным действием – бемитил, глюкокортикоиды, антиоксиданты, блокаторы кальциевых каналов;

- повышения эффективности цикла трикарбоновых кислот – янтарная, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, оксibuтират натрия, яктон, аскорбиновая кислота [35, 57];

- поддержания эффективности гликолиза при высоких степенях дефицита кислорода – амтизол, гутимин [17];

- переключения энергетического обмена на более экономичный с точки зрения потребления кислорода путь утилизации углеводов, активизации

постоянного образования глюкозы в реакциях глюконеогенеза и утилизация «шлаков» обмена – глюкокортикоиды, бемитил, аминокислоты, витаминные комплексы, инозин [28, 7, 4];

– шунтирование зон гипоксической блокады транспорта электронов в дыхательной цепи с помощью искусственных переносчиков электронов и восстановление фонда окисленных коферментов. Таким механизмом могут обладать цитохром С, аскорбиновая кислота, производные хинонов, коэнзим Q, олифен [16].

5. **Нормализация энергетики нервных клеток**, сохранение высших психических функций и вегетативного контроля за гиперактивацией симпатoadреналовой системы в условиях гипоксии. Указанное направление затрагивает напрямую только ЦНС и опосредованно может приводить к оптимизации функционирования других физиологических систем организма. С этой целью могут быть использованы ноотропил, аминалон, пантогам, оксипутират натрия, элеутерококк, другие адаптогены, нейропептиды, кофеин [7, 35, 22].

6. **Нормализация кислотно-основного состояния и проницаемости капилляров, функции клеточных мембран и обмена электролитов.** Это направление фармакокоррекции гипоксических состояний связано с разработкой средств, купирующих развитие острой горной болезни и других синдромов дезадаптации к гипоксии. В модельных и реальных условиях оценивалась эффективность средств, усиливающих выделительную функцию почек – фуросемида, верошпирона, и нормализующих кислотно-основное состояние в условиях респираторного алкалоза – ацетазоламида, хлористого аммония, лимонной и аскорбиновой кислот [54], корректоров обмена электролитов – поляризующей смеси, санасола, минералокортикоидов, панангина [35].

В современной фармакологии существуют различные классификации антигипоксантов. Наиболее удобная для клинической практики классификация предполагает выделение 5-ти групп препаратов, для которых антигипоксическое действие является главным или преобладающим:

Классификация антигипоксантов [42, 43, 44].

1. Ингибиторы окисления жирных кислот.

1.1. Прямые ингибиторы карнитин-пальмитоилтрансферазы-I – *пергекселин, этомоксир*.

1.2. Парциальные ингибиторы окисления жирных кислот – *ранолазин, триметазидин, мельдоний*.

1.3. Непрямые ингибиторы окисления жирных кислот – *карнитин*.

2. Сукцинат-содержащие и сукцинат-образующие средства.

2.1. Сукцинат-содержащие препараты – *реамберин, ремаксол, цитофлавин, оксиметилэтилтиридина сукцинат (мекесидол)*;

2.2. Сукцинат-образующие средства – *натрия оксибутират, полиоксифумарин, конфумин*.

Естественные компоненты дыхательной цепи – *цитохром C, убихинон, энергостим*.

Искусственные редокс-системы – *олифен*.

Макроэргические соединения – *креатинфосфат*.

Однако эта классификация рассматривает только препараты, которые могут быть использованы при гипоксии, сопровождающей развитие различной патологии, без учета состояний, характеризующихся повышением энергопотребностей клетки выше максимально возможной энергопродукции. Учитывая это, чаще используется классификация препаратов с первичным и вторичным антигипоксическим действием, основанная на происхождении и направленности действия:

1. Антигипоксанты прямого (специфического) действия:

1.1. Производные гуанилтиомочевина – *гутимин, амтизол*;

1.2. Полифенолы – *олифен, кверцетин, корвитин, липофлавон*;

1.3. Препараты, улучшающие энергоснабжение, уменьшающие выраженность гипоксии – *триметазидин, мельдоний, левокарнитин, магния оротат, таурин*;

1.4. Ферменты и коферменты дыхательной цепи переноса электронов – *цитохром C, убихинон (коэнзим Q), энергостим*;

1.5. Производные янтарной кислоты – *мексидол, мексикор, лимонтар, реамберин, янтарин*;

1.6. Препараты, способствующие образованию янтарной кислоты – *кислота глутаминовая, калия/магния аспарагинат*;

1.7. Субстраты для утилизации по альтернативным метаболическим путям – *АТФ, АТФ-ЛОНГ, креатинфосфат*;

1.8. Производные ГАМК – *натрия оксибутират, фенибут, пантогам, аминалон*;

1.9. Витаминные препараты – *витамины Е (токоферол), С (кислота аскорбиновая), РР (никотинамид), а также витамины группы В (рибофлавин, пиридоксин)*;

1.10. Невитаминные кофакторы – *карнитин, рибоксин, калия/магния оротат, липоевая кислота*;

1.11. Препараты фосфатидилхолина – *липин, лецитин*;

1.12. Антиоксиданты – *церулоплазмин, цереброкурин, препараты селена, тиотриазолин, карнозин, солкосерил, актовегин*.

2. Антигипоксанты непрямого действия:

2.1. Периферические вазодилататоры – *пентоксифилилин, винпоцетин и др.*;

2.2. Антагонисты кальция – *циннаризин, флунаризин*;

2.3. β -адреноблокаторы – *пропранолол, метопролол, бетаксолол; α, β -адреноблокатор — карведилол*.

Антигипоксанты прямого действия непосредственно влияют на течение энергетических процессов в клетке, активируя аэробное окисление, а также анаэробный гликолиз, усиливая утилизацию лактата и пирувата, активируя ферменты биологического окисления. Они также восстанавливают транспорт электронов в дыхательной цепи, стимулируют альтернативные пути метаболизма. У большинства препаратов выявлены также антиоксидантные свойства.

Антигипоксанты непрямого действия влияют на внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы косвенно, облегчая переход кислорода из крови в ткани, улучшая кровоснабжение тканей или замедляя скорость протекания метаболических процессов [22].

6. Методы моделирования гипоксии в биомедицинских исследованиях

В биомедицинских (доклинических) исследованиях обычно моделируются несколько видов гипоксии:

– гипоксическая (гипобарическая, связанная с изменением барометрического давления вдыхаемого воздуха; нормобарическая, связанная с понижением процентного содержания кислорода во вдыхаемом воздухе за счет изменения его газового состава при нормальном барометрическом давлении; изоляционная гиперкапническая, связанная как со снижением содержания кислорода в рециркулирующей воздушной смеси из-за его поглощения при дыхании, так и повышением парциального давления CO_2 за счет накопления выдыхаемого воздуха);

– анемическая (постгеморрагическая, вызванная массивным кровотечением с резким снижением содержания гемоглобина и количества эритроцитов; метгемоглобиновая, вызванная введением веществ-метгемоглобинообразователей, нарушающих способность гемоглобина переносить кислород);

– гистотоксическая (связанная с блокадой работы цитохромового каскада переноса электронов цианидами или иными токсикантами).

Необходимо отметить, что методов создания респираторной и гипоксии в арсенале биомедицинских исследований практически нет, а циркуляционная гипоксия рассматривается как следствие моделирования острой или хронической сердечной недостаточности у лабораторных животных, что затрудняет перенос результатов биомедицинских исследований из эксперимента в клиническую практику.

Наиболее просто в эксперименте на мелких лабораторных животных моделируется гипоксическая гипоксия, однако именно она менее всего соответствует основным клинически значимым гипоксическим состояниям. В то же время, ее создание у крупных лабораторных животных технически затруднено.

Ниже (Таблица 1) представлены данные сопоставления разных методов моделирования гипоксических состояний у мелких и крупных лабораторных животных.

Анализ таблицы 1 показывает, что для выявления антигипоксической активности потенциальных лекарственных средств более приемлемым является моделирование гипоксической гипоксии у мелких лабораторных животных. В то же время, исследования на крупных лабораторных животных могут быть важными при оценке эффективности медицинских технологий лечения клинически значимых кислородзависимых состояний (шоковые и ишемические состояния, цереброваскулярные заболевания и циркуляторные расстройства). Моделирование таких состояний у крупных животных зачастую не носит критический для их жизни характер, что позволяет проводить исследования в динамике патологического или реабилитационного процесса.

Таблица 1 – Методы моделирования гипоксических состояний у лабораторных животных

Вид гипоксии (способ формирования)	Мелкие лабораторные животные	Крупные лабораторные животные
Гипоксическая гипобарическая гипоксия (подъем животных в проточных барокамере)	Время жизни на предельной высоте Высотный порог	Технически сложно реализуемо, не применяется в доклинических исследованиях
Гипоксическая нормобарическая гипоксия (использование гипоксических газовых смесей, мембранных гипоксикаторов)	Применяется для исследования как острого, так и хронического гипоксического воздействия, гипоксических тренировок, оценки процессов реабилитации	Может быть реализовано для некоторых видов животных, не применяется в доклинических исследованиях
Гипоксическая гиперкапническая гипоксия (создание гермообъема с насыщением выдыхаемого воздуха)	Технически просто создается, но сложно дифференцировать гипоксическое действие от гиперкапнии. Используется для подтверждения антигипоксической активности лекарственных средств.	Создание технически возможно, но сложно дифференцировать собственно гипоксическое действие от гиперкапнии. В биомедицинских исследованиях не применяется.
Респираторная гипоксия (экспериментальный отек легких, бронхиальная астма)	Гипоксия рассматривается как критерий достижения патологических состояний, а не	Адекватных моделей не существует.

Вид гипоксии (способ формирования)	Мелкие лабораторные животные	Крупные лабораторные животные
	как самостоятельный фактор	
Анемическая гипоксия (критическая кровопотеря)	На мелких животных не создается	Обычно формируется у собак (особенности поверхностно расположенных сосудов), применяется при оценке противошокового действия препаратов.
Гемическая гипоксия (введение метгемоглобин-образователей, нарушающих сродство гемоглобина к кислороду)	Введение метиленового синего. Применяется для оценки антидотной активности в отношении цианидов	В биомедицинских исследованиях не применяется.
Циркуляторная гипоксия (экспериментальная острая или хроническая сердечная недостаточность)	Гипоксия рассматривается как осложнение патологических состояний, а не как самостоятельный фактор	В биомедицинских исследованиях не применяется.
Гипоксия нагрузки (выполнение тестов физической нагрузки до отказа)	Тесты на анаэробную работоспособность животных (плавание в грузом 10 и более % от массы тела)	Мини-пиги (бег на тредбане до отказа)
Гистотоксическая гипоксия (введение блокаторов митохондриального окисления)	В биомедицинских исследованиях практически не применяется.	В биомедицинских исследованиях не применяется.
Локальная гипоксия жизненно важных органов (перевязка магистральных для данного органа сосудов)	Ишемия мозга (перевязка сонных артерий) Ишемия миокарда (перевязка коронарных сосудов, модель изолированного сердца по Лангендорфу)	Ишемия мозга (перевязка сонных артерий) Ишемия миокарда (перевязка коронарных сосудов)

При анализе методических подходов к моделированию гипоксических состояний, обращает на себя внимание отсутствие единого для разных моделей методического подхода к оценке выраженности созданного гипоксического состояния. Чаще всего о выраженности гипоксического состояния судят по условной "степени экстремальности" воздействия. Наиболее просто она оценивается для гипоксической гипоксии, поскольку условно может быть определена по степени дефицита парциального давления кислорода во вдыхаемом воздухе.

В таблице (Таблица 2) представлены показатели, отражающие изменение парциального давления газов во вдыхаемом и альвеолярном воздухе, а также содержание оксигемоглобина крови на различных высотах. Для неадаптированного к гипоксии человека тяжелая гипоксия начинается с высоты 6 км, о чем свидетельствует появление значений резервного времени жизни.

Таблица 2 – Характеристика газового состава воздуха и некоторые показатели газообмена неадаптированного к гипоксии здорового человека по высотам (по: [41])

Высота (км)	В (мм рт. ст.)	pO ₂ (мм рт. ст.)	pH ₂ O (мм рт. ст.)	pCO ₂ (мм рт. ст.)	pAO ₂ (мм рт. ст.)	pACO ₂ (мм рт. ст.)	HbO ₂ (%)	Резерв ное время (мин)
0	760	159	13,8	0,23	109	40	98	
1	674	140	9,9	0,20	91	40	96	
2	596	125	5,5	0,18	77	38	92	
3	526	110	3,7	0,16	64	36	88	
4	462	96	2,3	0,14	53	34	84	
5	405	85	1,5	0,12	43	32	72	
6	354	75	0,9	0,11	35	29	65	30-60
7	308	65	0,5	0,09	29	26	57	5-20
8	267	56	0,2	0,08	23	23	38	2-11
9	230	49	0,1	0,07	17	21	28	1-3
10	199	43	0	0,06	14	18	18	0,3-0,4

Примечание: В - барометрическое давление; HbO₂ - содержание оксигемоглобина в крови.

Такой подход позволяет соотносить результаты, полученные при нормобарической и гипобарической гипоксической гипоксии. Однако уже для третьего вида гипоксической гипоксии - гиперкапнической, прямое сопоставление результатов исследования по дефициту кислорода во вдыхаемом воздухе становится не корректной, так как не учитывается неблагоприятное воздействие самой гиперкапнии.

Еще более проблематичным становится оценка тяжести гипоксического воздействия при других методах моделирования гипоксии. Так, о тяжести респираторной гипоксии условно можно говорить по степени дефицита оксигенации гемоглобина, и по этому показателю ее тяжесть может быть соотнесена с гипоксической гипоксией.

О тяжести анемической гипоксии можно говорить по степени экспериментальной кровопотере. Постфактум, о степени кровопотери можно судить

по показателю условного дефицита циркулирующей плазмы крови, рассчитываемому по изменениям значений гемоглобина и гематокрита. Однако критерии соотнесения с другими методами гипоксического воздействия не разработаны.

В клинической практике о тяжести циркуляторной гипоксии обычно судят по напряжению кислорода в артериальной и венозной крови больного, однако критерии их оценки в большей степени ориентированы на степень тяжести состояния пациента, но не на выраженность гипоксии. Каких-либо критериев соотнесения тяжести циркуляторной гипоксии с другими видами гипоксического воздействия не разработано.

Для остальных видов гипоксии (гемическая, гистотоксическая, гипоксия нагрузки) критериев оценки ее тяжести или соотнесения с другими методами моделирования не разрабатывались.

Неэффективными оказались также попытки оценивать тяжесть гипоксического состояния по физиологическим показателям (тахикардия, частота и минутный объем дыхания, ЭКГ, энцефалограмма). Они позволяют косвенно подтвердить возникновение гипоксического состояния, но, в силу высокой зависимости этих показателей от состояния и реактивности симпато-адреналовой и гипофизарно-надпочечниковой систем, не позволяют дифференцировать выраженность собственно гипоксии, так как отражают степень активации и истощения регуляторных механизмов, выраженность стресс-реакции.

6.1. Моделирование гипоксии на мелких лабораторных животных

Модели гипоксии должны наиболее точно отражать причинно-следственный механизм нарушений, связанный с кислородной недостаточностью, быть достаточно простыми и воспроизводимыми. Наиболее просто воспроизводятся модели острой гипоксии на мелких лабораторных животных.

Однако физиологические и биохимические механизмы, лежащие в основе формирования разных видов гипоксических состояний, могут существенно различаться. В связи с этим антигипоксическая активность, выявляемая на какой-либо одной модели гипоксии, не обязательно должна воспроизводиться на других

моделях. Корреляционная связь (r) между разными типами гипоксий и эффективностью действия на них одних и тех же антигипоксантов может существенно различаться (Таблица 3).

Таблица 3 – Коэффициенты корреляций между различными видами гипоксий (по: [34])

Виды гипоксии	ОГГ	ОНГ	ОГемГ	ОГисГ	ИМ
ОГГ		0,5	0,929	0,476	0,738
ОНГ	0,5		0,571	0,452	0,5
ОГемГ	0,929	0,571		0,429	0,631
ОГисГ	0,476	0,452	0,429		0,283
ИМ	0,738	0,5	0,631	0,283	

Примечание: ОГГ – острая гипобарическая гипоксия, ОНГ – острая нормобарическая гипоксия, ОГемГ – острая гемическая гипоксия, ОГисГ – острая гистотоксическая гипоксия, ИМ – ишемия мозга.

6.1.1. Моделирование гипобарической гипоксии.

Для создания биологических моделей гипобарической гипоксии (вплоть до экстремального ее уровня) у лабораторных животных необходимо формирование как минимум моделей двух типов:

- биологической модели с пониженной резистентностью нервной ткани к энергодефициту, не компенсируемому напряжением кислородтранспортной системы организма;
- биологической модели с проявлениями исходного напряжения и истощения регуляторных и энергопродуцирующих механизмов внецентральной локализации (нарушения функции печени, легких, сердца, кроветворных тканей, иммунитета).

Создание биологических моделей первого типа возможно путем направленной селекции низко устойчивой к гипоксии части популяции мелких лабораторных животных (в том числе, выведение и поддержание специальных линий). Исходно сниженная резистентность нервной ткани к энергодефициту у животных специальных линий делает их интересными моделями не только для испытания классических антигипоксантов, но и фармакомоделирования процессов восстановления после черепно-мозговых травм, острых или хронических нарушений

мозгового кровообращения, нейроинфекций и нейроинтоксикаций, оперативных вмешательств на ЦНС, критической гипертермии (тепловые и солнечные удары).

В результате селекции по устойчивости к острой гипобарической гипоксии животных из аутбредной популяции крыс (филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) были получены линии животных с высокой (ВУ/SmY) и низкой (НУ/SmY) резистентностью к гипоксии. Линия высокоустойчивых животных характеризуется как высоким высотным порогом (более 14000 м), так и высоким «временем жизни» на критической для крыс высоте 11500 м (более 20 минут). Линия низкоустойчивых животных характеризуется низким «временем жизни» на критической высоте (менее 80 секунд) при типичном для среднеустойчивых к гипоксии крыс высотном пороге (12000-12500 м). Вероятно, для линии низкоустойчивых животных характерен какой-либо неврологический дефицит, приводящий к снижению времени их жизни на высоте.

В случае отсутствия специализированных линий низко- и высокоустойчивых к гипоксии животных, такие группы могут быть сформированы при предварительном скрининге большой группы животных на группы устойчивости. Для этого предварительно животные подвергаются гипоксическому воздействию подъемом в барокамере на критическую высоту (для мышей – 10500-11000 м, для крыс – 11500-2000 м). Скорость подъема – 120-180 м/с (при такой скорости у животных практически не включаются срочные адаптационные реакции). Регистрируемые показатели – время появления второго агонального вдоха (резервное время, Tr), после чего животное «спускается» до уровня нормобарии. Затем составляют частотную кривую распределения животных по времени пребывания на площадке. Она асимметрична и смещена влево (что отражает степень экстремальности гипоксического воздействия). Для низкоустойчивых животных этот показатель, как правило, составляет менее 3 минут, для высокоустойчивых он должен быть в 3 раза выше, то есть более 9 минут. Повторное включение животных в исследование возможно не ранее чем через 12-15 дней после предварительного тестирования.

В фармакологических исследованиях на низко устойчивых к гипоксии животных должны изучаться препараты с антигипоксическим, антиоксидантным,

ноотропным, противоастеническим, нейропротекторным действием, а также средства повышения физической работоспособности.

Второй подход, связанный со снижением резистентности к гипоксии при избыточном напряжении и истощении регуляторных и энергопродуцирующих механизмов, может быть использован для подтверждения адекватности биологического моделирования патологических процессов (например, бронхообструктивных заболеваний, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, гепатитов, аутоиммунных поражений, радиационных поражений, поражений экотоксикантами).

Проведение тестирования биологических моделей на индивидуальную устойчивость к гипоксическому воздействию до и после применения средств лечебно-профилактического или реабилитационного действия позволит объективизировать динамику патогенеза (или саногенеза) и более качественно оценить эффективность новых лекарственных средств или новых медицинских технологий (включая клеточные технологии). В исследованиях, проводимых в рамках этого направления, целесообразно использовать линии лабораторных животных с высокой резистентностью к гипоксии, чтобы исключить влияние фактора низкой индивидуальной гипоксической устойчивости на результат последующего тестирования.

Достаточно проблемным видится и выбор адекватного показателя гипоксической устойчивости животных. В высотной физиологии таких показателей несколько: высотный порог, время жизни (для человека аналогом является резервное время пребывания на высоте до потери сознания), время поддержания позы (для человека аналогом является время сохранения деятельности). Дополнительным критерием устойчивости к гипоксии является стойкость гипоксических изменений в постгипоксическом периоде, которые отражаются таким показателем, как время восстановления позы животного при спуске с высоты. Также в качестве дополнительного критерия могут использоваться некоторые биохимические показатели, в первую очередь – лактат крови.

Для оценки антигипоксической активности лекарственных средств традиционно используется два подхода: оценка влияния препарата на среднегрупповые показатели индивидуальной гипоксической устойчивости, а также сдвиг в популяционной структуре устойчивости (изменение долей низко-, средне- и высокоустойчивых животных) [38]. Как правило, первый подход используется для оценки однократного применения препарата, второй – курсового применения лекарственных средств.

6.1.1.1. Определение высотного порога животных.

При исследовании высотного порога лабораторные животные (крысы) поднимаются в барокамере со скоростью 120-180 м/с (скорость подъема должна быть фиксированной для конкретной барокамеры) до начальной площадки 9000 м (пороговая величина устойчивости для животных с наличием заболеваний или постоперационных состояний), находятся на этой высоте 5 минут (300 секунд), и вновь поднимают с выбранной скоростью до следующей площадки на 1000 м выше, и так далее до фиксирования у животного агонального дыхания. Высота, на площадке которой было зафиксировано агональное дыхание, и является индивидуальным высотным порогом для данного животного. Однако, полученные таким образом данные являются дискретными, ступень повышения порога – 1000 м, они не учитывают фактическое время жизни животных на пороговой высоте.

Для перевода дискретной шкалы в непрерывную могут быть использованы 2 подхода: присвоение каждому временному промежутку (например, 100 секунд) пребывания на высоте балла (Таблица 4) или использование дробной высотной шкалы, при которой целая часть равна высоте площадки в километрах, а дробная часть равна отношению длительности жизни на этой высоте в секундах к длительности площадки [63].

Например, крыса прожила на площадке 13 000 м 120 секунд при длительность площадки 300 секунд. Тогда высотный порог животного будет равен 13,4 км, а его устойчивость к гипоксии по высотному порогу будет равна 14 баллам. По граничному времени площадки на соответствующей высоте может быть оценена

выживаемость животных как показатель популяционной устойчивости к гипоксии данного уровня (Рис. 2).

Таблица 4 – Балльная оценка устойчивости к гипоксии по критерию высотного порога для крыс

Высота	Время жизни, секунды		
	100	200	300
9000	1	2	3
10000	4	5	6
11000	7	8	9
12000	10	11	12
13000	13	14	15
14000	16	17	18
15000	19	20	21

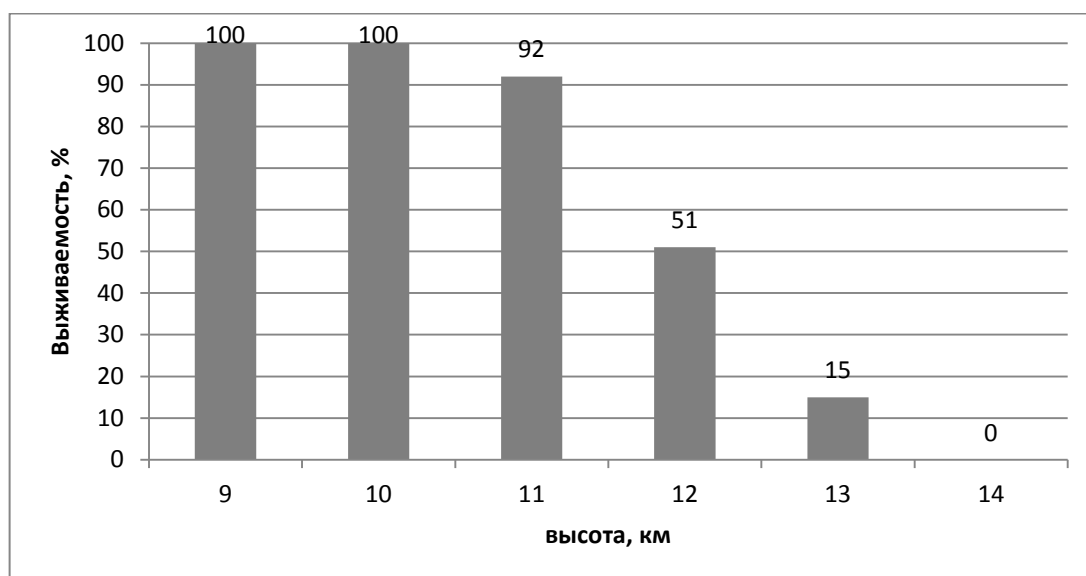


Рис. 2. Выживаемость крыс (площадка 300 секунд) на различных высотах.

Проведенный дисперсионный анализ показал, что на значения высотного порога не оказывают существенного влияния факторы линейности животных (нелинейные, линии WAG, Wistar, коэффициент детерминации модели $D=0,03$, $p=0,33$) и их пола (самки, самцы, коэффициент детерминации модели $D=0,06$, $p=0,29$).

Статистические характеристики высотного порога для крыс соответствуют основным требованиям нормального распределения (среднее значение, мода и

медиана распределения близки друг другу, параметры эксцесса и асимметрии в пределах нормативных значений).

Представленная частотная кривая распределения значений показателя высотного порога (Рис. 3) подтверждает соответствие этого параметра нормальному статистическому распределению.

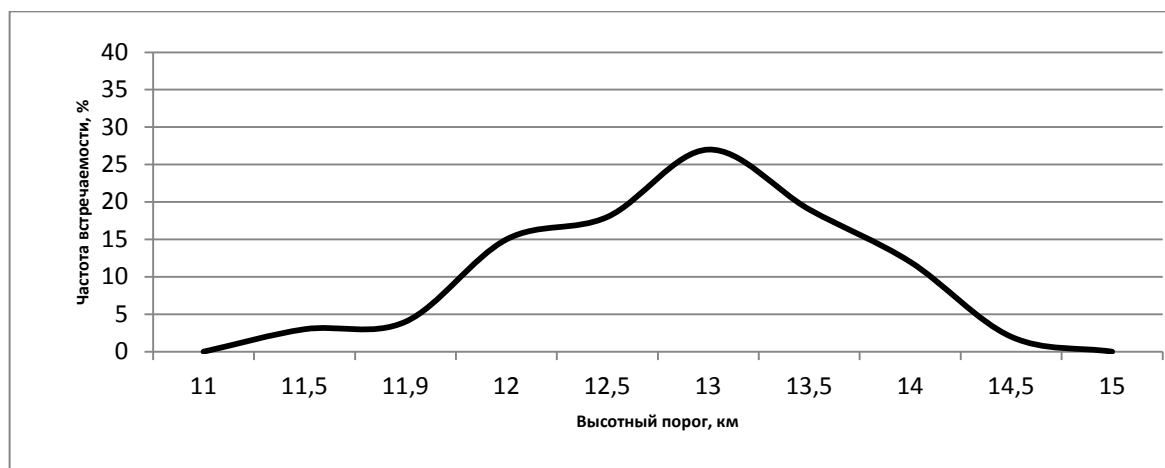


Рис. 3. Частотная кривая распределения значений высотного порога крыс.

Таким образом, результаты, полученные при исследовании гипоксической устойчивости крыс по критерию высотного порога, могут быть соотнесены с генеральной совокупностью животных, для них возможно прямое соотнесение результатов различных серий исследований, в том числе при исследованиях антигипоксической активности лекарственных средств. Статистическая обработка этого показателя любыми методами, в том числе — параметрическими, является корректной. Для высотного порога характерна низкая вариативность показателя (коэффициент вариации 5%), что отражает популяционную стабильность показателя.

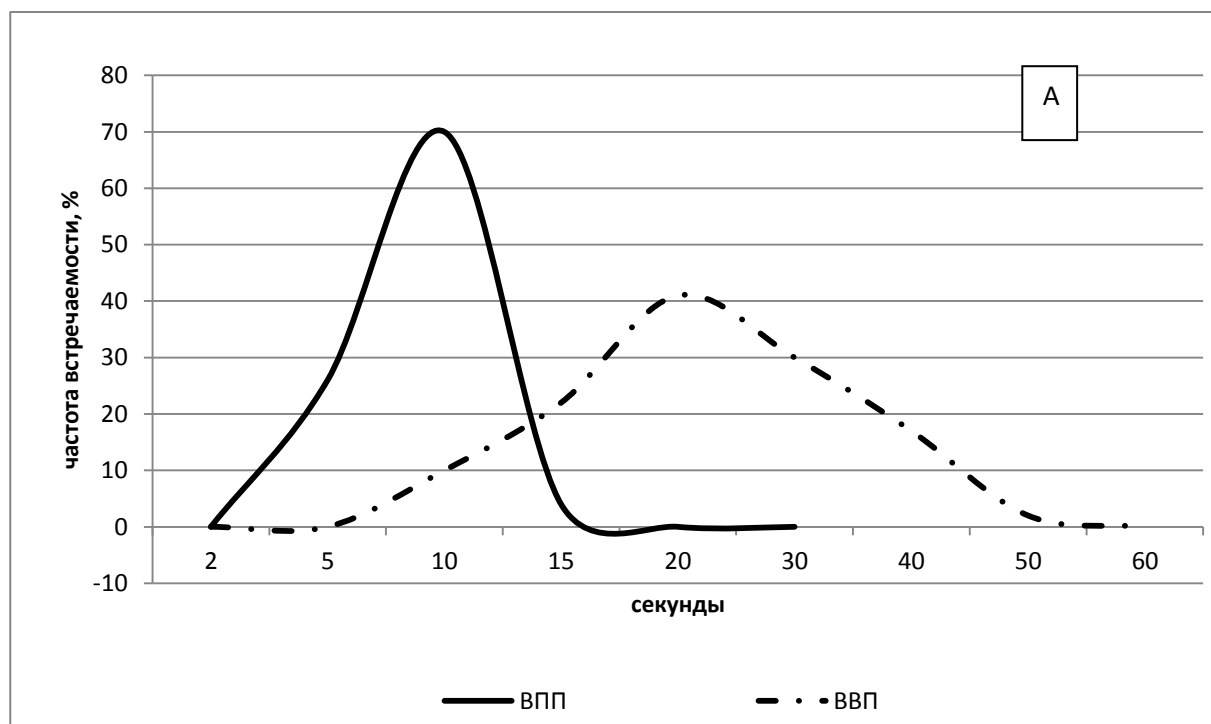
Границами диапазонов устойчивости к гипоксии являются точки перегиба кривой (11,9 и 13,5 км). Следовательно, животные, высотный порог которых менее 12 км, будут относиться к низко устойчивым к гипоксии, от 12 до 13,5 км — к среднеустойчивым, более 13,5 км — высоко устойчивым животным. Для популяции здоровых крыс структура высотной устойчивости будет иметь следующий вид: до 10% крыс будут иметь низкую устойчивость, около 15% — высокую, остальные 75% — среднюю устойчивость к гипоксии.

При исследовании антигипоксической активности лекарственных средств в случае высокой антигипоксической активности должно отмечаться повышение высотного порога и увеличение доли высокоустойчивых животных при снижении доли низко устойчивых. При умеренной антигипоксической активности могут или умеренно повышаться среднегрупповые значения высотного порога, или незначительно меняться соотношения между подгруппами животных по уровню устойчивости к гипоксии.

6.1.1.2. Определение комплексного показателя индивидуальной устойчивости животных экстремальной гипоксии (ИУГ).

Оценка индивидуальной устойчивости животных к экстремальной гипоксии связана с комплексным учетом основных показателей: время жизни (ВЖ), время поддержания позы (ВПП), время восстановления позы (ВВП), фиксируемых при барокамерном подъеме животных на критическую высоту (для мышей – 10500 м, для крыс – 11500 м).

Особенности статистического распределения показателей (частотный анализ) представлены на рисунке (Рис. 4).



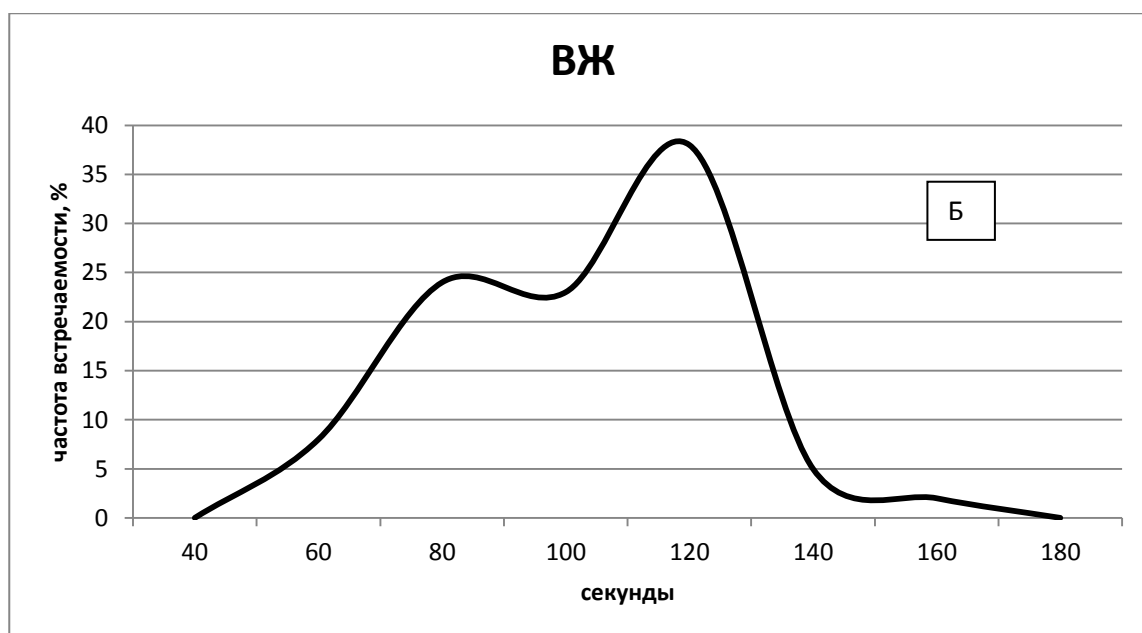


Рис. 4. Кривые частотного распределения значений показателей индивидуальной устойчивости животных к гипоксии (А – ВПП и ВВП, Б – ВЖ).

Анализ рисунка (Рис. 4) показывает, что применяемое гипоксическое воздействие является экстремальным. Об этом свидетельствуют резкий обрыв значений времени первого падения и времени жизни животных в области более высоких значений, характеризующих устойчивость животных, дополнительный локальный максимум на кривой времени жизни в области низких значений. Асимметрия распределения времени восстановления позы в сторону более высоких значений, также отражает низкую переносимость гипоксического воздействия.

Так как кривые распределения этих показателей (ВПП, ВЖ, ВВП) далеки от кривой нормального распределения, обычные статистические методы обработки результатов (оценка достоверности различий, корреляционный, регрессионный и мультифакторный анализы) к этим показателям не могут быть применены. В связи с этим для статистической обработки результатов исследований в условиях гипоксического воздействия нами были использованы методы дисперсионного факторного анализа и ранговой корреляции по Спирмену, не зависящие от вида статистического распределения анализируемых показателей.

Корреляционный анализ показал, что параметры устойчивости животных к гипоксическому воздействию (ВПП, ВЖ, ВВП) являются не зависимыми друг от друга.

Для оценки индивидуального уровня гипоксической устойчивости может быть использован балльный метод шкалирования, основанный на характеристиках кривых распределения анализируемых параметров (Ошибка! Источник ссылки не найден.). С учетом того, что традиционно значимость времени жизни оценивается исследователями выше (а многие вообще не учитывают остальные показатели), для этого показателя вводится весовой коэффициент 2. Оценка индивидуальной устойчивости животных к гипоксии проводится путем присвоения баллов экспериментально полученным данным с учетом весовых коэффициентов и их суммирования.

Таблица 5 – Балльные шкалы оценки показателей индивидуальной гипоксической устойчивости лабораторных животных

Показатель, ед. измерения	Баллы					Весовой коэффициент
	1	2	3	4	5	
ВПП, с	До 5	6-9	10	11-14	15 и более	1
ВЖ, с	До 60	61-80	81-100	101-120	121 и более	2
ВВП, с	41 и более	31-40	21-30	11-20	10 и менее	1

Частотная кривая распределения интегрального показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии (ИУГ) представлена на рисунке (Рис. 5).

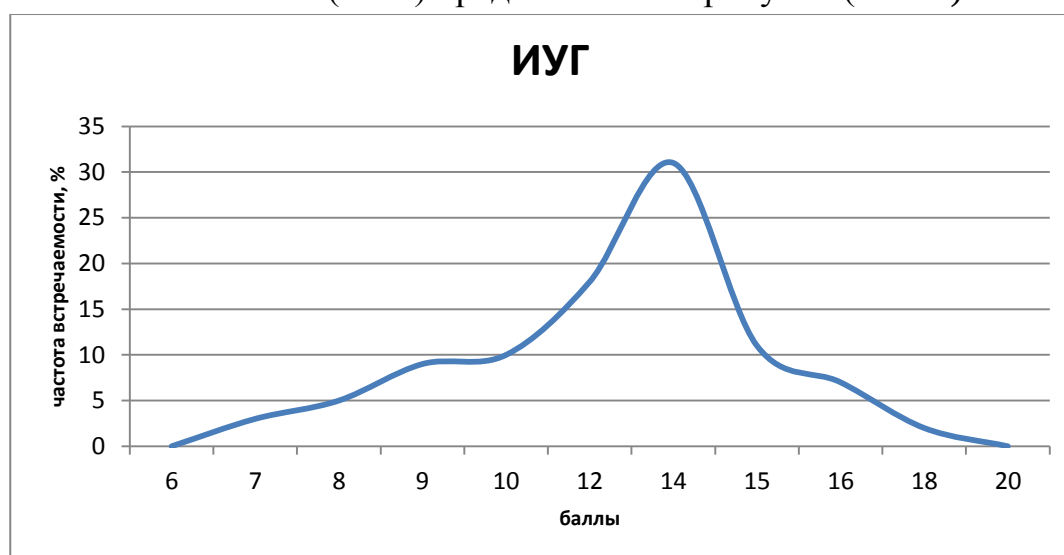


Рис. 5. Частотное распределение значений показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии животных без применения средств фармакологической коррекции.

Анализ рисунка (Рис. 5) показывает, что частотная кривая распределения значений показателя ИУГ близка к кривой нормального распределения, и,

следовательно, этот показатель может быть использован как интегральный показатель устойчивости лабораторных животных к гипобарической гипоксии. При этом точки перегиба частотной кривой позволяют статистически корректно произвести распределение животных на подгруппы по уровню устойчивости к гипоксии: до 9 баллов включительно – низкая устойчивость к гипоксии (17% наблюдений), от 10 до 14 баллов включительно – средняя устойчивость к гипоксии (63% наблюдений), 15 и более баллов – повышенная устойчивость к гипоксии (20% наблюдений).

В условиях фармакологической коррекции значения показателей ВПП и ВВП в основном не выходят за пределы диапазонов, указанных выше (Таблица 5). В отдельных случаях ВПП может превышать 60 секунд, а ВВП практически быть равным нулю. В таких случаях показатели получают оценку в 10 баллов. Показатель времени жизни на высоте 11500 м в условиях фармакологической коррекции увеличивается до 500 и более секунд. В этом случае для показателя времени жизни вводятся дополнительные балльные оценки: от 161 до 200 секунд – 6 баллов, от 201 до 300 секунд – 7 баллов, от 301 до 350 секунд – 8 баллов, от 351 до 400 секунд – 9 баллов, более 400 с – 10 баллов; более 500 с – 11 баллов, более 600 с – 12 баллов, более 700 с – 13 баллов, более 800 с – 14 баллов, более 900 с – 15 баллов, более 1200 с – 20 баллов.

6.1.2. Моделирование нормобарической гипоксии.

Моделирование нормобарической гипоксии подразумевает создание обедненной азотно-кислородной газовой смеси, подаваемой при нормальном барометрическом давлении для дыхания животным.

По условиям проведения моделируемая нормобарическая гипоксия может быть острой и хронической. Технически моделирование нормобарической гипоксии может осуществляться или в проточной барокамере с поглотителем CO_2 , или с использованием различных гипоксикаторов.

6.1.2.1. Моделирование острой нормобарической гипоксии.

6.1.2.1.1. В проточной камере.

Моделирование острой нормобарической гипоксии проводят в проточной камере с помощью обедненной азотно-кислородной (96-97% азота, 3-4% кислорода) при температуре окружающей среды 18-20 °С и скорости подачи газовой смеси в первую минуту не менее 10 л/мин, и 1,5-2 л/мин на протяжении остального времени исследования. В качестве поглотителя углекислого газа используется 30% раствор КОН, помещаемый в плоской емкости под решетку на дне камеры. Животных через 40-60 минут после введения исследуемого вещества помещают в камеру, которую герметизируют. После чего с фиксированной скоростью подают предварительно подготовленную обедненную газовую смесь. Регистрируют время гибели животных по прекращению дыхания.

6.1.2.1.2. С использованием гипоксикатора.

Исследования проводят в гипоксикамере (например, «БИО-НОВА-204»). Окружающий воздух, очищенный фильтром, сжимается компрессором и подается на вход мембранного модуля. Полупроницаемые мембраны обладают свойством селективного пропускания молекул кислорода и азота воздуха. На выходе мембранного модуля получается воздух с уменьшенным содержанием кислорода. С выхода газоразделительного блока газ поступает по шлангу в камеру (объем 75 л) нормобарической гипоксии. Установка обеспечивает плавную регулировку концентрации кислорода от 2 до 10% в гипоксической газовой смеси (ГГС). Производительность ГГС – не менее 5 л/мин. Процентное содержание кислорода в ГГС, подаваемой животным, регулируется и устанавливается с помощью газоанализатора, который встроен в установку.

Для создания острой нормобарической гипоксии используется проба нарастающей гипоксии, в ходе которой на приборе выставлялось минимальное содержание кислорода в газовой смеси (3%), и животные подвергались гипоксическому воздействию в ходе вывода прибора на максимальный уровень гипоксии. В гипоксическую камеру помещали до 30-ти мышей одновременно контрольной и опытной групп. Для каждого животного регистрировали критический процент кислорода в ГГС, который вызывал его гибель.

Стандартизированные условия эксперимента в гипоксикамере «БИО-НОВА-204» представлены на рисунке (Рис. 6).

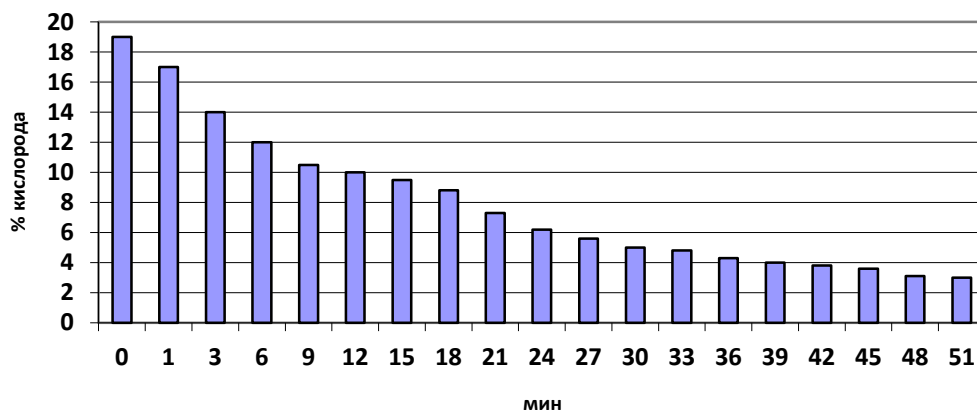


Рис. 6. Динамика процентного содержания кислорода в гипоксической газовой смеси при выполнении гипоксической пробы.

Установлено, что гибель лабораторных животных наблюдается при содержании кислорода в ГГС от 5,5% до 3,4% [56].

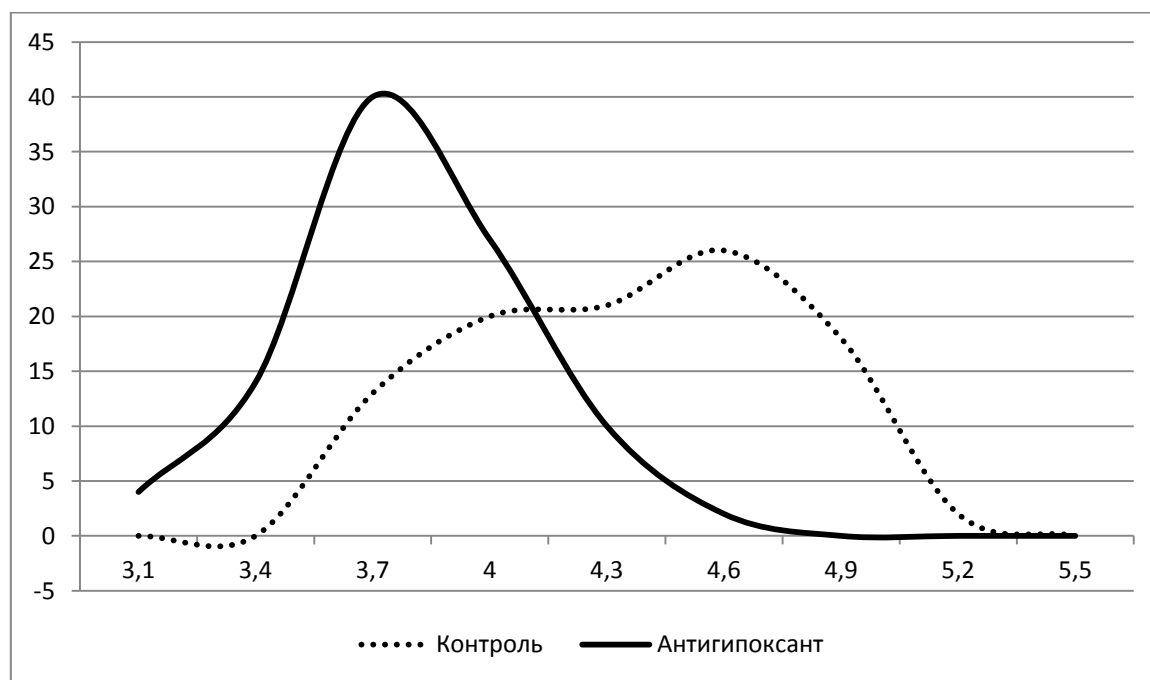


Рис. 7. Частотная кривая распределения гибели животных в зависимости от содержания кислорода в ГГС в контрольной группе и при применении антигипоксикантов.

Анализ данных (Рис. 7) показывает, что в контрольной группе кривая распределения достаточно далека от вида кривой нормального распределения, имея частотный «завал» в области более высоких значений содержания кислорода, что соответствует более низкой устойчивости к гипоксии. Анализ кривой по точкам

перегиба позволяет определить границы диапазонов устойчивости: для высокоустойчивых животных гибель животных происходит при диапазоне содержания кислорода в ГГС 3,7% и менее, диапазону средней устойчивости соответствует содержание кислорода в ГГС от 3,8 до 4,6 %, а диапазону низкой устойчивости к гипоксии – содержание кислорода в ГГС – 4,9% и более. В контрольной группе животных высокоустойчивых животных было в среднем 13%, среднеустойчивых – 67%, и низкоустойчивых – 20%.

При фармакологической коррекции нормобарической гипоксии соединениями с известной антигипоксической активностью происходит существенное изменение структуры устойчивости: на фоне применения антигипоксантов 61% животных попадают в группу высокоустойчивых животных и 39% в группу со средней высотной устойчивостью, При этом в группе с низкой устойчивостью к гипоксии не осталось ни одного животного.

6.1.2.2. Моделирование хронической нормобарической гипоксии.

Моделирование хронического гипоксического воздействия осуществляется с использованием гипоксикатора, позволяющего длительное время (до 20 дней) поддерживать заданные условия обедненной газовой смеси. Если целями конкретного исследования не предусмотрено иное (например, при оценке гипоксической устойчивости животных с экспериментальным инфарктом миокарда или дозированной черепно-мозговой травмой), то используется газовая смесь с 10% кислорода, что примерно соответствует подъему животного на высоту 6 000 м.

В ходе хронического гипоксического воздействия осуществляется наблюдение за поведением животных, их реакция на предъявляемые внешние стимулы (свет, звук, вода, пища, другое животное, посторонний предмет яркого цвета или несущий особую запаховую метку). Допускается кратковременное (до 30 минут) извлечение животного из гипоксических условий для выполнения отдельных исследований и взятия биологического материала.

Оценку антигипоксической активности исследуемого соединения проводят по динамике анализируемых показателей в сравнении с контролем и группой эталонного антигипоксанта.

В исследованиях, предусматривающих оценку адаптации животного к хроническому гипоксическому воздействию, финальное тестирование устойчивости к гипоксии осуществляется в режиме теста острой нормобарической гипоксии (раздел 6.1.2.1.2.) с регистрацией содержания кислорода в газовой смеси на момент гибели животного.

6.1.3. Моделирование гиперкапнической гипоксии.

Для воспроизведения этой формы гипоксии не нужно сложной аппаратуры. Животных (предпочтительнее мышей) по одиночке размещают под стеклянными банками одинакового объема, которые герметично закрывают. По мере потребления животными кислорода, его содержание во вдыхаемом воздухе снижается, а углекислого газа – повышается, что и приводит животных к гибели.

Контроль обязательно проводят параллельно с опытом. Регистрируют продолжительность жизни животных, и по ней судят об эффективности исследуемых веществ.

6.1.4. Моделирование респираторной гипоксии.

Основными моделями респираторной гипоксии являются модель бронхиальной астмы и модель острого отека легких.

6.1.4.1. Моделирование бронхиальной астмы.

Основной патогенетической моделью бронхиальной астмы в биомедицинских исследованиях является овальбуминовая модель. Для ее формирования крысам вводят подкожно адсорбированный на геле $\text{Al}(\text{OH})_3$ 1:100 овальбумин на 1-й и 7-й дни [74]. Одновременно с введением овальбумина в качестве адъюванта осуществляют внутрибрюшинные инъекции препарата «Бронхо-мунал», предварительно растворенного в 2 мл физиологического раствора, в дозе 2,5 мг/кг [14]. Начиная с 15-го дня, проводили ингаляции 5% раствора овальбумина в течение 15 минут каждые три дня (групповая процедура, 1 ингаляция – 10 крыс) с помощью небулайзера «F 1000» (Flaem, Италия). Контрольной группе ингалируют физиологический раствор в эквивалентных количествах.

Начиная с 30 дня каждые 10 дней проводят пульсоксиметрию у лабораторных животных (пульсоксиметрический датчик размещается у корня хвоста). Спустя 60

дней после начала эксперимента животные выводятся из эксперимента с забором венозной крови, изъятием и фиксацией ткани легкого. Гистологическое исследование проводят, используя окраску с одновременным выявлением эозинофилов (эозин), тучных клеток и муцина (альциановый синий) по методу Сухоруковой-Ворончихина [цит. по 29]. Анализируют перибронхиальное пространство (ПБ), периваскулярную область (ПВ) при увеличении $\times 400$ в 10-ти полях зрения.

О сформированности бронхиальной астмы судили по типичной картине крови (эозинофилия, лейкоцитоз, лимфоцитоз) и гистологической картине патологического процесса в легких (инфильтрация стенок бронхов и сосудов, перибронхиального и периваскулярного пространства тучными клетками и эозинофилами), о степени респираторной гипоксии – по проценту оксигенации крови (в сопоставлении с данными Таблица 5).

6.1.4.2. Моделирование острого отека легких.

Моделирование острого отека легких может быть достигнуто как фармакологическими (введение внутривенно большого объема физиологического раствора, внутривенное введение вазоконстрикторов (адреналина, FRFM-олигопептидов)), так и хирургическими методами (эмболизации сосудов малого круга кровообращения 1%-ной взвесью норакрила, введенной внутривенно). Основной моделью острого отека легких является адреналиновая.

В рамках этой модели отек легких вызывают путем внутривенного введения вазоактивного вещества, в частности адреналина, в дозах от 5 до 10 мг/кг. Развивающийся в результате отек легких проявляется характерной клинической и морфологической картиной, резким снижением показателя оксигенации крови, также изменением весового коэффициента (ВК) и сухого остатка (СО) легких, вычисляемым по следующим формулам: $ВК = (m_{в.л} / m_{т}) \cdot 100\%$; $СО = (m_{с.л} / m_{в.л}) \cdot 100\%$, где $m_{т}$ - масса тела животного (в г); $m_{в.л}$ - масса влажных легких (в г); $m_{с.л}$ - масса сухих (высушенных до постоянного веса при $200^{\circ}C$) легких (в г). Увеличение ВК и снижение СО свидетельствует о наличии и выраженности отека легких.

6.1.4.3. Моделирование гипоксии при сочетанной кардиореспираторной патологии.

Особенностью моделирования сочетанной кардиопульмональной патологии является синдром взаимного отягощения и антагонистическое влияние используемых при моделировании фармакологических средств. Так, при моделировании сердечной патологии невозможно использовать доксорубицин и монокроталин (обладают иммунодепрессивным действием и тормозят формирование экспериментальной бронхиальной астмы), при моделировании респираторной гипоксии невозможно использовать фармакологические методы (провоцируют фибрилляцию миокарда животных с экспериментальной сердечной недостаточностью). В связи с этим для моделирования гипоксии при сочетанной кардиореспираторной патологии необходимо [13] последовательно создавать хирургическую модель ХСН (раздел 6.1.5.1.2.) на протяжении 30 дней, а затем сразу приступить к моделированию бронхиальной астмы (раздел 6.1.4.1). Основными критериями оценки тяжести гипоксического состояния в данной модели являются показатели оксигенации гемоглобина (пульсоксиметрия) и уровень лактата венозной крови.

6.1.5. Моделирование циркуляторной гипоксии.

В клинической практике к числу наиболее значимых видов циркуляторных гипоксических состояний относятся кардиогенные ишемические состояния. К ним относятся расстройства кровообращения при нарушении насосной функции сердца (острая и хроническая сердечная недостаточность при инфаркте миокарда, гемодинамически значимые острые нарушения сердечного ритма).

6.1.5.1. Моделирование хронической сердечной недостаточности.

Для моделирования хронической сердечной недостаточности используется 2 группы методов – фармакологические и хирургические.

Период формирования значимой хронической сердечной недостаточности и циркуляторной гипоксии у крыс составляет 6-8 недель.

Вне зависимости от методов моделирования, оценка функционального состояния сердечной мышцы осуществляется морфофункциональными методами,

наиболее информативным из которых является динамическая трансторакальная эхокардиография. Оцениваются в динамике в сопоставлении контроля и группы применения референсного (эталонного) препарата следующие показатели: толщина передней и задней стенок правого и левого желудочков сердца в систолу и диастолу, конечный диастолический диаметр и объем левого желудочка, конечный диастолический и систолический объемы левого желудочка, ударный объем сердца, фракция выброса, фракция укорочения, минутный объем сердца. ЭхоКГ выполняется с использованием ультразвуковой системы с линейным датчиком (частота 8МГц). Исследование животных проводят под тиопенталовым наркозом (60 мг/кг). Для обеспечения необходимого качества изображения используют сосудистые линейные датчики с частотой 13 МГц, глубина сканирования составляет 2 см.

Альтернативным методом оценки сократительной способности миокарда лабораторных животных является катетеризация камер сердца с регистрацией характеристик объема и давления, а также построением на их основе графических кривых зависимости (PV-loops).

В современных экспериментальных моделях на мелких животных используется два основных подхода к выполнению данной методики для оценки функции левого желудочка: каротидный доступ (эндоваскулярная катетеризация ЛЖ через правую сонную артерию) и апикальный доступ, путем пункции верхушки сердца.

Для инвазивной регистрации показателей давления и объема внутри ЛЖ и построения PV-петли используют специализированный программно-аппаратный комплекс типа Advantage PV system (Science, США). Для проведения исследования крысы наркотизируются с помощью однократного внутривенного введения хлоралгидрата в дозе 450 мг/кг.

После прижизненной оценки морфофункциональных показателей сердца животных подвергают эвтаназии и забирают сердце для последующего гистологического анализа. Сердца фиксируются в 10% забуференном формалине. Гистологические препараты окрашивают гематоксилин-эозином. Для более

детального исследования соединительнотканного рубца ЛЖ используют окраску SiriusRed. Препараты изучают с помощью микроскопа при увеличении от 5 до 40. Проводят морфометрический анализ площади рубцовой ткани. Результаты микроскопии оценивают с помощью специализированного программного обеспечения (например, «ВидеоТест-Морфология»).

6.1.5.1.1. Фармакологические методы моделирования.

Фармакологические методы направлены на формирование глубоких метаболических изменений в миокарде животных, ведущих к стойкому снижению его сократительной способности. При этом возможно формирование не только зон дистрофии миокардиальной ткани, но и формирование мелких зон некроза с последующим формированием замещающей сократимый миокард рубцовой ткани по типу постинфарктного кардиосклероза. В практике доклинических исследований используется три методики формирования ХСН у крыс: доксорубициновая, изадриновая и монокроталиновая.

Доксорубицин вводят крысам внутривентрально в кумулятивной дозе 15 мг/кг, разделенной на 6 инъекций в течение 14 дней [82].

Изопротеренол (изадрин) вводится крысам подкожно в дозе 80 мг/кг дважды с интервалом в 24 часа [51].

Монокроталин вводится крысам внутривентрально однократно в дозе 60 мг/кг [51].

6.1.5.1.2. Хирургические методы моделирования.

В основе хирургического метода моделирования ХСН является формирование постинфарктного рубца и постинфарктного кардиосклероза. Животным проводится перманентное лигирование левой коронарной артерии (коронароокклюзия). Наркотизация крыс осуществляется хлоралгидратом (500 мг/кг, внутривентрально). Для проведения искусственной вентиляции легких используют аппарат ИВЛ типа Kent Scientific TOPO™ Dual Mode Ventilator; обеспечивающий необходимую для крыс частоту дыхания – 50/мин и дыхательный объем 1,5-3 мл/ 100 г массы).

Доступ к сердцу производится через четвертое межреберье. На границе свободного края ушка левого предсердия визуализируется левая коронарная артерия

(ЛКА), под которую подводится лигатура (пролен 6/0), непосредственно у края ушка левого предсердия.

Размер инфаркта миокарда сильно зависит от уровня перевязки: при выполнении высокой перевязки ЛКА (под ушком левого предсердия) размер ишемии обычно значительный и отличается низкой вариабельностью, однако при этом типе наложения лигатуры имеется выраженное нарастание приоперационной и ранней послеоперационной смертности. При более низкой перевязке (на 1-2 мм ниже свободного края ушка ЛП) отмечается возрастание вариабельности и уменьшение размера ишемии, в то же время отмечается большая выживаемость животных после операции.

В ходе эксперимента у животных осуществляется запись электрокардиограммы в стандартных отведениях до операции и через 10 мин после наложения лигатуры на левую коронарную артерию. Наступление ишемии верифицируют по электрокардиографическим критериям: элевации сегмента ST, наступлению ишемических аритмий.

Далее производится послойное ушивание операционной раны. Шов на коже обрабатывают спиртовым 5% р-ром йода. После операции производят внутривентрально инъекцию цефтриаксона (50 мг/кг) для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

6.1.6. Моделирование острой гемической гипоксии.

В основе острой гемической гипоксии лежит уменьшение кислородной емкости крови. Оно вызывается или изменением свойств гемоглобина (например, превращением гемоглобина в карбоксигемоглобин или метгемоглобин), или уменьшением количества гемоглобина (кровопускание). Кровопускание как метод создания гемической гипоксии применяется преимущественно в исследованиях на собаках (доступность магистральных сосудов, возможность регистрировать основные физиологические параметры).

6.1.6.1. Карбоксигемоглобинемия.

Животные помещаются в затравочную камеру, которая герметично закрывается, и в нее подается газовая смесь, обогащенная окисью углерода (CO).

Содержание СО в газовой смеси может быть в диапазоне от 5 до 20 мг/л, или 0,4-1,6%. Скорость подачи смеси в первую минуту не менее 10 л/мин, и 1,5-2 л/мин в последующем. Длительность экспозиции угарным газом при его концентрации в газовой смеси 5 мг/л – 60 минут, 10 мг/л – 30 мин, 15 мг/л – 20 мин, и при концентрации 20 мг/л – 15 мин. Гибель мышей в контроле составляет 8-15%. Об эффективности антигипоксической защиты судят по увеличению процента выживаемости животных в сравнении с контролем, а также по содержанию карбоксигемоглобина в крови.

Для определения содержания карбоксигемоглобина используется спектрофотометрический метод.

6.1.6.2. Метгемоглобинемия.

Для создания модели метгемоглобинемии животным (мыши) вводят внутрибрюшинно натрия нитрит (200-300 мг/кг), предварительно растворив его в воде очищенной. Допускается подкожное введение раствора NaNO_2 . Учитывается продолжительность жизни мышей в мин. При внутрибрюшинном пути введения 100%-ная гибель животного возникает через 13-17 минут, при подкожном пути введения – через 27-30 минут.

При необходимости моделирования легкой степени (метгемоглобин крови 18-20%) гемической гипоксии мышам подкожно вводят нитрит натрия (NaNO_2) в дозе 3 мг/100 г массы тела, для моделирования средней степени гипоксии (метгемоглобин крови 35-36%) используется введение нитрита натрия в дозе 5 мг/100 г массы тела.

На рисунке (Рис. 8) представлена кривая распределения времени жизни животных при моделировании гемической гипоксии метгемоглобиновым методом.

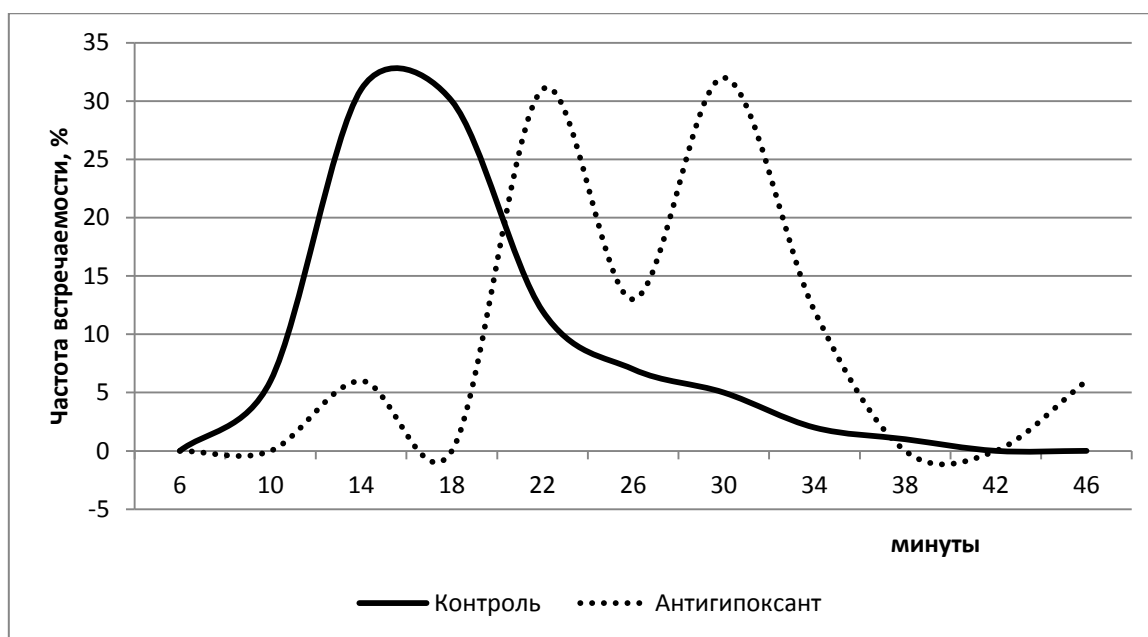


Рис. 8. Частотные кривые распределения времени жизни животных при метгемоглобиновом методе моделирования гипоксии.

Анализ рисунка (Рис. 8) показывает, что как в контрольной группе, так и при применении антигипоксанта, кривые распределения далеки от типичной кривой нормального статистического распределения, что свидетельствует о неоднородности популяции животных по чувствительности к метгемоглобинемии. Следовательно, по этому показателю невозможно решать задачи межвидового и популяционного переноса полученных результатов, в том числе – в отношении эффективности антигипоксанта.

Анализ точек перегиба кривой распределения (в том числе – ее кумуляционного вида) позволил выявить границы диапазонов устойчивости к гипоксии. В контрольной группе низкоустойчивые животные (продолжительность жизни после введения метгемоглобинообразователя до 12 минут включительно) в структуре устойчивости к гипоксии занимали 19%, среднеустойчивые животные (продолжительность жизни от 12,1 минут до 22 минут включительно) – 65%, высокоустойчивые животные (продолжительность жизни 22,1 минута и более) – 16%.

В условиях применения антигипоксанта с заведомо известными антигипоксическими свойствами структура устойчивости животных к гемической

гипоксии существенно меняется: к группе низкоустойчивых относился 0% животных, среднеустойчивых – 37%, к высокоустойчивым – 63%.

Основным критерием тяжести интоксикации (и, соответственно, степени гипоксии), является концентрация метгемоглобина в крови. Кровь для анализа у выживших животных (при моделировании гипоксии легкой и средней тяжести) забирается через 50 минут после отравления, когда концентрация метгемоглобина в крови максимальна. Определяют содержание метгемоглобина в крови спектрофотометрическим цианметгемоглобиновым методом).

Для оценки действия антигипоксического препарата в этой модели его вводят за 30 минут до введения метгемоглобинообразователя. О эффективности препарата судят по сдвигу среднего времени жизни животных или изменения структуры устойчивости животных к этому виду гипоксии. Достоверность различий оценивают непараметрическими методами.

6.1.7. Моделирование острой гистотоксической гипоксии.

В основе острой гистотоксической гипоксии лежит прямое взаимодействие различных ядов с цитохромоксидазой – ферментом терминального участка дыхательной цепи, приводящее к подавлению ее активности. Типичными ингибиторами цитохромоксидазы являются синильная кислота (HCN) и ее соли (RCN, NaCN) и нитропруссит натрия.

Моделируют острую гистотоксическую гипоксию путем внутрибрюшинного введения мышам 0,4% водного раствора натрия нитропруссиды (20 мг/кг). Регистрировали продолжительность жизни животных после введения ингибитора тканевого дыхания.

Частотная кривая распределения времени жизни животных при моделировании гистотоксической гипоксии представлена на рисунке (Рис. 9).

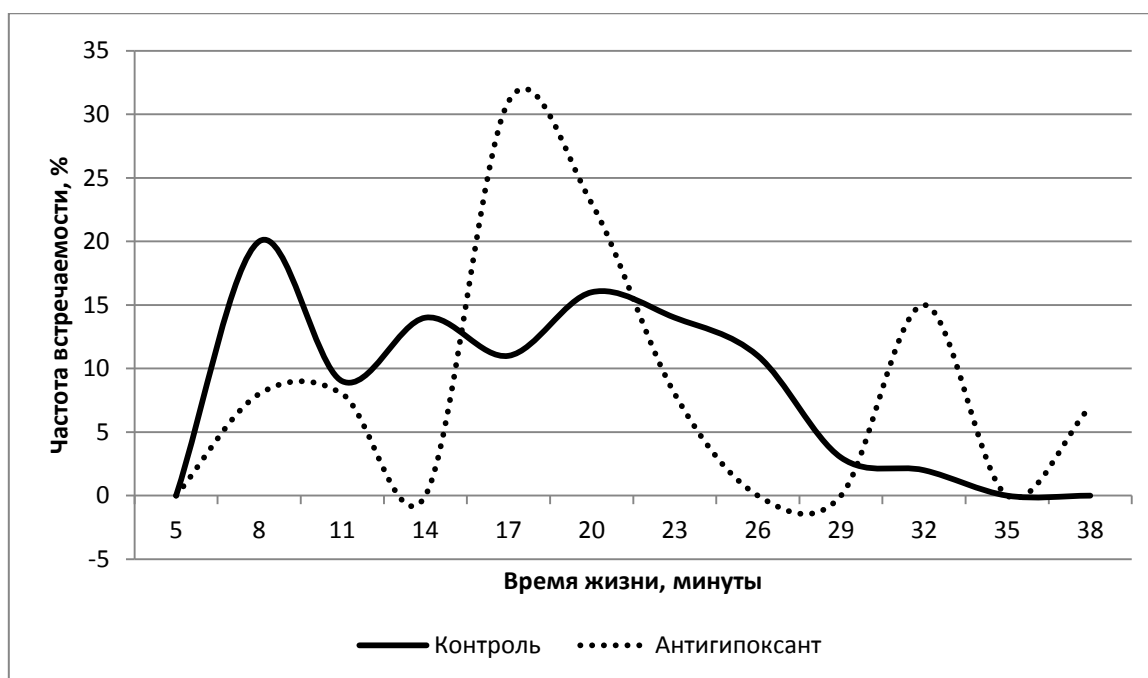


Рис. 9. Частотные кривые распределения времени жизни животных при моделировании острой гистотоксической гипоксии.

Анализ рисунка (Рис. 9) показывает, что распределение времени жизни животных при моделировании гистотоксической гипоксии как в контрольной группе, так и в условиях фармакологической коррекции резко отличается от нормального статистического распределения. Следовательно, статистическая обработка этого показателя возможна только непараметрическими методами, и он не может быть использован ни для межвидового сравнения, ни для популяционного переноса результатов.

Анализ точек перегиба частотной кривой позволил выявить границы диапазонов устойчивости животных к гистотоксической гипоксии. Животные, время жизни которых составляет менее 10 минут включительно, должны быть отнесены к группе с низкой устойчивостью. Животные, время жизни которых находится в диапазоне от 10,1 до 22 минут включительно, должны быть отнесены к группе срежнеустойчивых животных. Если время жизни животных при моделировании гистотоксической гипоксии превышает 23 минуты, то такие животные могут быть отнесены к группе высоко устойчивых животных. Структура распределения животных контрольной группы по уровню устойчивости к гипоксии следующая: низкоустойчивых животных – 26%, срежнеустойчивых – 59%, высокоустойчивых – 15%.

При использовании в рамках модели гистотоксической гипоксии профилактического введения антигипоксанта с заведомо известным антигипоксическим действием происходит более отчетливая дифференцировка животных по уровням устойчивости (частотная кривая характеризуется 3 пиками распределения, по одному для каждого диапазона). Структура группы животных по уровню устойчивости к гистотоксической гипоксии будет следующей: низкоустойчивых животных – 8%, среднеустойчивых – 69%, высокоустойчивых – 23%. Эффект антигипоксанта в отношении структуры устойчивости животных на этой модели менее отчетлив, чем при моделировании гипоксии другими способами.

6.1.8. Моделирование тканевых гипоксических повреждений в тесте индуцированной гипоксией эмбриональной летальности.

В организме человека и животных есть особая структура, высоко чувствительная к гипоксическому воздействию – эмбрион. Так, в современной гинекологии и педиатрии отмечают, что внутриутробная гипоксия плода разной степени выраженности или ее последствия встречаются в 10-15% случаев всех беременностей. К ассоциированной с внутриутробной гипоксией плода патологии относят различные неврологические расстройства, синдром гиперактивности с дефицитом внимания, отставание в умственном либо физическом развитии, различные психические и речевые патологии. К самым тяжелым последствиям гипоксии мозга плода относят ДЦП [47, 40].

У лабораторных животных также на стадии раннего органогенеза показана важная роль гипоксии в нарушении жизнеспособности эмбрионов [53].

Исследование может проводиться как на беременным самкам мышей, так и крыс. Признаком тканевого гипоксического повреждения при умеренной гипоксии плода является превышение доли мертвых эмбрионов в стадии раннего органогенеза над уровнем спонтанной эмбриональной летальности, определяемой у интактных самок, не подвергавшимся гипоксическому воздействию.

Так как исследование выполняется на беременных самках, то на предварительном этапе виргинным самкам, содержащимся в изолированных клетках по одной голове в клетке, на ночь подсаживали самцов в соотношении 1:1, чтобы

иметь фиксированную беременность. Для этого утром следующего дня по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке у самок крыс отбирали и вели отсчет срока беременности.

Гипоксическое воздействие создается в барокамере, в которой животные «поднимаются» на заданную высоту (7000 м для мышей и 9000 м для крыс) со скоростью подъема 120-180 м/с. Площадка пребывания в условиях гипоксического воздействия – 30 минут, после чего животные плавно возвращаются с такой же скоростью к условиям нормоксии. Гипоксическое воздействие создается 1 раз в сутки на 9, 10, 11 и 12 дни беременности самок.

Уровень спонтанной эмбриональной летальности у интактных (не подвергавшихся гипоксическому воздействию) самок крыс составляет $5,1 \pm 0,6$ (эмбриона на 100 мест имплантации), при коэффициенте вариации 37%.

Учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития проводят путем вскрытия самок крыс на 20-й день беременности. В эмбриологический анализ не включаются самки крыс и мышей, у которых полностью отсутствуют имплантанты. Показатель эмбриональной летальности в стадии органогенеза рассчитывается как отношение числа мертвых эмбрионов к числу мест имплантации (сумме количества живых и мертвых эмбрионов), определяемых при вскрытии самок на 20 день беременности.

При введении за 45-60 минут до начала барокамерного подъема беременных самок препаратов с антигипоксической активностью происходит снижение уровня индуцированной гипоксией эмбриональной смертности [61].

6.1.9. Моделирование локальной гипоксии жизненно важных органов.

Моделирование локальной гипоксии жизненно важных органов используется для подтверждения эффективности и специфичности действия антигипоксантов на функции различных органов в условиях моделирования, приближенного к клинической патологии. Гипоксия при этом моделируется путем лигирования сосудов, или временного наложения на них зажимов.

6.1.9.1. Ишемия головного мозга.

У крыс весом 150-200 г или мышей массой 25-35 г, зафиксированных к операционным станкам, под местной новокаиновой анестезией или легким эфирным наркозом рассекают на шее вдоль трахеи кожу, раздвигают в стороны подкожную клетчатку и мышцы. Отпрепарированные общие сонные артерии перевязывают, на кожу накладывают несколько узловых швов, а раневую поверхность обрабатывают раствором йода.

Оперированных животных сажают в клетки и ведут за ними наблюдение. После перевязки артерий животные гибнут в течение первых семи суток. При использовании крыс Вистар гибель животных составляет 80%, а беспородных животных – 20%.

6.1.9.2. Ишемия миокарда.

Ишемия миокарда моделируется путем введения в просвет коронарных сосудов инородных тел (эмболов), временного наложения зажима или перевязки нисходящей ветви артерии на границе верхней и средней трети коронарной артерии, внутривенного введения питуитрина или совместным введением питуитрина и изадрина. В результате развивается инфаркт миокарда, которому предшествуют резкие морфологические и биохимические изменения в сердечной мышце и во всем организме.

Инфаркт миокарда воспроизводится как у мелких, так и крупных лабораторных животных. У крыс, фиксированных к операционному станку, под легким эфирным наркозом вскрывают грудную клетку, перевязывают нисходящую ветвь левой коронарной артерии под ушком левого предсердия. На мышцы, подкожную клетчатку и кожу накладывают несколько швов, операционную рану обрабатывают раствором йода.

После перевязки артерии возникают нарушения в ЭКГ (смещается интервал S-T с изолинии и изменяется зубец Т) и энергетическом обмене сердца, через 4 часа зона инфаркта достигает максимума. После выведения животных из эксперимента осуществляется взятие биологического материала (сердца) для морфологического и гистологического анализа. Сердца фиксируют в 10% забуференном формалине. Гистологические препараты окрашивают гематоксилин-эозином. Препараты

изучают с помощью микроскопа при увеличении от 5 до 40. Проводится морфометрический анализ площади рубцовой ткани. Результаты микроскопии оценивают с помощью специализированного программного обеспечения (например, «ВидеоТест-Морфология»).

Оценивают влияние исследуемых препаратов на формирование зоны некроза, развитие ранних постокклюзионных аритмий, ЭКГ-признаки инфаркта, выживание животных.

6.1.9.3. Моделирование обратимой окклюзии коронарных сосудов (ишемически-реперфузионных поражений).

Существует целый ряд различных подходов к воспроизведению обратимой окклюзии ЛКА. Оптимальным является метод, включающий несколько этапов [75]:

- 1) подведение лигатуры под ЛКА, отрезание иголки, если это атравматический шовный материал;
- 2) два свободных конца лигатуры проводились через полиэтиленовую трубку малого диаметра;
- 3) натяжение концов нитки с последующей их фиксацией с помощью наложения зажима на полиэтиленовую трубку;
- 4) при необходимости реперфузии – снятие зажима.

Для снижения риска травматизации ткани миокарда между ним и полиэтиленовой трубкой укладывается небольшой кусочек трубки, сжатый посередине.

6.1.9.4. Модель изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу.

При отсутствии возможности выполнения ЭхоКГ и катетеризации ЛЖ в качестве метода оценки функциональных показателей сердца может рассматриваться методика изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу.

Через 21 день после моделирования ишемически-реперфузионного повреждения (см. раздел 6.1.9.3) с протяженностью периода ишемии 40 мин, животных наркотизируют с помощью внутрибрюшинного введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Грудная клетка вскрывается широким чрездиафрагмальным

билатеральным доступом, быстро вырезается сердце и помещается в ледяной (2-4°C) раствор Кребса-Хенселейта с гепарином, содержащий (в mM): глюкозы – 11; NaCl – 118; KCl – 4,7; CaCl₂ – 3,0; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 25.

После остановки сердца его присоединяют к аппарату Лангендорфа и осуществляют ретроградную перфузию через канюлю, введенную в аорту, раствором Кребса-Хенселейта под постоянным давлением гидростатического столба 80 мм рт. ст. Температуру перфузионного раствора, насыщенного газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂, поддерживают равной 37±0,5°C, pH раствора – 7,4. После завершения подготовки препарата изолированного сердца его помещают в термостатическую камеру.

Тотальная ишемия воспроизводится путем временной остановки поступления перфузата к сердцу. Длительность тотальной ишемии в эксперименте стандартно составляет 30 мин, последующая реперфузия – 120 мин. В ходе эксперимента регистрируют исходные функциональные показатели изолированного сердца, а именно: систолическое, конечно-диастолическое и пульсовое давление в левом желудочке, частоту сердечных сокращений и коронарный поток. Для выявления снижения функционального резерва миокарда после ишемического/ишемически-реперфузионного повреждения создается эпизод глобальной ишемии. В ходе периода глобальной ишемии осуществляют мониторинг среднего давления в ЛЖ, что позволяет оценивать амплитуду и скорость наступления ишемической контрактуры. Регистрация гемодинамических показателей проводится с помощью специализированного программного обеспечения, например, PhysExp [30].

6.2. Моделирование гипоксии на крупных животных

Моделирование гипоксии на крупных животных зачастую бывает технически сложным в связи с отсутствием у исследователей необходимой аппаратуры (например, барокамер для гипобарической гипоксии или гермокамер для гиперкапнической гипоксии соответствующего размерам животных объема). Кроме того, устойчивость крупных животных к гипоксии существенно ниже, чем у грызунов, и критическими для них уже могут быть высоты 5-6 км (содержание кислорода во вдыхаемом воздухе 10-12%).

Теоретически возможной, хотя и сложно осуществимой, является создание нормобарической гипоксии с использованием гипоксикаторов и фиксируемых на голове животного дыхательной маски, под которую подается от гипоксикатора поток гипоксической газовой смеси. Дыхание через маску является выраженным стрессом для животного, и оно будет пытаться сорвать маску с головы (например, кошки, собаки, обезьяны, некоторые породы свиней). Поэтому необходимо не только выбирать животного, способного носить маску, но и многократно приучать животное к ее ношению и дыханию с подачей в нее газового потока. При проведении такого исследования на животных из предварительно отобранной и обученной эмоционально спокойной субпопуляции мини-пигов необходимо учитывать, что критической высотой для этих животных (принятие бокового положения, эквивалентного потере сознания у человека) является высота 4-5 км (содержание кислорода во вдыхаемой газовой смеси 12-14%).

В основном крупные животные используются для моделирования гипоксии хирургическими методами. Так, на собаках (в связи с поверхностной локализацией крупных сосудов) моделируется анемическая (геморраргическая) форма гемической гипоксии, для создания которой животному осуществляется критическое кровопускание с замещением или без замещения потери объема циркулирующей плазмы.

На крупных животных (кошки, собаки) возможно исследовать локальную гипоксию головного мозга. В связи с особенностями мозгового кровообращения этих животных (более интенсивное снабжение мозга через позвоночные артерии), при перевязке обеих сонных артерий (раздел 6.1.9.1) животные не погибают. Однако по показателям ЭЭГ у них отчетливо регистрируются симптомы кислородной недостаточности и нарушения мозгового кровообращения.

В острых опытах у собак и кошек, находящихся в состоянии наркоза и искусственной оксигенации, ишемию головного мозга вызывают путем пережатия на 3-5 минут общих сонных артерий. Биоэлектрическая активность головного мозга в этом случае нарушается, развиваются хорошо выраженные изменения ЭКГ и кровяного давления. У кроликов в состоянии наркоза после пережатия общих

сонных, позвоночных и безымянной артерии развивается тотальная ишемия головного мозга. Важным признаком антигипоксической активности изучаемых лекарственных средств является латентный период развития указанных изменений.

Для мини-пигов возможен перенос методики моделирования ишемических поражений миокарда - модели окклюзии левой коронарной артерии (раздел 2.1.9.2).

Размер инфаркта миокарда сильно зависит от уровня перевязки: при выполнении высокой перевязки ЛКА (под ушком левого предсердия) размер ишемии обычно значительный и отличается низкой вариабельностью, однако при этом типе наложения лигатуры имеется выраженное нарастание приоперационной и ранней послеоперационной смертности. При более низкой перевязке (на 1-2 мм ниже свободного края ушка ЛП) отмечается возрастание вариабельности и уменьшение размера ишемии, в то же время отмечается большая выживаемость животных после операции.

После наркотизации мини-пигов зоветилом (500 мг/кг, внутривенно) обрабатывают гортань 2% раствором лидокаина и осуществляют интубацию трахеи. Для проведения искусственной вентиляции легких используют аппарат ИВЛ (например, Kent Scientific TOPO™ Dual Mode Ventilator; частота дыхания – 50/мин, дыхательный объем 1,5-3 мл/ 100 г массы животного).

Доступ к сердцу производится через четвертое межреберье с предварительным L-образным разрезом кожи от верхнего края тела грудины до мечевидного отростка по средней линии и далее по ходу VII ребра до средней аксиллярной линии и с разведением грудных мышц. После осуществления торакотомии через четвертое межреберье производится визуализация сердца. Далее, тупым способом, с помощью браншей анатомических пинцетов удаляется фрагмент перикарда.

На границе свободного края ушка левого предсердия визуализируется левая коронарная артерия, под которую подводится лигатура (пролен 6/0, Ethicon, Германия или из аналогичного материала), непосредственно у края ушка левого предсердия.

Далее производится послойное ушивание операционной раны. Шов на коже обрабатывают спиртовым 5% р-ром йода. После операции производят инъекцию цефтриаксона (50 мг/кг внутримышечно) для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

По ЭКГ в стандартных отведениях регистрируют признаки ишемии миокарда (изменение положения сегмента S-T, снижение амплитуды зубца R, выявление признаков ишемических аритмий, остановка сердца при высокой перевязке ЛКА). Учитывается латентный период развития указанных изменений.

7. Моделирование гипоксии нагрузки

Физическая нагрузка различной интенсивности в условиях предельной своей переносимости (выраженное утомление) сопровождается резким падением тканевого уровня макроэргических фосфатов (АТФ, КФ), накоплением молочной кислоты и появлением сдвигов кислотно-основного равновесия в сторону ацидоза, а также рядом других взаимосвязанных биохимических и патофизиологических изменений, существенно ограничивающих работоспособность организма человека. Аналогичные сдвиги характерны и для состояния гипоксии, что позволило ввести в научный оборот термин «гипоксия нагрузки» или «двигательная гипоксия» [5, 6, 71].

Выполнение практически всех видов физических упражнений связано с возникновением гипоксии как в работающих мышцах и мозге, так и в других органах. Условно все упражнения можно разделить на четыре вида в зависимости от скорости развивающейся тканевой гипоксии: скрытая (латентная), компенсированная, выраженная гипоксия с наступающей декомпенсацией и декомпенсированная тканевая гипоксия. Гипоксическая нагрузка возникает в тех мышцах, которые выполняют большую работу; она и является причиной резкого утомления. Резко выраженная гипоксия может быть причиной нарушения энергетического обмена, проницаемости мембран, а также вести к другим изменениям в организме спортсменов, что сопровождается снижением работоспособности. Профилактическое применение антигипоксантов может рассматриваться в качестве средства восстанавливающей терапии.

У человека прямым показателем, характеризующим развитие гипоксии нагрузки, является кислородный долг, определяемый как разницу между кислородным запросом организма и потребленным в ходе выполнения работы кислородом. Для его определения необходима регистрация респираторных показателей непосредственно в ходе нагрузки. Однако прямое использование этого показателя у лабораторных животных в ходе доклинических исследований не представляется возможным по техническим причинам (не возможность применения респираторных масок у животных в ходе выполнения ими беговых нагрузок).

Для биологического моделирования гипоксии нагрузки на лабораторных животных в качестве маркеров возникающей гипоксии могут быть рекомендованы [60]:

- избыточный удельный прирост ЧСС, не соответствующий нагрузке;
- избыточная лактацидемия;
- активация транскрипции и накопление в тканях HIF-1 (следовая реакция, определяемая на следующие сутки после гипоксического воздействия).

В биомедицинских исследованиях до настоящего времени нет адекватных биологических моделей сердечной деятельности человека в экстремальных (критических) ситуациях, в том числе – во время интенсивных физических нагрузок. В основном это связано с тем, что сердечная деятельность (регуляция, метаболизм, тканевая гемодициркуляция) мелких лабораторных животных (мыши, крысы, хомячки, морские свинки, кролики, кошки) не является адекватной для переноса полученных результатов на человека, а применение крупных животных (свиньи, овцы, лошади, приматы) в доклинических исследованиях, связанных с экстремальными воздействиями на организм, является достаточно проблематичным. Необходимо также учитывать, что регистрация ЭКГ во время нагрузочных проб у мелких лабораторных животных требует предварительной имплантации специализированных датчиковых систем, что уже само по себе вызывает отличия оперированных животных от интактных. Кроме того, даже имплантированные телеметрические системы могут быть использованы только в одной группе нагрузочных тестов – беге животных на тредбане.

Особое положение в группах экспериментальных животных занимают мини-свиньи [49, 78, 64]. Эти животные, с одной стороны, по основным метаболическим процессам и механизмам регуляции физиологических функций достаточно близки к человеку и могут рассматриваться в качестве достаточно адекватной биологической модели основных тканевых процессов человека [18, 19, 21], а с другой стороны, могут легко содержаться в условиях стандартного вивария, и проведение каких-либо манипуляций с ними (включая хирургические манипуляции и проведение нагрузочных проб) не представляет собой особо сложную задачу [20].

Для мини-пигов бег не является физиологическим видом двигательной нагрузки, и необходимость бега является очень сильным стрессовым фактором для этих животных, вызывающим предельное напряжение всех систем регуляции. Предварительно животных в течение 15 дней до начала исследования обучали бегу на беговой дорожке. Скорость движения ленты во время обучения – 5 км/час. Длительность обучения – 30 минут ежедневно.

В связи с выявленной нестабильностью ритмограммы мини-пигов в фоновых исследованиях (до нагрузки) необходимо обеспечить более длительную (не менее 1 минуты) регистрацию фоновой ЭКГ и определение усредненного за этот период фонового значения ЧСС до нагрузки. Животные, у которых в предстартовый период отмечаются избыточно высокие (110 и более) значения ЧСС, должны исключаться из исследований по оценке гипоксии нагрузки.

О состоянии гипоксии физической нагрузки у мини-пигов судят по появлению избыточной по отношению выполненного объема работы тахикардии и динамике показателей лактата в крови.

В ответ на интенсивную физическую нагрузку у мини-пигов, также как и у человека, происходит закономерное укорочение длительности кардиоциклов (интервал RR), что сопровождается резким повышением (более чем в 1,5 раза) значениями ЧСС. Происходит снижение минимальных значений интервалов RR при практически сохраненном диапазоне максимальных значений интервалов RR. Такие изменения характерны для резкой активации на нагрузку симпатoadренальной системы.

Маркером гипоксии нагрузки может быть прирост ЧСС, отнесенный к объему выполненной нагрузки. Для мини-пигов, выполняющих беговую нагрузку на тредбане со скоростью движения ленты 7 км/час, объем работы будет пропорционален массе животных и продолжительности нагрузки.

Накопление лактата в крови животных, как и динамика других биохимических маркеров, не может быть прямым индикатором гипоксии нагрузки, так как может быть следствием непосредственного выполнения физических нагрузок, так и адаптивной перестройки организма для более адекватной реакции на нагрузку.

Несколько более специфичным маркером гипоксии нагрузки является ее удельный прирост (прирост лактата, отнесенный к объему выполненной нагрузки).

Так как физиологические и биохимические показатели являются только косвенными признаками гипоксии нагрузки, характеристика ее выраженности может быть достигнута присвоением отдельным признакам гипоксии нагрузки баллов в соответствии с таблицей (Таблица 6) и последующим их суммированием.

Таблица 6 – Балльная оценка выраженности признаков гипоксии нагрузки (для мини-пигов, тест бега на тредбане до отказа)

Показатель	Степень гипоксии нагрузки (балл)			
	0	1	2	3
ЧСС после нагрузки, уд/мин	< 130	131 - 150	151–170	>170
Удельный прирост ЧСС на нагрузку, уд/мин*кДж	<40	41-50	51-60	>60
Лактат крови после нагрузки, ммоль/л	<5,0	5,1-6,0	6,1-7,0	>7,0
Удельный прирост лактата на нагрузку, ммоль/л*кДж	<4,0	4,1-5,0	5,1-6,0	>6,0

Если сумма набранных баллов по анализируемым признакам будет находиться в диапазоне 0-2 баллов, то гипоксия нагрузки считается не выраженной, в диапазоне 3-5 баллов – слабо выраженной, 6-9 баллов – умеренно выраженной, 10 и более баллов – выраженной.

8. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α как универсальный маркер развившегося гипоксического состояния

Несмотря на обилие работ по моделированию гипоксических состояний, единых критериев оценки степени тяжести гипоксических состояний, а также соотнесения результатов разных методов создания гипоксии друг с другом, в настоящее время не создано. Однако необходимость разработки таких критериев, особенно в рамках развития медицины экстремальных состояний и фармакологии защиты профессиональной деятельности человека в неблагоприятных условиях является весьма высокой. Не менее значимым созданием универсального маркера тяжести гипоксии является и для клинически значимых гипоксических состояний (шок различного генеза, локальная ишемия жизненно важных органов, внутриутробная гипоксия плода и т.д.).

Универсальный критерий тяжести гипоксического состояния может быть разработан на основе анализа интенсивности генного ответа тканей на гипоксическое воздействие. Несоответствие в потребности организма в кислороде и его доставке приводит к активации ряда стабилизационных механизмов. Наиболее типичным и важнейшим стабилизационным механизмом геномного ответа на гипоксическое воздействие является экспрессия транскрипционного гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α , вовлеченного в такие процессы как гликолиз, окислительное фосфорилирование в митохондриях, гематопоез, ангиогенез, регуляцию сосудистого тонуса и ряда других адаптационных механизмов.

Из биологического материала (цельная кровь или образцы тканей животных) выделяют тотальную РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля согласно протоколу производителя к комплекту реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала (например, «АмплиПрайм РИБО-сорб»). Синтез первой цепи кДНК проводили согласно указаниям инструкции комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК (например, «РЕВЕРТА-L»).

Амплификацию, с последующим определением уровня экспрессии гена *HIF-1 α* крыс, проводят методом ПЦР с детекцией накопления продуктов реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR) с помощью детектирующего

амплификатора и специфических праймеров и зондов к гену *HIF-1α* крыс. Праймеры для последовательностей *HIF-1α* и *TSPO* (гену «домашнего хозяйства», транспортера субстратов через наружную митохондриальную мембрану) отражены в таблице (Таблица 7).

Таблица 7 – Праймеры и зонды для Real-Time PCR

Исследуемая мишень	Олигонуклеотидные праймеры и зонды
Ген <i>HIF-1α</i>	HIF_1a_F: 5- АСТСАТСАТГАСАТГТТТАСТАААГГАС -3 HIF_1a_R: 5-TGТСАААСГГААГАТГГСАГ-3 Z HIF_1a: 5-ROX-TCACCACAGGACAGTACAGGATGCTTGC–BHQ1-3
Ген «домашнего хозяйства» крысы <i>TSPO</i>	TSPO_F: 5- AGGCTGTGGATCTTTCCAGAAC -3 TSPO_R: 5- GGCTGGGCACCAGAGTGA-3 ZTSPO: 5-FAM-CAATCACTATGTCTCAATCCTGGGTACCCG-BHQ1-3

Стадию амплификации кДНК *HIF-1α* крыс в режиме реального времени проводят в 25 мкл смеси: ПЦР Буфер (×10): 700 mM Трис-НСl, pH 8,6; 25°C, 166 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, *Taq* - полимеразы, на детектирующем амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США).

Условия проведения амплификации кДНК *HIF-1α* с праймерами HIF-1α_F/HIF-1α_R и зонда Z HIF-1α: 95 °C – 15 мин., затем 50 циклов: 95 °C – 30 сек., 65 °C – 50 сек., 72 °C – 30 сек.

Количество исследуемых кДНК (копийных ДНК полученных из РНК путем обратной транскрипции) в образцах рассчитывали путем определения пороговых циклов ПЦР. Нормализация количества изучаемых транскриптов к общему количеству кДНК в пробе проводилась с помощью отношения *HIF-1α/TSPO*. Для оценки уровня экспрессии гена *HIF-1α* в качестве стандарта сравнения использовался ген *TSPO*, экспрессия которого считается стабильной для животного.

В условиях нормоксии уровень экспрессии гена *HIF-1α* в крови и почках соответствует базовому уровню экспрессии генов "домашнего хозяйства" лабораторных животных, в сердце – идет в 3 раза более интенсивно, в печени – в 17 раз более интенсивно, а в тканях мозга – в 272 раза интенсивнее.

В условиях развития гипоксии [62] повышение уровня экспрессии гена *HIF-1α* в цельной крови (в 20-40 раз) свидетельствует о наступлении гипоксического состояния, но не позволяет дифференцировать его тяжесть (значения показателя по

высотам от 6 000 м и выше имеют близкий диапазон). Маркером выраженной гипоксии тканей является двух-трехкратный рост экспрессии этого фактора в печени, а критического уровня гипоксии – в сердце (в 6-7 раз) и почках (в 20-30 раз). В условиях гипоксии экспрессия *HIF-1 α* в тканях мозга снижается, и только при критических ее степенях отмечается повторный рост, не достигающий уровня нормоксической экспрессии *HIF-1 α* .

9. Критерии тяжести гипоксических состояний в биомедицинских исследованиях

В порядке возрастания выделяют следующие степени тяжести гипоксических состояний: невыраженная, слабо выраженная, умеренно выраженная, выраженная критическая. Их характеристика для мелких лабораторных животных представлена в таблице (Таблица 8). Для крупных лабораторных животных четкие критерии тяжести гипоксических состояний не разработаны.

Таблица 8 – Характеристика гипоксических состояний по степени тяжести у здоровых мелких лабораторных животных

Степень тяжести	Патогенетические признаки	Физиологические и биохимические критерии*	Внешние критерии
Невыраженная	Напряжение физиологических механизмов компенсации в пределах нормы реакции	Прирост ЧСС и ЧД не более 20% Повышение уровня лактата крови в 1,2-1,5 раза	Высота до 4 км, рО ₂ во вдыхаемом воздухе – более 96 мм рт. ст. % оксигенации гемоглобина – 84-98
Слабо выраженная	Напряжение механизмов компенсации выходит за границы нормы реакции, включение механизмов адаптации	Прирост ЧСС и ЧД от 20 до 50% Повышение уровня лактата в крови в 2-3 раза Отдельные признаки возбуждения, нарушение типичного поведения	Высота 5-6 км, рО ₂ во вдыхаемом воздухе – 75-85 мм рт. ст. % оксигенации гемоглобина – 65-83
Умеренно выраженная	Выраженное напряжение механизмов компенсации, выраженная стресс-реакция	Повышение уровня глюкокортикоидов в крови в 1,5-2 раза Гипергликемия Повышение уровня лактата в крови в 4 и более раз	Высота 7-8 км для мышей, 8-9 км для крыс, рО ₂ во вдыхаемом воздухе – 56-84 мм рт. ст. % оксигенации гемоглобина – 28-64
Выраженная	Проявление отдельных реакций декомпенсации, нарушения деятельности нервной системы	Шаткость и не координированность походки, потеря позы, боковое положение Появление отдельных агональных вдохов Гибель животных в течение нескольких десятков минут Гипогликемия	Высота 9-10 км для мышей, 10-11 км для крыс, рО ₂ во вдыхаемом воздухе – 43-55 мм рт. ст. % оксигенации гемоглобина – 18-28
Критическая	Декомпенсация сердечной и нервной деятельности, угасание рефлексов	Гибель животных в течение нескольких минут	Высота более 11 км км, рО ₂ во вдыхаемом воздухе – менее 43 мм рт. ст.; % оксигенации гемоглобина – менее 18

* при совпадении не менее двух критериев.

10. Референсные (эталонные) препараты для оценки антигипоксической активности лекарственных средств

К предполагаемому "эталонному" (или стандартному) препарату для доклинических исследований могут быть предъявлены следующие требования:

- высокая антигипоксическая активность при однократном введении;
- отличия от контроля должны быть статистически достоверны, $p < 0.05$;
- высокая биодоступность при внутрижелудочном введении;
- хорошая растворимость в воде;
- хорошая скорость развития эффекта (45-60 мин);
- доступность для широкого круга исследователей;
- низкая вариативность индивидуального ответа на введение препарата.

В настоящее время на фармацевтическом рынке России представлен достаточно узкий перечень лекарственных средств с доказанным первичным антигипоксическим действием. К ним относятся триметазидин, убихинон, цитохром С, фосфокреатин, мексидол, натрия оксibuтират, субстраты цикла Кребса (янтарная, яблочная, альфа-кетоглутаровая и фумаровая кислоты, их соли).

Фармакологическим комитетом МЗ СССР в 1990 г в качестве эталонных препаратов предложено применение натрия оксibuтирата а дозе 300 мг/кг и амтизола в разовой дозе 40-50 мг/кг [38]. Однако в настоящее время оксibuтират натрия не является доступным из-за требований Госнаркоконтроля к его обращению, а амтизола сукцинат не имеет промышленного выпуска и является недоступным для исследователей. По этой же причине в качестве эталонных препаратов не могут рассматриваться гутимин, олифен. Фосфокреатин и цитохром С разрушаются в пищеварительной системе и применяются только инъекционно. Применение субстратов цикла Кребса, хинонов и растительных антигипоксантов, как правило, дает не резко выраженный и нестабильный эффект.

Таким образом, в качестве потенциального эталонного антигипоксанта из промышленно выпускаемых лекарственных средств могут рассматриваться триметазидин (предуктал), мексидол, пирацетам (ноотропил) и актовегин. Свойства

этих препаратов описаны в Приложении 1. Пирацетам рекомендован в качестве антигипоксанта с высокой активностью в отношении гипоксической и гемической (но не гистотоксической) видов гипоксий [39] (Таблица 7 Указаний).

В таблице (Таблица 9) представлены данные о сравнительной оценке антигипоксической активности потенциальных эталонных препаратов на трех методиках гипоксической гипоксии: высотном пороге жизни животных (раздел 6.1.1.1.), индивидуальной устойчивости к гипоксии (6.1.1.2.), модели внутриутробной гипоксии плода (раздел 6.1.8.). Все препараты применялись в дозах, биоэквивалентных среднетерапевтическим дозам для человека (раздел 6), за 1 час до гипоксического воздействия при внутрижелудочном зондовом введении.

Таблица 9 – Антигипоксическая активность потенциальных референсных (эталонных) препаратов

Методика	Контроль	Триметазидин, 0,5 мг/кг	Пирацетам, 120 мг/кг	Актовегин, 40мг/кг	Мексидол, 75 мг/кг
Высотный порог, км	11,9 + 0,5	13,9 + 0,2	13,9 + 0,1	14,4 + 0,2	13,7 + 0,1
% от контроля	100	116	116	120	114
p=		0,007	0,007	0,001	0,02
ИУГ, баллы	18,7 + 1,4	38,8 + 2,7	43,7 + 3,0	35,2 + 2,8	29,7 +
% от контроля	100	209	235	189	3,8+160
p=		0,001	0,001	0,005	0,01
Эмбриональная летальность, эмбрионов/100 мест имплантации	26	5,7	7,7	5,7	8,1
% к контролю	100	22	30	22	31
p=		0,001	0,005	0,001	0,005

Анализ данных (Таблица 9) показывает, все 4 исследованных претендента на статус референсного препарата могут выступать в этой роли. Наиболее соответствуют критериям референсного препарата при острой гипоксии пирацетам и триметазидин. При моделях гипоксии, в которых существенную роль играет циркуляционный компонент, в роли референсного препарата более целесообразно использование актовегина. С учетом специфических особенностей механизмов действия препаратов можно предположить, что в ситуациях хронического гипоксического воздействия, в качестве референсного препарата может быть использован также мексидол.

11. Статистическая обработка результатов и популяционный перенос результатов

Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований подразумевает оценку описательных статистических параметров анализируемых выборок (средняя арифметическая, мода и медиана выборки, стандартное отклонение, ошибка средней, минимальное и максимальное значение, коэффициенты асимметрии и эксцесса, коэффициент вариации) и оценку нормальности распределения данных экспериментальных выборок.

В случае, если экспериментальное распределение близко к нормальному, достоверность различий между опытными, контрольными и референсными (с использованием эталонных препаратов сравнения) группами может быть оценена любыми методами, как параметрическими (например, t-критерий Стюдента), так и непараметрическими (F-критерий дисперсионного анализа (ANOVA), U-критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, критерий знаков, метод точной вероятности Фишера и другие).

Проведенные исследования на большой группе лабораторных животных показали, что критериям нормального распределения относительно соответствуют показатели «высотного порога» (как в барокамерном (раздел 6.1.1.1), так и нормобарическом варианте с использованием гипоксикатора (раздел 6.1.2.1.2), а также интегральный показатель индивидуальной устойчивости животных к гипоксии (ИУГ, раздел 6.1.1.2), получаемый путем присвоения нормированных баллов показателям ВЖ, ВПП и ВВП с их последующим суммированием с учетом весовых коэффициентов их вклада в общую устойчивость к гипоксии.

Показатели, отражающие не нормированные относительные величины (доля высоко- или низкоустойчивых животных), показатели выживаемости, времени жизни в условиях моделируемой различными методами острой или хронической гипоксии, биохимические или физиологические показатели, регистрируемые в условиях гипоксии, включая признаки локальной ишемии мозга и миокарда, показатели гипоксии нагрузки не соответствуют критериям нормального статистического распределения. Для оценки достоверности различий между

группами животных по этим показателям возможно только по непараметрическим статистическим критериям.

Для межвидового сопоставления полученных данных дизайн доклинического исследования должен соответствовать следующим требованиям:

- биоэквивалентный состав группы животных (одинаковое соотношение пола, эквивалентные средние значения массы тела: например, масса мышей 18-20 г и эквивалентная ей масса крыс 180-220 г и возраста животных: по отношению к средней продолжительности жизни животных соответствующего вида или линии животных в пределах одного вида)
- биоэквивалентные дозы исследуемых препаратов (рассчитанные с учетом метаболических коэффициентов соответствующих видов животных, Таблица 10);
- идентичные схемы исследования;
- идентичные пути введения исследуемых средств;
- идентичные сроки от введения препарата до начала гипоксического воздействия;
- идентичные (или биоэквивалентные) методики моделирования гипоксии;
- идентичные критерии оценки переносимости гипоксии (или ее тяжести);
- идентичные методы статистической обработки полученных результатов;
- идентичные референсные препараты в биоэквивалентных дозах;
- идентичные подходы и критерии соотнесения антигипоксической активности исследуемых и референсных препаратов.

Соблюдение указанных требований к дизайну исследований позволяет говорить об их идентичности (биоэквивалентности), а, следовательно, о сопоставимости результатов, полученных на разных видах животных.

Таблица 10 – Метаболические коэффициенты для расчета биоэквивалентных доз

Показатель	Мышь	Крыса	Морская свинка	Кролик	Мини-пиг	Человек
Масса тела	20 г	200 г	300 г	2,2 кг	20 кг	70
МК	3,0	6,0	6,4	12,8	24,0	39

Метаболические коэффициенты приведены в соответствии с данными ([3] Таблица 4).

Расчет проводится по следующему алгоритму:

$$\text{ЭД (жив)} \text{ мг/кг} = \text{ТД (чел)} \text{ мг/кг} * \text{МК (чел=39)} / \text{МК (жив)}$$

$$\text{Д (жив В)} \text{ мг/кг} = \text{Д (жив А)} \text{ мг/кг} * \text{МК (жив А)} / \text{МК (жив В)}$$

Например, терапевтическая доза препарата пирацетам для человека массой 70 кг равна 1600 мг (или 22,9 мг/кг). Эквивалентная ей доза для мыши будет равна

$$\text{ЭД (мышь)} \text{ мг/кг} = 22,9 * 39 / 3 \text{ мг/кг} = 297 \text{ мг/кг} \text{ или округленно } 300 \text{ мг/кг}.$$

Если, например, в исследовании на мышах использовалась доза 100 мг/кг, то эквивалентная ей доза для крыс будет равна

$$\text{ЭД (крыса)} \text{ мг/кг} = \text{Д (мышь)} * \text{МК (мышь)} / \text{МК (крыса)}$$

$$\text{ЭД (крыса)} \text{ мг/кг} = 100 \text{ мг/кг} * 3 / 6 = 50 \text{ мг/кг}.$$

Если масса животного более чем на 20% отличается от приведенной в таблице (Таблица 10), полученную эквивалентную дозу нужно умножить на массовый коэффициент, равный отношению фактической массы животного к табличной.

Популяционный перенос полученных результатов биомедицинских (доклинических) исследований основан свойствах нормального распределения случайной величины: если какое-либо значение X нанести на кривую нормального распределения, то соответствующая нормированная оценка этой величины $Z_{(x)}$ [15] всегда будет соответствовать такой же Z -оценке на любой другой кривой нормального распределения этого же показателя (в том числе – если массив измерения выполнен на иной биоэквивалентной выборке).

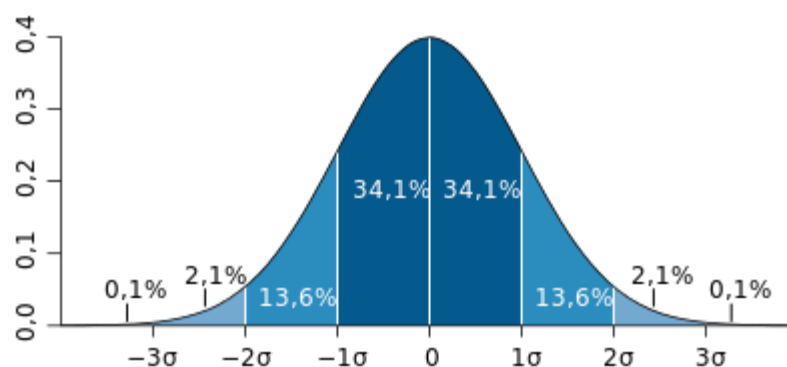


Рис. 10. График плотности вероятности нормального распределения и процент попадания случайной величины на отрезки, равные среднеквадратическому отклонению.

Система Z-оценок обычно используется, если анализируемые материалы в дальнейшем планируется подвергать параметрическим видам математической обработки и статистического моделирования (корреляционный, регрессионный, мультифакторный, кластерный и др. виды анализа), в том числе – задач популяционного переноса полученных результатов. Расчет Z-оценок проводится по следующей формуле:

$$Z(x) = (X-M)/\sigma,$$

где $Z(x)$ – Z-оценка величины X , X – оцениваемая величина, M – математическое ожидание (среднее значение) параметра X , σ – стандартное отклонение параметра X .

Для интерпретации значений Z-оценок важным является их знак (больше или меньше нуля), значимыми являются отличия более чем на одну единицу.

Для расчета Z-оценок устойчивости крыс к гипоксии по показателям высотного порога и ИУГ могут быть применены статистические характеристики контрольной группы животных (таблица 11).

Таблица 11 – Статистические параметры показателей устойчивости к гипоксии крыс, пригодных для популяционного переноса путем расчета Z-оценок (контрольная группа)

Показатель	Высотный порог (км)	Индекс индивидуальной устойчивости к гипоксии (ИУГ) баллы
Математическое ожидание	12,8	18,7
Стандартная ошибка	0,08	1,4
Стандартное отклонение (σ)	0,46	7,9
Коэффициент вариации	0,05	0,42

T-баллы являются производными Z-оценок и рассчитываются по следующей формуле:

$$T(x)=50 + 10*Z(x).$$

T-баллы преимущественно используются в системе оценки динамики показателя или в задачах классификации (отнесения к определенному классу объектов). Значимыми являются отличия более чем на 10 T-баллов.

Таким образом, если в результате действия контролируемого статистического фактора (введения лекарственного средства) среднегрупповое значение показателя, отражающего переносимость гипоксии (например, высотный порог для крыс) и

имеющего близкую к нормальной характеристику статистического распределения, перевести в Z-оценку (при нормировании по показателям описательной статистики биоэквивалентной контрольной группы), то близкое к полученной величине место на кривой нормального распределения значений высотного порога этот эффект должен проявляться и в любой другой биоэквивалентной (то есть соответствующей ранее описанным требованиям) выборке, в том числе – других видов животных. Именно на этом свойстве Z-распределения (которое всегда нормально со средним, равным 0, и дисперсией, равной 1) и основан статистический популяционный перенос полученных данных.

12. Первичная фармакологическая оценка специфической антигипоксической активности

Целями отбора и первичного фармакологического исследования антигипоксантов являются:

1. Установление наличия антигипоксических свойств у исследуемого вещества;
2. Их сравнение с активностью эталонных препаратов.

Первичный отбор антигипоксантов ведется на организменном уровне на одной или нескольких моделях гипоксии (гипоксическая гипоксия, гемическая гипоксия, гистотоксическая гипоксия). Однако возможно использование для этих целей клеточных и органных модельных систем. В связи с неоднозначностью патогенетических механизмов, лежащих в основе различных типов гипоксии, антигипоксические свойства химических или природных соединений, проявляемой на одной из каких-либо моделей гипоксии, не обязательно должны воспроизводиться на другой. Поэтому при выявлении антигипоксических свойств исследуемых соединений следует указывать, для каких форм гипоксии и при каких патологических состояниях вещество может быть применено как антигипоксикант.

При первичной оценке антигипоксантов рекомендуется проводить исследования не менее, чем на двух видах лабораторных животных. Их количество должно быть достаточным для статистической обработки (не менее 8 животных в каждой точке исследования). По каждому тесту следует выявлять действие соединения, используя не менее чем в 2-3 дозах, рассчитанных в соответствии с LD₅₀ (1/10 от LD₅₀ и менее). Должны быть использованы не менее двух способов введения вещества в организм животного, один из которых должен соответствовать предполагаемому способу клинического применения. Контрольной группе животных вводят физиологический раствор тем же способом в эквивалентном количестве. В связи с разнообразием форм гипоксии и способов ее моделирования каждый используемый метод должен быть подробно описан. Данные обрабатываются с помощью современных методов статистики и представляются в виде таблиц и рисунков.

Исследование необходимо проводить параллельно и в сравнении с эталонным препаратом. Выбор эталонного препарата (триметазидин, пирацетам, актовегин или мексидол) следует осуществлять по принципу схожести предполагаемого механизма или показаний к применению исследуемого соединения и эталонного. При этом необходимо указывать, в каких именно единицах активности (пирацетамовых, актовегиновых, триметазидиновых или мексидоловых) выполнено сравнительное исследование антигипоксической активности. Вещества вводятся животному за 30-60 минут до начала гипоксического воздействия.

Как правило, на уровне первичного выявления антигипоксических эффектов у потенциальных антигипоксантов, проводится оценка на мелких лабораторных животных (мыши, крысы) в тестах гипоксической гипоксии.

Для оценки антигипоксической активности лекарственных средств традиционно используется два подхода: оценка влияния препарата на среднегрупповые показатели индивидуальной гипоксической устойчивости, а также сдвиг в популяционной структуре устойчивости (изменение долей низко-, средне- и высокоустойчивых животных) [38]. Как правило, первый подход используется для оценки однократного применения препарата, второй – курсового применения лекарственных средств.

В стандартных исследованиях антигипоксическая активность анализируемой субстанции может выражаться в относительных единицах (по отношению к контролю, в безразмерном варианте или в процентном исчислении) на основе среднегрупповых значений (например, высотного порога, времени жизни):

$$КА = \frac{X_{пр}}{X_{к}},$$

где КА – коэффициент активности, $X_{пр}$ – значение анализируемого показателя устойчивости при приеме препарата, $X_{к}$ – в контрольной группе.

При оценке антигипоксической активности по выживаемости животных (например, пребывание на критической высоте более 20 минут) может быть применен Коэффициент защиты (КЗ), который определяется по следующей формуле:

$$КЗ = \frac{\frac{a}{b} + 1}{\frac{c}{d} + 1},$$

где «а» и «б» – число выживших животных в опыте и контроле, «в» и «д» – общее число взятых в опыт животных в опыте и контроле соответственно. Величина Коэффициента защиты обычно выражают в процентах.

Достаточно проблемным видится и выбор адекватного показателя гипоксической устойчивости животных. В высотной физиологии таких показателей несколько: высотный порог, время жизни (для человека аналогом является резервное время пребывания на высоте до потери сознания), время поддержания позы (для человека аналогом является время сохранения деятельности). Дополнительным критерием устойчивости к гипоксии является стойкость гипоксических изменений в постгипоксическом периоде, которые отражаются таким показателем, как время восстановления позы животного при спуске с высоты. Также в качестве дополнительного критерия могут использоваться некоторые биохимические показатели, в первую очередь – лактат крови.

При исследовании антигипоксической активности лекарственных средств в случае высокой антигипоксической активности должно отмечаться повышение высотного порога и увеличение доли высокоустойчивых животных при снижении доли низко устойчивых. При умеренной антигипоксической активности могут или умеренно повышаться среднегрупповые значения высотного порога, или незначительно меняться соотношения между подгруппами животных по уровню устойчивости к гипоксии.

Для оценки антигипоксической активности лекарственных средств также может применяться Индекс защиты (ИЗ), который показывает, какая часть изменений анализируемого показателя, возникающих под влиянием гипоксического воздействия, компенсировалась профилактическим введением данного лекарственного средства [59].

$$ИЗ=100*\frac{X_{пл}-X_{пр}}{X_{пл}-X_{ф}},$$

где $X_{пл}$, $X_{пр}$, $X_{ф}$ – значения анализируемого параметра в плацебо-группе (воздействие фактора), при профилактическом введении препарата (препарат + воздействие фактора), и у интактных животных (фоновые данные) соответственно.

Важным методическим аспектом является выбор показателя, характеризующего выраженность ответа организма на гипоксическое воздействие. Он должен иметь однозначную трактовку в конкретном виде биомедицинского исследования, патогенетически быть связанным с гипоксией, быть монотонно возрастающим при увеличении степени гипоксического воздействия (и соответственно, монотонно снижаться при снижении степени гипоксического воздействия). Оптимальным является выбор показателя, который статистически достоверно повышается в ответ на гипоксию.

В сравнительных исследованиях с использованием референсных (эталонных) препаратов антигипоксическая активность исследуемого соединения оценивается в «эталонных» (пирацетамовых, актовегинowych, триметазидиновых или мексидоловых) единицах, которые рассчитывались по следующей формуле:

$$AA_{\text{э}} = \frac{X_{\text{пр}} - X_{\text{пл}}}{X_{\text{э}} - X_{\text{пл}}},$$

где $AA_{\text{э}}$ – антигипоксическая активность в «эталонных» единицах (индекс «э» соответствует выбранному эталону, п – пирацетамовые единицы, т – триметазидиновые единицы, а – актовегинowych единицы, м – мексидоловые единицы), X – показатель переносимости гипоксической пробы (например, высотный порог, время жизни, эмбриональная летальность, уровень лактата и т.д.), $X_{\text{пр}}$ – при приеме исследуемого препарата, $X_{\text{пл}}$ – при приеме плацебо, $X_{\text{э}}$ – при приеме «эталонного» препарата в стандартной дозе.

Кроме того, можно определить Коэффициент сравнительной эффективности ($K_{\text{сэ}}$):

$$K_{\text{сэ}} = \frac{X_{\text{пр}}}{X_{\text{э}}},$$

где $X_{\text{пр}}$ – значение анализируемого показателя в условиях гипоксии при приеме препарата, $X_{\text{э}}$ – при приеме эталонного препарата.

Кроме первичной оценки антигипоксического действия, может также выполняться расширенное изучение специфичности антигипоксической активности веществ и механизмов их действия, а также изучение сопутствующей фармакологической активности веществ, их фармакодинамики, безопасности.

13. Расширенное изучение специфичности антигипоксической активности веществ и механизмов их действия

Расширенное изучение специфичности антигипоксической активности веществ проводится, если в ходе первичной фармакологической оценки (раздел 8) была выявлена высокая антигипоксическая активность, сопоставимая или превышающая активность референсных (эталонных) препаратов. Она подразумевает последовательное прохождение методик моделирования гипоксии в соответствии с кислородным каскадом (рис. 1). При этом сопоставление антигипоксической активности вещества в одной и той же дозе и одинаковом пути введения позволяет выявить тот уровень кислородного каскада, на котором реализуется специфическая антигипоксическая активность.

Так, тесты с нормобарической и гипобарической гипоксией только подтверждают наличие и выраженность антигипоксического действия, но не позволяют конкретизировать его уровень. Наличие высокой антигипоксической активности на модели респираторной гипоксии позволяет предположить, что исследуемое вещество влияет на процессы транспорта кислорода через легкие и оксигенации гемоглобина, или действует на нижележащие стадии кислородного каскада. Наличие высокой (превалирующей) активности при использовании моделей гемической гипоксии свидетельствует о том, что действие вещества направлено или на устранение механизмов снижения кислородной емкости крови, или на процессы отдачи кислорода гемоглобина тканям и его утилизации в реакции клеточного дыхания. Наличие превалирующей активности на моделях циркуляционной гипоксии или локальной ишемии жизненно важных органов свидетельствует о том, что исследуемое вещество влияет преимущественно на процессы отдачи кислорода гемоглобина тканям и его утилизации в реакции клеточного дыхания. В то же время, наличие превалирующей активности на моделях гистотоксической гипоксии свидетельствует о том, что вещество или исключает механизм повреждения транспорта электронов по дыхательной цепи, или шунтирует этот процесс на уровне митохондриальных электрон-транспортных систем.

Важную информацию о механизмах антигипоксического действия изучаемого вещества могут дать оценка его влияния в условиях гипоксии на энергетический обмен и пул аденилнуклеотидов, процессы окислительного фосфорилирования, состояние дыхательной цепи и редокс-системы клетки, величину мембранных потенциалов и транспорт ионов, состояние клеточных и митохондриальных мембран, перекисные процессы.

Самостоятельными задачами являются поиск субклеточных и молекулярных мишеней, на которые может быть направлено действие нового вещества с антигипоксической активностью, изучение его влияния на различные рецепторные системы, микроциркуляцию и реологические свойства крови, сродство гемоглобина к кислороду. Новые возможности в этом направлении открывает математическое моделирование рецептор-лигандного взаимодействия молекулярной структуры соединения с типовыми структурами фармакологических мишеней [58].

Важную информацию о возможном тканеспецифическом действии исследуемого вещества с антигипоксической активностью может дать изучение особенностей экспрессии гипоксия-индуцибельного фактора HIF1 α (раздел 4) в разных тканях.

Установление различий в эффективности защитного действия вещества при гипоксии у животных с высокой и низкой устойчивостью является необходимым при разработке тактики фармакологической коррекции клинически значимых гипоксических состояний.

Объем исследований механизма действия вещества с антигипоксической активностью может существенно варьировать в зависимости от методических возможностей организации-разработчика. Проведение такого рода экспериментальной работы не является обязательной.

14. Изучение общей фармакологической активности новых антигипоксантов, их фармакокинетики и безопасности

Данный раздел включает выявление влияния исследуемых веществ на общее состояние и работоспособность животных, психотропную активность, сердечно-сосудистую систему, дыхание, периферические отделы нервной системы, а также изучение фармакокинетики, метаболизма и токсичности.

Наблюдение за состоянием животных проводят на мышах и крысах при введении препарата в широком диапазоне доз от не оказывающих заметного влияния на общее состояние до вызывающих гибель. При этом определяют возбудимость, увеличение или снижение двигательной активности, наличие тремора, судорожных подергиваний, судорог, гиперкинезов и т.д. Изучается влияние веществ на температуру тела животных, потребление воды и пищи, динамику массы тела.

Подробное описание методов изучения общих эффектов фармакологической активности, фармакокинетики и безопасности новых антигипоксантов представлено в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [50].

15. Требования к лабораторным животным. Особенности их содержания

В исследованиях высотного порога (раздел 6.1.1.1) и оценки индивидуальной устойчивости животных к гипобарической гипоксии (раздел 6.1.1.2), нормобарической гипоксии (раздел 6.1.2), гиперкапнической гипоксии (раздел 6.1.3), острой гемической (раздел 6.1.6) или гистотоксической (раздел 6.1.7) могут использоваться нелинейные белые мыши и крысы, а также крысы линий WAG, Wistar вне зависимости от их пола (в каждом конкретном исследовании, если дизайном эксперимента не запланировано иначе, используются животные только одного пола).

В исследованиях с моделированием респираторной гипоксии (раздел 6.1.4), циркуляторной гипоксии (раздел 6.1.5) и локальной гипоксии жизненно важных органов (раздел 6.1.9) используются крысы-самцы линии Wistar массой 250-300 г.

В исследованиях с моделированием внутриутробной гипоксии плода (раздел 6.1.8.) используются виргинные самки крысы НУ/У или иных линий, характеризующиеся сниженной устойчивостью к гипоксии, или предварительно отобранные самки нелинейных крыс, соответствующие критериям сниженной устойчивости к гипоксии.

На беспородных собаках моделируется анемическая (геморрагическая) форма гемической гипоксии (раздел 6.2). На крупных животных (кошки, собаки) исследуют локальную гипоксию головного мозга (6.1.9).

На предварительно отобранных и тренированных к бегу на тредбане минипигах изучают гипоксию нагрузки (раздел 3).

Все животные включенные в исследования, должны поступать из сертифицированных вивариев и иметь ветеринарное заключение, подтверждающее их статус и состояние здоровья.

Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляет не менее 14 дней. В течение карантина проводят ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдают в клетках (заболеваемость и смертность).

Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределяют на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина.

Маркировка клетки кодирует пол животных, породу, дату начала введения препаратов, название группы. Каждому отобранному в исследование животному должен быть присвоен индивидуальный номер. Мини-пигов маркируют бирками на ушной раковине, мелких грызунов – с помощью меток на хвосте.

Мыши и крысы содержатся в вентилируемых клетках, группами по 3 головы в клетке. Мини-пиги содержатся в индивидуальных клетках. В качестве подстилки используют стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Кормление животных осуществляется по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным дается *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержатся в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 18-22°C и относительная влажность 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживается 12-часовой цикл освещения.

После завершения эксперимента животные выводятся из исследования в соответствии с утвержденным Протоколом. Биоматериал подлежит утилизации в соответствии с Ветеринарно-санитарными правилами сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов, (в ред. Приказа Минсельхоза России от 16.08.2007 № 400).

Заключение

Использование представленных Методических рекомендаций позволит унифицировать и стандартизировать поиск и отбор веществ с антигипоксическими свойствами, установить спектр их действия, активность и терапевтическую широту, выявить их преимущества по сравнению с референсными препаратами, приблизить доклинические исследования к потребностям клинической практики.

Следует учитывать, что рекомендованная система исследований ориентирована на текущий уровень наших знаний и представлений о гипоксических нарушениях и способах их коррекции. С развитием клеточных и субклеточных технологий закономерно будут расширяться и методы исследования механизмов действия антигипоксантов, и биологические модели для изучения гипоксических повреждений органов и тканей.

Основные свойства референсных антигипоксантов

Актовегин (Солкосерил)

Препарат представляет собой высокоочищенный гемодиализат крови, содержащий олигопептиды, нуклеозиды, промежуточные продукты углеводного и жирового обмена. Основой действия актовегина является улучшение транспорта глюкозы и поглощение кислорода тканями [22]. Благодаря инсулиноподобному действию актовегин увеличивает клеточную проницаемость для глюкозы в условиях гипоксии; этот эффект сохраняется при инсулинорезистентности. Под действием актовегина активируются процессы аэробного окисления, повышается обмен высокоэнергетических фосфатов (АТФ), активируются ферменты окислительного фосфорилирования (пируват-, сукцинатдегидрогеназа, цитохром-С-оксидаза), повышается активность щелочной и кислой фосфатаз и лизосомальная активность, происходит ускорение синтеза углеводов и белков, увеличение притока ионов K^+ в клетки, активация калийзависимых ферментов (каталаз, сахараз, гликозидаз), ускорение распада продуктов анаэробного гликолиза (лактата и γ -гидроксibuтирата). Для восстановления аэробного энергообмена лучше вводить актовегин внутривенно капельно.

Мексидол

Мексидол — сукцинат-2-этил-3-метил-3-оксипиридин сочетает антиоксидантные свойства основания (производное 3-оксипиридина) с антигипоксической активностью сукцината [36]. Защитное действие мексидола проявилось в экспериментах на изолированном сердце крыс. Препарат уменьшал вызванное гипоксией повреждение механической функции сердца, предотвращая при этом падение содержания АТФ, и ускорял восстановление кардиомиоцитов в постгипоксический период. Мексидол повышал устойчивость организма к кислородозависимым патологическим состояниям (шоку, нарушениям мозгового кровообращения), улучшал мнестические функции, снижал токсическое действие алкоголя [55]. Применение препарата в клинической практике связано с такими

показаниями, как острые нарушения мозгового кровообращения, дисциркуляторные энцефалопатии, вегетососудистая дистония, атеросклероз мозговых сосудов, купирование абстинентного синдрома при алкоголизме и наркомании. Антигипоксическая активность мексидола в различных клинически значимых экстремальных состояниях оценивается как умеренная.

Мексидол показан при острых нарушениях мозгового кровообращения, дисциркуляторной энцефалопатии, нейроциркуляторной дистонии, легких когнитивных нарушениях атеросклеротического генеза, тревожных расстройствах при невротических и неврозоподобных состояниях. Применяется препарат и для купирования абстинентного синдрома при алкоголизме с преимущественно неврозоподобными нейроциркуляторными нарушениями, при острой интоксикации антипсихотическими средствами, в схемах комплексной терапии острых гнойно-воспалительных процессов в брюшной полости (панкреонекроз, перитонит).

Мексидол является активным антигипоксантом также благодаря антиоксидантной активности. Вместе с тем, в условиях гипоксии препарат вызывает компенсаторную активацию аэробного гликолиза и уменьшает угнетение окислительных процессов в цикле Кребса с повышением содержания АТФ и креатинфосфата, активацией энергосинтезирующей функции митохондрий, стабилизацией клеточных мембран. В присутствии мексидола отмечена активация сукцинатоксидазного пути окисления, которая в условиях ограничения НАД-зависимого окисления на ранних стадиях гипоксии позволяет сохранить способность цитохромного участка дыхательной цепи к образованию энергии.

Мексидол, как и другие производные янтарной кислоты, в условиях гипоксии, сопровождающей физические нагрузки, оказывает антиоксидантное действие, сохраняет и восстанавливает уровень адениловых нуклеотидов, никотинамидных коферментов, креатинфосфата, стимулирует активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, ацетилхолинэстеразы, активирует при гипоксии анаэробный гликолиз, способствует восстановлению митохондриальных окислительно-восстановительных процессов, нормализует соотношение холестерол/липопротеины

высокой плотности в мембранных структурах, что является весьма существенным для поддержания энергообеспечения и физической работоспособности.

Пирацетам

В основе действия пирацетама лежат два нейрометаболических эффекта: улучшение энергетического статуса клеток мозга и активация пластических процессов в ЦНС за счет усиления синтеза РНК и белков [12].

Энергетический потенциал нейрона увеличивается в результате облегчения синтеза АТФ, повышение ее концентрации и метаболического оборота. В частности, пирацетам усиливает обмен АТФ, активируя аденилатциклазу в нейронах [70], повышает активность фермента синтеза АТФ в митохондриях – аденилаткиназы, увеличивает активность ферментов дыхательной цепи, активизирует гликолитические процессы, повышает утилизацию глюкозы мозгом [81], препятствует набуханию митохондриальных мембран и разобщению окисления и фосфорилирования при неблагоприятных воздействиях на нейроны [32]. Определенное значение имеет способность ноотропов усиливать транспорт глюкозы, аминокислот и жирных кислот через гематоэнцефалический барьер, снижать уровень лактата.

Усиление синтеза РНК и белков составляет вторую особенность нейрометаболического действия пирацетама. В опытах с включением радиоактивного фосфора показано, что под влиянием пирацетама активируется биосинтез РНК, белков, липидов [24]. Показана способность препарата предотвращать характерное для старения снижение активности полирибосомального аппарата, ответственного за синтез белков [70].

Ряд исследователей придает важное значение влиянию ноотропов на нейромедиаторные системы мозга. Так, показана способность пирацетама предотвращать возрастное снижение активности дофамин- и холинэргических структур мозга [25]. На уровне электрофизиологических процессов действие пирацетама проявляется оптимизацией ритмики ЭЭГ, повышением уровня пространственной синхронизации биоэлектрических колебаний, что облегчает

иррадиацию процессов возбуждения внутри полушарий мозга и между ними, увеличением пика доминирующего ритма спектра ЭЭГ [31].

Основные биохимические и клеточные механизмы действия пирацетама в мозгу обусловлены активацией метаболических процессов, которые включают повышенную утилизацию глюкозы и образование АТФ, стимуляцию биосинтеза белков и РНК, ингибирование процессов пероксидного окисления липидов и стабилизацию биомембран, а также повышение антиоксидантной защиты клеток [32].

Пирацетам повышает устойчивость мозга к гипоксии, интоксикации [80]. Он обладает способностью повышать активность СДГ, что может вносить свой вклад в молекулярный механизм его антигипоксического и энергизующего действия. Его применение при гипоксических состояниях оказывает благоприятное действие на структуру нейронов, в частности, на клеточную и ядерную мембраны, рибосомальный аппарат, митохондрии и лизосомы [46, 48].

У больных с инфарктом миокарда пирацетам рекомендуется использовать для развития компенсаторной гипертрофии неповрежденных отделов миокарда и формирования постинфарктного рубца. Положительный клинический эффект препарата связан, вероятно, с его воздействием на метаболизм кардиомиоцитов, повышением утилизации глюкозы, увеличением синтеза АТФ, РНК и фосфолипидов. При этом восстанавливается дыхательная способность митохондрий и уменьшается выраженность аутолиза [48].

Пирацетам выпускается в различных лекарственных формах: гранулах для приготовления сиропа для детей, капсулах, растворе для внутривенного и внутримышечного введения, растворе для инфузий, растворе для приема внутрь, сиропе, покрытых оболочкой таблетках. Показаниями к применению пирацетама являются: нарушения психической деятельности (ухудшение памяти, обучения, астенические состояния), посттравматические церебральные нарушения, ишемическая болезнь мозга, последствия инсульта, трудности адаптации, предупреждение негативных последствий стресса, что определяет назначение препарата в восстановительный период после любых ишемических эпизодов.

Триметазидин

Триметазидин (предуктал, вастарел) – клеточный антиишемический препарат, синтезированный в Servier Research Institute (Франция). В эксперименте он ограничивает зону некроза миокарда у кроликов [67], приостанавливает увеличение концентрации внутриклеточного кальция в зоне инфаркта [69]. В опытах *in vitro* на изолированном сердце крыс препарат ограничивает тканевое повреждение [77], уменьшает активность КФК во время ишемии [73], защищает миокард во время реперфузии [65]. Показана эффективность препарата у больных стабильной стенокардией, ишемической миокардиопатией, а также в постинфарктном периоде [76]. Антиишемический эффект триметазида связывают со способностью поддерживать энергетический метаболизм путем снижения накопления лактата, сохранения уровня АТФ в клетках миокарда, а также ограничения накопления Na^+ и Ca^{2+} в клетке. Немаловажное значение имеет также антиоксидантный эффект триметазида [72]. Так же, как и нифедипин или пропранолол, триметазидин эффективен в отношении клинических проявлений стенокардии, и улучшает результаты проб с физической нагрузкой, но, в отличие от этих препаратов, не имеет центральных гемодинамических эффектов, оказывая прямую миокардиальную цитопротекцию [66].

Триметазидин угнетает окисление жирных кислот за счет ингибиции кетоацил-КоА-тиолазы. При этом повышается окисление глюкозы, ограничивается образование лактата при повышенной физической нагрузке, сохраняется уровень АТФ, креатинфосфата, малата, уменьшается транспорт ионов Na^+ внутрь клетки, внутриклеточная аккумуляция кальция и натрия, а также сохраняется на нормальном уровне уровень внутриклеточного калия. Препарат угнетает процессы перекисного окисления липидов, образование свободных радикалов, препятствует их деструктивному влиянию, препятствует потере креатинфосфокиназы в экстремальных условиях и возникновению ацидоза, защищая нервные клетки и кардиомиоциты.

Триметазидин также предотвращает образование тромбоксана A_2 , и, обладая антиагрегантным действием, улучшает микроциркуляцию и сохраняет транспорт кислорода к мышцам на нормальном уровне.

По данным [17], по своим молекулярным механизмам действия триметазидин близок к амтизолу, и, также как амтизол, активирует в условиях гипоксии анаэробный гликолиз. По выраженности метаболических изменений несколько уступает амтизолу. Кроме того, в отличие от амтизола, при низком уровне углеводных резервов в тканях, триметазидин не обладает способностью активировать процессы глюконеогенеза.

Библиография

1. Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Человек и противогипоксические вещества. – Л.: Наука, 1985, 106 с.
2. Агапов Ю.Я. Кисотно-щелочной баланс. – М.: Медицина, 1988, 184 с.
3. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ / Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У.Хабриева. – М.: Медицина, 2005, с. 41-54.
4. Белаковский М.С., Богданов Н.Г., Гиппенрейтер Е.Б., Ушаков А.С. Витамины в процессе адаптации к условиям высокогорья // Космическая биология и авиакосмическая медицина, 1984, № 3, с. 4-9.
5. Бобков Ю.Г., Виноградов В.М., Катков В.Ф., Лосев С.С., Смирнов А.В. Фармакологическая коррекция утомления. – М.: Медицина, 1984, 208 с.
6. Вайнштейн Х.И. Утомление. – М.: Физкультура и спорт, 1967, 240 с.
7. Васильев П.В., Глод Г.Д., Сытник С.И. Фармакологические средства стимуляции работоспособности летного состава при напряженной деятельности // Воен. мед. журн., 1992, № 8, с. 45-47.
8. Виноградов В.М. Некоторые итоги и перспективы изучения гутимина – одного из первых антигипоксических средств / Фармакология амидиновых соединений. – Кишинев, 1972, с. 106-115.
9. Виноградов В.М., Бобков Ю.Г. Фармакологическая стратегия адаптации / Фармакологическая регуляция состояний дезадаптации. – М. 1986, с. 3-11.
10. Виноградов В.М., Урюпов О.Ю. Анализ действия гутимина на тканевое дыхание, проверенный полярографическим методом / Полярографические методы определения кислорода в биологических объектах. – Киев, 1972, с. 17-20.
11. Виноградов В.М., Урюпов О.Ю. Гипоксия как фармакологическая проблема // Фармакол. и токсикол., 1985, т. 48, № 4, с. 9-20.

12. Воронина Т.А., Гарибова Т.Л., Хромова И.В. Диссоциация антиамнестического и противогипоксического эффектов у ноотропов и противогипоксических препаратов // Фармакол. и токсикол., 1987, № 5, с. 12-15.
13. Ворончихин П.А., Куликов А.Н., Карпов А.А., Сухорукова Е.Г., Ваулина Д.Д., Оковитый С.В., Коржевский Д.Э., Шустов Е.Б. Моделирование кардиопульмональной патологии у экспериментальных животных // Биомедицина, 2014, № 1, с. 19-26.
14. Ворончихин П.А., Сырцова М.А., Талантов С.В. Влияние метопролола и бисопролола на течение экспериментальной бронхиальной астмы // Биомедицина, 2013, № 2, с. 48-57.
15. Джонсон Н., Лион Ф. Статистика и планирование эксперимента в технике и науке. Методы обработки данных (пер. с англ.). – М.: Мир, 1980, 549 с.
16. Драгузя М.Д. Влияние цитохрома С на некоторые энергетические физиологические реакции и биоэнергетические процессы при гипоксической гипоксии // Специальная и клиническая физиология гипоксических состояний. – Киев, 1979, т. 1, с. 54-58.
17. Зарубина И.В. Основные метаболические эффекты антигипоксантов и их энергетическое обеспечение. Автореф. Дисс. ... доктора биол.наук. – СПб.: ВМедА, 1999, 40 с.
18. Капанадзе Г.Д. Некоторые зоотехнические и гематологические показатели у мини-свиней светлогорской популяции // Доклады ТСХА, 2007, вып. 279, с. 140-143.
19. Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А. Светлогорская популяция мини-свиней // Биомедицина, 2007, № 6, с. 71-81.
20. Каркищенко В.Н. Капанадзе Г.Д., Деньгина С.Е., Станкова Н.В. Разработка методики оценки физической выносливости лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов // Биомедицина, 2011, № 1, с. 4-23.
21. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Межакадемическое издательство ВПК, 2004, 608 с.

22. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Котенко К.В., Оковитый С.В. Очерки спортивной фармакологии. Т.2 Векторы фармакопротекции / под ред. Н.Н.Каркищенко и В.В. Уйба. – М., СПб.: Айсинг, 2014, 448 с.
23. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Котенко К.В., Люблинский С.Л. Очерки спортивной фармакологии, т. 3. Векторы фармакорегуляции / под ред. Н.Н.Каркищенко и В.В.Уйба. – М., СПб: «Айсинг», 2014, 356 с.
24. Кленикова В.А., Глущенко Т.С., Тунева С. Влияние пирацетама на метаболизм белков в нейронах и глиоцитах некоторых отделов головного мозга крыс // Физиол. журнал СССР, 1982, № 1, с. 9-12.
25. Ковалев Г.В. Ноотропные средства. Волгоград: Нижне-Волжское книжное издательство, 1990, 368 с.
26. Колчинская А.З. Дыхание при гипоксии // Физиология дыхания. СПб: Наука, 1994, с. 589-624.
27. Колчинская А.З. О классификации гипоксических состояний // Специальная и клиническая физиология гипоксических состояний. – Киев: Наук. думка, 1979, ч. 1, с. 9-16.
28. Кораблев М.В., Лукиенко П.И. Противогипоксические средства. Минск: Беларусь, 1976, 128 с.
29. Коржевский Д.Э., Гилерович Е.Г., Кирик О.В. и др. Морфологическая диагностика. – СПб: СпецЛит, 2013, 127 с.
30. Королев Д.В., Александров И.В., Галагудза М.М. и др. Автоматизация получения и обработки данных физиологического эксперимента // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2008, т. 7, № 2(26), с. 79-84.
31. Крапивин С.В. Электрофизиологический анализ действия ноотропных препаратов и производных 3-оксипиридина: Автореф. дис. ... кандидата биол.наук. М. 1987, 23 с.

32. Кресюн В.И., Борисюк Б.Б., Аксельрод Л.Б. Церебральные и экстрацеребральные эффекты ноотропных средств / VI Всесоюзн. съезд фармакологов: Тез.докл. Ташкент, 1988, с. 198.
33. Кулинский В.И., Ольховский И.А. Две адаптационные стратегии в неблагоприятных условиях – резистентная и толерантная. Роль гормонов и рецепторов // Успехи современной биологии, 1992, т. 112, № 5-6, с. 697-714.
34. Лосев С.С. Индивидуальная фармакологическая защита человека в осложненных условиях / Материалы 3 Всесоюзн. Конф. «Экспериментальная физиология, гигиена и средства индивидуальной защиты человека». – М., 1990, с. 319-420.
35. Лукьянова Л.Д. Проблемы фармакологической коррекции гипоксии и поиска антигипоксантов / Клеточные механизмы реализации фармакологического эффекта. – М., 1990, с. 184-216.
36. Лукьянова Л.Д., Романова В.Е. Особенности антигипоксического действия мексидола, связанные с его специфическим действием на энергетический обмен // Хим. фарм. журнал, 1990, № 8, с. 9-11.
37. Малкин В. Б., Гиппенрейтер Е. Б. Острая и хроническая гипоксия (Проблемы космической биологии. Т. 35.). – М.: Наука. 1977, 319 с.
38. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д.Лукьяновой. – М., 1990, 18 с.
39. Методические указания по экспериментальной оценке эффективности лекарственных средств, предназначенных для неотложной терапии гипоксического синдрома при интоксикациях высокотоксическими веществами. – М.: ГВМУ МО РФ, 1997, 29 с.
40. Микашинович З. И. и др. Метаболические аспекты внутриутробной гипоксии плода при сердечно-сосудистой патологии у беременных. – Ростов-на-Дону, 2008, 158 с.
41. Новиков В.С., Горанчук В.В., Шустов Е.Б. Физиология экстремальных состояний. – СПб: Наука, 1998, 247 с.

42. Оковитый С.В. Клиническая фармакология антигипоксантов (I) // ФАРМиндекс: ПРАКТИК, 2004, вып. 6, с. 30-39.
43. Оковитый С.В. Клиническая фармакология антигипоксантов (II) // ч II - ФАРМиндекс: ПРАКТИК, 2005, вып. 7, с. 48-63.
44. Оковитый С.В., Суханов Д.С., Заплутанов В.А., Смагина А.Н. Антигипоксанты в современной клинической практике // Клиническая медицина, 2012, т.90, № 9, с. 69-74.
45. Павлов А.Д., Морщакова Е.Ф. Регуляция эритропоза: физиологические и клинические аспекты. – Л.: Медицина, 1987, 272 с.
46. Полуниин Б.А., Туманов В.П., Авруцкий Г.Я. Влияние ноотропила и контрикала на структурные изменения в центральной нервной системе при гипоксическом отеке мозга // Бюлл. exper. биол., 1979, № 12, с. 726-729.
47. Полянчикова О.Л. Клинические и метаболические факторы в патогенезе задержки развития плода и выборе акушерской тактики / автореф. дисс....д.м.н. – М., 2010.
48. Рощина Л.Ф., Островская Р.У. Влияние пираретама на устойчивость организма к гипоксии // Фармакология и токсикология. – 1981, № 2, с. 210-212.
49. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010, 358 с.
50. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, Часть 2. – М.: Гриф и К, 2012, 944 с.
51. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум, 2005, 829 с.
52. Сейфулла Р.Д., Борисова И.Г. Проблемы фармакологии антиоксидантов // Фармакол. и токсикол., 1990, т. 53, № 6, с. 3-10.
53. Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Матвеев Е.Л., Капанадзе Г.Д. Влияние острой гипобарической гипоксии на репродуктивную функцию лабораторных крыс и мышей. Сообщение 1. Исследование последствий воздействия острой гипобарической гипоксии на стадии раннего органогенеза на

жизнеспособность эмбрионов у самок крыс и мышей // Биомедицина, 2012, № 3, с. 73-78.

54. Сиротинин Н.Н. Горная болезнь и ее профилактика / Покоренные вершины. – М.: Географгиз, 1950, с. 224-257.

55. Смирнов Л.Д., Воронина Т.А. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний алкилзамещенными 3-оксипиридинами / Фармакологическая коррекция кислородзависимых состояний. – М., 1984, с. 87.

56. Титович И.А., Болотова В.Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола // Биомедицина, 2016., №2, с. 77-83.

57. Чаговец Н.Р. О влиянии янтарной кислоты на протекание восстановительных процессов в скелетной мышце после интенсивной деятельности / Терапевтическое действие янтарной кислоты. – Пущино, 1976, с. 77-79.

58. Шустов Е.Б. От исследований *in vivo* и *in vitro* к методологии *in silico* // Вестник образования и развития науки РАЕН, 2016, т. 20, № 2, с.91-96.

59. Шустов Е.Б. Повышение устойчивости к экстремальным воздействиям при астении: Автореф. дисс. ... доктора мед.наук. – СПб: ВМедА, 1996, 38 с.

60. Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Станкова Н.В., Ревякин А.О., Матвеев Е.Л., Ким А.Е., Шуленин Н.С. Гипоксия физической нагрузки у спортсменов и лабораторных животных // Биомедицина, 2014, № 4, с. 4-16.

61. Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х., Матвеев Е.Л. Умеренная внутриутробная гипоксия плода как клинически значимая модель для изучения антигипоксической активности лекарственных средств // Биомедицина, 2016, № 3, с. 4-10.

62. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Семенов Х.Х., Оковитый С.В., Радько С.В. Экспрессия гипоксия-индуцибельного фактора HIF-1 α как критерий развития гипоксии тканей // Биомедицина, 2015, № 4, с. 4-15.

63. Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семенов Х.Х. Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и

антигипоксического действия лекарственных средств // Биомедицина, 2013, № 4, с. 149-157.

64. Bollen P.J.A., Hansen A.K., Rassmusen H.J. The Gottingen minipig in pharmacology and toxicology // Pharmacology and toxicology. 2000. V. 80 (Suppl.), p. 3-4.

65. De Leiris J., Boucher F. Intervention in ischaemia. Reperfusion syndrome. Rationale for trimetazidine // Rev. Port. Cardiol., 1994, vol.13, № 9, p.661-667.

66. Detry J.M. Clinical features of an anti-anginal drug in angina pectoris // Eur. Heart J., 1993, vol. 14, suppl. G, p. 18-24.

67. Drake-Holland A.J., Belcher P.R., Hynd J., Noble M.I. Infarct size in rabbits: a modified method illustrate by the effects of propranolol and trimetazidine // Basic Res. Cardiol., 1993, v. 88.. № 3, p. 250-258.

68. Elsner D., Riegger G.A.J. Characteristics and clinical relevance of animal models of heart failure /D. Elsner // Curr Opinion Cardiol., 1995, vol. 10, № 3, p. 253-259.

69. Fantini E., Demaison L., Sentex E. et al. Some biochemical aspects of the protective effects of trimetazidine on rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation // J. Moll. Cell. Cardiol., 1994, v.26, № 8, p.949-958.

70. Gobert Y. Nootropil in Neurological and Psychiatric Practice: Material of a symposium / USB. Belgium, 1978, p 3-5.

71. Grandjean A.B. Fatigue: its physiological and psychological significance // Ergonomics, 1968, v.2, p.427-438.

72. Harpey C., Labrid C., Baund L. et al. Evidence for antioxidant properties of trimetazidine / Xth International Congress on Pharmacology, 1987, p.649.

73. Honore E., Adamantides M.M., Charllice C.E., Dupuis D.A. Cardioprotection by calcium antagonist, piridoxilate and trimetazidine // IRCS Med. Sci., 1986, v. 14, p. 938-939.

74. Kamachi A., Munakata M., Nishimura Y. et al. Enhance of goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness by salbutamol in a rat model of atopic asthma // J. Thorax., 2001, vol. 56, № 1, p.19-24.

75. Karpov A.A., Uspenskaya Y.K., Minasian S.M., et al. The effect of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation on myocardial remodelling in the rat model of ischaemic heart failure // *Int. J. Exp. Pathol.*, 2013, vol. 94, № 3, p. 169-77.
76. Kozakiewicz K., Petelenz T., Chrusciel T.L. Effectiveness of trimetazidine in patients with hypertension and the symptoms of coronary disease // *Polski Tygodnik Lekarski*, 1992, vol. 47, № 27-28, p.594-596.
77. Maridonneau-Parini K., Harpey C. Effects of trimetazidine on membrane damage induced by oxygen free radicals in human red cells // *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1985, v. 20, p. 148-151.
78. McAnulty A., Dayan A.D., Ganderup N-C., Hasting K.L. *The Minipig in Biomedical Research.* – Peter CRC Press, 2012, 662 p.
79. Moore M.S. Complexities on human factor in aviation // *Aviat. Space Environ. Med.*, 1977, v. 48, № 5, p. 441-473.
80. Mosergoon F., Guirgea C. Protective effect of piracetam in experimental barbiturate intoxication: EEG and behavioral studies // *Arch. int. Pharmacodyn.*, 1974, v. 210, p. 38-48.
81. Scondia V. Nootropic drugs // 21 Ann. Czechoslovak Psychopharmacological meeting. – Iesenic Spa, 1979, p. 40-54.
82. Weinberg L.E., Singal P.K. Refractory heart failure and age-related differences in adriamycin-induced myocardial changes in rats // *Can J Physiol Pharmacol.*, 1987, vol. 65, № 9, p. 1957-1965.