

Особенности экспериментального моделирования соматических и неврологических заболеваний для оценки эффективности лекарственных препаратов

С.В. Чепур, В.Н. Быков, М.А. Юдин, А.С. Никифоров, И.В. Фатеев, А.А. Арутюнян

Научно-исследовательский испытательный центр (медико-биологической защиты)
Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной
медицины Минобороны России, Санкт-Петербург

Контактная информация: Сергей Чепур svch-spb@mail.ru

Систематизированы сведения об экспериментальном моделировании жировой дистрофии и цирроза печени, панкреатита с сахарным диабетом, демиелинизирующих заболеваний нервной системы. Моделирование экспериментальной патологии осуществляется посредством аппликации лекарственных препаратов и химических соединений в установленных дозах. Двухэтапное формирование инсульта головного мозга на крысах осуществляли последовательной перевязкой общих сонных артерий. Стандартизацию моделей и выбор оптимальных сроков для оценки эффективности лекарственных препаратов осуществляли в ходе морфологических и биохимических исследований, выявляющих сходство моделируемых патологических изменений с таковыми у человека. Адекватность экспериментальных моделей оценена в ходе скрининга лекарственных препаратов.

Ключевые слова: диметилнитрозамин, стрептозоцин, паракват, органофосфаты, реперфузионный синдром.

По мере формирования отечественного производственного фармацевтического сектора усиливается интерес к разработке и испытанию оригинальных лекарственных средств. В связи с этим, особую актуальность приобретают исследования по созданию экспериментальных моделей патологических процессов, которые по своим проявлениям, реакциям клеточных популяций и биохимическому статусу в значительной степени соответствовали бы протеканию заболеваний у человека. Важность создания моделей *in vivo* для скрининга лекарственных препаратов определяется необходимостью выявления эффектов лекарств в условиях существования системного кровотока, сохранности микроциркуляторного русла, иннервации, а главное – функци-

онирующих гистогематических барьеров, воспроизведение которых в полной мере невозможно в органных и тканевых культурах *in vitro*. Немаловажное значение имеет возможность моделирования патологических состояний на мелких лабораторных животных, что необходимо для первичного отбора эффективных лекарственных препаратов среди синтезированных в небольшом количестве оригинальных химических соединений.

Отсутствие стандартизованных воспроизводимых экспериментальных моделей, в свою очередь, существенно затрудняет сравнительную оценку результатов многочисленных исследований эффективности лекарственных средств, а в ряде случаев ставит под сомнение прогноз проявления целевого эффекта у человека.

В этой связи, **цель** настоящего исследования состояла в разработке экспериментальных моделей заболеваний печени, поджелудочной железы, демиелинизирующих заболеваний нервной системы и инсульта головного мозга на крысах.

Для достижения указанной цели предстояло решить задачи по стандартизации условий воспроизведения патологических процессов на мелких лабораторных животных, а также, с учетом характеристик их протекания, определить оптимальные сроки испытания эффективности лекарств и наиболее информативные регистрируемые показатели, а также методы лабораторного исследования.

Материал и методы

Исследования выполнены на паспортизированных линиях белых крыс *Sprague Dawley* и *Wistar*, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино».

Поддержание указанных линий осуществляется в виварии НИИЦ (МБЗ), что также обеспечивает поступление животных линии *Wistar* для проведения экспериментов. Эксперименты выполнены на самцах массой 180–220 г. Животных содержали в условиях вивария на сухом корме без ограничения водопотребления. В стандартные пластмассовые клетки помещали не более 6 крыс, в качестве подстилки использовали автоклавированные березовые стружки.

Для получения репрезентативных выборок в группы включали по 10 животных. Моделирование патологических процессов осуществляли введением крысам химических соединений по схемам в соответствии с данными табл. 1. Моделирование инсульта головного мозга осуществляли двухэтапно, посредством лигирования одной из сонных артерий с последующим через 1–5 сут. перевязкой общей сонной артерии на контралатеральной стороне.

Таблица 1

Дозы и порядок введения лекарственных препаратов для моделирования соматических и неврологических заболеваний

Вариант патологического процесса	Вещество, применяемое для моделирования	Доза, мг/кг	Режим введения
Жировая дистрофия печени	тетрахлорметан	2000	50% масляный раствор, подкожно по 0,4 мл/100 г массы тела ежедневно в течение 4 сут.
Цирроз печени	диметилнитрозамин	10	Три раза в неделю, внутримышечно, в течение 3–4 нед.
Панкреатит с выраженной гипергликемией	стрептозоцин	70–140	Однократно, внутримышечно
Дыхательная недостаточность	паракват	20	Однократно, внутрибрюшинно
Рассеянный склероз	хлорофос, мипафокс	0,8 ЛД ₅₀	0,4 ЛД ₅₀ подкожно, затем 0,4 ЛД ₅₀ через 1 ч после первой инъекции, внутримышечно

Для характеристики протекания патологического процесса группы животных выводили из опыта на 1, 3, 7, 14 и 28-е сутки эксперимента. Регистрировали изменение массы тела крыс, количество потребляемой жидкости, состав и свойства мочи, собираемой в обменных клетках, а также специфические проявления патологических процессов. Вывод животных из опыта осуществляли одномоментной гильотинной декапитацией с отбором крови для гематологического и биохимического исследования, а также проведением комплекса патоморфологических и гистологических исследований органов и тканей для определения характеристик протекания патологического процесса. При гистологическом исследовании материал фиксировали 12% нейтральным формалином (BioVitrum), парафиновые срезы 5-7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином, по ван Гизон, по Маллори, а также другими красителями в соответствии с вариантом патологического процесса. Срезы оценивали на микроскопе PolyVar с применением цифровой фотокамеры с архивацией изображений для их последующего морфометрического анализа. Гематологические исследования выполнены с применением гематологического анализатора Mythic 18, биохимические исследования выполнены на автоматическом биохимическом анализаторе BioScan с использованием программ для анализа крови крыс.

При анализе результатов изменения характеристик животных в группах использовали непараметрическую статистику Манна-Уитни, при анализе динамики клеточных популяций для сравнения выборок использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Особое внимание уделяли характеристикам протекания патологических

процессов и возможности применения разработанных моделей для оценки эффективности лекарственных препаратов.

Жировая дистрофия печени. Классическая жировая дистрофия печени воспроизводится при подостром отравлении крыс тетрахлорметаном. Для моделирования применяют 50% раствор тетрахлорметана в подсолнечном масле, который вводят подкожно в объеме 0,4 мл/100 г массы тела, ежедневно в течение 4 сут. Применение масел богатых ненасыщенными жирными кислотами снижает токсическое действие хлорированного углеводорода. Как правило, гибели крыс при проведении эксперимента не наблюдали. Результаты моделирования могут применяться для оценки эффективности гепатопротективных средств на 7-е сут. эксперимента и сохраняют выраженность у животных контрольных групп на протяжении не менее 14-ти сут.

При отравлении крыс тетрахлорметаном в печени развиваются типичные воспалительно-дистрофические реакции. Макроскопически печень выглядела кирпично-оранжевой с мелкими западинами на поверхности, на ощупь орган тестоватой консистенции.

При гистологическом исследовании в участках, которые не были целиком подвержены некрозу, удавалось четко проследить зональность поражений и предположить последовательность структурных изменений. В большинстве клеток периферической зоны развиваются дистрофические изменения, преимущественно в виде белково-гидропической дистрофии. В цитоплазме большинства гепатоцитов выявлены просветления с нечеткими контурами. Необходимая часть цитозоля в виде глыбок смещена к периферии клетки. Ядро часто располагается полярно и в большинстве случаев пикнотично изменено.

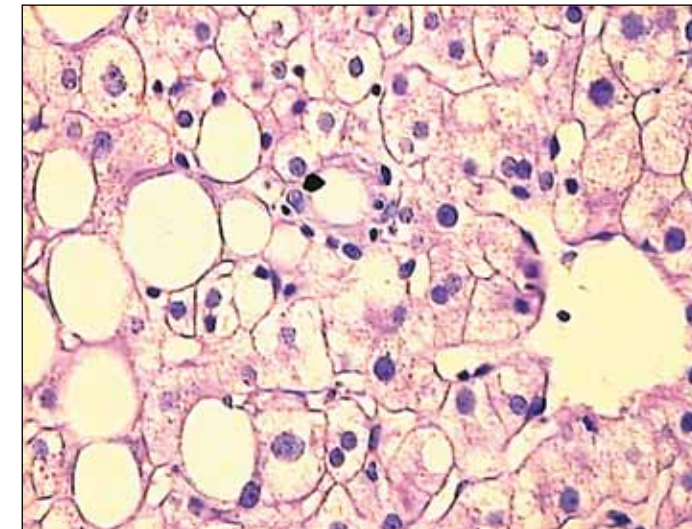


Рис. 1. Расширение центральной вены и крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов печени крыс, сопровождающаяся умеренно-выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. Подострое отравление тетрахлорметаном, 7 сут. эксперимента. Окраска гематоксилин-эозин, ув. об. х 40.

По мере удаления от центра дольки происходит смена гистопатологических изменений. В умеренно гиперхромных клетках определяют глыбчатую агрегацию матрикса, соответствующую картине зернистой дистрофии. Часто в этих же клетках выявляли мелкие и средней величины вакуоли с ровными контурами. При окрасках суданами эти вакуоли интенсивно окрашивались. В ряде клеток выявлены крупные жировые вакуоли, оттесняющие ядра клеток к цитолемме. При разрушении этих клеток свободнолежащие капли жира определяются в межклеточном пространстве в виде жировых кист (рис. 1).

Средний диаметр воротной вены увеличивается в 3-4 раза и составляет 183 ± 17 мкм (43 ± 9 мкм у intactных животных). Значительно расширяются также просветы венозных синусоидов и пространств Диссе. В сосудах отмечены явления стаза крови и агрегации форменных элементов. Большинство эндотелиоцитов набухшие.

Таким образом, при отравлении четыреххлористым углеродом у животных возникает картина токсического гепатита с развитием колликационного некроза и дистрофических изменений гепатоцитов с преобладанием жировой дистрофии, сопровождающимися формированием воспалительной клеточной инфильтрации. Элементы желчевыводящей системы часто остаются сохранными. Подобные изменения сходны с гистологическими проявлениями HCV-инфекции у человека, в особенности при ее протекании на фоне сахарного диабета.

Подобная модель позволяла выявить активность ряда гепатопротекторов, в частности гепатофальк-планта, и оценить цитопротективное действие этимизола, данные о котором были систематизированы в диссертационном исследовании Е.В. Саблиной [5].

Цирроз печени. Моделирование цирроза печени на крысах представляет собой непростую задачу, решение которой во многом определяет возможность



Рис. 2. Неровность поверхности печени и изменение ее цвета (А), сопровождающиеся спленомегалией (Б) и формированием асцита (В) у крыс на 21-е сут. подострого отравления ДМНА.

комплексной оценки гепатопротективных средств и побочных эффектов лекарственных препаратов. К сожалению, для моделирования цирроза достаточно часто применяются различные варианты введения хлорированных углеводов, применение которых формирует поральный фиброз и крайне редко сопровождается истинными цирротическими изменениями гистоархитектоники печени с формированием соединительнотканых септ, отграничивающих псевдодольки. В этой связи, результаты исследований

противоцирротической активности препаратов, выполненных на таких моделях, зачастую без должного гистологического контроля, следует признать несостоятельными.

Гистопатологические изменения в печени крыс, сходные с таковыми при формировании постнекротического цирроза печени у человека, возникают на фоне подострого отравления диметилнитрозоамином (ДМНА), который вводят внутримышечно в дозе 10 мг/кг три раза в неделю на протяжении 3-4 недель

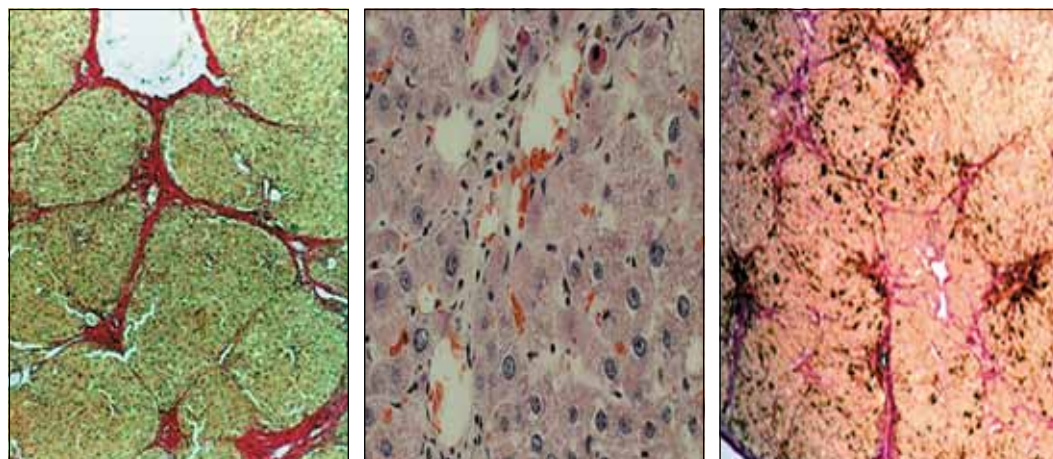


Рис. 3. Формирование псевдодолек (А), разделенных соединительноткаными септами, в которых выявляются признаки поражения сосудов и неоангиогенеза (Б), клетки Купфера насыщены гемосидерином (В). 21 сут. подострого отравления ДМНА, окраска по ван Гизон (А, В) и гематоксилин-эозином (Б). Ув. об. х 16 (А, В), х 40 (Б).

в зависимости от требуемой глубины поражения. Необходимо также отметить, что летальность крыс, которые подверглись подострому введению ДМНА, составила 40%, при этом гибель животных регистрировали, в среднем, через $17,65 \pm 0,26$ сут. после начала эксперимента. Важно отметить, что в отличие от человека, патологические изменения у крыс сохраняются на протяжении 1,0-1,5 мес., после чего подвергаются регрессии. Вследствие этого, при необходимости оценки лекарственных препаратов на протяжении длительного периода требуется продолжение введения ДМНА.

При аутопсии крыс выявляли типичные цирротические изменения с форми-

рованием зернистой печени, спленомегалии и асцита (рис. 2), который крайне редко формируется при отравлениях четыреххлористым углеродом.

При гистологическом исследовании выявляли формирование соединительнотканых септ на месте некроза гепатоцитов. Формирование соединительной ткани сопровождалось васкулитом с инфильтрацией и множественным тромбозом сосудов, инициирующим компенсирующий его интенсивный неоангиогенез. Клетки Купфера в большинстве случаев содержали гемосидериновые включения (рис. 3).

При биохимическом исследовании выявляли признаки цитолиза и измене-

Таблица 2
Изменения биохимических показателей при введении лекарственных препаратов на фоне сформированного ДМНА-индуцированного цирроза печени

Показатель	Группы				
	Интактные	Контроль, ДМНА по схеме в течение 3 нед.	Нимесулид, 8,5 мг/кг два раза в день в течение 5 сут.	Дексаметазон, 2 мг/кг ежедневно в течение 5 сут.	Метронидазол + кларитромицин, по 100 мг/кг ежедневно 5 сут.
АЛТ, ммоль/л	67,7 $\pm$ 0,95	109,3 $\pm$ 6,40*	104,5 $\pm$ 6,65 *	138,0 $\pm$ 23,41*	148,3 $\pm$ 9,54* ^Δ
АСТ, ммоль/л	183,0 $\pm$ 9,37	239,3 $\pm$ 28,51	246,3 $\pm$ 15,62*	226,0 $\pm$ 23,12	270,6 $\pm$ 18,54*
Билирубин общ., мкмоль/л	4,3 $\pm$ 0,42	7,2 $\pm$ 1,42	4,3 $\pm$ 1,05	6,0 $\pm$ 1,59	5,3 $\pm$ 1,22
Общ. белок, г/л	49,0 $\pm$ 1,24	46,83 $\pm$ 4,60	58,5 $\pm$ 1,76* ^Δ	46,67 $\pm$ 3,84	48,8 $\pm$ 3,78
-ГТП, ед	5,8 $\pm$ 0,91	12,2 $\pm$ 1,03*	10,5 $\pm$ 0,71*	10,3 $\pm$ 1,52*	10,2 $\pm$ 0,61*
ЩФ, ед	9,3 $\pm$ 0,95	10,2 $\pm$ 1,91	12,25 $\pm$ 3,91	4,3 $\pm$ 0,73* ^Δ	10,6 $\pm$ 1,65
Глюкоза, ммоль/л	5,3 $\pm$ 0,38	7,1 $\pm$ 0,70*	7,7 $\pm$ 0,48*	6,3 $\pm$ 0,94	7,8 $\pm$ 0,73*
Холестерин, ммоль/л	1,1 $\pm$ 0,07	1,4 $\pm$ 0,20	1,3 $\pm$ 0,22	1,1 $\pm$ 0,23	2,0 $\pm$ 0,24*

Примечание: * – различия с группой интактных животных достоверны при $p \leq 0,05$;
^Δ – различия с группой контрольных животных достоверны при $p \leq 0,05$.

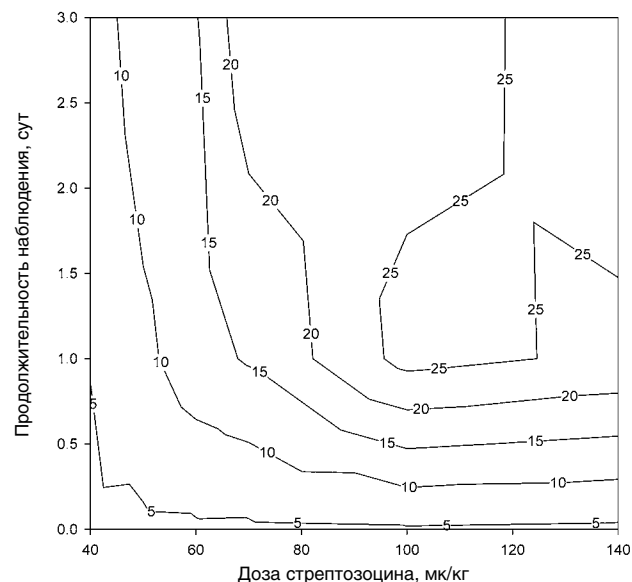


Рис. 4. Изменение концентрации глюкозы (моль/л) в крови крыс после однократного введения стрептозоцина в разных дозах в зависимости от продолжительности постинтоксикационного периода.

ния системы гемостаза, проявляющиеся в увеличении временных характеристик свертывания крови.

Указанная модель была применена для оценки эффективности тиопозитинов [2] и позволила детально оценить гепатопротективную эффективность препаратов группы глутоксида. Кроме того, цирротическая модель может применяться для исследования побочных эффектов лекарственных средств. Результаты такого исследования препаратов, применяемых в комплексной терапии циррозов и ассоциированных с ними осложнений, приведены в табл. 2.

Панкреатит с выраженной гипергликемией. Моделирование сахарного диабета осуществляли посредством внутримышечного однократного введения стрептозоцина, индуцирующего необратимые нарушения структуры инсулярного аппарата поджелудочной железы. Стрептозоцин применяли в широком диапазоне доз от 40 до 140 мг/кг в зависимости от требуемых сроков формирования

стойкой гипергликемии в соответствии с номограммой (рис. 4). При отравлении животных стрептозоцином в дозе 140 мг/кг начиная с 4-х сут. отмечали гибель крыс, средняя продолжительность жизни животных составила $5,0 \pm 0,21$ сут. К исходу недели все отравленные стрептозоцином в этой дозе крысы погибли.

У животных всех опытных групп наблюдали развитие сходных структурных изменений в поджелудочной железе, соответствующих острому панкреатиту. На фоне недостаточного артериального кровоснабжения отмечали признаки венозного застойного полнокровия, которое сопровождалось диапедезными кровоизлияниями. Застой крови в венозном отделе сосудистого русла повышал вероятность внутрисосудистого тромбообразования. В ряде случаев на фоне выраженного сладж-синдрома и паретического расширения веноулярного отдела микроциркуляторного русла наблюдали признаки интерстициального отека междольковой и внутридольковой соедини-

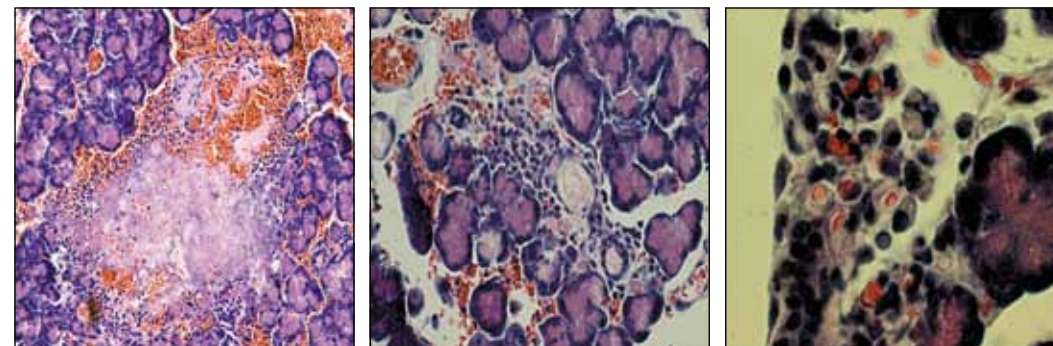


Рис. 5. Участок паренхимы поджелудочной железы крысы на 10-е сут. после острого отравления стрептозоцином в дозе 70 мг/кг. Зона творожистого некроза с геморрагическим пропитыванием (А), перидуктулярное скопление полиморфно-ядерных лейкоцитов (Б), отек соединительной ткани и дистрофические изменения клеток островка Лангерганса (В). Окраска гематоксилином-эозином, ув. об. х 40 (А) и х 100 (Б, В).

тельной ткани поджелудочной железы. В отечном интерстиции поджелудочной железы крыс определяли умеренное количество активированных мононуклеаров, набухшие элементы стромы и слущенные дистрофические и некробиотически измененные ацинарные клетки. Клетки

островков Лангерганса подвергались дистрофическим изменениям на фоне выраженного отека стромы (рис. 5).

Результаты применения различных фармакологических зондов на фоне стрептозоцинового диабета представлены в табл. 3. Применение цитостатика

Таблица 3

Влияние фармакологических препаратов на уровень гликемии у крыс после острого отравления стрептозоцином в дозе 140 мг/кг

Группа	Фоновые значения	Продолжительность эксперимента, сут.	
		1	3
Интактные	$4,3 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,3$
Контроль, Стрептозоцин 140 мг однократно, внутримышечно	$4,2 \pm 0,1$	$24,0 \pm 1,2^*$	$28,2 \pm 1,7^*$
Эстрадиол, 0,17 мг/кг, внутривбрюшинно, ежедневно в течение 5 сут.	$4,9 \pm 0,2$	$24,1 \pm 1,0^*$	$28,2 \pm 3,4^*$
Метотрексат, 2,5 мг/кг, внутривбрюшинно, ежедневно в течение 5 сут.	$4,4 \pm 0,1$	$19,4 \pm 1,2^*$	$16,1 \pm 1,3^{* \Delta}$
Кофеин, 35 мг/кг, внутривбрюшинно, ежедневно в течение 5 сут.	$4,0 \pm 0,2$	$23,4 \pm 1,3^*$	$20,9 \pm 3,5^*$

Примечание: * — различия с фоновыми значениями достоверны при $p \leq 0,05$;

Δ — различия с группой контрольных животных достоверны при $p \leq 0,05$.

Таблица 4

Характеристика компенсированной модели дыхательной недостаточности у крыс после внутрибрюшинного введения параквата в дозе 20 мг/кг ($M \pm mM$, $n=6$)

Показатель	Фоновые значения	3-е сут. после отравления
ЧСС, уд./мин.	477,8 $\pm$ 3,56	379,2 $\pm$ 10,98*
ЧД, в мин.	139,2 $\pm$ 3,61	202,5 $\pm$ 7,91*
ДО, мл	0,41 $\pm$ 0,315	0,14 $\pm$ 0,011*
МОД, мл/мин.	43,9 $\pm$ 2,10	28,0 $\pm$ 2,29*
Масса тела, г	197,5 $\pm$ 2,94	166,9 $\pm$ 4,00*

Примечание: * – различия с фоновым значением достоверны при $p \leq 0,05$.

метотрексата снижает выраженность воспалительных изменений и способствует снижению уровня гипогликемии, эффект препарата более выражен на 3-и сутки наблюдения.

Дыхательная недостаточность. Моделирование экспериментального поражения легких проводили путем внутрибрюшинного введения параквата. Отравление паракватом у крыс относится к моделям паренхиматозного поражения легких с развитием альвеолита и фиброза, приводящих к развитию дыхательной недостаточности [8]. При отравлении паракватом отмечали дозозависимые эффекты: тахипное (частота дыхания более 200 в мин.) развивалась при введении яда в дозе 17,8 $\pm$ 5,26 мг/кг, отек легких развивается при введении яда в дозе 38,5 $\pm$ 14,59 мг/кг. Гибель животных отмечали, начиная с 1-2 сут. после введения параквата и до 5-8 сут. включительно. Введение яда в дозе 40 мг/кг и выше сопровождалось гибелью животных в течение 1-2 сут. после отравления на фоне развития отека легких, среднелетальная доза параквата составила 23,4 $\pm$ 5,40 мг/кг.

Основные функциональные характеристики органов дыхания крыс при введении параквата систематизированы в табл. 4. Более выраженные изменения могут быть получены посредством предъявления крысам различных физи-

ческих нагрузок или увеличением дозы параквата.

Модель дыхательной недостаточности, вызванной паракватом, использована для анализа эффективности бронходилататоров, analeптиков, сердечных гликозидов и ряда инотропных средств.

Демиелинизирующее поражение нервной системы. Воспроизводимой моделью демиелинизирующих поражений нервной системы, близких по морфологической сущности к рассеянному склерозу, может служить отдаленная органофосфатная нейропатия. Развитие этого патологического состояния сопряжено с предъявлением модифицированных аутоантигенов нервной ткани при разрушении гематоэнцефалического барьера. Исследования патогенеза нейропатий в настоящее время не могут дать убедительный ответ на вопрос в какой момент и каким образом осуществляется антигенпрезентация: контакт структур «забарьерной» ткани с иммунокомпетентными клетками в острую фазу интоксикации, презентация модифицированных (фосфорилированных, нитрозилированных и т.д.) белков в остром и раннем постинтоксикационном периоде, появление аномальных белков вследствие повреждения ядерного аппарата клеток. В сущности, у 30-67% крыс, отравленных хлорофосом

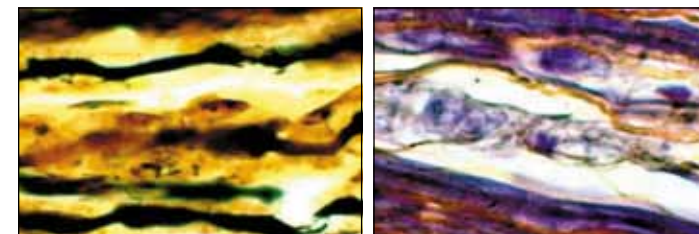


Рис. 6. Разрушение миелиновой оболочки при сохранении непрерывности осевого цилиндра вследствие первичной демиелинизации (А), осуществляемой при участии фагоцитов, расположенных в непосредственной близости к нейритам (А, Б). 28-е сут. после отравления крыс мипафоксом. Окраска по Бильшовскому-Грос (А) и по Маллори (Б), ув. об. х 100.

или мипафоксом, развиваются расстройств чувствительности и движений, морфологической основой которых являются процессы первичной демиелинизации. Учитывая, что отдаленные нейропатии представляют собой вариант нехолинергического эффекта ФОС, при моделировании осуществляют двукратное введение яда. Первую дозу (0,4 ЛД₅₀) вводили подкожно для постепенной инактивации холинэстеразы, не вызывая значимых проявлений интоксикации. Вторую, разрешающую, дозу яда (0,4 ЛД₅₀) вводят через 1 ч после первой, для достижения максимального связывания яда с нехолинергическими структурами. Вторая инъекция органофосфатов вызывает развитие тремора и в ряде случаев судорог, однако, с учетом десенсилизации холинорецепторов на фоне первого введения яда, гибели отравленных животных не отмечали. Проявления демиелинизирующих поражений развиваются на 21–28-е сут. эксперимента и сохраняются на протяжении 90 сут. наблюдения. Резкое снижение скорости проведения нервного импульса доказано в ходе электрофизиологических исследований. В крови существенно увеличивается количество циркулирующих иммунных комплексов.

При морфологическом исследовании в периферических нервных проводниках отмечали проявления васкулита и отека

соединительной ткани. При импрегнации выявляли выраженные нарушения структуры миелиновых цилиндров и появление фагоцитирующих элементов в непосредственной близости к нервным волокнам (рис. 6). При иммунологическом исследовании выявляли изменение антигенного состава нервной ткани с появлением дополнительных полос преципитатов в полиакриламидном геле.

С использованием модели отдаленных органофосфатных нейропатий оценена эффективность глюкокортикоидных препаратов, нестероидных противовоспалительных средств и антиоксидантов различной структуры.

Острое нарушение мозгового кровообращения. Среди многообразия моделей ишемического повреждения головного мозга, используемых для оценки эффективности лечебных препаратов, наиболее часто применяемыми являются модель тотальной ишемии головного мозга с перевязкой общих сонных артерий и модель локального нарушения кровообращения с перевязкой средней мозговой артерии. Моделирование локального нарушения с перевязкой средней мозговой артерии сопровождается рядом технических трудностей и требует специальных микрохирургических инструментов. Перевязка же сонных артерий является более простой по выполнению хирургической операции

ей, а также позволяет сформировать патогенетически сходную с ишемическим инсультом редукцию церебрального кровообращения [7, 9]. Однако вследствие хорошо развитого коллатерального кровообращения у животных (в частности, у крыс), односторонняя перевязка общих сонных артерий не приводит к выраженным изменениям, что затрудняет дифференцировку экспериментальных групп. Одномоментная двухсторонняя перевязка общих сонных артерий по данным разных авторов приводит к гибели экспериментальных животных в 70–100% случаев, преимущественно в течение первых 2–3 сут., что затрудняет изучение динамики восстановительного периода и оценку эффективности терапии [1, 4, 6, 10, 11]. При попытке моделирования ишемического повреждения головного мозга путем одномоментной перевязки общих сонных артерий отмечали гибель 100% животных в течение 1 сут. после операции. Поэтапная же перевязка общих сонных артерий была использована для описания коллатерального кровообращения головного мозга при ишемическом повреждении [3], однако вторая перевязка была произведена только на 77-е сут., что также создает определенные трудности для адекватной оценки эффективности лечебной терапии. Вышеизложенные обстоятельства позволили рассмотреть модель ишемического повреждения головного мозга при поэтапной перевязке общих сонных артерий, как возможную для оценки фармакологической активности лекарственных средств.

Было проведено несколько серий экспериментов с поэтапной перевязкой общих сонных артерий у крыс. В первой серии экспериментов проводили перевязку правой общей сонной артерии и через 1 сут. перевязку левой общей сонной ар-

терии. Во второй серии опытов интервал между перевязками составлял 2-е сут., в третьей — 3-е сут., в четвертой серии — 5 сут.

Показано, что степень тяжести нарушения кровоснабжения головного мозга зависит от интервала между перевязками сонных артерий. В случаях, когда интервал между перевязками составлял 1–2 сут., наблюдали развитие заторможенности и нарушения координации движений животных, что представляло сложность в оценке их поведения в тесте «открытое поле» и регистрации условных рефлексов пассивного избегания. При данном режиме моделирования отмечали достоверное снижение массы тела животных и увеличение послеоперационной гибели до 50–60%. Модель поэтапной перевязки с интервалом не менее 3 сут. снижает уровень летальности оперированных животных и позволяет использовать этологические методики для оценки их высшей нервной деятельности.

С помощью разработанной экспериментальной модели показано, что ишемические повреждения головного мозга повышают уровень возбудимости центральной нервной системы, что является причиной нарушения поведенческих и мнестических функций. По-видимому, эти изменения связаны с формированием в коре головного мозга, гиппокампе и ядрах таламуса очаговых и диффузных деструктивных изменений. Используемая модель ишемии хорошо воспроизводима и может применяться для исследования механизмов ишемических повреждений головного мозга и оценки эффективности лекарственных средств различных фармакологических групп (антиоксиданты, ингибиторы синтазы оксида азота, блокаторы кальциевых каналов и др.).

Разработанные экспериментальные модели основаны на схожести патоморфологических характеристик протекания патологических процессов у животных и у человека. Стандартизация и изучение экспериментальной патологии позволит унифицировать сравнение эффективности лекарственных препаратов, определить направления синтеза наиболее эффективных биологически активных соединений.

Разработанные модели являются воспроизводимыми и позволяют с использованием стандартизованных лабораторных животных провести скрининг препаратов.

Выводы

Экспериментальное моделирование патологических процессов для отбора лекарственных препаратов *in vivo* должно основываться на схожести универсальных реакций клеточных популяций в условиях сохранения единства организменного континуума.

Список литературы

1. Горбачева С.В., Беленичев И.Ф., Дунаев В.В., Бухтиярова Н.В. Фармакологическая коррекция повреждений нейронов сенсомоторной зоны фронтальной коры в условиях экспериментального нарушения мозгового кровообращения // Экспер. и клин. фармакол. 2007. Т. 70. № 6. С. 13–16.
2. Кетлинская О.С. Клинико-экспериментальное обоснование регионарного и системного введения препаратов из группы тиапозитинов при циррозе печени: сообщение I / О.С. Кетлинская, В.А. Кащенко, А.Е. Борисов, С.В. Чепур, В.В. Кацалуха, А.Е. Антушевич, Л.А. Кожемякин, Е.Л. Васюкова, И.Е. Мотушук, А.О. Новиченков // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2001. № 4. С. 32–38.

3. Колесов М.А. Некоторые данные о развитии окольного кровообращения после перевязки сонных артерий у белой крысы // Морфогенез и структура органов человека и животных. — Минск: «Беларусь». 1970. С. 179–183.
4. Макарова Л.М. Экспериментальная оценка эффективности глицина и его фосфорилированного производного при ишемических повреждениях головного мозга / Л.М. Макарова, В.Е. Погорельский // Экспер. и клин. фармакол. 2006. Т. 69. № 6. С. 24–26.
5. Саблина Е.В. Современная оценка терапии хронических гепатитов и неосложненных циррозов печени в фазе обострения: автореф. дисс. канд. мед. наук. / Е.В. Саблина / СПбГМУ им. И.П.Павлова. СПб. 1997. 20 с.
6. Яковлева Е.В. Исследование эффективности семакса при глобальной ишемии мозга *in vivo* / Е.В. Яковлева, В.С. Кузенков, В.Н. Федоров, В.И. Скворцова, В.Б. Кошелев, Е.И. Гусев, И.П. Ашмарин // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 1999. Т. 128. № 8. С. 172–174.
7. Bacigaluppi M. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia / M. Bacigaluppi, G. Comi, D.M. Hermann // Open Neurol. J. 2010. № 4. P. 34–38.
8. Liu R. Therapeutic effect of somatostatin on acute respiratory distress syndrome in experimental rats / R. Liu, C.H. Wang, M.H. Huang // Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2006. Vol. 37. № 3. P. 412–415.
9. Prieto-Arribas R. Experimental models of cerebral ischemia / R. Prieto-Arribas, A. Moreno-Gutiérrez, P. Simal-Hernández, J.M. Pascual-Garvi, J. Matías-Guiu, J.M. Roda, J.A. Barcia-Albacar // Rev. Neurol. 2008. Vol. 47.

№ 8. P. 414-426.

10. **Tohda M.** Expression changes of the mRNA of Alzheimer's disease related factors in the permanent ischemic rat brain / M. Tohda, P. Suwanakitch, R. Jeenapongsa, H. Hayashi, H. Watanabe, K. Matsumoto // Biol. Pharm. Bull. 2004. № 12. P. 2021-2023.

11. **Ulrich P.T.** Laser-Doppler Scanning of Local Cerebral Blood Flow and Reserve Capacity and Testing of Motor and Memory Functions in a Chronic 2-Vessel Occlusion Model in Rats / P.T. Ulrich, S. Kroppenstedt, A. Heimann, O. Kempfski // Stroke. 1998. № 29. P. 2412-2420.

Features of experimental modelling of somatic and neurologic diseases for estimation of medical products efficiency

S.V. Chepur, V.N. Bykov, M.A. Yudin, A.S. Nikiforov, I.V. Fateyev, A.A. Arutyunyan

The evidence about liver lipid dystrophy, liver cirrhosis, pancreatitis with diabetes mellitus and demyelination nerve diseases experimental modeling are systemized. The experimental pathologies are induced by medicine and chemical substances application in optimal doses. Two step brain insult formation on rat is accomplish at common carotid arteria ligation with following contralateral arteria clamping after several time. Standardization and registration time optimization for medicine efficiency estimation are realized in morphological and biochemical testing which presented the identity of pathological changes in animal and human. During medicine screening the adequacy of experimental model is confirmed.

Key words: dimethylnitroamine, streptozocine, paraquate, organophosphates, reperfusion syndrome.



МЕТОДЫ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Анализ некоторых физиологических и этологических характеристик бесшёрстных крыс как новая модель биомедицинских исследований

Д.А. Беляев¹, М.М. Пекелис¹, Ю.В. Фокин², Л.Х. Казакова²

¹ – РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Беляев Дмитрий Анатольевич, d_belyaev@mail.ru

В статье анализируются возможные причины пониженной температуры тела и сравнительно низкого уровня метаболизма у бесшёрстных крыс по сравнению с крысами с нормальным волосным покровом и помесными крысами. Вероятно, у данных животных, лишённых волосного покрова, это связано с необходимостью снижения теплопотерь, что заставляет их меньше двигаться и чаще умыться, чтобы согреться. Указанные факты делают этих животных привлекательными в качестве моделей для различного рода биомедицинских исследований.

Ключевые слова: бесшёрстные крысы, терморегуляция, температура тела, скорость прохождения пищи по ЖКТ, двигательная активность, ультразвуковая вокализация, биомедицинские и доклинические исследования.

Введение

Многие метаболические реакции у гомойотермных животных могут протекать в узких температурных рамках. В связи с необходимостью нормального процесса метаболизма, в живом организме поддерживается относительно постоянная температура тела [7]. Для этого должно выполняться одно требование: скорость теплопотерь должна быть равна скорости теплопродукции. За температуру тела млекопитающего обычно принимается температура тела глубоко расположенных органов, называемая внутренней температурой (core temperature), измеряется она ректально [13]. Внутренняя температура подверже-

на некоторым колебаниям – например, суточным. У ночных животных, к которым относятся крысы, она на 1-2° выше в тёмное время [12]. В светлое время суток она равняется 37,3°C [16]. Кроме того, на характер терморегуляции у крыс оказывают влияние режим питания, лучистая УФ-радиация, температурные особенности внешней среды, сезонные изменения физиологических функций [11], а также мышечная нагрузка, зрелость животного, возраст и т.д., при этом постоянной корреляции между размерами и температурой тела не наблюдается [9]. В целом, грызунам присуще снижение роли химической терморегуляции, характерной для низших млекопитающих, при этом