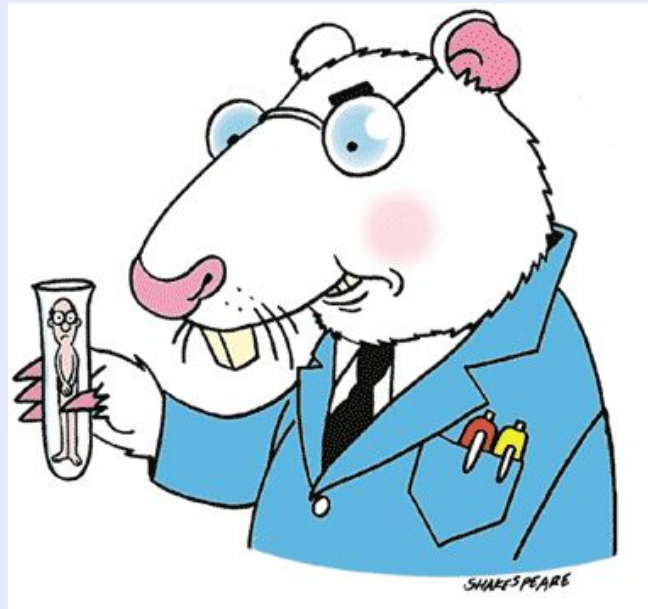


Д. м. н. М. М. Галагудза

Роль эксперимента в современной медицине. Подходы к моделированию патологических процессов



Санкт-Петербург, 04.09.2017

Что дают эксперименты на животных современной клинической медицине?

- Животные используются для моделирования и изучения патологических процессов и болезней (*этиология и патогенез многих заболеваний остаются неизвестными*)
- Экспериментальная терапия (*новые лекарства*)
- Изучение роли отдельных генов и белков в механизмах развития заболеваний
- Меньшая продолжительность жизни у животных позволяет изучать патологию в течение всей жизни



Трансляционный цикл: от научного открытия к лечебной технологии и обратно



Оценка
результата

Внедрение
(лекарство,
технология)

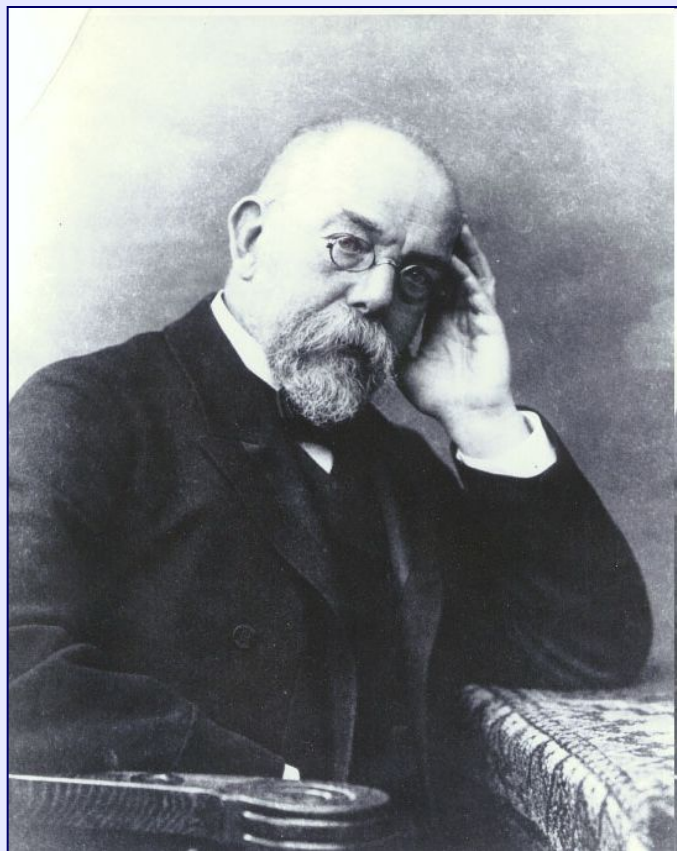
Оптимизация



Клиническая проблема

Научные исследования

Достижения медицины, ставшие возможными благодаря экспериментам на животных



Роберт Кох (1843-1910)

- Выделение возбудителей туберкулеза и сибирской язвы (1882)
- Культивирование бактерий



M. tuberculosis



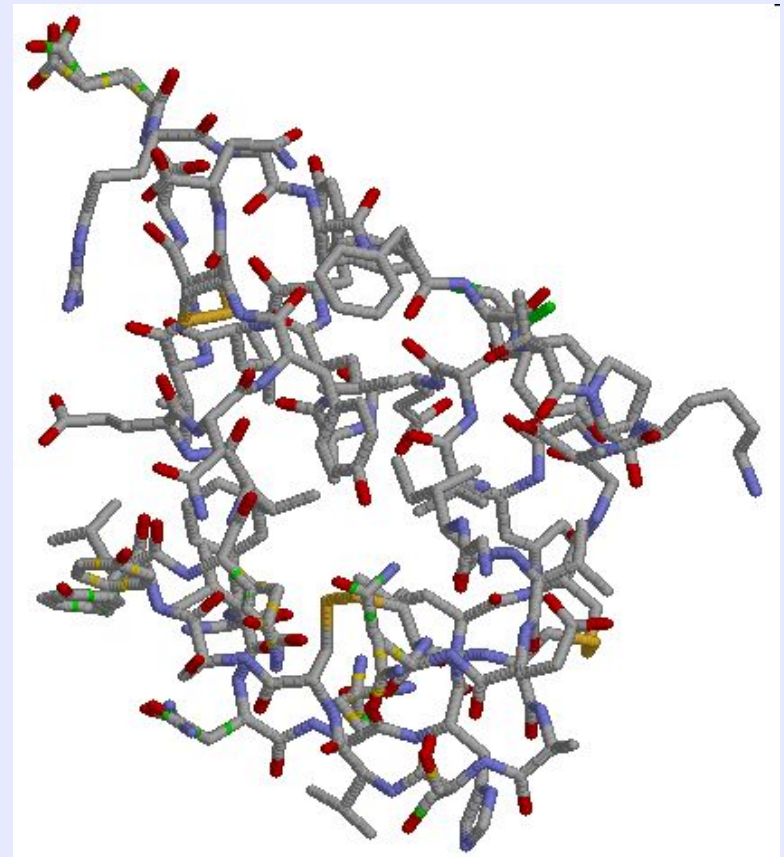
Cavia porcellus

Достижения медицины, ставшие возможными благодаря экспериментам на животных

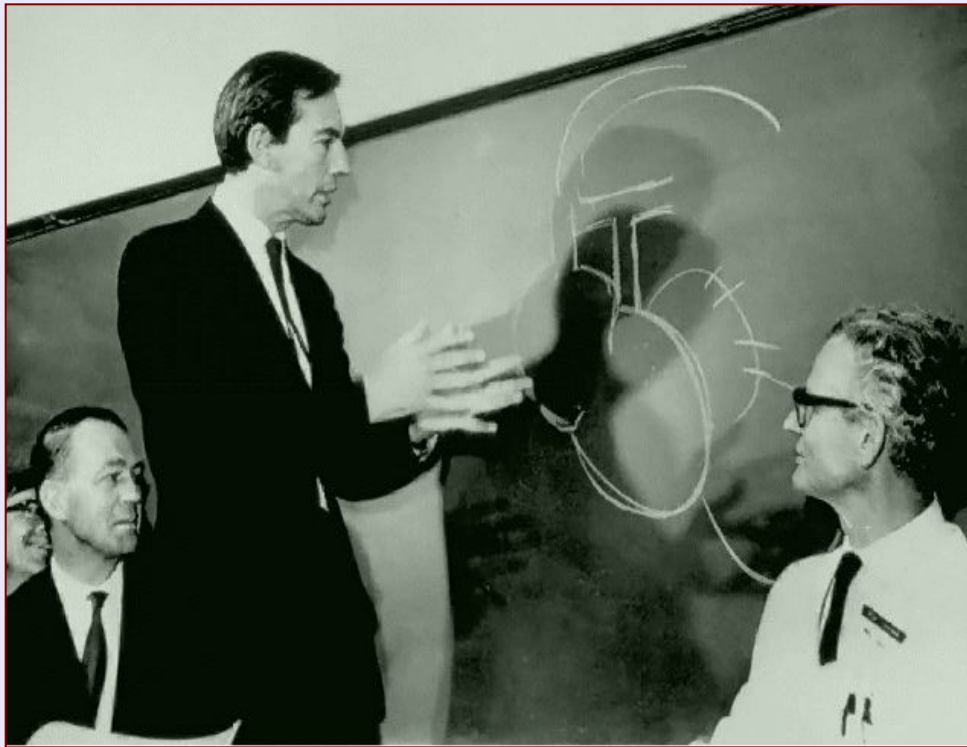


Фредерик Бантинг (1891-1941),
Чарльз Бест (1899-1978)

- Открытие инсулина (1921)

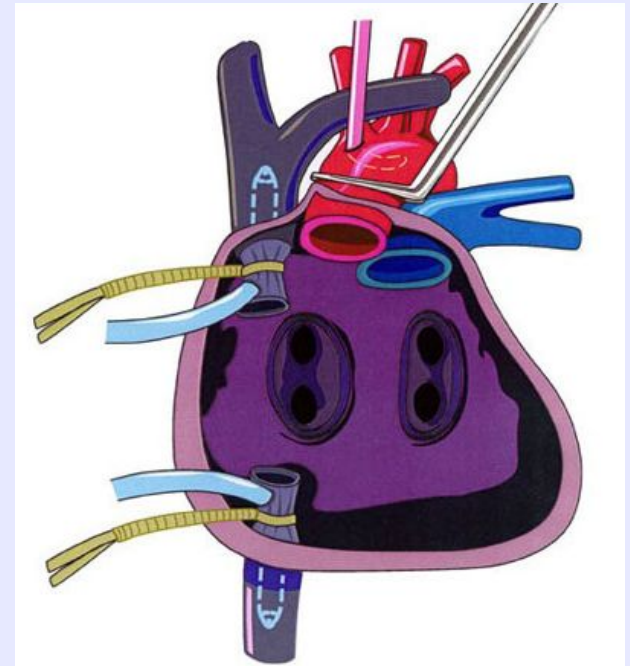


Достижения медицины, ставшие возможными благодаря экспериментам на животных



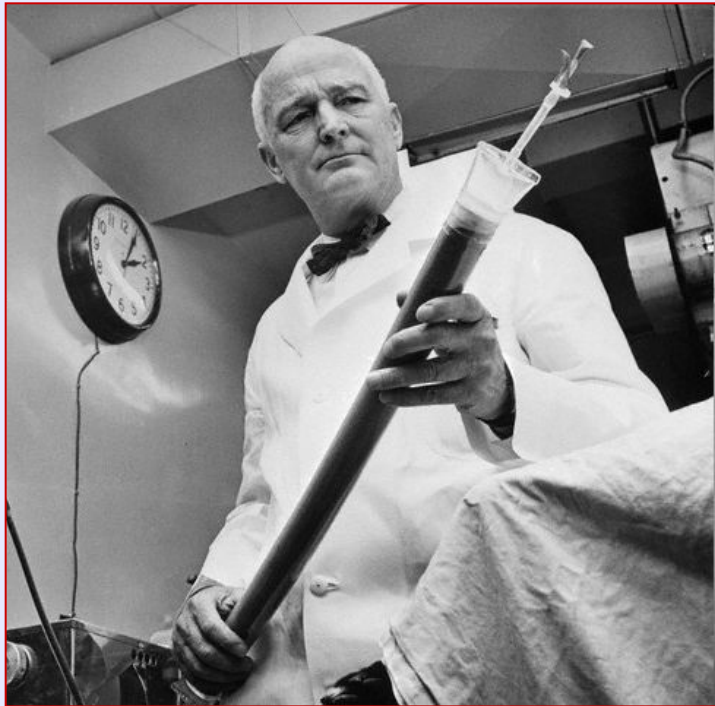
Кристиан Барнард (1922-2001)

- Трансплантация сердца (1967)

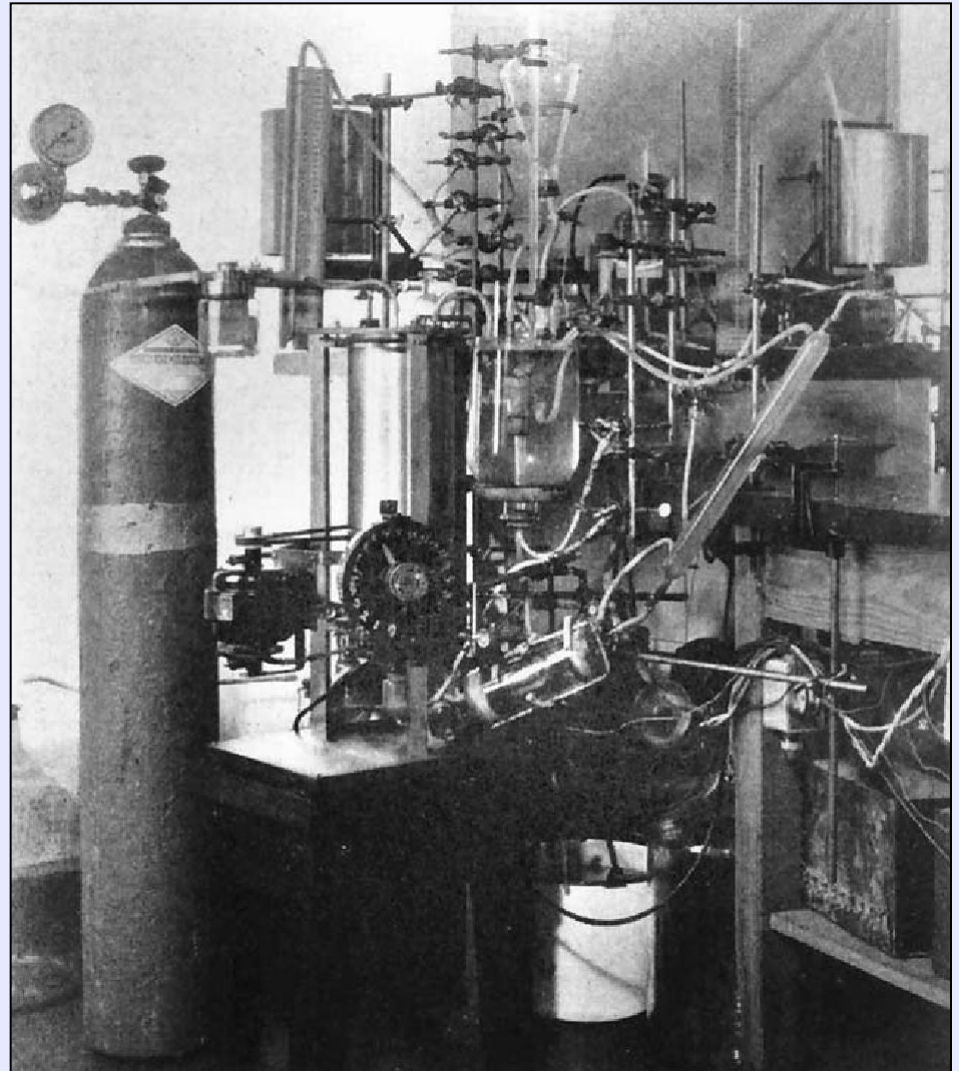


Достижения медицины, ставшие возможными благодаря экспериментам на животных

- Аппарат искусственного кровообращения (1937)

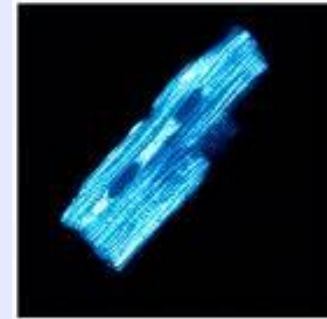


John Gibbon (1903-1973)

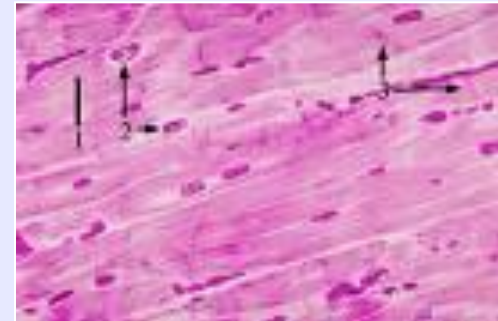


Важнейшие экспериментальные модели (1)

1. Изолированные клетки
(нейроны, кардиомиоциты)



2. Клеточная культура
(опухолевые клетки,
фибробласты и др.)



3. Тканевые фрагменты
(папиллярная мышца,
сосудистые кольца и др.)

4. Изолированные органы
(сердце, тонкая кишка,
почка)



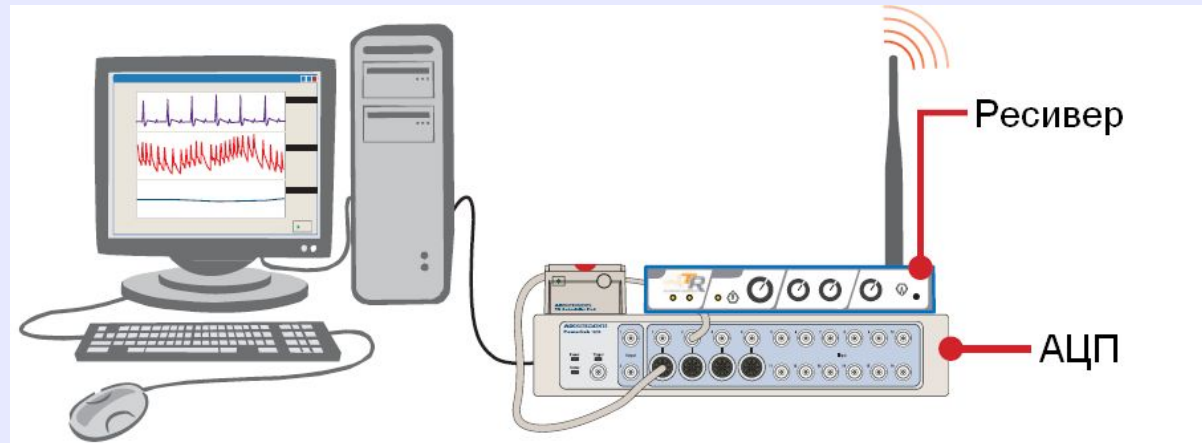
Важнейшие экспериментальные модели (2)

5. Эксперименты *in vivo* на наркотизированных ЖИВОТНЫХ



Важнейшие экспериментальные модели (3): *телеметрическая регистрация артериального давления у бодрствующих животных*

- Датчик АД помещается в брюшную полость и катетер из него имплантируется в аорту
- Срок работы датчика - 4 месяца



← Двигательная
активность

← Артериальное
давление

← Температура

Как создать модель заболевания у животного?

- Хирургические манипуляции
- Воздействие экзогенных факторов:
 - химических (блокаторы рецепторов, токсины и др.)
 - физических (радиация, УФ, температура и др.)
 - биологических (бактерии, вирусы и др.)
- Генетические модели (у мышей):
 - Трансгены (дополнительные копии генов)
 - Нокауты (отсутствие генов)

Хирургическая модель артериальной гипертензии

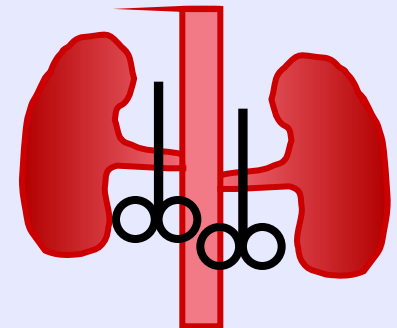
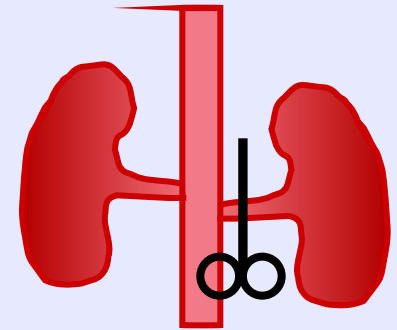
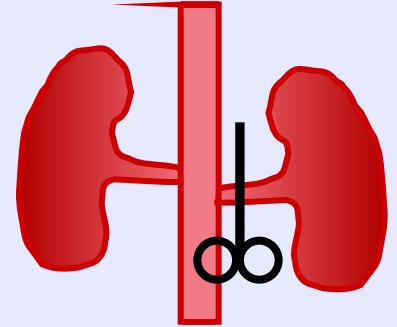


Гарри Гольдблат
(1891-1977)

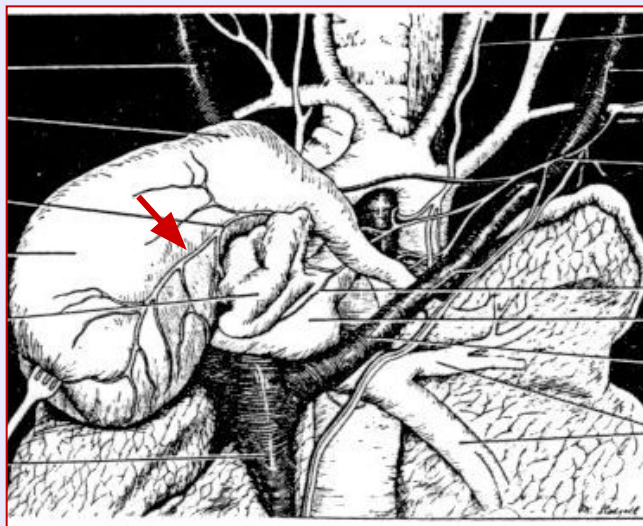
«Две почки, один зажим»: ↑ ренин,
↑ ангиотензин II →
↑↑ ОПСС → ↑↑ АД

«Одна почка, один зажим»: нарушение
экскреции Na^+ и H_2O →
↑↑ ОЦК → ↑↑ АД

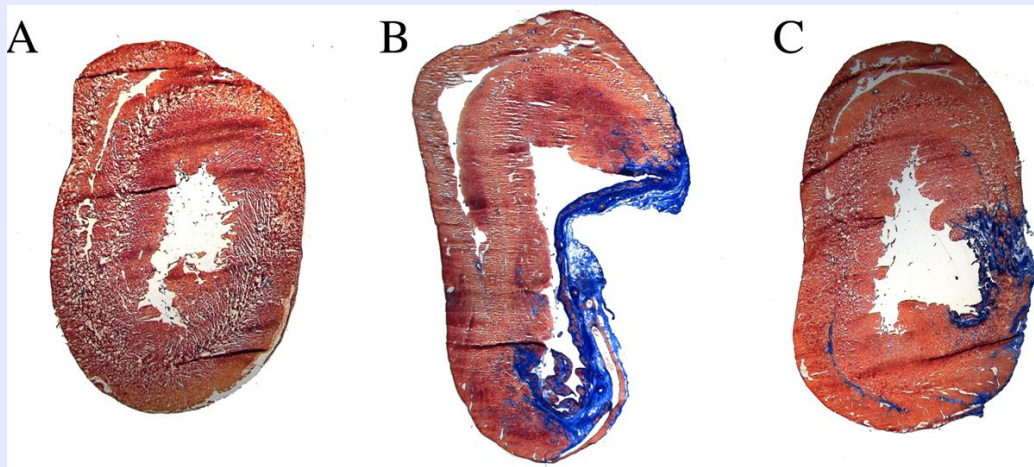
«Две почки, два зажима»: см.
предыдущий



Хирургическая модель инфаркта миокарда у крыс



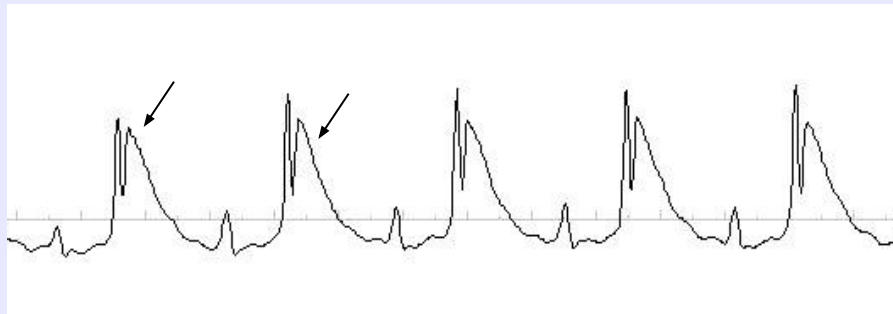
Анатомическое расположение левой коронарной артерии (стрелка – место перевязки)



А
Нормальное сердце

В
Протяженный постинфарктный рубец (синий)

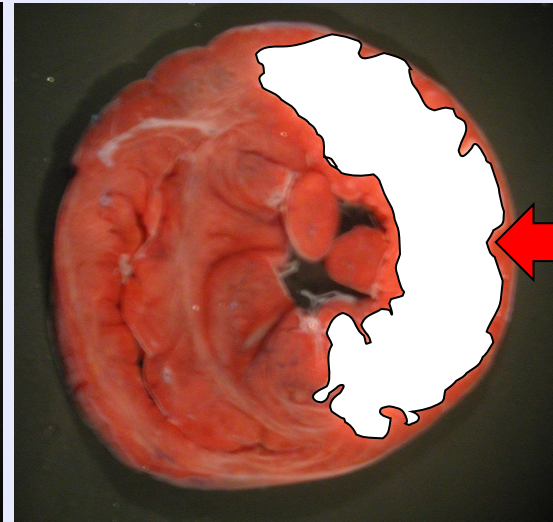
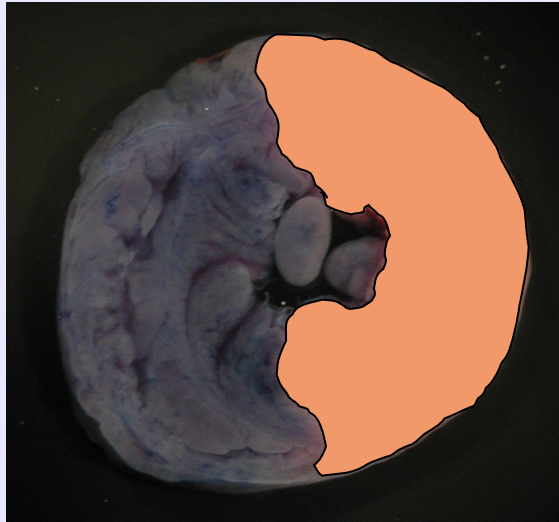
С
Небольшой постинфарктный рубец (синий)



типичные записи ЭКГ до (слева) и после (справа) после перевязки левой коронарной артерии

Оценка размера инфаркта дифференциальным индикаторным методом

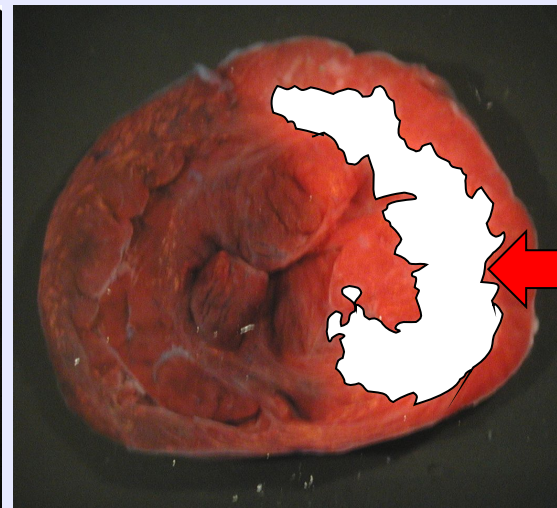
Контроль



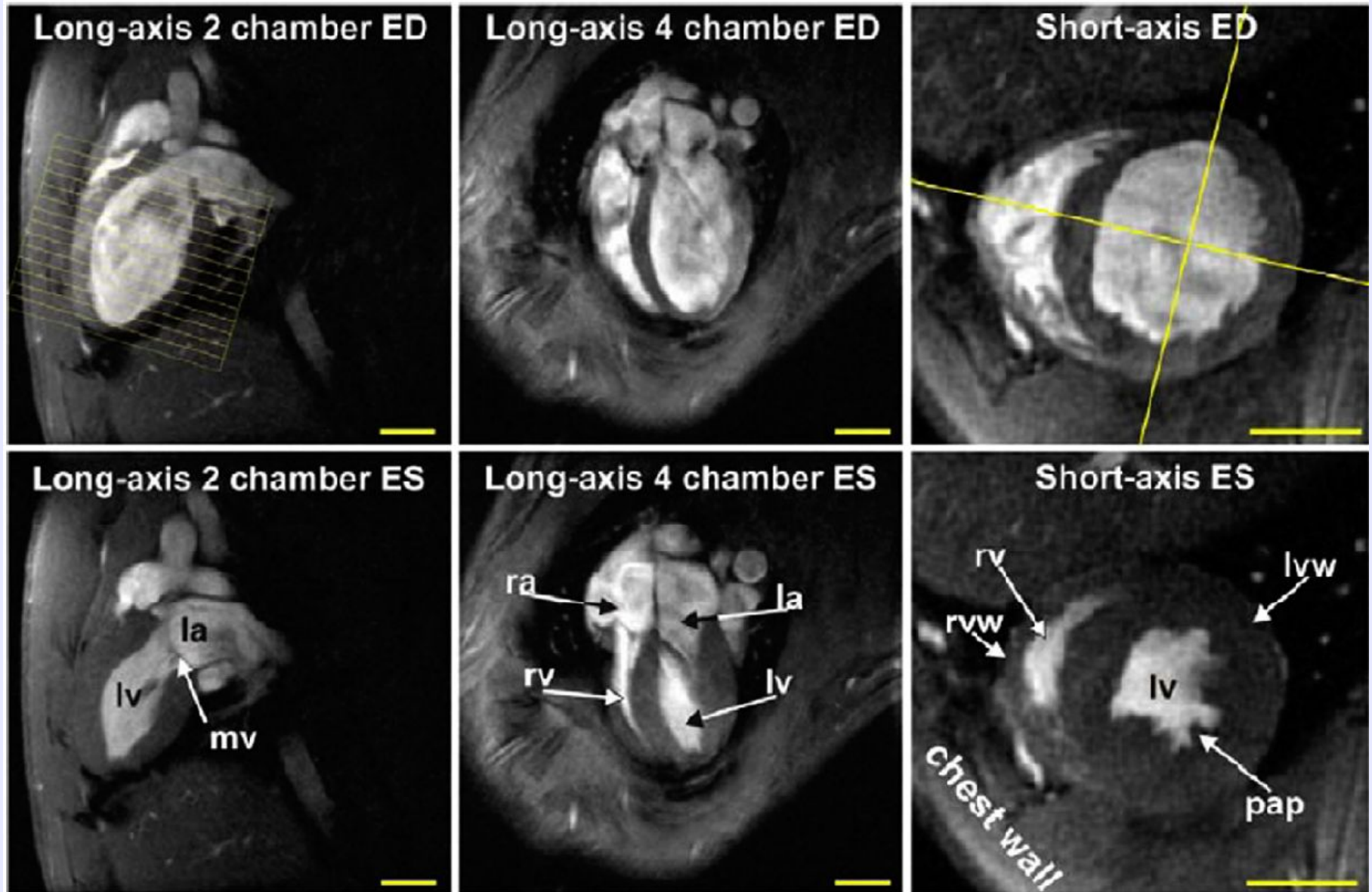
Одинаковый
объем
ишемизированного
миокарда

Пре кондиционирование

Значительно
меньший размер
инфаркта

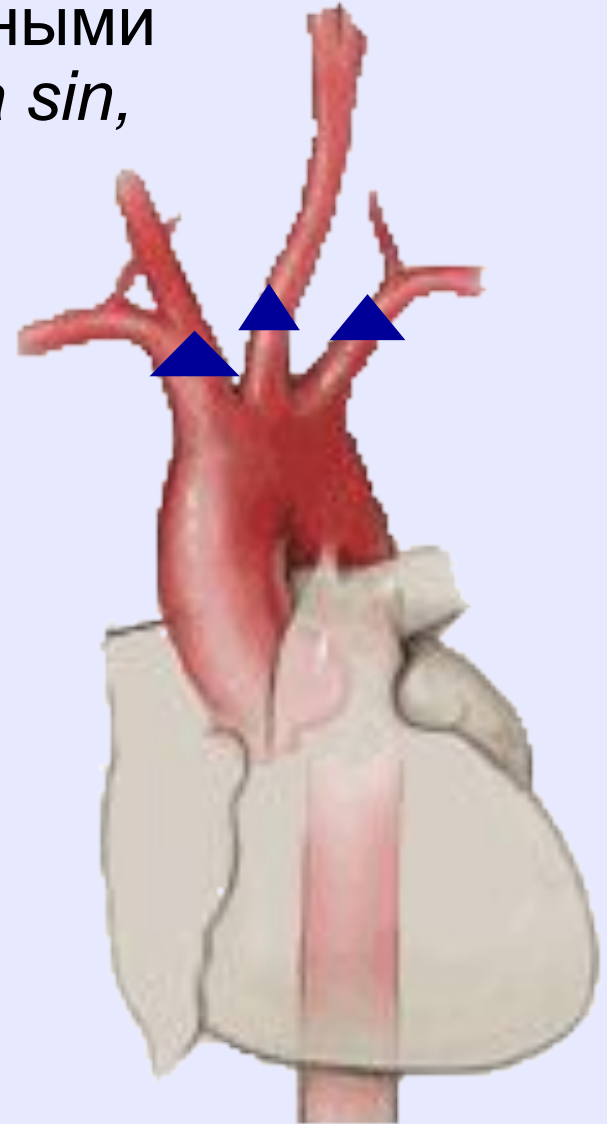
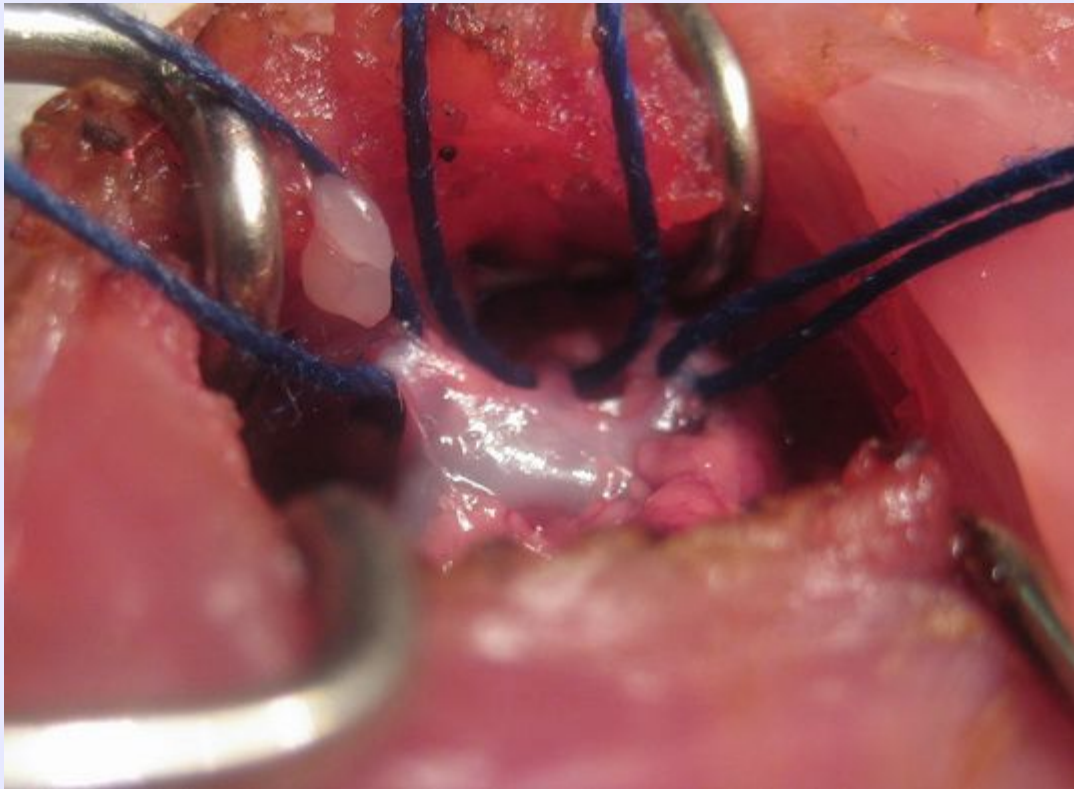


MPT (9.4 Тл) изображения сердца мыши (шкала = 1 мм)



Хирургическая модель общей ишемии-реперфузии головного мозга у крыс

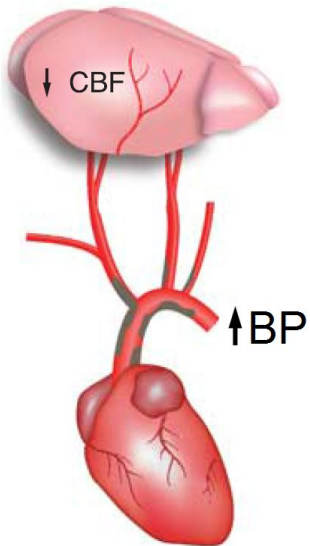
Дуга аорты с лигатурами, подведенными под *tr. brachiocephalicus*, *a. subclavia sin*, *a. carotis communis sin*.



Экспериментальные модели сосудистой деменции

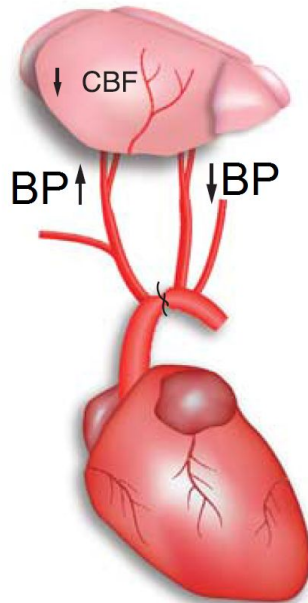
Атеросклероз

ApoE^{-/-}



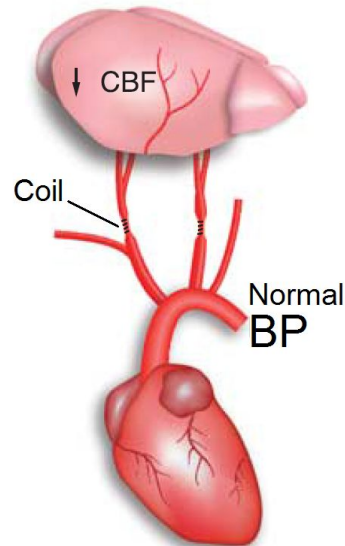
ХСН

Transverse
aortic
constriction



Гипоперфузия мозга

Bilateral
carotid
stenosis



Атеросклероз:

- ApoE^{-/-}
- hApoB Tg
- LDLr^{-/-}
- LDLr^{-/-} × hApoB

Сердечная недостаточность:

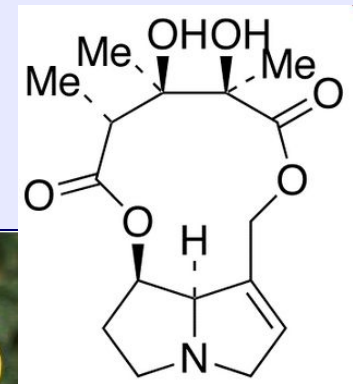
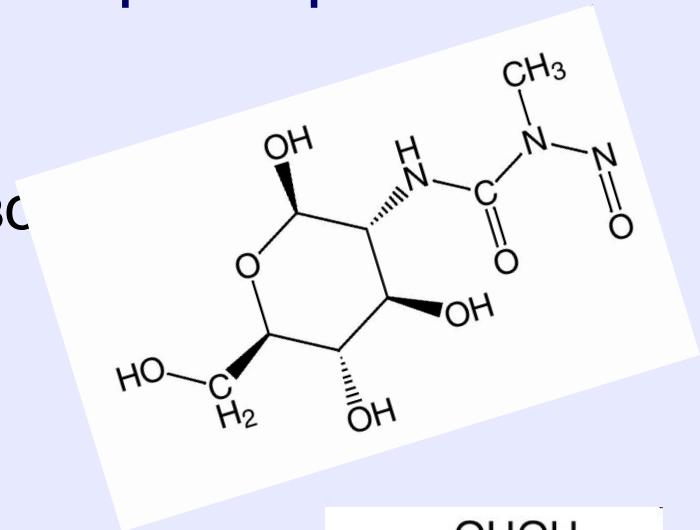
- Констрикция аорты
- Инфаркт миокарда

Гипоперфузия мозга:

- Билатеральный стеноз сонных артерий (мышь)
- Билатеральная перевязка сонных артерий (крыса)

Примеры моделей заболеваний вызванных специфическими химическими факторами

- Введение **стрептозотоцина (или аллоксана)** крысам и кроликам приводит к избирательной гибели β -клеток островков Лангерганса → модель **сахарного диабета 1 типа**
- Введение **монокроталина** (алкалоид из *Crotalaria species*) → повреждение эндотелия ветвей легочной артерии с последующей пролиферацией гладкомышечных клеток → модель **легочной гипертензии**

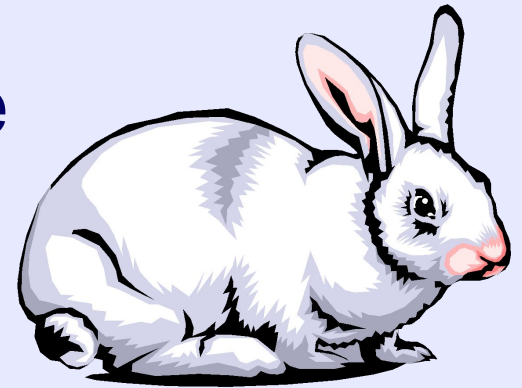


Основные лабораторные животные

- Лягушка
- Мышь
- Крыса
- Морская свинка
- Кролик
- Кошка
- Собака
- Другие виды, при необходимости

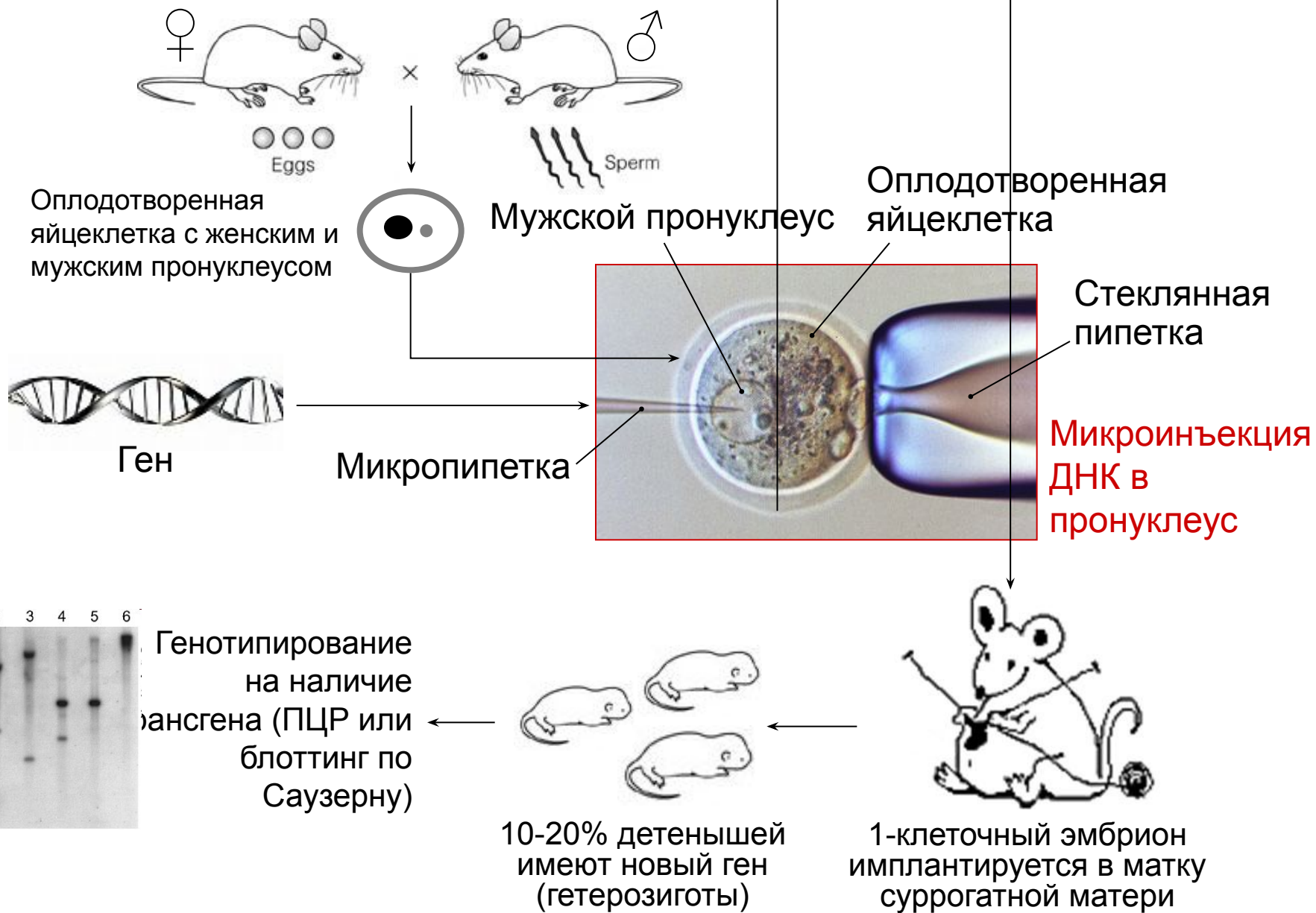


Какие виды животных наиболее часто используются в экспериментах?

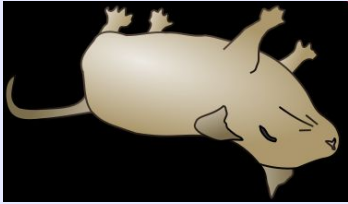


- Наиболее часто используются мыши;
- Вместе с другими грызунами (крысы, хомяки), мыши используются в 90% всех экспериментов;
- 20 миллионов грызунов в год выводятся для исследований;
- Другие животные (собаки, кошки, лягушки и др.) используются только в 10% случаев.

Создание трансгенных мышей



Фенотипические изменения у нокаутных мышей



Гибель

Ген-мишень важен для нормального развития или выживания

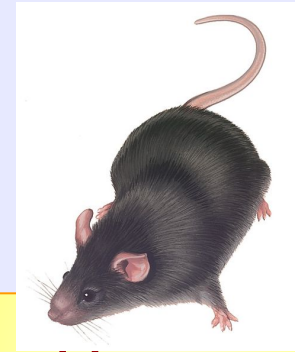
Альтернативный подход

Кондиционное удаление гена



Фенотипические отличия

Функция гена-мишени выявлена



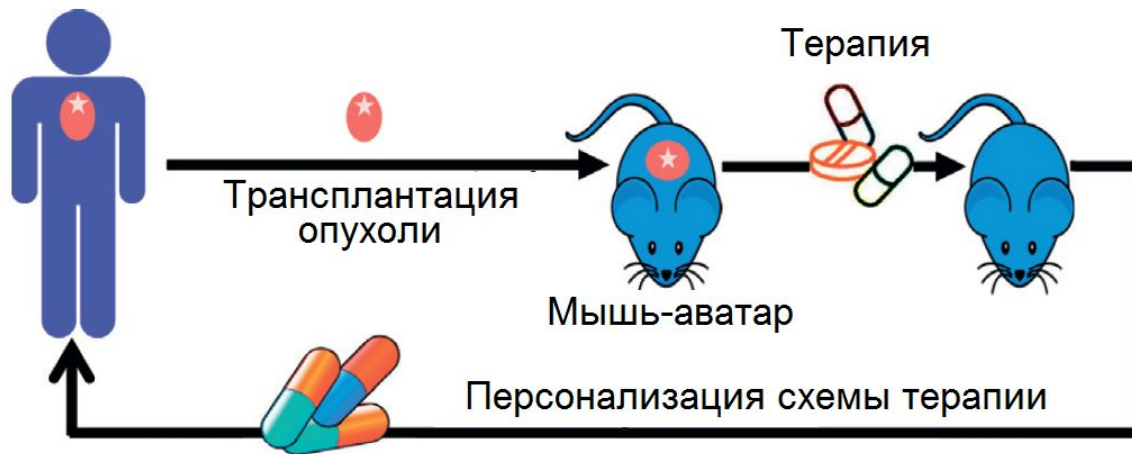
Норма

Ген-мишень неважен или избыточен

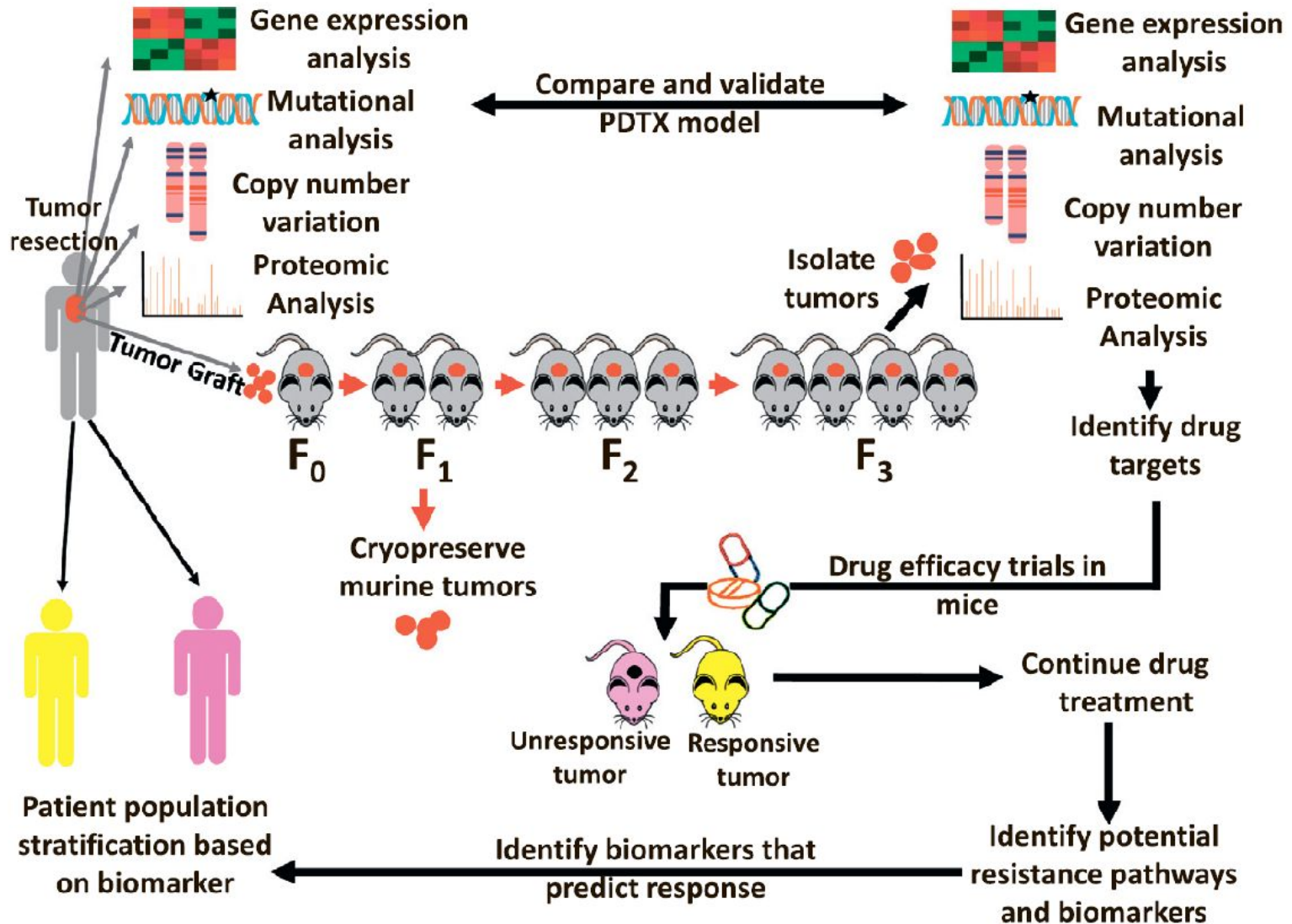


Вначале я обрадовался, что мне удалось создать этих трансгенных мышей!

Мыши-аватары



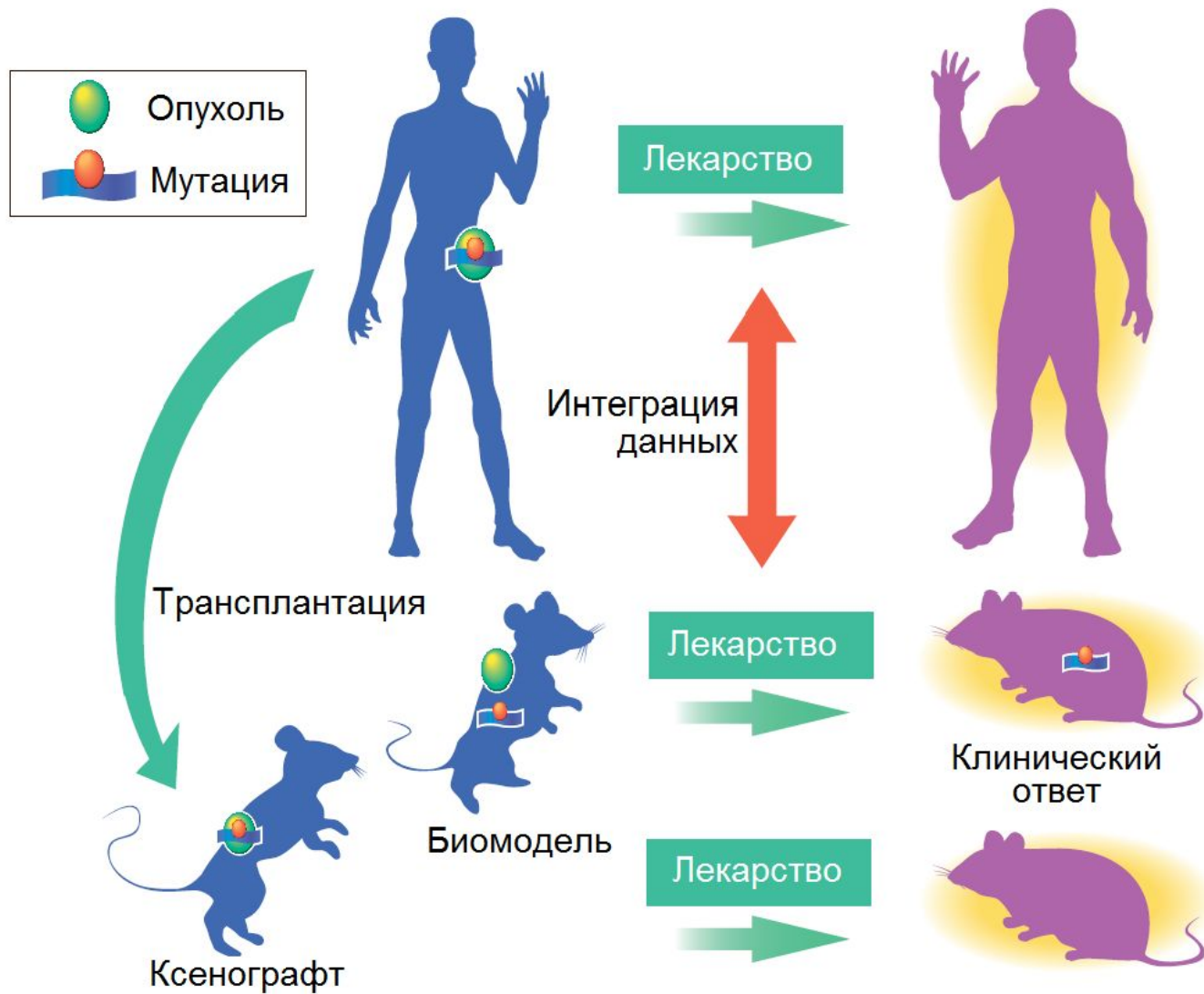
Мыши-аватары



Коммерциализация технологии мыши-аватара

- Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA
- The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA
- Oncotest GmbH, Freiburg, Germany
- Oncodesign, Dijon Cedex, France
- GenScript, Piscataway, New Jersey, USA
- Pharmaron, Beijing, China

Концепция ко-клинических исследований



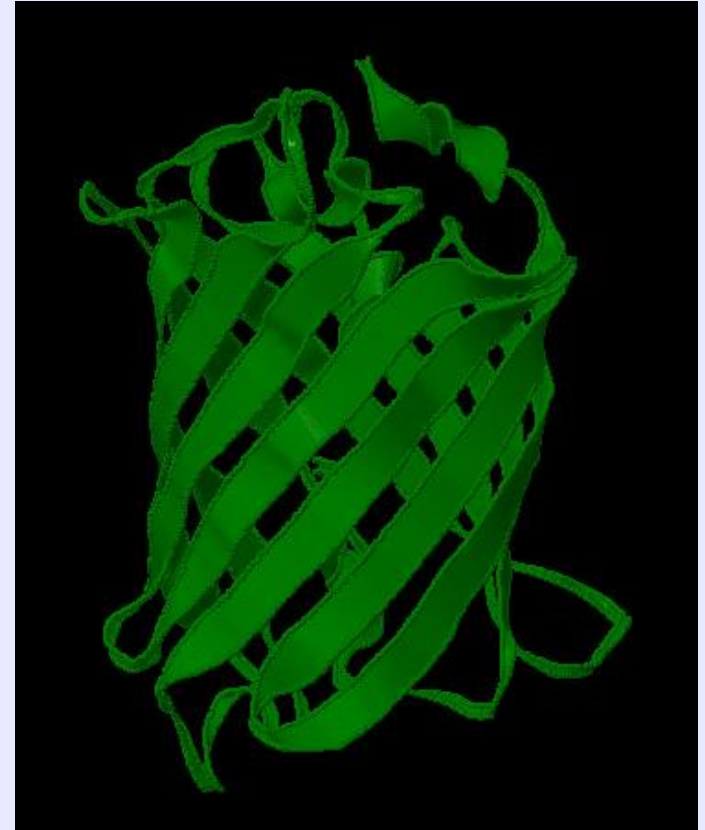
«Прозрачная» лягушка для неинвазивного наблюдения внутренних органов и сосудов



Ob/ob нокаутная мышь с дефицитом лептина (слева) и здоровая мышь (справа)



«Зеленые» мыши, экспрессирующие зеленый флуоресцирующий белок



«Голая» мышь с иммунодефицитом и агенезией тимуса (*Foxp1* нокаут)



Нарушения развития у мыши, лишенной гена матричной металлопротеиназы 14 (*Mmp14* нокаут)



Здоровая мышь
(дикий тип)

Карликовость, аномалии
структуры костей черепа

Возраст обеих мышей – 10 недель

Мышь с раком молочной железы (вирус Bittner)



Какие новые возможности дает использование крупных лабораторных животных?

- Экспериментальная хирургия, в особенности кардиохирургия, трансплантология, эндоваскулярная хирургия и аритмология
- Тестирование токсичности лекарственных средств на крупных животных
- Нейродегенеративные заболевания
- Возможность использования генетически модифицированных животных
- Атеросклероз, дестабилизация бляшки, визуализация
- Мастер-классы по хирургии, обучение



Операционная для крупных лабораторных животных



Какие возможности дает использование рыб?

- Скрининг биологической активности, токсичности и мутагенности соединений (экономические и технические преимущества)
- Биология развития, эмбрио- и органогенез
- Простота генетической модификации (морфолиновые олигонуклеотиды), повышенная жизнеспособность генномодифицированных особей
- Молекулярная визуализация (прозрачность эмбрионов)
- Канцерогенез
- Поведенческие реакции



Оборудование для содержания рыб



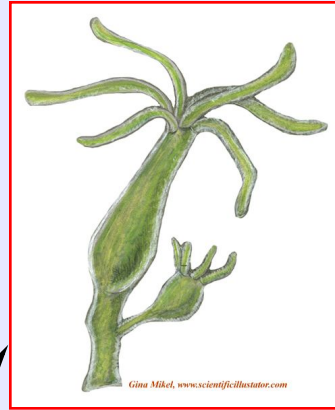
ZebraLab – программно-аппаратный комплекс для изучения поведенческих реакций у рыб



Сравнительно-эволюционный метод: исследование воспаления у животных разных эволюционных классов



Простейшие



Гидра



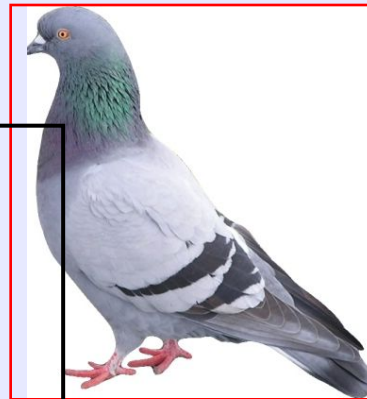
Амфибии



Рептилии



Млекопитающие



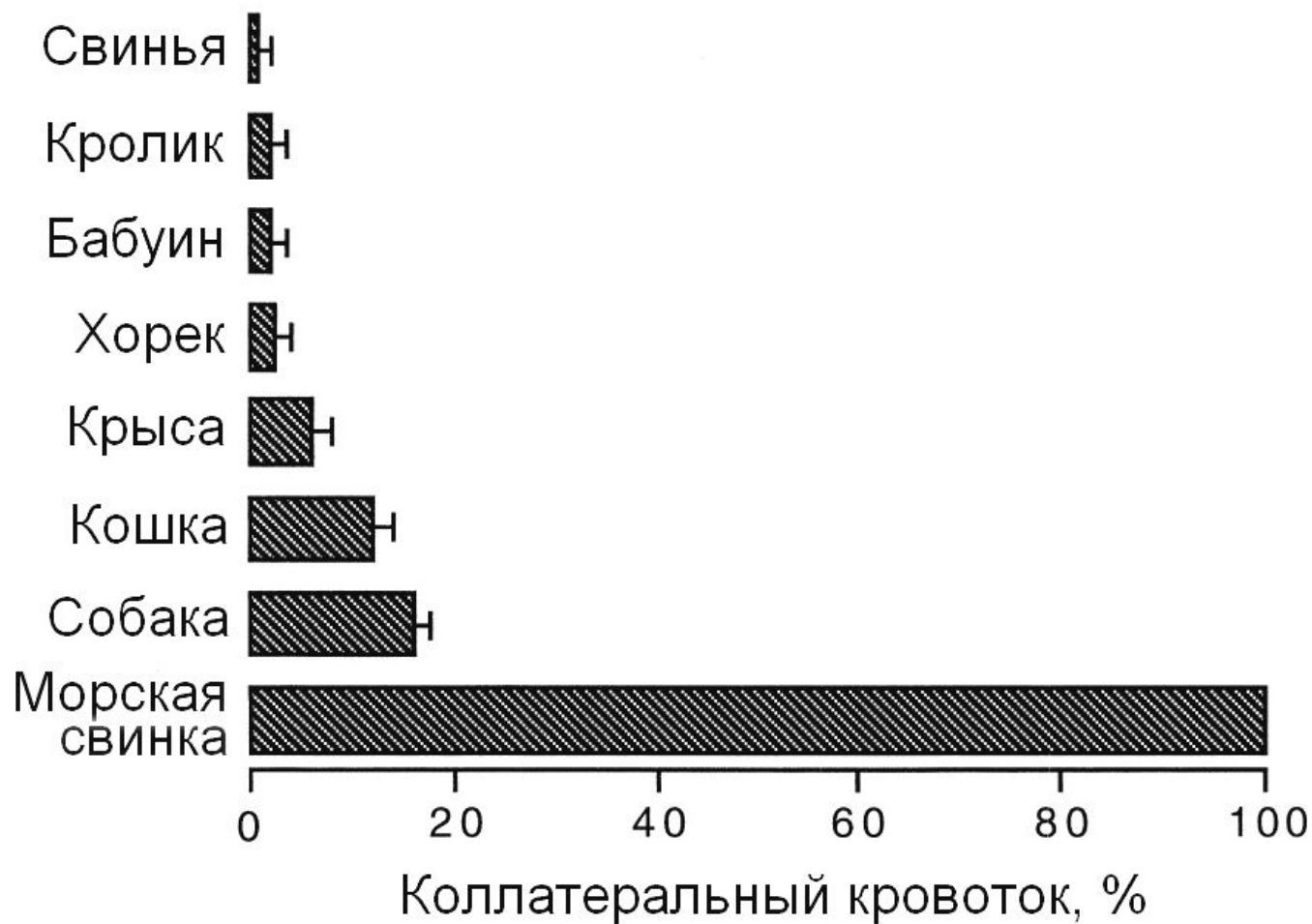
Птицы



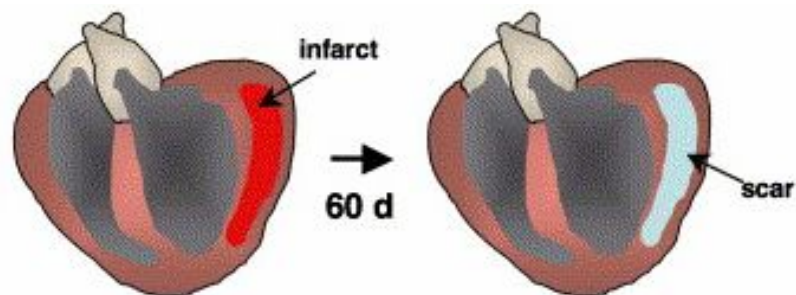
Условия проведения эксперимента на ЖИВОТНЫХ

- Правильный выбор вида животного
- Правильный выбор модели
- Животное должно быть **ЗДОРОВЫМ**
- Эксперимент должен проводиться под адекватной анестезией
- Стандартизация животных

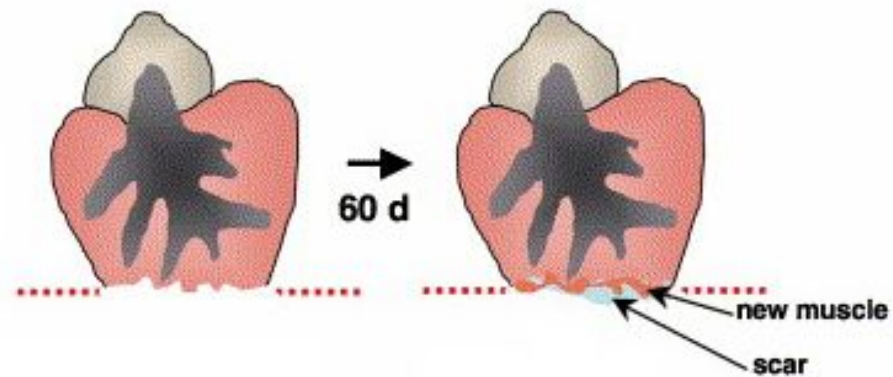
Вариабельность коронарного коллатерального кровотока у различных представителей млекопитающих



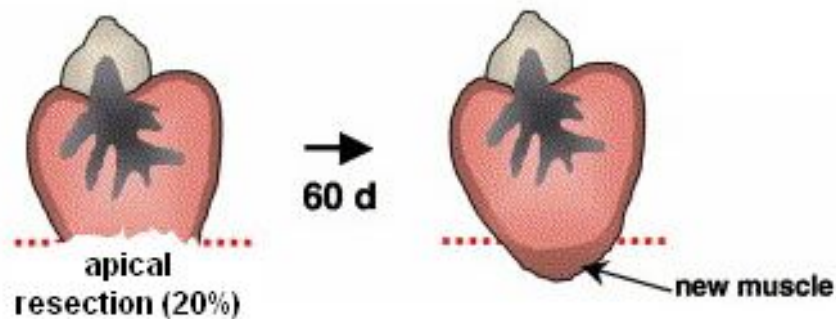
Регенерация миокарда у разных видов животных



Млекопитающие (*Mus musculus*)



Тритон (*Notophthalmus viridescens*)



Данио (*Danio rerio*)

Что должно быть стандартизировано?

- Генетический фон:
 - по генотипу
 - по фенотипу
- Внешние факторы:
 - стандартная патогенная флора
 - питание
 - условия содержания (световой режим, температура, влажность и др.)

Влияние различных параметров на результат эксперимента



Компоненты качества лабораторных животных

Стандартизированные
условия содержания



Контролируемая
микробиота

Определенный
генетический
статус

Работа в барьерном виварии для SPF животных



Операционная



Комната содержания крыс

Центр доклинических трансляционных исследований – 10 000 м²



Животные:

- Мыши – 17 000
- Крысы – 5 000
- Лягушки (*Xenopus laevis*) – 250
- Рыбы (*Danio rerio*) – 34 000
- Мини-свиньи – 10

Подразделения:

- Молекулярная визуализация
- Клеточные технологии/цитотоксикология
- Молекулярная биология и генетика
- Токсикология и канцерогенез
- Биохимия
- Патоморфология
- Фармакология и физиология
- Аналитическая химия
- Эмбриогенез
- Иммунотоксикология
- Микробиология
- Отдел биомоделей

Стимулы для появления новых знаний в биологии и медицине: смена парадигм

Наблюдение (в последнее время – достаточно редко): случайное обнаружение необычных явлений – феноменов – становятся стимулом для их исследования и объяснения

Гипотеза (в настоящее время основной путь познания): формулировка гипотезы на основе сопоставления имеющихся знаний и ее последующая экспериментальная проверка

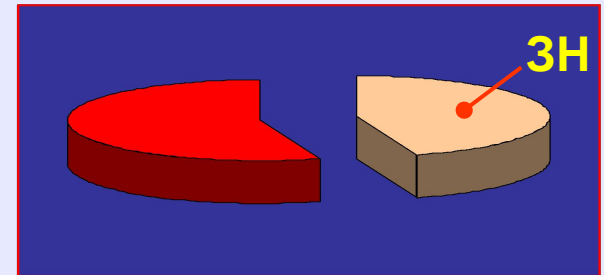
Избыточность количественных данных (наука будущего): анализ огромных массивов цифровых данных (баз данных) обеспечивает понимание ранее неизвестных закономерностей без предварительной формулировки гипотезы

Феномен прекондиционирования миокарда: история открытия

Протокол эксперимента Murry и соавт., 1986

Контроль

Коронароокклюзия 40'

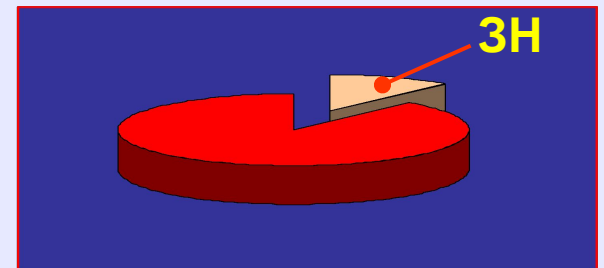


Относительный объем зоны некроза (ЗН) в контроле

Ишемическое
прекондиционирование

5' 5'

Коронароокклюзия 40'



Уменьшение объема ЗН **более чем в 4 раза** под действием ишемической предпосылки

Объяснение механизма preconditionирования: формирование гипотезы

Факт №2

Кратковременные эпизоды ишемии повышают устойчивость к последующей длительной ишемии

Факт №1

Повышение устойчивости к ишемии может быть связано с улучшением доставки кислорода

Гипотеза

Preconditionирование работает за счет усиления коллатерального кровотока

Проверка гипотезы

Preconditionирование существует у животных, лишенных коронарных коллатералей

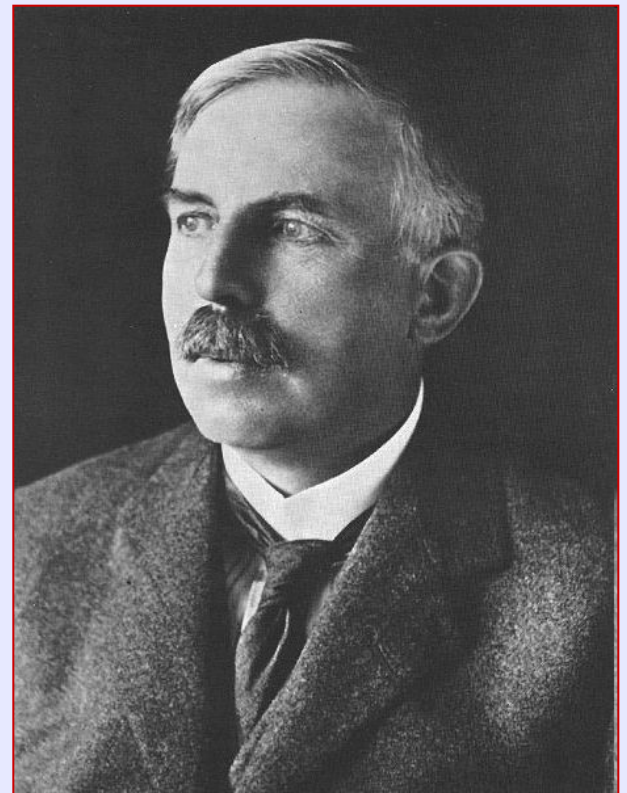
У животных с наличием коллатералей повышения кровотока не происходит

Гипотеза неверна

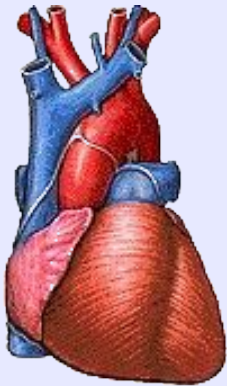
Недостаток современной парадигмы исследований, основанной на формулировке гипотез: *заранее известно, какой результат нужно (не нужно) получить*

«Если результаты Ваших экспериментов требуют статистической обработки, Вам следует провести более качественные эксперименты»

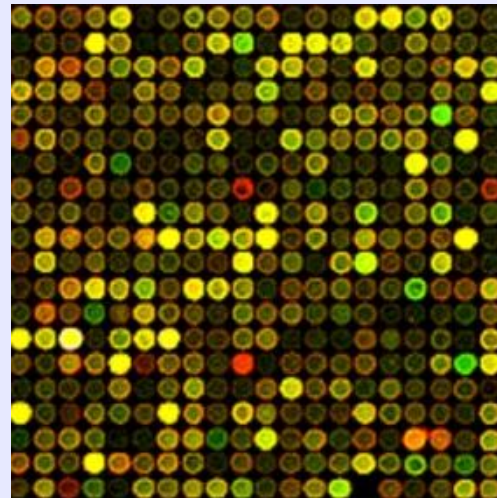
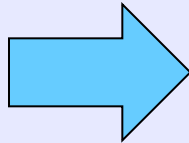
Э. Резерфорд (1871-1937)



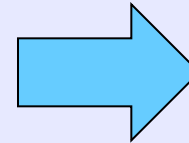
Пример использования массивов данных для получения новых знаний



**Инфаркт
миокарда у крыс**



**Анализ экспрессии
4.500 генов в
поврежденном и
неповрежденном
миокарде**



**Экспрессия 400
генов была
изменена:
повышение
экспрессии 287
генов и снижение
экспрессии 113
генов**

Гуманизм или рационализм?

