

№ 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 гомеотермных 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

они представляют промежуточное звено со слабо развитой физической терморегуляцией (слабый механизм сосудистой регуляции, имеются зачатки потоотделения). Таким образом, терморегуляция у лабораторных крыс имеет широкий спектр вариаций, их температура тела отличается малой устойчивостью и довольно сильно зависит от температуры окружающей среды. В литературных источниках также содержатся достаточно противоречивые данные относительно ректальной температуры тела крыс: 34,4°C [11], 36,6-37,9°C [16], 37,5-39,2°C [4], 38-39°C [17], 38,1°C [9], 38,5-39,5°C [5], а в целом, крысы способны пережить колебания температуры тела в пределах от 18°C до 41°C [18]. Оптимальной для содержания лабораторных крыс считается температура воздуха 20-26°C [3, 9].

Важную роль в поддержании постоянной температуры тела у млекопитающих играет шерстный покров. Воздух, находящийся между волосками, создаёт буферную зону между кожей и окружающей средой, препятствуя теплопотерям. Животные, обитающие в холодном климате, имеют густой шерстный покров с подшерстком. Когда в результате мутации животные теряют шерстный покров, возникает необходимость поддержания температуры тела за счёт других ресурсов организма [7, 8].

Материалы и методы

Эксперимент проводился в осенние периоды 2009 и 2011 гг. на базе кафедры зоологии РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева и ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАМН.

В исследованиях принимали участие три группы крыс, уравниваемых по массе, в возрасте 24-х недель: группа 1 (контрольная) – нелинейные крысы с нормально

развитым шерстным покровом (n=30), группа 2 – бесшерстные крысы аутбредной популяции, полученные в результате спонтанной мутации (n=41), и группа 3 – гибриды F1 между крысами из групп 1 и 2 с промежуточным состоянием шерстного покрова (n=26). Крысы находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Содержались в клетках типа Т-3 при световом цикле 12:12, получали комбикорм для хомяков, крыс и мышей производства ООО «Лабораторкорм». Вода была в свободном доступе. Температура в помещении составляла 15-18°C. Температуру тела измеряли ректально электронным термометром с точностью измерения 0,1°C.

При изучении скорости прохождения пищи по ЖКТ использовалась методика В.Ю. Литвина и И.Л. Кулика [6], несколько модифицированная нами. Для этого также были сформированы три группы животных, аналогичных предыдущим, по 11 особей в каждой. Животные помещались в небольшие индивидуальные клетки с поддоном для сбора фекалий. За сутки до начала эксперимента крыс прекращали кормить, затем каждой давали кусочек хлеба, пропитанного 0,2 мл эозина. Далее каждый час контролировали состояние животных, убирая найденные экскременты и фиксируя время появления первых фекалий, окрашенных эозином.

Дополнительно анализировались поведенческие и коммуникативные особенности данных животных.

В эксперименте принимали участие животные обоих полов популяции бесшерстных крыс в сравнении с крысами с нормальным шерстным покровом линии WAG/GY, по 9 особей в каждой группе. Возраст животных: 4-5 мес., масса – 300-450 г.

Регистрация УЗВ. Коммуникативные особенности животных в виде их вокализации в ультразвуковом диапазоне фиксировались [10] с помощью специальных микрофонов системы Sonotrack (Metris B.V., Нидерланды). Микрофоны устанавливались дистантно, на расстоянии 20-25 см от головы животных. Частота дискретизации составляла 200 кГц, сигнал записывался в цифровом формате. Регистрация ультразвуковых колебаний (в течение 30 мин.) у каждого животного проводилась в состоянии спокойного бодрствования, в одно и то же время суток (13.00-17.00 местного времени). Всего было произведено 5 замеров. После удаления физических артефактов (монотонных шумов) осуществляли спектральный анализ ультразвука с использованием процедуры быстрого преобразования Фурье в частотной полосе от 15 до 100 кГц с помощью пакета программ MATLAB методом Уэлча. Эпоха анализа составляла 10 мс, размерность быстрого преобразования Фурье – 2000 интервалов. В ходе анализа спектральную плотность мощности ультразвука (СПМ), излучаемого каждым животным, нормировали к СПМ фона окружающей среды, в результате получали вектор-строку изменений ультразвука, в котором находили максимум, приравнявая его к 100%, остальные значения изменяли пропорционально максимуму. После этого находили медианы по каждой частоте, учитывая все эпохи анализа в эксперименте для каждого животного и по группам.

Регистрация поведенческих компонентов происходила одновременно с исследованием УЗВ, в те же временные промежутки. Для этого использовалась система Laboras (Metris B.V., Нидерланды), которая позволяла вычислять дли-

тельность таких форм поведения как локомоции (горизонтальная активность), неподвижность, стойки (вертикальная активность), умывание [10]. Кроме того, оценивалось время так называемых нераспознанных системой движений. По каждому животному определяли процент каждой формы поведения от общей длительности эксперимента, после чего полученные данные (по всем пяти замерам) группировали в зависимости от формы поведения, находя среднееарифметическое значение. В результате длительность каждой формы поведения (в процентах) бесшерстных крыс сравнивалась с аналогичным показателем в группе крыс с нормальным шерстным покровом.

Результаты и их обсуждение

Измерение температуры тела.

Измеряя температуру тела крыс с различным шерстным покровом, мы получили следующие данные. Температура тела крыс с нормальным шерстным покровом была самой высокой среди исследованных групп крыс (35,9±0,23°C), несколько ниже – у гибридов (35,3±0,18°C), самые низкие показатели отмечались у бесшерстных крыс (34,3±0,12°C).

Прохождение пищи по ЖКТ.

По результатам наших исследований, наибольшая скорость прохождения пищи по ЖКТ наблюдалась у гибридов (группа 3), наименьшая – у бесшерстных крыс (группа 2). При этом различия между группами помесных и бесшерстных крыс оказались достоверными ($P \leq 0,005$, $n=22$) Различия между крысами с нормальным шерстным покровом (группа 1) и бесшерстными крысами недостоверны (рис. 1).

Итак, в нашем исследовании наименьшая температура тела была зафиксирована у бесшерстных крыс. Этот результат в некоторой степени согласуется с

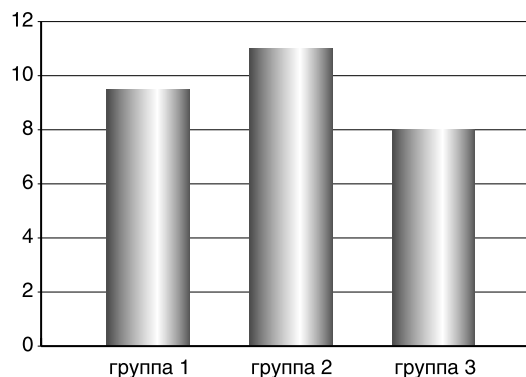


Рис. 1. Время прохождения пищи по желудочно-кишечному тракту.

данными, полученными на других видах бесшёрстных животных. Аналогичная картина наблюдалась, например, у бесшёрстных мышей [15]. А у бесшёрстных кошек ректальная температура достоверно не отличалась от таковой короткошёрстных кошек, а температура кожи была выше [2]. Однако следует отметить, что хищникам характерна совершенно иная терморегуляция, и они меньше зависят от температуры окружающей среды. Низкую внутреннюю температуру тела бесшёрстных крыс можно объяснить следующим. Для поддержания постоянной температуры тела необходимо, чтобы метаболическая теплота равнялась теплопотерям. То есть скорость потери тепла (H) пропорциональна разности температур тела (T_T) и окружающей среды (T_C):

$$H = C(T_T - T_C),$$

где C – коэффициент, зависящий от массы тела и удельной теплопроводности тканей [13]. Соответственно, чем больше разность в правой части уравнения, тем больше теплопотери. Таким образом, одним из путей уменьшения теплопотерь может быть сокращение разности температур между организмом и средой. Мелкие млекопитающие не могут при низкой температуре среды удержать высокую разность температур тела и окружающей

среды. Не имея возможности повлиять на температуру среды, они могут понизить собственную температуру тела. Уменьшение разности температур понижает процесс теплоотдачи. У крыс при колебаниях температуры окружающей среды от 15 до 30°C температура тела варьировала в пределах 33,0-37,2°C [11]. Но существенное значение здесь имеет шёрстный покров. При охлаждении лабораторной крысы с довольно густым шёрстным покровом понижение её температуры тела начиналось при температуре воздуха -25°C, а у морской свинки с редким шёрстным покровом – уже при -15°C. Термоизоляция шёрстного покрова крыс летом равна 0,079 мкал/см³·сек·град, а зимой – 0,091 мкал/см³·сек·град. Толщина кожи также влияет на теплоизоляционные свойства шкурки. Способность к потоотделению у грызунов развита довольно слабо. Как показали наши исследования [1], бесшёрстные крысы вообще лишены потовых желёз. Кожный покров у них тоньше, чем у крыс с нормальным шёрстным покровом, а слой эпидермиса – несколько толще. Вероятно, по своим способностям к терморегуляции они довольно близки к африканским голым землекопам (*Heterocephalus glaber* Rüppel, 1842), которые также весьма зависимы от температуры окружающей среды [14].

Поскольку в течение эксперимента животные содержались при температуре воздуха ниже комфортной, им приходилось уменьшать разность температур тела и окружающей среды за счёт понижения температуры тела. Однако понижение температуры тела у бесшёрстных крыс не вышло за пределы физиологической нормы крыс, указанной А.Ф. Слонимом [11]. Крысы с нормальным шёрстным покровом имели возможность за счёт его термоизолирующих свойств и более толстой кожи не понижать так сильно свою температуру тела. Бесшёрстным же крысам, которые лишены этого фактора, влияющего на терморегуляцию, пришлось приспособляться к температуре окружающей среды. Меньшая способность поддерживать постоянную температуру тела делает их крайне зависимыми от температуры окружающей среды. Кроме того, у них может быть понижена так называемая «контрольная точка» (set point) [16, 18], то есть та температура, которую животное поддерживает, чтобы как можно больше уравновесить теплопродукцию и теплопотери, как, например, это происходит у бесшёрстных мышей. Считается, что у них эта «контрольная точка» ниже, чем у мышей с нормальным шёрстным покровом, и поэтому они обладают более низкими энергетическими потребностями для терморегуляции, что, в свою очередь, компенсирует их плохую термоизоляцию [15]. Вероятно, это обстоятельство справедливо и для бесшёрстных крыс.

Чем выше интенсивность обменных процессов у мелких млекопитающих, тем больше их потребности в пище. Количество потребляемой пищи и энергетические потребности – тесно взаимосвязаны. Для того, чтобы иметь возможность потреблять большее количество пищи,

необходимо, чтобы скорость её прохождения по ЖКТ была выше. Высокая скорость прохождения корма через пищеварительный тракт у грызунов не сказывается на усвояемости питательных веществ [7, 8]. Диктуемые скоростью обменных процессов кормовые потребности, а также и периодическая деятельность пищеварительного аппарата в значительной степени есть функция терморегуляции. Поскольку, как мы убедились, бесшёрстным крысам приходится снижать температуру тела, чтобы уменьшить теплопотери, то снижается и уровень метаболической теплоты, а также замедляется скорость прохождения пищи по ЖКТ.

Ультразвуковая вокализация и коммуникативные особенности.

Результаты исследований УЗВ животных представлены на рис. 2.

Как видно из рисунка, частотные составляющие двух кривых в диапазоне 15-47 кГц буквально в точности аналогичны друг другу, что говорит о схожести коммуникативных особенностей данных групп животных. В области 50-100 кГц УЗВ бесшёрстных крыс более «скачкообразна» по сравнению с крысами с нормальным шёрстным покровом, что проявляется в периодических пиках небольшой мощности, имеющих, вероятно, свои информативные признаки. В целом, основным отличием УЗВ бесшёрстных крыс от крыс с нормальным шёрстным покровом является наибольшая мощность писка, которая, по-видимому, связана с остротой слуха данных животных, сниженной в результате мутаций.

Поведенческие особенности.

Результаты проведённых этологических исследований представлены в таблице.

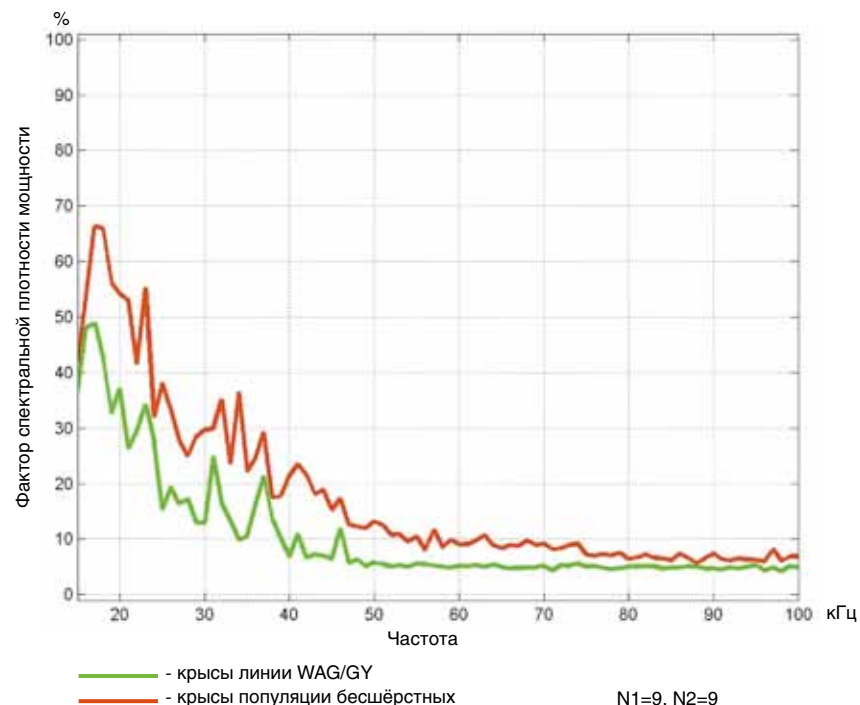


Рис. 2. Сравнительный анализ УЗВ крыс с нормальным волосяным покровом и бесшёрстных крыс аутбредной популяции.

Как видно из таблицы, в группе бесшёрстных крыс существенно снижена вертикальная активность, они более неподвижны по сравнению с крысами с нормальным шёрстным покровом. Однако длительность умыывания бесшёрстных крыс почти на треть превышает данный показатель в группе крыс с нормальным шёрстным покровом. Данный результат, скорее всего, связан с пониженной температурой бесшёрстных крыс. Т.е., чтобы уменьшить теплопотери и согреться, они меньше двигаются и чаще умыываются.

Таким образом, бесшёрстных крыс можно рассматривать как биомодель для изучения интенсивности обмена веществ. Также бесшёрстные животные являются признанным объектом для дерматологических исследований. Ранее проведённые исследования [1] показали, что бесшёрстные крысы могут быть интересны

для доклинических исследований ряда гормональных препаратов. А анализируя поведенческие особенности данных животных, можно предположить, что они могут использоваться и в качестве моделей для биомедицинских исследований, проводимых в искусственно создаваемых жёстких условиях окружающей среды.

Выводы

При существенном понижении температуры окружающей среды организм крыс не в состоянии компенсировать потери температуры тела, и она может опускаться до нижнего порога физиологической нормы – причём у бесшёрстных крыс в большей степени, чем у крыс с нормальным шёрстным покровом и гибридов. Также у бесшёрстных крыс замедляется прохождение пищи по желудочно-кишечному тракту, снижается

Таблица

Сравнительный анализ поведенческих особенностей крыс с нормальным шёрстным покровом и бесшёрстных крыс аутбредной популяции

Форма поведения	Длительность компонента (% от общего времени эксперимента)	
	Крысы с нормальным шёрстным покровом	Бесшёрстные крысы аутбредной популяции
Неподвижность	33,5	34,8
Горизонтальная активность	2,3	2,4
Вертикальная активность	14,3	7,2
Умыывание	21,3	28,0
Нераспознанные движения	28,6	27,6

двигательная активность, что способствует экономному расходованию энергии и уменьшению теплопотерь. В связи с этим, бесшёрстных крыс рекомендуется содержать при более высокой температуре.

Данные животные привлекательны для различного рода опытов, направленных на изучение влияния веществ, изменяющих метаболизм, гормональных и дерматологических препаратов, а также для других видов биомедицинских и доклинических исследований.

Список литературы

1. **Блохин Г.И., Беляев Д.А., Пекелис М.М., Губская Е.М., Казакова Л.Х.** Особенности гистологического строения кожных покровов и молочной железы бесшёрстных крыс // Биомедицина. 2011. № 3. С. 50-53.
2. **Блохина Т.В.** Морфо-функциональные особенности кошек породы донской сфинкс: Дис. ... канд. биол. наук. М. 2005. 127 с.
3. **Каркищенко Н.Н.** Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК. 2004. 608 с.
4. Лабораторная крыса (Справочный материал) / Ланг С.М., Уилсон Р.П. // Лабораторные животные. 1993 т. III. № 2. С.111-120.
5. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / Западнюк И.П., Заниднюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. – Киев: Вища школа. Головное изд-во. 1983. 383 с.
6. **Литвин В.Ю., Кулик И.Л.** Поиски красителей, выводящихся из организма с фекалиями, для мечения мышей и полевок // Зоол. журнал. – 1969. т.XLVIII, вып. 6. С. 920-923.
7. **Пантелеев П.А.** Биоэнергетика мелких млекопитающих. Адаптация грызунов и насекомых к температурным условиям среды. М.: Наука. 1983. 269 с.
8. **Пантелеев П.А.** Родентология. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2010. 221 с.
9. **Проссер Л., Браун Ф.** Сравнительная физиология животных. –М.: Мир. 1967. 675 с.
10. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям

- в биомедицинских технологиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С, 2010. 358 с.
11. **Слоним А.Ф.** Животная теплота и ее регуляция в организме млекопитающих. – М.-Л.: Изд. АН СССР. 1952. 325 с.
 12. **Шмидт-Нюельсен К.** Физиология животных. Приспособление и среда. В 2 томах (т.1). М.: Мир. 1982. 412 с.
 13. **Шмидт-Нюельсен К.** Размеры животных: почему они так важны? М.: Мир. 1987. 259 с.
 14. **Daly T.J.M., Buffenstein R.** Skin morphology and its role in thermoregulation in mole-rats, *Heterocephalus glaber* and *Cryptomys hottentotus* // J. Anat. 1998. No. 193. P. 495-502.
 15. **Donnelly H.T.** Oxygen consumption, activity and body fat in normal and hairless mice // Laboratory Animals. 1982. No.16. P.167-171.
 16. **Gordon C. J.** Temperature regulation in laboratory rodents. N-Y.: Cambridge University Press. 1993. 276 p.
 17. **Pass D., Freeth G.** The Rat // ANZCCART News. 1993 Vol. 6 No 4. P. 1-4.
 18. **Satinoff E.** Thermoregulation // I.Q. Whishalow, B. Kolb (Eds.) The behavior of the laboratory rat. A handbook with tests. NY.: Oxford University Press. 2005. P. 226-236.

The analysis of some physiological and ethological characteristics of hairless rats as new model of biomedical researches

D.A. Belyaev, M.M. Pekelis, Yu.V. Fokin, L.Kh. Kazakova

In article the possible reasons of the lowered body temperature and rather low level metabolism of hairless rats in comparison with rats with a normal hair coat and hybrid rats are analyzed. Possibly, at the given animals deprived of a hair coat, it is connected with necessity of decrease of heat losses that forces them to move less and more often to wash to be warmed. The specified facts do these animals attractive as models for any biomedical researches.

Key words: hairless rats, thermoregulation, body temperature, rate of passage of food through the digestive tract, impellent activity, ultrasonic vocalization, biomedical and non-clinical researches.

Радиационно-индуцированные повреждения коллагена в сухожилиях *in vitro*

Н.Ю. Игнатьева¹, О.Л. Захаркина², М.В. Кочуева³, А.В. Масленникова^{3,4}, В.А. Каменский⁴, В.Н. Баграташвили²

¹ – Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

² – Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк

³ – Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

⁴ – Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Контактная информация: профессор Виктор Николаевич Баграташвили bagrat@laser.ru

В работе изучен эффект ионизирующего излучения аппарата для дистанционной лучевой терапии «Луч-1» (энергия пучка 1,25 МэВ, однократная доза 10 Гр) на коллаген сухожилий хвостов крыс. Уменьшение энтальпии денатурации коллагена и устойчивости к действию протеолитического фермента (трипсина) указывает на частичную деградацию макромолекул коллагена (19±7%). Появление после облучения дестабилизированной фракции макромолекул коллагена и изменение их взаимодействия с водой обнаружено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, сухожилие хвоста крысы, коллаген, многофотонная микроскопия.

Одним из первых этапов изучения динамики радиационно-индуцированной деградации тканей является определение модификации коллагенового каркаса при воздействии ионизирующего излучения. В литературных данных описываются, главным образом, изменения коллагена при облучениях дозами ≥ 10 кГр, которые проводятся для стерилизации коллагенсодержащих материалов. Они на несколько порядков превышают дозы, используемые в клинике при проведении лучевой терапии, и вызывают глубокие повреждения на всех уровнях структурной иерархии коллагена – от молекул до общей архитектоники материала [8, 12, 13, 16]. Целью настоящей работы явилось выявление первичных радиационно-индуцированных изменений в коллагеновой сетке *in vitro* при воздействии ионизирующего излучения в дозе, вызывающей начальные визуально определяемые изменения

тканей. В качестве объекта исследования использовали сухожилия хвостов крыс с квазикристаллической одноосной укладкой молекул в фибриллы, фибрилл — в волокна, а волокон — в пучки [3, 4].

Материалы и методы

Отсеченные хвосты (n=3) белых беспородных крыс подвергали облучению с помощью аппарата для дистанционной лучевой терапии «Луч-1» (энергия пучка 1,25 МэВ) однократно в дозе 10 Гр, что соответствует 30 Гр в режиме стандартного фракционирования. Далее сухожилие препарировали и исследовали методом кросс-поляризационной оптической когерентной томографии (КП ОКТ) по всей длине. Затем сухожилие освобождали от мышечной ткани, отмывали в 0,15 М растворе NaCl и выделяли пучки коллагена. Образцы сухожилия для изучения методом многофотонной микроскопии фиксировали.