



УКРАЇНА

(19) UA (11) 87759 (13) C2
(51) МПК
G09B 23/28 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГЛОБАЛЬНОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ У МИШЕЙ

1

(21) а200714636

(22) 24.12.2007

(24) 10.08.2009

(46) 10.08.2009, Бюл.№ 15, 2009 р.

(72) ШТРИГОЛЬ СЕРГІЙ ЮРІЙОВИЧ, ШТРИГОЛЬ
В'ЯЧЕСЛАВ СЕРГІЙОВИЧ, ЄСЄВА ОЛЬГА АНДРІ-
ЇВНА, ТІМАНЮК ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

(56) Мирзоян Р.С., Саратиков А.С., Плотноков М.Б.
и др. Методические указания по эксперименталь-
ному изучению препаратов для лечения наруше-
ний мозгового кровообращения // Руководство по
экспериментальному (доклиническому) изучению
новых фармакологических веществ. - М., 2000
UA, 25489, G09B 23/28, 30.10.1998
SU, 1554007, G09B 23/28, 30.03.1990
RU, 2083000, G09B 23/28, 27.06.1997

Суфианова Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А. и др.
Малоинвазивная модель фокальной ишемии го-
ловного мозга у крыс // Эксперим. и клинич. фар-
макология. - 2001. - №4

Макарова Л.М., Погорелый В.Е. Эксперименталь-
ная оценка эффективности глицина и его фосфо-
рилированного производного при ишемических
повреждениях головного мозга // Эксперим. и кли-
нич. фармакология. - 2006. - №6

2

Мищенко О.Я., Штриголь С.Ю., Яковлева Л.В. та ін.
Вивчення церебропротекторної дії засобу „Полле-
нтар” // Медична хімія. - 2003. - №3.

Тюренков И. Н., Багметов М.Н., Епишина В.В.
Сравнительная характеристика нейропротектор-
ного действия фенотропила и пирацетама в усло-
виях ишемии головного мозга у лабораторных
животных // Эксперим. и клинич. фармакология. -
2007, том 70. - № 2

Макарова Л.М. Нейропротекторное действие пре-
парата «мексидол» при тотальной ишемии мозга // Бюллетень экспериментальной биологии и меди-
цины. - 2006, приложение 1

(57) 1. Спосіб моделювання глобальної церебра-
льної ішемії у мишей шляхом штучного порушення
мозкового кровообігу, який **відрізняється** тим, що
мишей піддають впливу гравітаційного переванта-
ження при обертанні у радіальному положенні
головою до центра обертання.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ми-
шей піддають впливу гравітаційного переванта-
ження 6г.

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 **відрізняєть-
ся** тим, що час обертання становить від 10 до 60
секунд.

Винахід відноситься до медицини та фармації,
а саме до експериментального моделювання по-
рушень мозкового кровообігу, зокрема глобальної
церебральної ішемії, у лабораторних тварин.

Порушення мозкового кровообігу, насамперед
церебральна ішемія відноситься до числа найваж-
ливіших медико-соціальних проблем, оскільки су-
динні захворювання є одними з найбільш актуа-
льних причин інвалідизації та смертності населення
розвинутих країн. Тому існує необхідність ство-
рення ефективних лікарських препаратів та інших
засобів профілактики та лікування судинних за-
хворювань головного мозку, що потребує викорис-
тання відповідних моделей експериментальної

патології на етапі доклінічних досліджень лікарсь-
ких засобів.

Найбільш розповсюдженими моделями цере-
бральної ішемії є ті, що засновані на оклюзії загаль-
них 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
кровообіг до 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 по-
вній оклюзії загальних сонних і хребетних артерій

C2
(13)

87759
(11)

UA
(19)

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 результати. 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 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 винаходу 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 винаходом передбачено, що мишей піддають впливу гравітаційного перевантаження при обертанні у радіальному положенні головою до центра обертання.

Згідно з винаходом 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 центрифугі у радіальному положенні головою до центра обер-

тання. 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.

Винахід 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 центрифугі перпендикулярно осі обертання таким чином, що голова 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) піддавали 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.

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	Вижило / 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 одnobічна каротидна оклюзія				
5	-	8	8/0	100
Вірогідність відмінностей				$p_{4-5}<0,001$

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 каротид-

ної 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. Одnobічне перев'язування загальної сонної артерії не призводить до загибелі мишей, що не дозволяє рекомендувати дану модель ішемії головного мозку для скрінінгу церебропротекторної долікарських препаратів при проведенні доклінічних досліджень.

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 дослідження 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 конт-

рольної 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 постішемічному періоді.

Таблиця 3

Показники поведінки мишей в 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	1,4±0,2	0,7±0,2	-54	p<0,05
- дефекації та урінації	1,1±0,4	0,5±0,2	-46	-
- всього	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 краніокаудальному векторі. З'явлений 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 мозга 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 засобу "Поллентар" // Медична хімія. - 2003. - №3.-С14-17.

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. - 172 с.