

## Анализ параметров индивидуальной устойчивости лабораторных животных к гипоксии в интересах биологического моделирования нейропротекторного и антигипоксического действия лекарственных средств

Е.Б. Шустов, Н.Н. Каркищенко, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов

*ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область*

*Контактная информация: Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru*

---

Представлены статистические характеристики биологической модели острой гипобарической гипоксии на мелких лабораторных животных. Показано, что время жизни животных на критической высоте не подчиняется закономерностям нормального распределения и не может в полной мере отражать потребности фармакологии для оценки нейропротекторной и антигипоксической активности лекарственных средств. Высотный порог и бальная оценка индивидуальной устойчивости к гипоксии являются более адекватными (по статистическим характеристикам) маркерами устойчивости к гипоксии у биомоделей.

**Ключевые слова:** гипоксия, биологическое моделирование, антигипоксическая активность, статистические характеристики распределения.

---

Гипоксия как типовой патогенетический процесс, присущий основной массе заболеваний и патологических состояний человека, издавна является объектом научного изучения. Нейропротекторная и антигипоксическая активность лекарственных средств являются базовыми свойствами для широкой группы лекарственных средств (ноотропов, антигипоксантов, антиоксидантов, блокаторов кальциевых каналов, цитопротекторов, актопротекторов, транквилизаторов, регуляторных пептидов и многих других). В связи с этим важное значение приобретает возможность корректной экстраполяции результатов различных

серий экспериментальных исследований на лабораторных животных, их популяционный перенос, возможность прямого сопоставления друг с другом, прогнозирование активности лекарственных средств с антигипоксическим действием у человека [1]. Статистически корректно это можно сделать, если анализируемые параметры состояния животных подчиняются закономерностям нормального распределения и исследуемая выборка может быть соотнесена с генеральной совокупностью животных (популяционный перенос). В то же время, сама по себе экстремальная гипоксия является тем дополнительно действующим

фактором, влияние которого отклоняет статистические характеристики маркерных функциональных показателей от нормального статистического распределения. Возникающий при этом методологический конфликт для своего устранения требует разработки специализированных биологических моделей для исследования экстремальной гипоксии и приводимых к нормальному статистическому распределению параметров оценки устойчивости животных к этому экстремальному фактору.

В публикуемой в этом номере журнала статье «Физиологическое обоснование требований к лабораторным моделям для оптимизации параметров скрининга антигипоксической активности с использованием критериев резистентности к экстремальной гипоксической гипоксии» [4] нами было показано, что при создании биологических моделей экстремальной гипоксии 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 (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 фармакологических исследованиях на низко устойчивых к гипоксии линиях 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 патогене-

за (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.

В исследованиях на 10 линиях инбредных мышей коллекционного фонда НЦБМТ[3] было показано, что по генетически детерминированной устойчивости к гипоксическому воздействию линии мышей могут быть разделены на три группы: с низкой (IOR/HabY, CC57WY, CBA/LacY, 101/HY), средней (C3HAY, CBA/JY) и высокой (A/SnY, B10CWY, C57BL/6Y, DBA/2Y) устойчивостью к гипоксии. Однако исследуемый признак (устойчивость к гипоксии по критерию времени жизни на критической высоте) обладает высокой вариабельностью как между животными разных линий, так и между особями внутри каждой линии (коэффициент вариации от 20 до 50%).

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). Как правило, первый подход используется для оценки однократного применения препарата, второй – курсового применения лекарственных средств.

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 времясохранения 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.

**Целью** настоящего исследования было изучение закономерностей статистического распределения различных показателей гипоксической устойчивости лабораторных животных – крыс различных линий, в том числе – при использовании лекарственных средств с нейропротекторным и антигипоксическим действием.

При исследовании высотного порога лабораторные животные (крысы) поднимались в барокамере со скоростью 165 м/с до начальной площадки 9000 м (пороговая величина устойчивости для животных с наличием заболеваний или постоперационных состояний), пребывали на этой высоте 5 минут (300 секунд), и вновь поднимались со скоростью 165 м/с до следующей площадки на 1000 м выше, и так далее до фиксации 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, степень повы-

шения 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 (табл. 1) 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.

Таблица 1  
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

Например, крыса прожила на площадке 13000 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. 1).

Проведенный дисперсионный анализ показал, что на значения высотного порога не оказывают существенного влияния факторы линейности животных

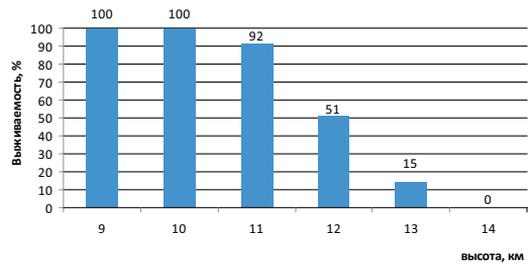


Рис. 1. Выживаемость крыс (площадка 300 секунд) на различных высотах.

(нелинейные, линии WAG, Wistar, коэффициент детерминации модели  $D=0,03$ ,  $r=0,33$ ) и их пола (самки, самцы, коэффициент детерминации модели  $D=0,06$ ,  $r=0,29$ ).

Статистические характеристики высотного порога для крыс представлены в табл. 2. Обращает на себя внимание, что статистические характеристики высотного порога для животных соответствуют основным требованиям нормального распределения (среднее значение, мода и медиана распределения близки друг другу, параметры эксцесса и асимметрии в пределах нормативных значений). Представленная на рис. 2 частотная кривая распределения значений показателя высотного порога подтверждает соответствие этого параметра нормальному статистическому распределению. Следовательно, 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 – пара-

метрическими, является корректной. Для высотного порога характерна низкая вариативность показателя (коэффициент вариации 5%), что отражает популяционную стабильность показателя.

Таблица 2  
**Статистические параметры  
распределения значений высотного  
порога для крыс**

Статистический параметр	Значение
Среднее, км	12,78718
Стандартная ошибка, км	0,076846
Медиана, км	13
Мода, км	13
Стандартное отклонение, км	0,678685
Дисперсия выборки, км	0,460613
Эксцесс	-0,62224
Асимметричность	-0,01619
Интервал, км	2,9
Минимум, км	11,3
Максимум, км	14,2
Коэффициент вариации	0,053075
Счет	78

Исходя из критериев S-образного шкалирования, границами диапазонов устойчивости к гипоксии являются точки перегиба кумулятивной кривой. 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.



Рис. 2. Частотные кривые распределения значений высотного порога.

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 проверки этого предположения была выполнена оценка влияния на крыс внутрибрюшинного введения ноотропного препарата пираретама в дозе 120 мг/кг, для которого антигипоксическая активность давно известна и прямо вытекает из молекулярных механизмов его действия [2]. Полученные результаты выявили у пираретама в исследованной дозе умеренную антигипоксическую активность, которая проявилась в повышении среднегруппового значения высотного порога с 12,8 до 13,2 км (103% от контроля), повышении доли высокоустойчивых животных с 14 до 29% при практически не измененной доле низкоустойчивых животных (изменение с 7 до 5%, не достоверно). Бальная оценка высотной устойчивости живот-

ных изменилась с 12,22 до 13,65 баллов (112%). Таким образом, умеренное антигипоксическое действие пирацетама проявляется на среднеустойчивой к гипоксии группе и ведет к перераспределению 15% животных из среднеустойчивых в высокоустойчивую группу. Более низкая доза пирацетама (100 мг/кг) при однократном введении не оказали влияния на высотный порог у крыс.

Второй подход к оценке индивидуальной устойчивости животных к экстремальной гипоксии связан 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 крыс – 11500 м).

Контрольная группа характеризовалась следующими значениями показателей (табл. 3). Особенности статистического распределения показателей (частотный анализ) представлены на рис. 3.

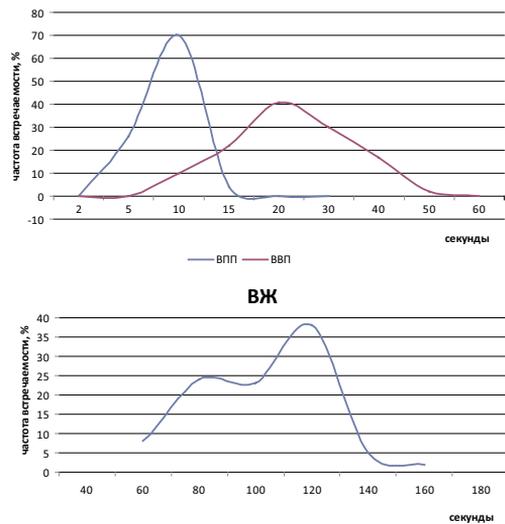


Рис. 3. Кривые частотного распределения значений показателей индивидуальной устойчивости животных к гипоксии.

Анализ рис. 3 показывает, что применяемое гипоксическое воздействие является экстремальным. Об этом свидетельствуют резкий обрыв значений времени первого падения и времени

Таблица 3  
Статистические характеристики чувствительности к гипоксии животных контрольной группы

Статистический параметр	ВПП	ВЖ	ВВП
Среднее	8,90625	95,55208	23,17708
Стандартная ошибка	0,258656	2,64056	0,919214
Медиана	10	95	20
Мода	10	110	20
Стандартное отклонение	2,534304	25,8721	9,006424
Дисперсия выборки	6,422697	669,3657	81,11568
Эксцесс	0,010361	3,047795	-0,3459
Асимметричность	-0,32845	0,734026	0,244251
Интервал	10	170	45
Минимум	5	40	0
Максимум	15	210	45
Коэффициент вариации	0,284553	0,270764	0,388592
Счет	96	96	96

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 отражающая низкую гипоксическую устойчивость.

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 обработке 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. Матрица корреляционных связей между этими показателями у контрольных животных в условиях гипоксии представлена в табл. 4.

Таблица 4

**Матрица корреляционных связей показателей устойчивости к гипоксическому воздействию**

<b>N=96</b>	<b>ВПП</b>	<b>ВЖ</b>	<b>ВВП</b>
<b>ВПП</b>	1		
<b>ВЖ</b>	-0,07337	1	
<b>ВВП</b>	0,027022	0,090422	1

Корреляционный анализ показывает, 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 (табл. 5). 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.

Частотная кривая распределения интегрального показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии (ИУГ) представлена на рис. 4.

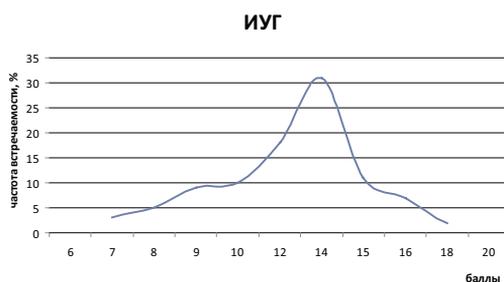


Рис. 4. Частотное распределение значений показателя индивидуальной устойчивости к гипоксии животных без применения средств фармакологической коррекции.

Анализ рис. 4 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 статисти-

Таблица 5

**Балльные шкалы оценки показателей индивидуальной гипоксической устойчивости лабораторных животных**

Показатель	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

чески 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 в таблице 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 мв условиях фармакологической коррекции увеличивается до 500 и более секунд (рис.5).

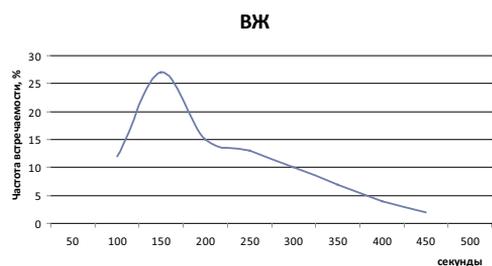


Рис. 5. Частотная кривая распределения показателя «Время жизни на высоте» для лабораторных животных в условиях фармакологической коррекции гипоксии.

Анализ рисунка показывает, что левые (начальные и центральные участки кривой, до 160 с) соответствуют закономерностям нормального распределения, а правые участки (более 160 с) представляют собой отрезок монотонного равномерного снижения. Для этого участка необходимо предусмотреть дополнительную балльную шкалу оценки времени жизни на высоте в условиях фармакологической коррекции:

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.

Таблица 6

**Влияние пирецетама на показатели индивидуальной устойчивости животных к гипоксии**

Показатель	Контроль	Пирецетам
Время поддержания позы, с	8,9 ± 0,3	12,7 ± 0,8
Время жизни на высоте, с	96 ± 3	252 ± 34 (263% от контроля)
Время восстановления позы, с	23 ± 1	21 ± 10
Индивидуальная устойчивость к гипоксии, баллы	12,2 ± 0,3	24,9 ± 2,1 (204% от контроля)

В соответствии с разработанными шкалами бальных оценок были обработаны значения, полученные при тестировании индивидуальной устойчивости к гипоксии крыс при внутрибрюшинном введении парацетама в дозе 120 мг/кг (табл. 6).

### **Заключение**

Статистический анализ показателей, отражающих различные подходы к оценке индивидуальной чувствительности лабораторных животных к острой гипобарической гипоксии, показал, что оценка высотного порога переносимости гипоксии и комплексная оценка индивидуальной устойчивости к гипоксии с нормированием по предложенным бальным шкалам приближаются по параметрам к нормальному распределению и являются предпочтительными (по сравнению с временем жизни животных на критической высоте) в исследованиях с применением фармакологических средств с нейропротекторным и антигипоксическим действием.

### **Список литературы**

1. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д. Лукьяновой. М. 1990. 18 с.
2. *Новиков В.В., Шустов Е.Б., Горанчук В.В.* Коррекция функциональных состояний при экстремальных воздействиях. СПб: Наука. 1998. 544 с.
3. *Семенов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Казакова Л.Х., Бескова Т.Б., Лушников З.С., Егорова И.Ю., Матвеев Е.Л.* Межлинейные различия в чувствительности к острой гипобарической гипоксии у инбредных мышей коллекционного фонда // Биомедицина. 2013. №1. С. 78-82.
4. *Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Гананольский В.П., Ржепецкая М.К.* Физиологическое обоснование требований к лабораторным моделям для оптимизации параметров скрининга антигипоксической активности с использованием критериев резистентности к экстремальной гипоксической гипоксии // Биомедицина. 2013. №4.

## **Analysis of individual tolerance parameters of laboratory animals to hypoxia in biological modeling neuroprotective and antihypoxant action of medicines**

**E.B. Shustov, N.N. Karkischenko, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov**

Presents the statistical characteristics of the biological model of acute hypobaric hypoxia in small laboratory animals. It is shown that the lifetime of the animals at a critical height does not obey the laws of the normal distribution and do not fully reflect the needs of pharmacology for the evaluation of the neuroprotective and antihypoxant activity of medicines. High-altitude threshold and a points-based assessment of individual resistance to hypoxia are more adequate (according to the statistical characteristics) markers of resistance to hypoxia of biomodels.

**Key words:** hypoxia, biological modeling, antihypoxant activity, statistical characteristics of the distribution.