



УКРАЇНА

(19) UA (11) 33367 (13) U
(51) МПК
G09B 23/28 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГЛОБАЛЬНОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ У МИШЕЙ

1

2

(21) u200714635

(22) 24.12.2007

(46) 25.06.2008, Бюл.№ 12, 2008 р.

(72) ШТРИГОЛЬ СЕРГІЙ ЮРІЙОВИЧ, UA, ШТРИГОЛЬ В'ЯЧЕСЛАВ СЕРГІЙОВИЧ, UA, ЄСЄВА ОЛЬГА АНДРІЇВНА, UA, ТИМАНЮК ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, UA

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, UA

(57) 1. Спосіб моделювання глобальної церебральної ішемії у мишей, що включає штучне порушення мозкового кровообігу, який **відрізняється**

тим, що мишей піддають впливу гравітаційного перевантаження при обертанні у радіальному положенні головою до центра обертання.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що мишей піддають впливу гравітаційного перевантаження 6g.

3. Спосіб за п. 1, п. 2, який **відрізняється** тим, що ступінь ішемічних порушень у мишей регулюють тривалістю часу обертання.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що час обертання становить від 10 до 60 секунд.

Корисна модель відноситься до медицини та фармації, а саме до експериментального моделювання порушень мозкового кровообігу, зокрема глобальної церебральної ішемії, у лабораторних тварин.

Порушення мозкового кровообігу, насамперед церебральна ішемія відносяться до числа найважливіших медико-соціальних проблем, оскільки судинні захворювання є одними з найбільш актуальних причин інвалідизації та смертності населення розвинутих країн. Тому існує необхідність створення ефективних лікарських препаратів та інших засобів профілактики та лікування судинних захворювань головного мозку, що потребує використання відповідних моделей експериментальної патології на етапі доклінічних досліджень лікарських засобів.

Найбільш розповсюдженими моделями церебральної ішемії є ті, що засновані на оклюзії загальних сонних артерій, а найбільш типовим видом експериментальних тварин є щури [1]. Незворотне перев'язування обох сонних артерій відтворює в них неповну передньомозкову ішемію [2], тому що кровопостачання головного мозку за цих умов здійснюється за рахунок хребетних артерій. Повну ішемію головного мозку це втручання моделює тільки у монгольських піщанок [1], які є екзотичним та недоступним у широкій експериментальній практиці видом тварин. Більш того, навіть при повній оклюзії загальних сонних і хребетних артерій у тварин залишається до 30% мозкового кровообігу за рахунок анастомозів між

інтра- та екстракраніальними судинами. Тому дана модель не є достатньо регламентованою, що утруднює уніфікацію даних. Більш регламентована модель локальної церебральної ішемії при оклюзії середньої мозкової артерії [1].

До недоліків всіх наведених методів слід віднести те, що вони травматичні, потребують складного хірургічного втручання, використання наркозних препаратів. Останні пригнічують центральну нервову систему, що утруднює об'єктивну оцінку церебропротекторних властивостей досліджуваних лікарських або інших лікувально-профілактичних засобів.

Існує також модель повної церебральної ішемії у мишей, яка відтворюється шляхом декапітації тварин без використання знеболювальних засобів з подальшим підрахунком кількості позіхань як маркера стійкості нейронів до гіпоксії (так званий gasping-test) [2]. Але цей метод також має очевидні недоліки. По-перше, він викликає заперечення з точки зору біоетики; крім того, тварина знаходиться у стані спінального шоку, що впливає на результат. Можливості метода дуже обмежені - неможливо дати оцінку інтегрального ефекту, а саме виживаності тварин, і перебіг експериментальної патології після ішемічного періоду, оскільки тварини гинуть під час відтворення церебральної ішемії.

Найбільш зручним видом тварин для експериментальних досліджень, особливо скрінінгових, є миші. Вони значно дешевші за щурів, а завдяки меншому розміру кількість речовин, що

UA (19) 33367 (11) 33367 (13) U

використовується для дослідження, скорочується в 10-20 разів. Але невеликий розмір мишей створює технічні труднощі, що пов'язані з перев'язуванням сонних артерій - дуже дрібних судин.

Завданням корисної моделі є створення способу моделювання глобальної церебральної ішемії у мишей шляхом створення гравітаційного перевантаження в краніо-каудальному векторі при обертанні, що дозволяє одержати просту та добре відтворювану модель заданої патології з можливістю варіювати тяжкість ішемічних порушень.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі моделювання глобальної церебральної ішемії у мишей шляхом штучного порушення мозкового кровообігу корисною моделлю передбачено, що мишей піддають впливу гравітаційного перевантаження при обертанні у радіальному положенні головою до центра обертання.

Згідно з корисною моделлю мишей піддають впливу гравітаційного перевантаження 6g, причому ступінь ішемічних порушень регулюють тривалістю часу обертання. У відповідності з винаходом, час обертання становить від 10 до 60 секунд.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Дослідних мишей фіксують на центрифусі у радіальному положенні головою до центра обертання. При обертанні створюється гравітаційне перевантаження, яке викликає ішемію. Ступінь тяжкості ішемії регулюється часом обертання і залежить від створюваного прискорення.

Краніо-каудальний вектор прискорень (позитивне радіальне прискорення) створюється за допомогою центрифуги. За умов частоти обертання 1000 об/хв. (центрифуга лабораторна клінічна ЦЛК-1) при розташуванні тварини в радіальному напрямі з мінімальною відстанню голови від осі обертання (0,5 см) гравітаційне перевантаження становить 6g. Гравітаційне перевантаження сприяє переміщенню крові в каудальному напрямі, що забезпечує ішемію головного мозку в усіх його судинних басейнах, тобто глобальну церебральну ішемію.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1

Були проведені дослідження ефективності модельної патології, одержаної за заявленим способом у порівнянні з існуючими моделями. Дослід виконаний на 74 нелінійних мишах-самцях масою 12-15 г, що були розподілені на 6 груп.

Тварин перших трьох груп піддавали впливу гравітаційного перевантаження в краніо-каудальному векторі. Для цього їх розміщували в спеціально виготовлених тканинних пеналах, які щільно охоплюють мишу, але не заважають її диханню. Пенали закріплювали на центрифусі перпендикулярно осі обертання таким чином, що го-

лова тварини спрямована до осі (відстань від осі становить 0,5 см). Мишей першої групи (n=16) піддавали впливу гравітаційного перевантаження при 6g (1000 об/хв.) протягом 10-20 секунд, мишей другої групи (n=12) - протягом 30-40 секунд, третьої групи (n=6) - протягом 60 секунд, після чого центрифугу вимикали. Повна зупинка відбувалася через 30 секунд, протягом яких гравітаційне перевантаження плавно зменшувалося з 6g до 0g.

У мишей четвертої групи (n=19) під нембуталовим наркозом (40 мг/кг) відтворювали ішемію головного мозку шляхом перев'язування обох загальних сонних артерій, викликаючи незворотну двобічну каротидну оклюзію. У мишей п'ятої групи (n=8) перев'язували загальну сонну артерію з одного боку (по 4 тварини з лівого та з правого), викликаючи незворотну однобічну каротидну оклюзію.

Шосту групу (n=13) складали інтактні тварини.

Оцінювали виживаність тварин першої, другої, третьої, четвертої та п'ятої груп протягом 2 тижнів, а також набряк головного мозку (його визначали за масовим коефіцієнтом головного мозку порівняно з показником інтактних тварин шостої групи). Визначення вірогідності відмінностей виживаності проводили за кутовим перетворенням Фішера, масового коефіцієнту головного мозку - за критерієм Ст'юдента. Результати наведені в таблицях 1 і 2.

Як свідчать дані таблиці 1, гравітаційне перевантаження 6g в краніо-каудальному векторі викликає загибель тварин, яка прямо залежить від часу дії перевантаження. Таким чином, тяжкість глобальної церебральної ішемії і летальність мишей можна регулювати шляхом змінення терміну перебування тварин в умовах гравітаційного перевантаження залежно від мети дослідження. У тварин, що вижили після гравітаційного перевантаження, протягом 20-30 хв. спостерігалися значні порушення координації рухів, потім вони візуально не відрізнялися від інтактних тварин.

Слід відзначити, що моделювання церебральної ішемії у мишей шляхом перев'язування обох загальних сонних артерій викликає загибель 100% тварин протягом першої доби. Значна частина мишей не виходить з наркозу. Це свідчить про більшу чутливість мишей до незворотної каротидної оклюзії порівняно зі щурами, в яких летальність після подібного експериментального втручання звичайно становить 20-30% [3, 4]. Стовідсоткова летальність мишей з перев'язаними загальними сонними артеріями не дає можливості виконувати дослідження в віддаленому періоді. Однобічне перев'язування загальної сонної артерії не призводить до загибелі мишей, що не дозволяє рекомендувати дану модель ішемії головного мозку для скрінінгу церебропротекторної дії лікарських препаратів при проведенні доклінічних досліджень.

Таблиця 1

Вживаність мишей з моделями церебральної ішемії, які відтворені шляхом гравітаційного перевантаження та перев'язування загальних сонних артерій

Гравітаційна церебральна ішемія				
№ групи	Час впливу 6g, с	Кількість тварин	Вжило / загинуло	Вживаність, %
1	10-20	16	12/4	75
2	30-40	12	5/7	41,7
3	60	6	0/6	0
Вірогідність відмінностей				$P_{1-2}<0,05$ $p_{1-3}<0,001$ $p_{2-3}<0,01$
Незворотна двобічна каротидна оклюзія				
4	-	19	0/19	0
Незворотна однібічна каротидна оклюзія				
5	-	8	8/0	100
Вірогідність відмінностей				$p_{4-5}<0,001$

У мишей, яких піддавали впливу гравітаційного перевантаження, швидко розвивається набряк головного мозку, про який свідчить вірогідне збільшення масового коефіцієнту головного мозку. Воно виражено навіть більше, ніж у випадку перев'язування обох загальних сонних артерій (табл. 2).

Таблиця 2

Масовий коефіцієнт головного мозку (% від маси тіла) у мишей з моделями церебральної ішемії, що викликані гравітаційним перевантаженням та перев'язуванням обох загальних сонних артерій

Група тварин	Кількість тварин	Масовий коефіцієнт головного мозку, %	Вірогідність відмінностей
Інтактний контроль	13	2,22±0,11	
Гравітаційна церебральна ішемія	10	3,10±0,20	$p<0,01$
Незворотна двобічна каротидна оклюзія	6	2,84±0,13	$p<0,02$

Дані проведеного досліджу свідчать про те, що заявлений спосіб дозволяє ефективніше моделювати глобальну церебральну ішемію у мишей, ніж інші відомі моделі.

Приклад 2

З метою з'ясування впливу ішемії головного мозку, змодельованої за заявленим способом, на показники вищої нервової діяльності проводили дослідження поведінки мишей у тесті „відкритого поля” [5]. Досліди виконували через 1 годину після дії гравітаційного перевантаження. В якості контрольної групи використовували інтактних тварин. Результати наведені у таблиці 3.

Як свідчать дані таблиці 3, після моделювання гравітаційної ішемії у мишей виникає неврологічний дефіцит, який підтверджується зменшенням показників у тесті „відкрите поле”. Особливо заслуговує на увагу повна відсутність вертикального компоненту рухової активності - стійок тварин, а також вірогідне зменшення інтегрального показника - суми активностей, тобто найбільш чутливих критеріїв. Це дозволяє вивчати динаміку неврологічного статусу в постішемичному періоді.

Таблиця 3

Показники поведінки мишей у тесті „відкрите поле” впродовж 3 хвилин через 1 годину після моделювання гравітаційної церебральної ішемії

Показники	Інтактний контроль (n=12)	Гравітаційна ішемія (n=6)	Зміни, %	Вірогідні відмінності
Перетин квадратів	55,3±7,1	45,0±8,3	-19	
Стійки	5,6±1,3	0±0	-100	$p<0,01$
Обстеження отворів	32,1±3,6	16,8±3,1	-48	$p<0,05$
Емоційна активність: грумінг, дефекації та урінації всього	1,4±0,2	0,7±0,2	-54	$p<0,05$
	1,1±0,4	0,5±0,2	-46	-
	2,5±0,5	1,2±0,4	-52	$p<0,05$
Сума всіх активностей	95,5±9,1	63,0±11,4	-34	$p<0,05$

Таким чином, результати дослідів свідчать про можливість моделювати глобальну церебральну ішемію у мишей шляхом дозованого гравітаційного перевантаження в краніокау дальньому векторі. Заявлений спосіб моделювання глобальної церебральної ішемії у мишей є простим, може бути здійснений за допомогою будь-якої центрифуги, придатної для відтворення способу, і може бути рекомендований для застосування в експериментальних дослідженнях, наприклад, при проведенні доклінічних досліджень церебропротекторних засобів, при вивченні динаміки неврологічного статусу в постішемичному періоді тощо.

Джерела інформації:

1. Мирзоян Р.С., Саратиков А.С., Плотников М.Б. и др. Методические указания по экспериментальному изучению препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М., 2000. - С. 159-161.

2. Суфианова Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А. и др. Малоинвазивная модель фокальной ишемии

головного мозгу у крыс // Эксперим. и клин. фармакология. - 2001. - №4. - С.63-67.

3. Макарова Л.М., Погорелый В.Е. Экспериментальная оценка эффективности глицина и его фосфорилированного производного при ишемических повреждениях головного мозга // Эксперим. и клин. фармакология. - 2006. - №6. - С.24-26.

4. Міщенко О.Я., Штриголь С.Ю., Яковлева Л.В. та ін. Вивчення церебропротекторної дії засо-

бу „Поллентар“ // Медична хімія. - 2003. -№3.-С.14-17.

5. Трахтенберг И.М., Тимофиевская Л.А., Квятковская И.Я. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / Отв. ред. И.М. Трахтенберг. - Рига: Зинатне, 1987. -172с.