

УДК 612.014.464:615.015.16:615.23:597

СПОСОБ СКРИНИНГА АНТИГИПОКСАНТОВ^{1,2,3}Ураков А.Л., ²Уракова Н.А., ²Чернова Л.В.¹Министерство образования и науки Российской Федерации, Москва, Россия²ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» МЗ РФ, Ижевск, Россия³ФГБУН «Институт механики» Уральского отделения РАН, Ижевск, Россия

e-mail: urakoval@live.ru

Для решения проблем термологии, ихтиологии, физиологии, биохимии, фармакологии, фармации, акушерства и гинекологии разработана модель оценки устойчивости животных к острой гипоксии при различных температурных режимах. В качестве биологических объектов предложено использовать аквариумных рыбок, в качестве модели гипоксии предложено использовать герметизацию малого объема воды с рыбой, помещенного внутрь прозрачной пластиковой емкости в условиях определенной температуры. Для скрининга антигипоксантов предлагается определять длительность периода сохранения рыб живыми при проводимом параллельно мониторинге двигательной активности рыб, цвета их плавников и прозрачности воды. Выяснено, что при исчерпании резервов адаптации к гипоксии у рыб темнеют плавники, появляются каловые массы в воде и развивается период судорожной двигательной активности, после которого они становятся неподвижными и тут же погибают. Обнаружено, что внутри герметичной емкости длительность сохранения рыбок живыми при прочих равных условиях определяется температурой воды, величиной резервов адаптации рыб к гипоксии, введением в воду атмосферного воздуха или перекиси водорода. Обнаружено, что однократное введение в воду с рыбками раствора 6% перекиси водорода в дозе 0,2 мл/кг рыбы или охлаждение воды с 26 до 16°C удлинит период сохранения рыбок живыми в условиях гипоксии в 2,0-2,3 раза. Кроме этого установлено, что сила протекторного действия перекиси водорода и гипотермии прямо пропорциональна их дозе. При этом чрезмерно значительное увеличение концентрации кислорода и/или перекиси водорода в воде при исчерпании резервов адаптации рыб к гипоксии способно убить рыбок.

Ключевые слова: температура тела, аквариумные рыбки, гипоксия, антигипоксанты, кислород, перекись водорода

METHOD OF SCREENING ANTIHYPOXANTS^{1,2,3}Urakov A.L., ²Urakova N.A., ²Chernova L.V.¹The Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Moscow²Institute of Biotechnology and Interdisciplinary Dentistry, Moscow³Institute of Mechanics Ural Branch of RAS, Izhevsk

e-mail: urakoval@live.ru.

To solve the problems of thermology, ichthyology, physiology, biochemistry, pharmacology, pharmacy, obstetrics and gynecology developed a model to assess the resistance of animals to acute hypoxia at different temperatures. As biological objects is proposed to use aquarium fish, as a model of hypoxia is proposed to use sealing of a small amount of water with fish, inside a clear plastic containers under the conditions specified temperature. For screening antihypoxants proposed to determine the duration of period preservation fish alive held in parallel monitoring locomotor activity of fish, the color of their fins and water clarity. Found that the exhaustion of reserves adaptation to hypoxia fins of fish became darker, appear fecal in water and develops period convulsive motor activity, after which they become immobile and immediately die. Found that inside sealed containers duration of preservation of fish living under other equal conditions is determined by the temperature of the water, the quantity of adaptation reserves of fish to hypoxia, the introduction into the water of atmospheric air or hydrogen peroxide. Found that a single injection into the water with fish solution 6% peroxide of hydrogen in the dose of 0.2 ml/kg of fish or cooling water from 26 to 16 C prolongs the period of preservation of fish living in hypoxia in 2.0-2.3 times. Besides it is established, that the power of the protective action of hydrogen peroxide and hypothermia is directly proportional to the dose. At the same time too significant increase in the concentration of oxygen and/or hydrogen peroxide in water with the exhaustion of reserves of adaptation of fish to hypoxia can kill fish.

Key words: body temperature, aquarium fish, hypoxia, antihypoxants, oxygen, hydrogen peroxide

Для борьбы с гипоксией сегодня рекомендуется применять антигипоксанты, то есть средства «против гипоксии». При этом современные антигипоксанты не являются заменителями, аккумуляторами или донаторами кислорода, поэтому на основе классических законов химии, биохимии, биофизики и биологии трудно себе представить, как такие средства могут заменить кислород и побороть гипоксию [6]. Более того, исходя

из указанных представлений, эти средства не могут продлевать жизнь человека и животных в условиях гипоксии [10, 12]. А как же на самом деле ?

Ответ этот вопрос следует искать в области фармакологии. В этой сфере деятельности в настоящее время к антигипоксантам относят такие лекарственные средства, как дибунол, оксипутират натрия, олифен, эпофен, эмоксипин, мексидол, ма-

фусол и реамберин [6]. Считается, что механизм действия этих лекарств сводится к способности эффективно защитить от гипоксического повреждения чуть ли не весь организм, включая клетки коры головного мозга. Тем не менее, эти средства не применяются для сохранения жизнеспособности изолированных органов и тканей при их консервации, которая осуществляется в условиях недостатка кислорода, то есть в условиях гипоксии [1, 2, 3]. В связи с этим возникает обоснованное сомнение в истинной способности этих средств повышать устойчивость к гипоксии у органов, тканей и организма в целом.

Иными словами, имеющиеся факты противоречат друг другу. С одной стороны, гипоксия – это недостаток кислорода, с другой стороны, современные антигипоксантаы – это не кислород и не его заменители, а соли, лишенные кислорода. При этом известно и то, что живые органы, ткани и организмы могут быть защищены от гипоксического повреждения без добавления кислорода. Парадоксально то, что победа над гипоксией без кислорода возможна довольно просто, а именно – с помощью охлаждения биологических объектов [2, 4, 5, 9].

На наш взгляд, сохранение неразрешенных проблем в поиске и изучении антигипоксантаов объясняется тем, что исследователи до сих пор не имеют в своих руках простой и дешевой экспериментальной модели, которая бы позволяла оценивать устойчивость организма к гипоксии с учетом недостатка кислорода, зависимости аэробного метаболизма от температуры и устойчивости организма к гипоксии.

Результаты анализа истории изучения антигипоксантаов показывают, что приведенные выше противоречия остаются неразрешенными еще и потому, что особенности гипоксических повреждений длительного времени изучались в опытах на теплокровных животных. А теплокровные животные не допускают «свободного» (то есть беспрепятственного) искусственного изменения температуры их тела, поскольку при искусственном охлаждении они борются как с общей, так и с локальной гипотермией и реагируют на попытки искусственного изменения температуры их тела как на повреждающий фактор. Однако сегодня методологическая основа изучения устойчивости живых объектов к гипоксии может быть существенно оптимизирована благодаря появлению новой модели в области термофармакологии, а именно – в области изуче-

ния эффективности антигипоксантаов. Дело в том, что для изучения проблем термофармакологии предложено использовать аквариумных рыбок, допускающих «беспрепятственное» изменение температуры своего тела, поскольку рыбы относятся к холоднокровным животным [7,8].

Цель исследования: разработка способа скрининга гипоксантаов и антигипоксантаов.

Материалы и методы исследования.

Опыты с острой и потенциально смертельной гипоксией проведены на 300 взрослых здоровых аквариумных рыбках обоего пола породы голубые неоны (150 рыбок) массой по 290-310 мг и гуппи (150 рыбок) массой по 300-320 мг. Моделирование острой гипоксии достигалось путем помещения каждой рыбки в 5 или в 2,5 мл пресной воды, находящейся в герметичной емкости (внутри шприца) при определенной температуре в диапазоне 16-26°C, отличающейся от серии к серии на 1°C. Каждая рыбка находилась в воде внутри отдельного прозрачного пластикового инъекционного шприца при стабильной температуре. Определялась продолжительность жизни рыбок в условиях прекращения поступления атмосферного воздуха в воду, в которой находились рыбки. Помимо этого регистрировалась динамика двигательной активности рыб, в частности частота дыхательных движений жаберных дуг, частота открывания рта, частота и амплитуда колебаний плавников, а также последовательность изменения цвета плавников.

Перекись водорода вводилась в воду до или после помещения в нее рыбок с учетом двигательной активности рыбок, характерной для стадии их адаптации к гипоксии. Разовая доза перекиси водорода составляла 0,2 мл/кг рыбы.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы «Stastica for Windows 5.0». Достоверность отличий определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $P < 0,05$. Данные представлены как $M \pm m$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего) [11].

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты проведенных экспериментов показали, что при прочих равных условиях продолжительность сохранения рыбок живыми в воде после прекращения поступления в нее атмосферного воздуха зависит от температуры воды и величины атмосферного давления. Установлено, что продолжительность жизни рыбок в герметичной емкости с водой тем дольше, чем ниже температура воды, и чем выше величина атмосферного давления в атмосферном воздухе.

Так, в серии опытов, проведенных в дни, когда атмосферное давление воздуха находилось в пределах 755-765 мм рт. ст., продолжительность жизни рыб в условиях прекращения поступления воздуха в воду зависит от температуры воды следующим

образом: при температуре воды 26°C смерть рыбок породы голубые неоны и гуппи наступала соответственно через $25,3 \pm 1,31$ и $27,4 \pm 1,32$ минут ($P \leq 0,05$, $n = 5$), а при температуре воды 16°C смерть рыбок породы голубые неоны и гуппи наступала соответственно через $65,4 \pm 2,60$ и $67,6 \pm 2,68$ ($P \leq 0,05$, $n = 5$) минут после начала прекращения поступления воздуха в воду. Иными словами, понижение температуры воды на 10°C с уровня комнатной температуры удлинит продолжительность жизни рыб при гипоксии в 2,2-2,3 раза.

В следующей серии опытов исследована продолжительность жизни рыбок в ограниченном объеме воды после прекращения поступления в нее атмосферного воздуха при различном атмосферном давлении. Опыты с рыбками проведены при температуре воды 16°C в дни, когда атмосферное давление воздуха было ниже или выше нормы на 10 мм рт. ст. При этом были получены следующие результаты. Продолжительность жизни рыбок из породы голубые неоны и гуппи при переживании ими гипоксии в воде при 16°C в дни, когда атмосферное давление находилось в пределах 770-780 мм рт. ст., была соответственно $67,3 \pm 2,57$ и $69,5 \pm 2,62$ минут, а в дни, когда атмосферное давление находилось в пределах 740-750 мм рт. ст. продолжительность жизни рыбок этих пород была соответственно $64,3 \pm 2,50$ и $65,8 \pm 2,61$ ($P \leq 0,05$, $n = 5$) минут.

Помимо этого выяснено, что в первый период адаптации к гипоксии рыбки практически неподвижны. Так, при нормальных значениях атмосферного давления (755-765 мм рт. ст.) и при температуре воды 26°C рыбки породы голубые неоны и гуппи остаются в неподвижном состоянии соответственно $21,90 \pm 0,91$ и $27,2 \pm 0,95$ минут ($P \leq 0,05$, $n = 5$), а при температуре воды 16°C сохраняют неподвижное состояние соответственно $49,73 \pm 2,10$ и $59,83 \pm 2,22$ минут ($P \leq 0,05$, $n = 5$). После этого неподвижность у рыбок исчезает. Вместо этого появляются активные движения жаберных дуг, плавников и туловища, рыбки непрерывно открывают рот и начинают усиленно пропускать воду через открытый рот и открытые жабры. Еще через 5-10 секунд после начала указанного периода двигательной активности рыбки начинают беспорядочно и резко перемещаться (метаться) в воде внутри емкости. При этом рыбы эпизодически испражняются, поэтому вода, в которой они плавают, загрязняется каловыми массами.

В целом указанный период высокой двигательной активности у рыб напоминает собой их судорожный поиск «лучшего» места внутри шприца (места, в котором вода содержит больше кислорода). Длится этот период в среднем 30-100 секунд, после чего рыбки замирают и вновь становятся неподвижными. При этом половина из них переворачивается кверху брюхом и всплывает кверху, оставшаяся часть рыб остается в положении вниз брюхом и опускается на дно. Однако после этого все рыбки еще около 1 минуты продолжают производить очень редкие дыхательные движения ртом и жаберными дугами, а также единичные подергивания плавниками, после чего окончательно становятся неподвижными и погибают. Перенос их тел в аэрируемую пресную воду не приводит к оживлению рыбок.

Полученные данные решено было принять за естественную устойчивость рыбок к гипоксии. Другими словами, описанные выше значения продолжительности жизни рыбок в герметичной емкости с водой были приняты за условную физиологическую норму, то есть за «контрольные данные», сравнение с которыми дает возможность выявлять изменение устойчивости рыбок к гипоксии, вызванное, например, применением антигипоксантов. Причем, исследуемые средства можно вводить прямо в воду, в которой плавают рыбки.

Выяснение данной возможности было исследовано в опытах с перекисью водорода. Дело в том, что перекись водорода является, по сути дела, химическим аккумулятором кислорода, из которого может образовываться с помощью каталазы молекулярный кислород. В частности, 100 мл раствора 6% перекиси водорода может выделить 1,97 л O_2 (молекулярного кислорода) массой 2,816 г. Поэтому дополнение воды терапевтической дозой перекиси водорода теоретически должно отодвинуть момент наступления смерти рыб в воде при отсутствии поступления атмосферного воздуха в воду. И если такое удлинение длительности жизни аквариумных рыб будет обнаружено с помощью нашей модели острой гипоксии, то это будет означать, что модель пригодна для поиска веществ, обладающих антигипоксическим действием.

Нами были проведены химические расчеты, которые показали, что при введении в пресную воду с рыбами перекиси водорода в разовой дозе 0,2 мл/кг рыбы можно рассчитывать на следующее изменение содержания кислорода в этой воде. С одной сторо-

ны, можно сохранить в этой воде нормальный уровень растворенного в ней кислорода (что обеспечивается его содержанием в воздухе и величиной атмосферного давления), а с другой стороны дополнить воду связанным кислородом в количестве, достаточном в случае высвобождения из него растворенного кислорода для нормализации содержания кислорода в воде, лишенной кислорода.

Поэтому если использовать небольшой объем пресной воды (например, в объеме 5 мл), приготовленный для введения в нее аквариумной рыбки (массой около 0,3 г), ввести в этот объем перекись водорода в дозе 0,2 мл/кг рыбы, а затем измерить содержание в воде свободного и связанного кислорода, то будет выявлено увеличение суммарного количества кислорода практически в 2 раза. Это дает надежду на увеличение в 2 раза продолжительности жизни рыб в этой воде после прекращения поступления в нее атмосферного воздуха, если рыбы могут использовать связанный кислород, а точнее – перекись водорода.

Результаты проведенных нами экспериментов подтвердили правильность этих расчетов. Установлено, что для своевременного обеспечения рыбок кислородом и для достижения эффективного антигипоксического действия перекись водорода следует вводить в воду либо до помещения в нее рыб (то есть перед началом опыта с гипоксией), либо после помещения рыб в воду и начала прекращения доступа в нее кислорода, но не позднее 40 секунд после появления беспорядочной двигательной активности у рыб в конце адаптации их к гипоксии.

Оказалось, что в условиях нормального атмосферного давления и температуры воды в пределах 16°C введение перед началом эксперимента в воду с рыбками породы голубые неоны, переживающими острую гипоксию, перекиси водорода в дозе 0,2 мл/кг рыбы, позволяет продлить период сохранения их живыми с $49,73 \pm 2,10$ до $99,10 \pm 4,70$ минут, то есть практически в 2 раза.

Подобные же данные получены нами в опытах с рыбками породы гуппи и голубые неоны при гипоксии в условиях нормального атмосферного давления при более высокой температуре воды, а именно – при температуре воды 26°C. Показано, что в этих условиях перекись водорода в дозе 0,2 мл/кг рыбы также удлиняет период сохранения живых рыб. Так, рыбки породы голубые неоны и гуппи в контроле погибают через с $25,3 \pm 1,31$ и $27,4 \pm 1,32$ минут

($P \leq 0,05$, $n = 5$) (соответственно), а в опыте (под действием перекиси водорода) – через $52,43 \pm 2,43$ и $57,11 \pm 2,45$ минут ($P \leq 0,05$, $n = 5$) (также соответственно).

Кроме этого показано, что введение в воду с рыбками перекиси водорода в дозе, увеличенной в 4 раза, приводит к тому, что все 100% рыбок погибают через 5-12 минут после введения препарата.

Полученные результаты свидетельствуют, с одной стороны, о возможности использования аквариумных рыб для скрининга антигипоксантов в условиях острой гипоксии при различных температурных режимах, а с другой стороны – о способности перекиси водорода и холода эффективно отодвигать момент наступления смерти рыб при гипоксии, что может найти применение при хранении и транспортировке живой рыбы.

Таким образом, нами разработан способ поиска веществ, изменяющих устойчивость организма к острой гипоксии, то есть способ скрининга гипоксантов и антигипоксантов.

Список литературы

1. Ураков А.Л. Использование гипотермии для изыскания принципиальных путей фармакологической защиты миокарда от повреждения в ранний период острой ишемии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1984. № 4. С. 512.
2. Ураков А.Л. Рецепт на температуру // Наука и жизнь. 1989. № 9. С. 38-42.
3. Ураков А.Л. Медицинская термофармакология // Экономический вестник фармации. 2000. № 8. С. 101-104.
4. Ураков А.Л., Уракова Н.А. Устойчивость плода к гипоксии и родам // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2012. Т. 4. С. 221-223.
5. Ураков А.Л. Холод в защиту сердца // Успехи современного естествознания. 2013. № 11. С. 32-36.
6. Чернова Л.В. Антигипоксанты: миф или реальность? // Электронный научно-образовательный вестник Здоровье и образование в XXI веке. 2013. Т. 15. № 6. С. 20-23.
7. Чернова Л.В. Динамика двигательной активности аквариумных рыбок при их гипоксии // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2014. Т. 16. № 3. С. 9-11.
8. Чернова Л.В. Влияние температуры на динамику цвета плавников и двигательной активности взрослых аквариумных рыбок при острой гипоксии // Международный научно-исследовательский журнал. 2014. № 3 (22). С. 117-118.
9. Urakov A., Urakova N., Kasatkin A. Temperature of newborns as a sign of life in Russia - time to change in World? // J. Perinat. Med. 2013. Vol. 41. P. 473.
10. Urakov A., Urakova N., Demytyev V. Infrared thermography as a means to quantify the effects of intrauterine fetal hypoxia // Resuscitation. 2013. Vol. 84S. P. S73-S74.
11. Infrared thermographic investigation of fingers and palms during and after application of cuff occlusion test in patients with hemorrhagic shock / A.L. Urakov, A.A. Kasatkin, N.A. Urakova, A. Kurt // Thermology International. 2014. Vol. 24. № 1. P. 5-10.
12. Urakov A.L., Urakova N.A., Kasatkin A.A. Local hypothermia skin above cracks skull fetus in the final period births may be a symptom of hypoxia and ischemia of the cortex of his brain // 18TH World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI). October 24-27, 2013, Vienna, Austria. Editor Z. Ben-Rafael. Milano (Italy): Monduzzi editoriale proceedings. 2014. P. 177-181.