



Умеренная внутриутробная гипоксия плода как клинически значимая модель для изучения антигипоксической активности лекарственных средств

Е.Б. Шустов, В.Н. Каркищенко, Х.Х. Семёнов, Е.Л. Матвеев

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

Контактная информация: д.м.н. Шустов Евгений Борисович, shustov-msk@mail.ru

Разработана клинически значимая модель для изучения антигипоксической активности лекарственных средств. Показано, что кратковременные повторные умеренные гипоксические воздействия (пребывание беременных самок крыс на 9-12 дни беременности в барокамере на высоте 9000 м ежедневно по 30 мин) вызывают отчетливую гипоксию плода, сопровождающуюся достоверным повышением показателя эмбриональной летальности к 20-21 дню беременности. Лекарственные средства с антигипоксической активностью триметазидин, актовегин, пирацетам при внутрижелудочном зондовом введении за 1 ч до начала гипоксического воздействия предупреждают индуцированный гипоксией рост эмбриональной летальности.

Ключевые слова: внутриутробная гипоксия плода, гипобарическая гипоксия, антигипоксанты.

Введение

Несмотря на то, что антигипоксанты как фармакологический класс известны с конца 60-х гг. прошлого века [1], 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 ги-

побарической, так и нормобарической), гиперкапнии, отравлении цианидами и метгемоглобинообразователями, критической кровопотере, а именно эти методы доклинического изучения антигипоксантов являются основными до настоящего времени [3].

Несколько ближе к клинической практике хирургические методы создания региональной или общей циркуляторной гипоксии (лигирование коронарных, позвоночных и мозговых сосудов, магистральных сосудов конечностей, сосудов брыжейки кишечника), но они не стандартизированы как методы из-

учения 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. Зачастую о степени антигипоксического действия препаратов можно судить лишь по косвенным показателям – в основном биохимическим и физиологическим, что также не вызывает оптимизма у многих исследователей.

Тем не менее, в организме человека и животных есть особая структура, высокочувствительная 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 детский церебральный паралич [4, 5].

У лабораторных животных также на стадии раннего органогенеза показана важная роль гипоксии в нарушении жизнеспособности эмбрионов [7].

В обширной литературе по изучению антигипоксической активности лекарственных средств мы не нашли источников, использующих такой подход.

В связи с этим, **целью** настоящего исследования была разработка методики оценки антигипоксической активности лекарственных средств на модели

внутриутробной гипоксии плода, вызываемой гипоксическим воздействием на беременную самку крысы.

Материалы и методы

Исследование выполнялось в два этапа. На первом этапе оценивалась сама модель внутриутробной гипоксии плода при воздействии гипобарической гипоксии на беременных самок крыс. При этом варьировались уровни гипоксического воздействия (барокамерный подъем на высоты 7000 и 9000 м) и кратность гипоксического воздействия (1, 2, 4). На втором этапе работы изучалось влияние лекарственных средств с антигипоксической активностью (триметазидин, актовегин и пирацетам) на индуцированную гипоксией эмбриональную летальность у беременных самок.

Т.к. исследование выполнялось на беременных самках, на предварительном этапе стояла задача получить достаточное количество беременных самок с фиксированной продолжительностью беременности. Для этого виргинным самкам, содержащимся в изолированных клетках по одной особи 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. Учет эмбриональной смертности в утробном периоде развития проводили путем вскрытия самок крыс на 20-й день беременности. В эмбриологический анализ не были включены самки, у которых полностью отсутствовали имплантаты. Таким образом, было исследовано 20 интактных (не подвергавшихся в последующем гипоксическому

воздействию) беременных самок крыс – по 10-11 самок на каждую точку гипоксического контроля и по 10 беременных самок на каждый исследуемый фармакологический препарат.

Показатель эмбриональной летальности на стадии органогенеза рассчитывался как отношение числа мертвых эмбрионов к числу мест имплантации (сумме количества живых и мертвых эмбрионов), определяемых при вскрытии самок на 20-й день беременности.

Гипоксическое воздействие создавалось в барокамере, в которой животные «поднимались» на заданную высоту (7000 или 9000 м) со скоростью «подъема» 165 м/с. Площадка пребывания в условиях гипоксического воздействия – 30 мин, после чего плавно возвращались с такой же скоростью к условиям нормоксии. Гипоксическое воздействие создавалось 1 раз в сутки на 9-й, 10-й, 11-й и 12-й дни беременности самок (в ходе первого этапа в отдельных группах исследовалось также влияние одно- и двукратного гипоксического воздействия). Выбор максимальной «высоты» 9000 м был обусловлен тем, что на этой высоте у здоровых крыс даже при пребывании в течение 2 ч не формируется летальная гипоксия (высотный порог для крыс этой линии составляет 11960 ± 460 м) [9].

Исследуемые препараты с антигипоксической активностью вводились внутривенно зондом в дозах, эквивалентных средним терапевтическим для человека (пирацетам – 120 мг/кг, триметазидин – 0,5 мг/кг, актовегин – 40 мг/кг) в объеме 0,2 мл за 1 ч до начала барокамерного воздействия [2]. Контрольные животные получали эквивалентное количество физиологического раствора.

Антигипоксическая активность изучаемых препаратов в стандартных условиях оценивалась по критерию высотного порога, для достижения которого крысы «поднимались» в барокамере со скоростью 165 м/с до начальной площадки 9000 м (пороговая величина устойчивости для животных с наличием заболеваний или послеоперационных состояний), «пребывали» на этой «высоте» 5 мин (300 сек) и вновь «поднимались» со скоростью 165 м/с 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.

Антигипоксическая активность изучаемых препаратов в экспериментальной модели оценивалась по индексу защиты (ИЗ), который показывает, какая часть изменений анализируемого показателя (в данном случае – эмбриональная летальность), возникающих под влиянием гипоксического воздействия, компенсировалась профилактическим введением данного лекарственного средства [8].

$$\text{ИЗ} = 100 * (\text{Хпл} - \text{Хпр}) / (\text{Хпл} - \text{Хф}),$$

где Хпл, Хпр, Хф – значения анализируемого параметра в плацебо-группе (воздействие фактора), при профилактическом введении препарата (препарат + воздействие фактора) и у интактных животных (фоновые данные) соответственно.

Статистическая обработка полученных результатов и оценка их достоверности проводилась по F-критерию методом дисперсионного факторного анализа (прикладной пакет «Анализ

данных» для табличного процессора Microsoft Excel 2010).

Лабораторные животные – виргинные самки крыс линии HY/SmY (Sm – автор инбредной линии крыс Семёнов Х.Х.), полученные из филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. На момент начала исследования масса животных составляла 180-205 г.

Регулирующие стандарты. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации, в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией 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), согласно утвержденному письменному протоколу, в соответствии со стандартными операционными процедурами исследователя (СОП), а также с Руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях [6]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Результаты и их обсуждение

Исследование показало, что 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%.

Однократное гипоксическое воздействие оказывает существенное влияние на эмбриональную летальность (индуцированная эмбриональная летальность). Так, 30-минутное

«пребывание» беременных самок на 9-е сутки беременности на «высоте» 7000 м приводило к повышению уровня эмбриональной летальности в 2 раза ($10,4 \pm 1,3$ эмбриона на 100 мест имплантации, 204%, $p=0,0016$), а на «высоте» 9000 – почти в 3 раза ($14,7 \pm 2,1$ эмбриона на 100 мест имплантации, 288%, $p=0,0003$). По результатам факторного дисперсионного анализа можно полагать, что фактор уровня гипоксии играет существенную роль в повышении эмбриональной летальности (коэффициент детерминации модели $D=0,45$; $p=0,0003$), а уровень «высоты» 9000 м является достаточным для индукции эмбриональной летальности.

Для оценки влияния кратности гипоксического воздействия дальнейшие исследования проводились на «высоте» 9000 м. Однократное гипоксическое воздействие на 9-й день беременности характеризовалось уровнем индуцированной эмбриональной летальности в $14,7 \pm 2,1$ эмбриона на 100 мест имплантации. Двукратное гипоксическое воздействие (на 9-й и 10-й дни беременности) сопровождалось незначительным повышением уровня индуцированной эмбриональной летальности ($16,7 \pm 2,3$ эмбриона на 100 мест имплантации, 113%, недостоверно). Четырехкратное гипоксическое воздействие оказывало уже более выраженное индуцирующее влияние на уровень эмбриональной летальности ($25,9 \pm 5,0$ эмбриона на 100 мест имплантации, 176%, $p=0,05$). По результатам факторного дисперсионного анализа можно полагать, что фактор кратности гипоксического воздействия играет менее выраженную (по сравнению с уровнем гипоксии) роль в повышении эмбриональной ле-

тальности (коэффициент детерминации модели $D=0,19$; $p=0,05$), и четырехкратное гипоксическое воздействие является достаточным для индукции эмбриональной летальности.

Таким образом, проведенный первый этап исследования позволил отработать следующую модель изучения влияния гипоксического воздействия на индуцируемую эмбриональную летальность у самок крыс: на 9-12 дни беременности самки крыс подвергаются ежедневному гипоксическому воздействию («пребывание» в течение 30 мин на «высоте» 9000 м). Оценка эмбриональной летальности проводится на 20-й день беременности.

Второй этап исследования был посвящен оценке применимости модели внутриутробной гипоксии плода для изучения антигипоксической активности лекарственных средств. Анализируемые препараты (триметазидин, актовегин и пирацетам) оказывают выраженное

антигипоксическое действие, проявляющееся в повышении высотного порога устойчивости животных к гипоксии (рис. 1).

Анализ рис. 1 показывает, что в исследуемых дозах при однократном профилактическом введении за 1 ч до предельно переносимого гипоксического воздействия триметазидин и пирацетам обладают практически совпадающей антигипоксической активностью, а актовегин – несколько более высоким ее уровнем (повышение высотного порога на 3,5%).

В исследуемой экспериментальной модели антигипоксическая активность препаратов оценивалась по снижению индуцированной гипоксией эмбриональной летальностью (рис. 2).

Так, профилактическое введение триметазидина и актовегина проявлялось снижением уровня индуцированной эмбриональной летальности практически до уровня спонтанной

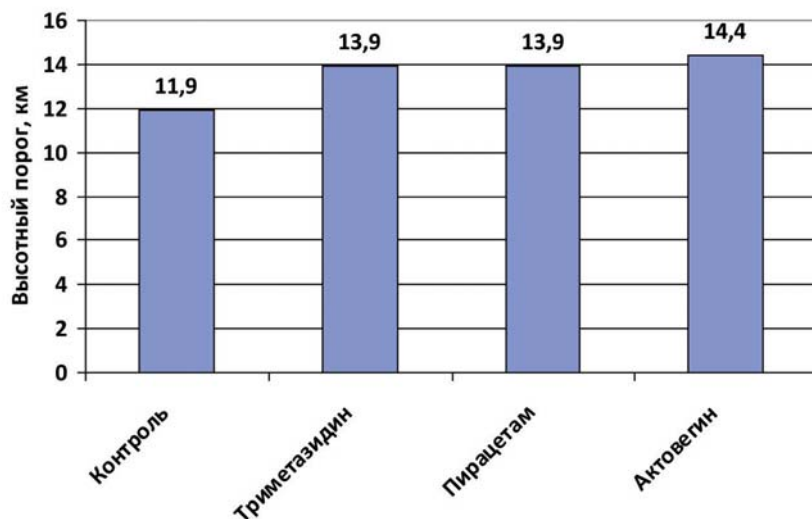


Рис. 1. Антигипоксическая активность исследуемых препаратов в тесте высотного порога.

(с 26,0 до 5,7 эмбрионов на 100 мест имплантации, при спонтанном уровне 5,1). Индекс защиты для этих двух препаратов был равен 97%. Антигипоксическая активность пирацетама в этом тесте была несколько ниже, 88% (снижение индуцированной эмбриональной летальности с 26,0 до 7,7 эмбрионов на 100 мест имплантации), но вполне сопоставимой с уровнем антигипоксической активности триметазидина или актовегина. Возможно, их более высокая антигипоксическая активность в модели внутриутробной гипоксии плода может быть связана с более отчетливым влиянием на микроциркуляцию и реологические свойства крови.

Заключение

Таким образом, разработанная модель внутриутробной гипоксии плода (четырёхкратное 30-минутное гипоксическое воздействие с уровнем гипоксии 9000 м на 9-12 дни беременности самок крыс) по показателю индуцированной эмбриональной летальности отражает степень тяжести гипоксического повреждения эмбрионов на стадии раннего органогенеза. Фармакологические средства с доказанным антигипоксическим действием, такие как триметазидин, пирацетам и актовегин, при профилактическом введении за 1 ч до начала гипоксического воздействия практически полностью (индекс

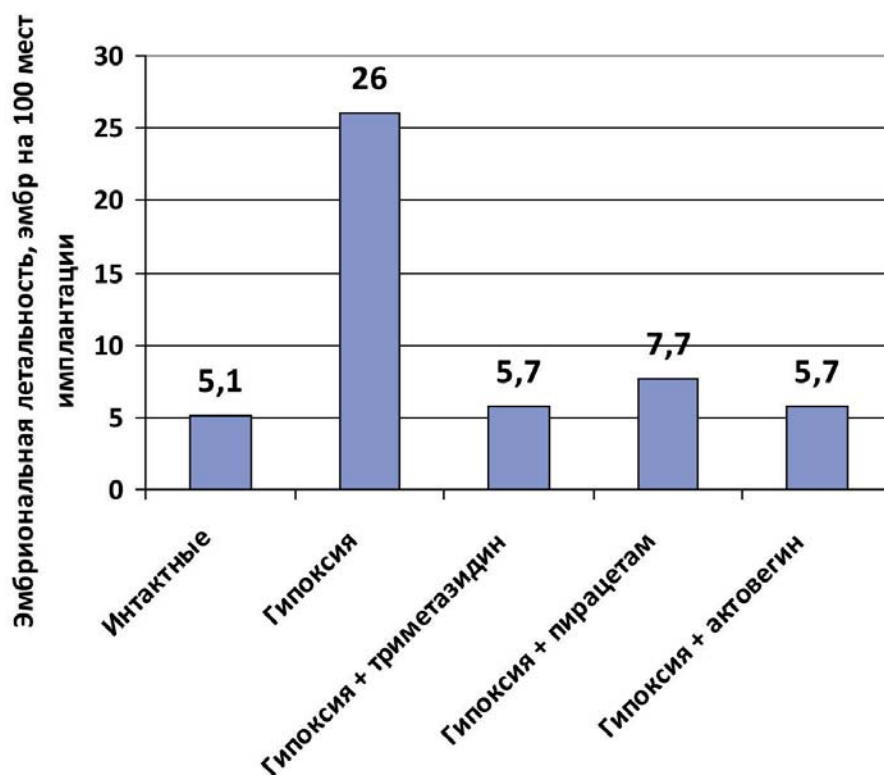


Рис. 2. Влияние антигипоксантов на индуцированную гипоксией эмбриональную летальность у беременных самок крыс.

защиты 88-97%) устраняют влияние гипоксического воздействия на эмбриональную летальность. Следовательно, данная модель может быть использована для доклинического исследования антигипоксической активности лекарственных средств на уровне формирующегося тканевого повреждения, что делает ее перспективной для экстраполяции полученных результатов на клиническую практику.

Список литературы

1. **Виноградов В.М.** Некоторые итоги и перспективы изучения гутимины – одного из первых антигипоксических средств / Фармакология амидиновых соединений. - Кишинев. 1972. С. 106-115.
2. **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.
3. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств / под ред. Л.Д. Лукьяновой. - М., 1990. 18 с.
4. **Микашинович З.И. и др.** Метаболические аспекты внутриутробной гипоксии плода при сердечно-сосудистой патологии у беременных. - Ростов-на-Дону. 2008. 158 с.
5. **Полянчикова О.Л.** Клинические и метаболические факторы в патогенезе задержки развития плода и выборе акушерской тактики / автореф. дисс....д.м.н.: М., 2010.
6. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
7. **Семёнов Х.Х., Каркищенко Н.Н., Матвеевко 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.
8. **Шустов Е.Б.** Повышение устойчивости к экстремальным воздействиям при астении / автореф. дисс. ... д.м.н. - СПб: ВМедА. 1996. 38 с.
9. **Шустов Е.Б., Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Семёнов 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.

Mild prenatal fetal hypoxia as clinically important model for the study of antihypoxic drugs activity

E.B. Shustov, V.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, E.L. Matveyenko

Clinically relevant model for the study of antihypoxic activity drugs was developed. It is shown that repeated short-term moderate hypoxic exposure (pregnant female rats on days 9-12 of gestation stay in the chamber at daily 9000 m altitude for 30 min) caused marked fetal hypoxia, accompanied by a significant increase in the higher rate of embryonic lethality to the 20-21 day of pregnancy. Antihypoxic activity drugs (Trimetazidine, Actovegin, Piracetam) introduced intragastric before 1 hour of hypoxia exposure prevent hypoxia-induced increase in embryonic lethality.

Key words: intrauterine fetal hypoxia, hypobaric hypoxia, antihypoxants.