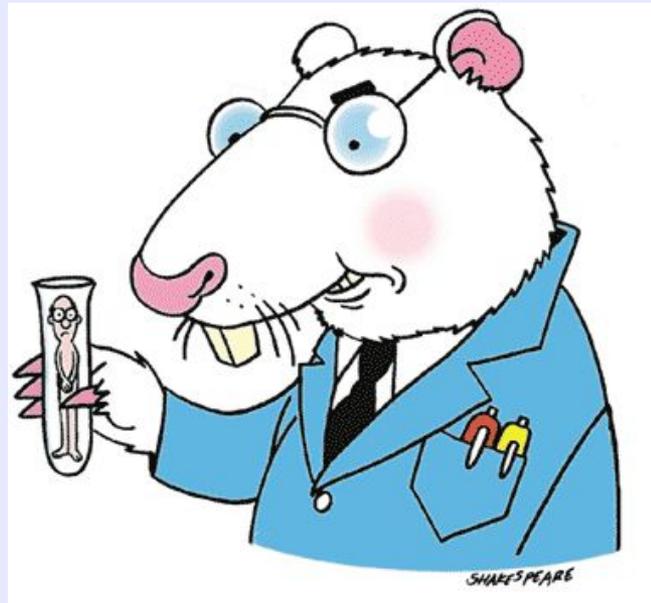


Д. м. н. М. М. Галагудза

# 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



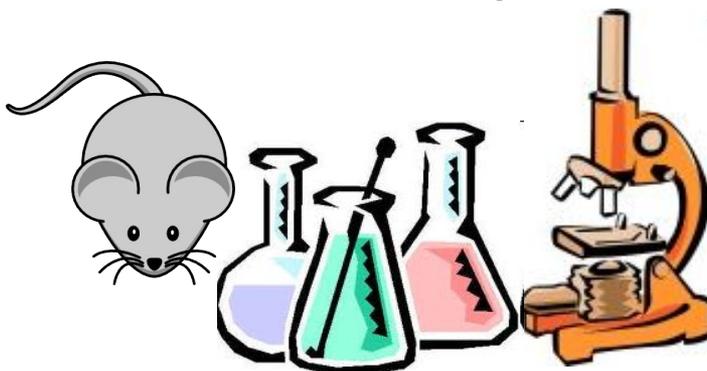
# Трансляционный цикл: от научного открытия к лечебной технологии и обратно



Оценка  
результата

Внедрение  
(лекарство,  
технология)

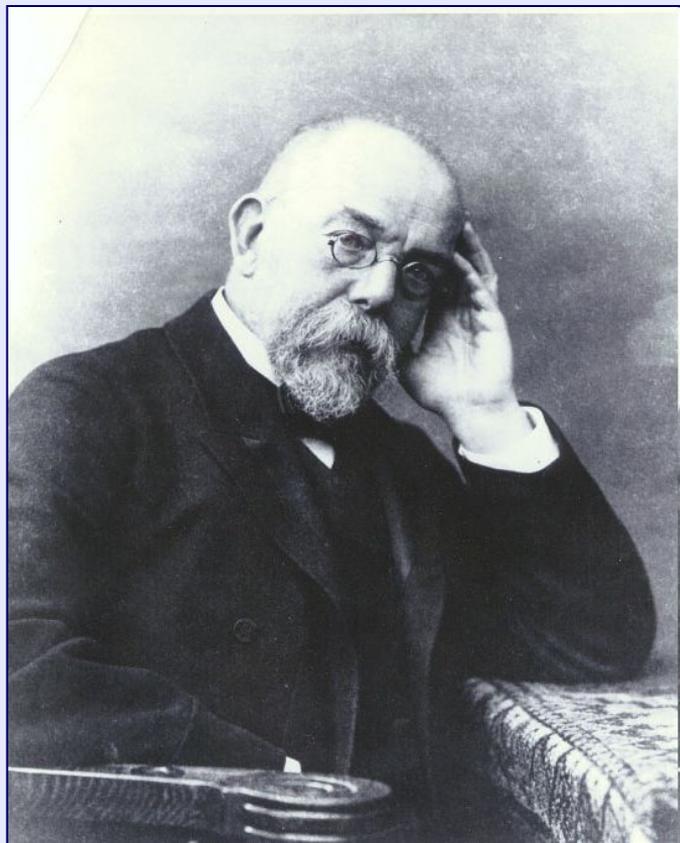
**Оптимизация**



Клиническая проблема

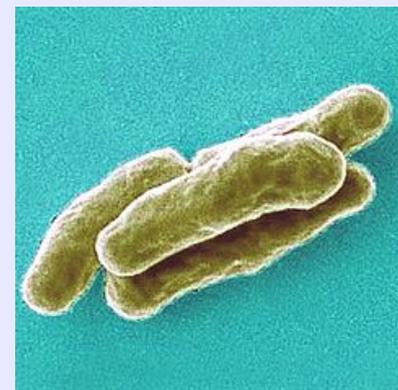
Научные исследования

# Достижения медицины, ставшие возможными благодаря экспериментам на животных



Роберт Кох (1843-1910)

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



*M. tuberculosis*



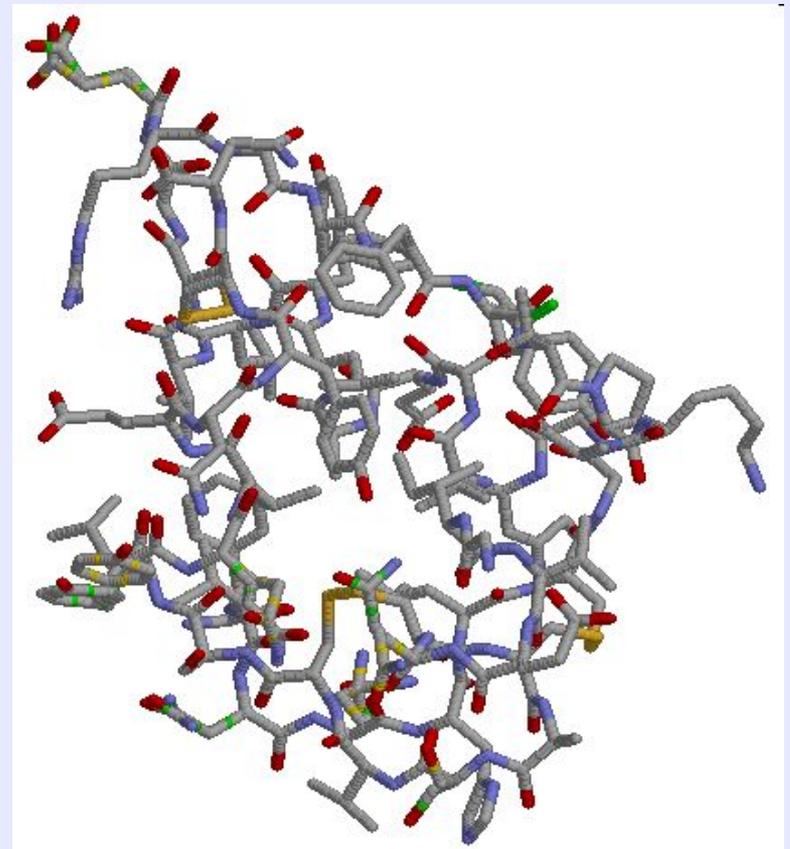
*Cavia porcellus*

# Достижения медицины, ставшие возможными благодаря экспериментам на животных

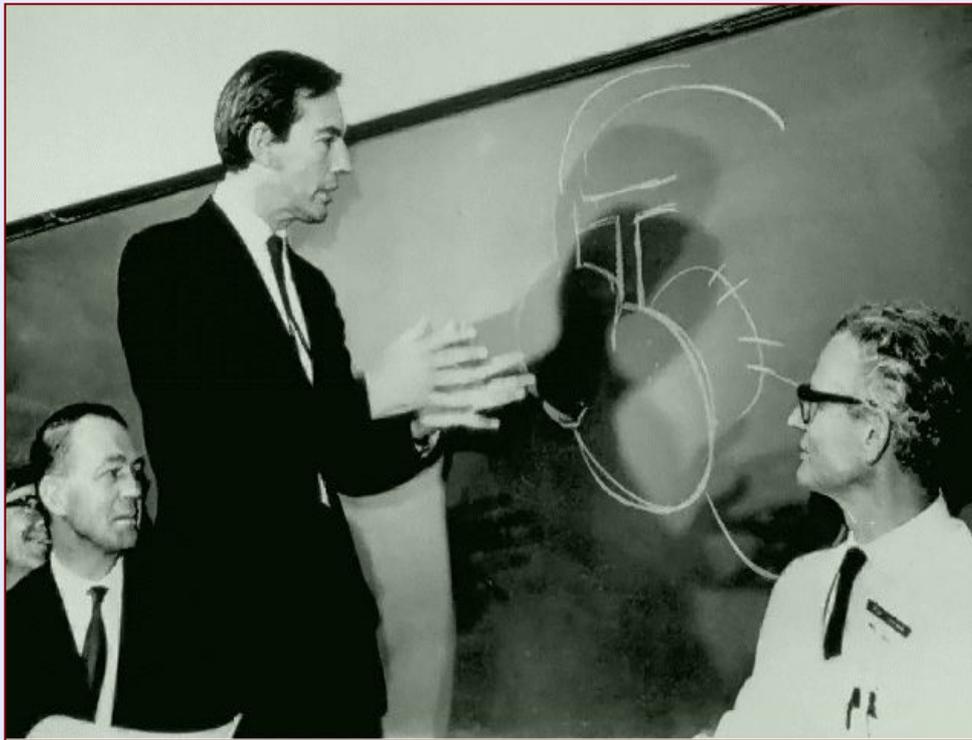


Фредерик Бантинг (1891-1941),  
Чарльз Бест (1899-1978)

- Открытие инсулина (1921)

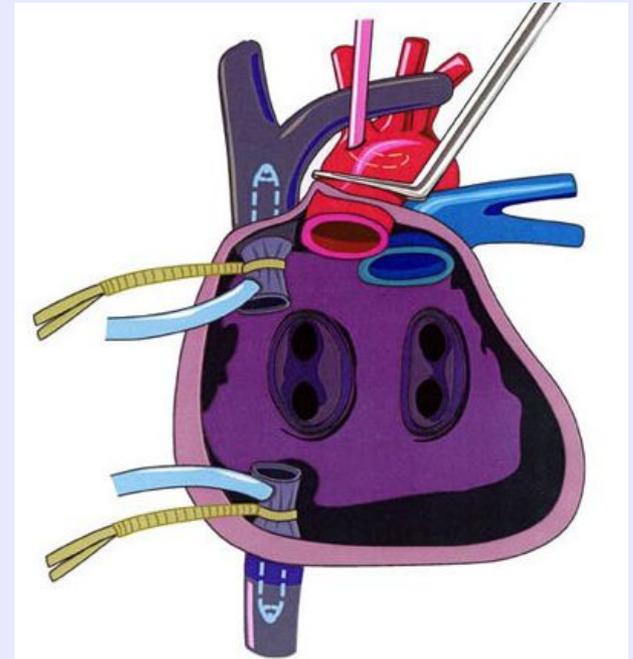


# Достижения медицины, ставшие возможными благодаря экспериментам на животных



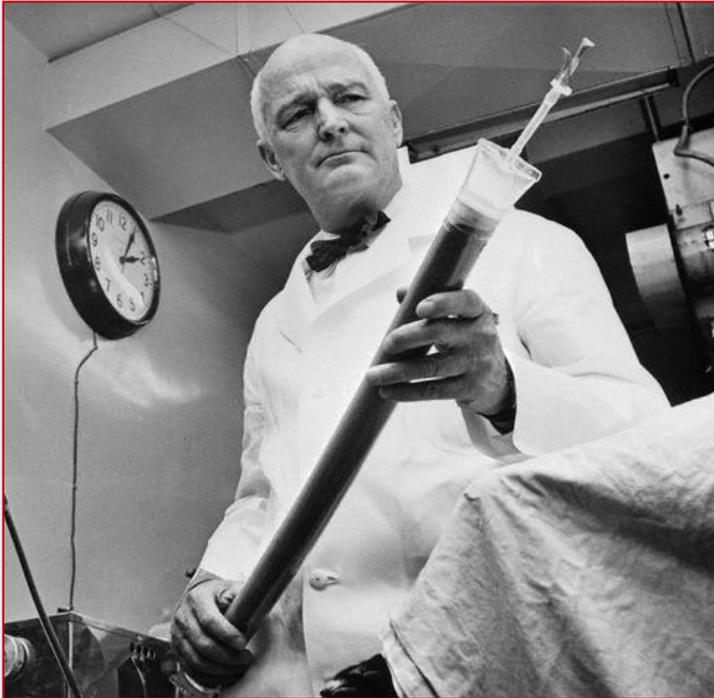
Кристиан Барнард (1922-2001)

- Трансплантация сердца (1967)

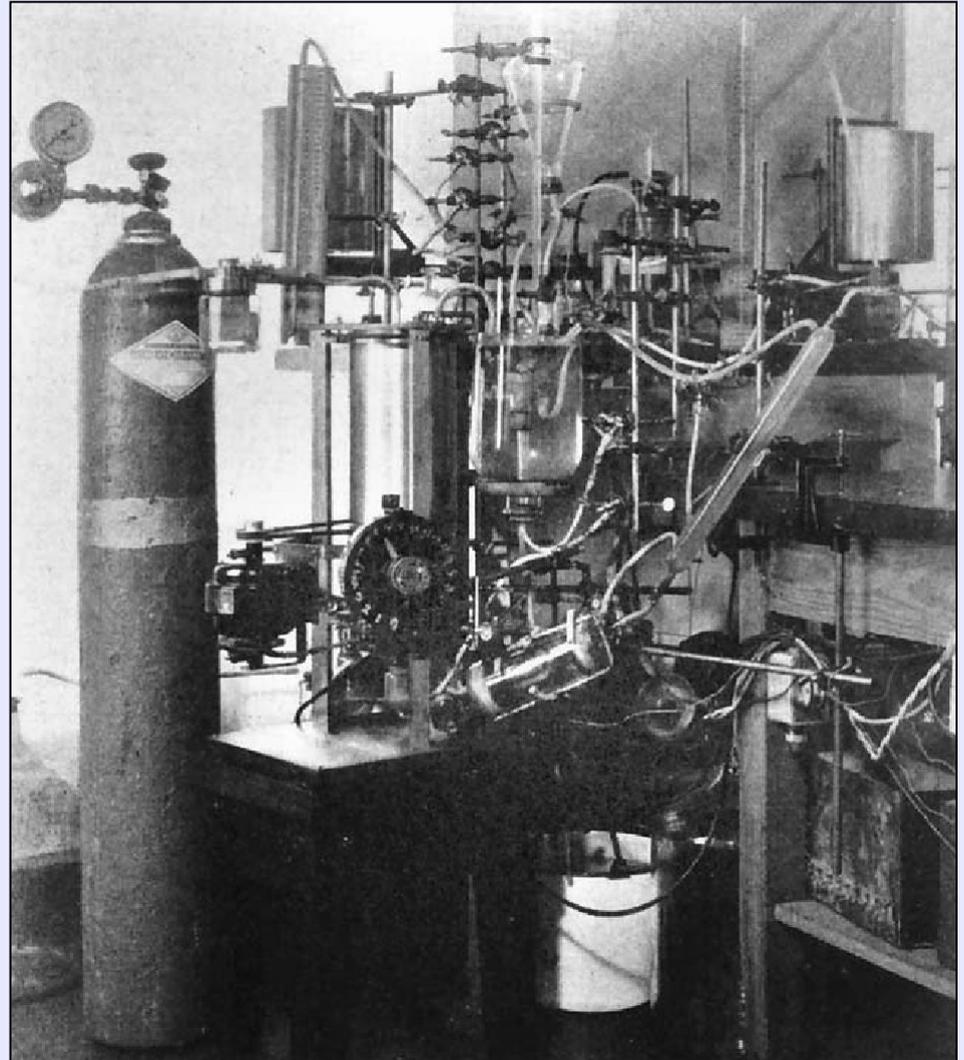


# Достижения медицины, ставшие возможными благодаря экспериментам на животных

- Аппарат искусственного кровообращения (1937)

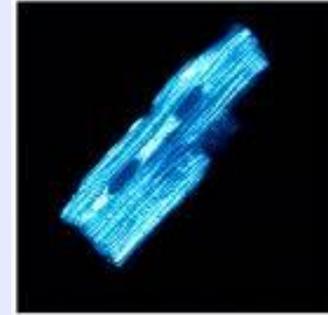


John Gibbon (1903-1973)

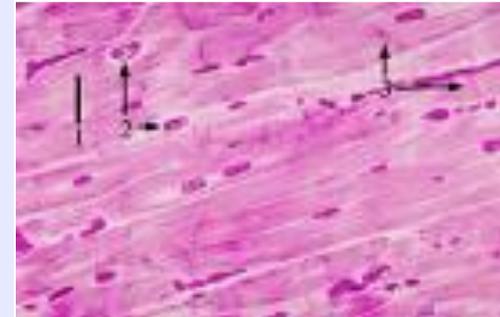


# Важнейшие экспериментальные модели (1)

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)



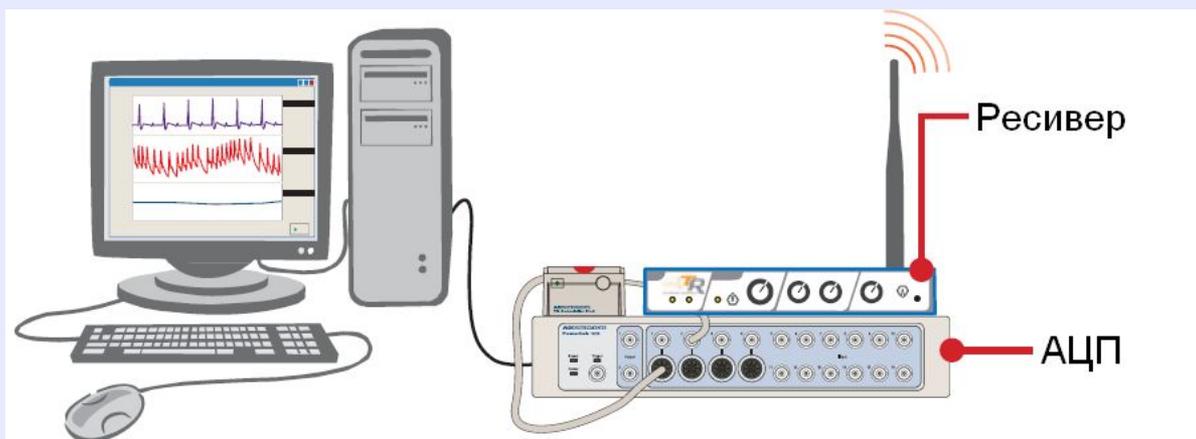
# Важнейшие экспериментальные модели (2)

## 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

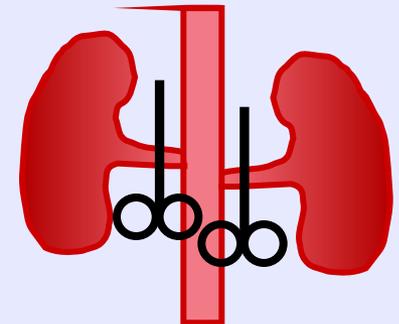
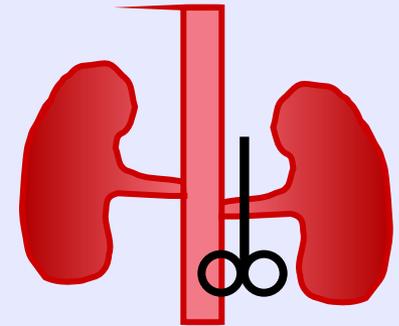
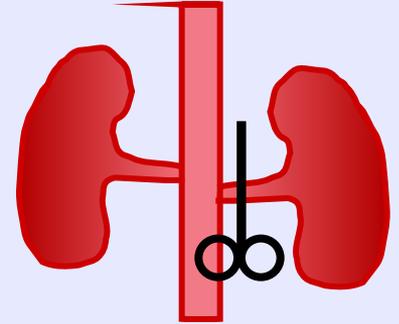


Гарри Гольдблат  
(1891-1977)

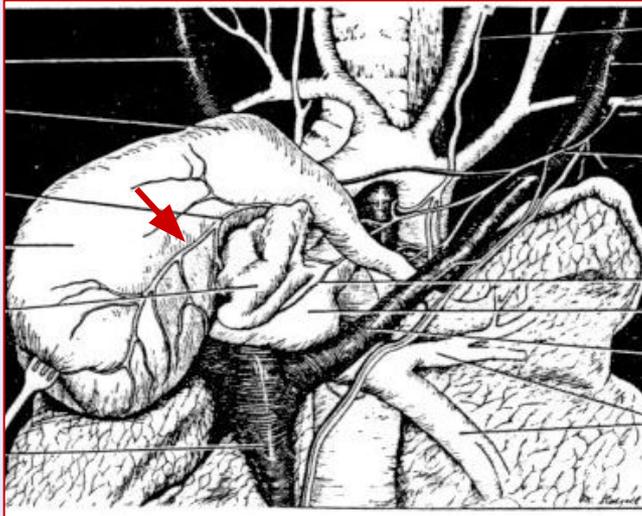
«Две почки, один зажим»: ↑ ренин,  
↑ ангиотензин II →  
↑↑ ОПСС → ↑↑ АД

«Одна почка, один зажим»: нарушение  
экскреции  $\text{Na}^+$  и  $\text{H}_2\text{O}$  →  
↑↑ ОЦК → ↑↑ АД

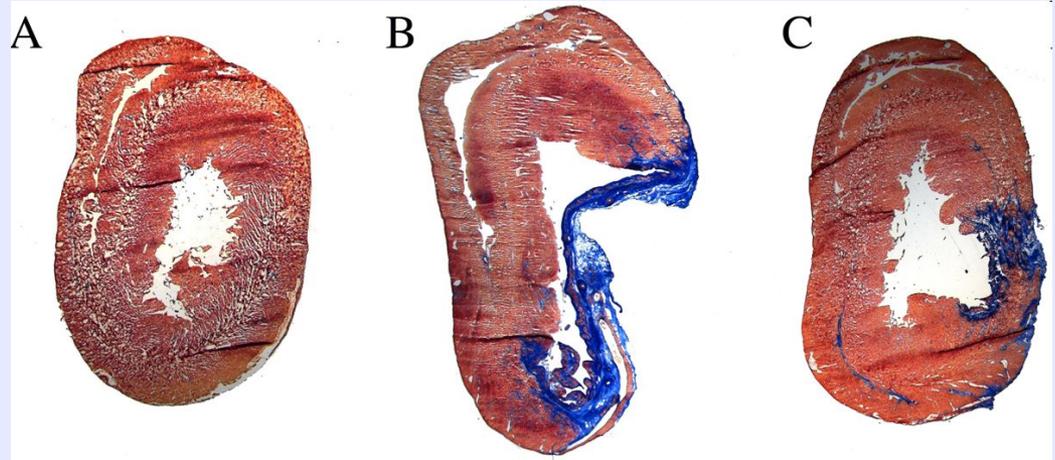
«Две почки, два зажима»: см.  
предыдущий



# Хирургическая модель инфаркта миокарда у крыс



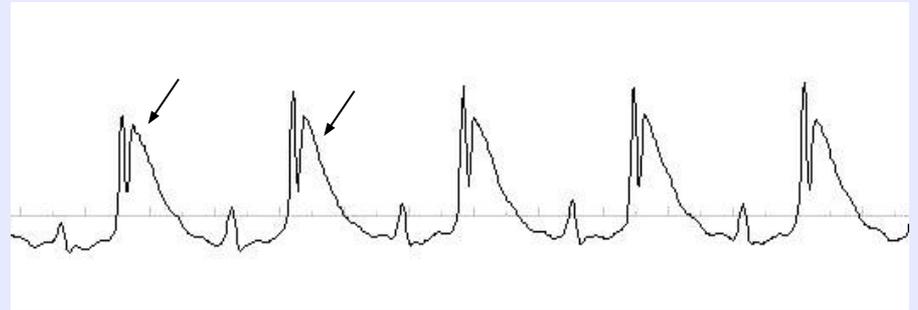
Анатомическое расположение левой коронарной артерии (стрелка – место перевязки)



А  
Нормальное сердце

В  
Протяженный постинфарктный рубец (синий)

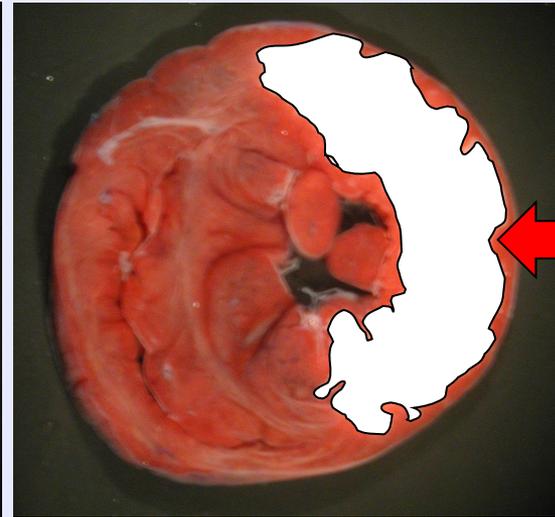
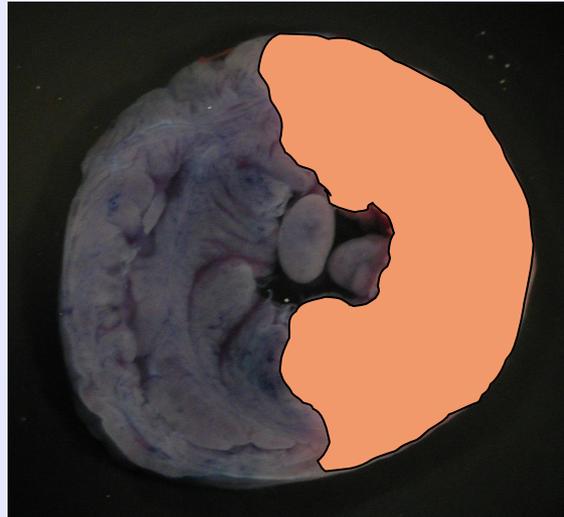
С  
Небольшой постинфарктный рубец (синий)



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

# Оценка размера инфаркта дифференциальным индикаторным методом

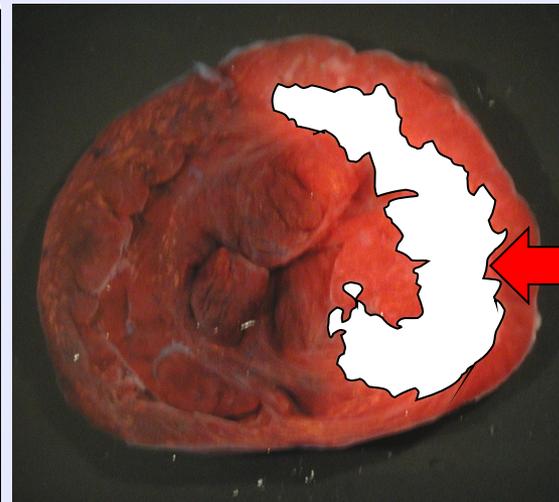
Контроль



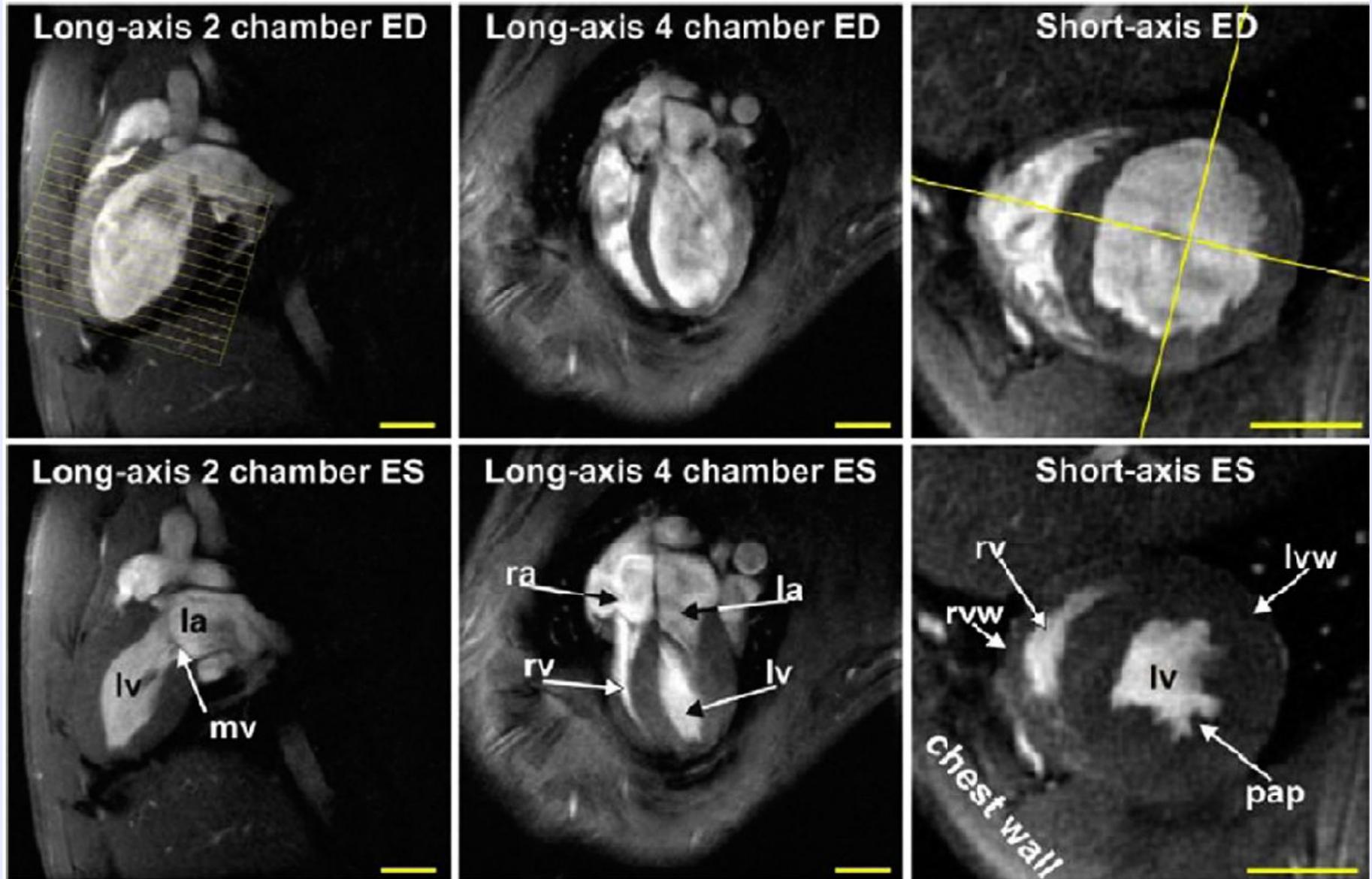
Одинаковый  
объем  
ишемизированного  
миокарда

Пре кондиционирование

Значительно  
меньший размер  
инфаркта

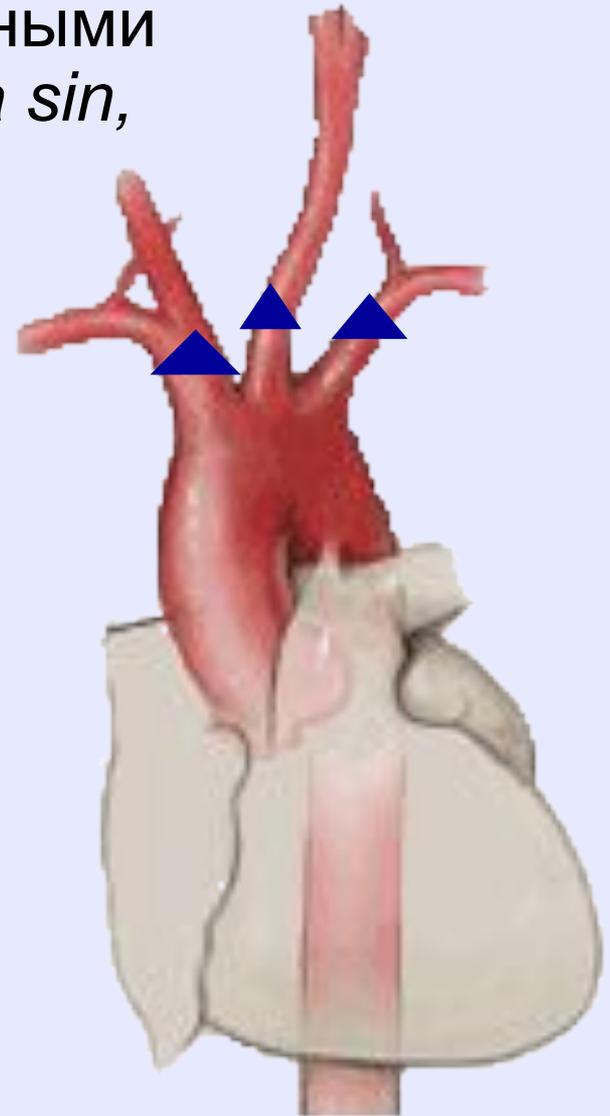
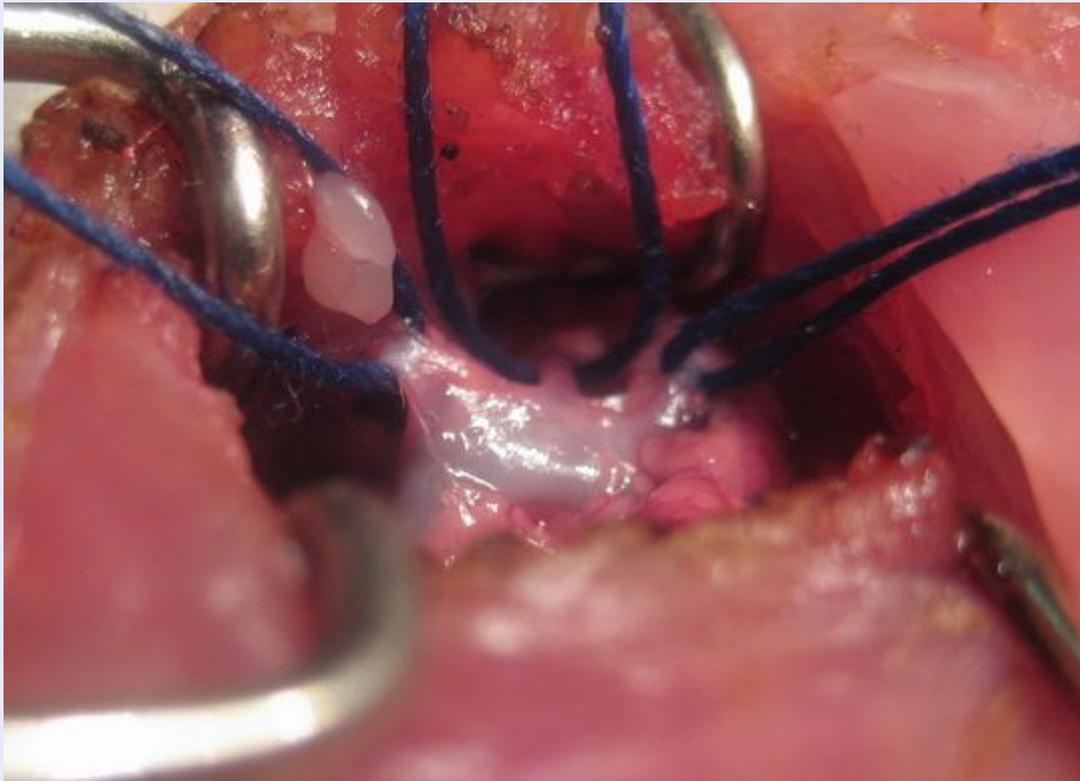


# MPT (9.4 Тл) изображения сердца мыши (шкала = 1 мм)



# Хирургическая модель общей ишемии-реперфузии головного мозга у крыс

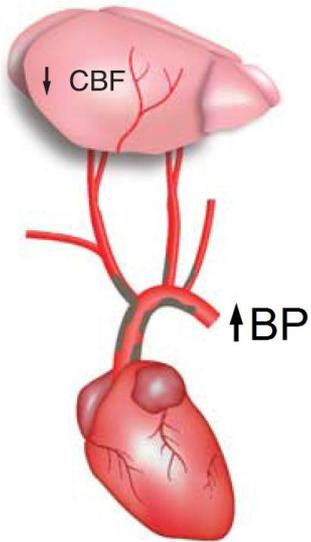
Дуга аорты с лигатурами, подведенными под *tr. brachiocephalicus*, *a. subclavia sin*, *a. carotis communis sin*.



# Экспериментальные модели сосудистой деменции

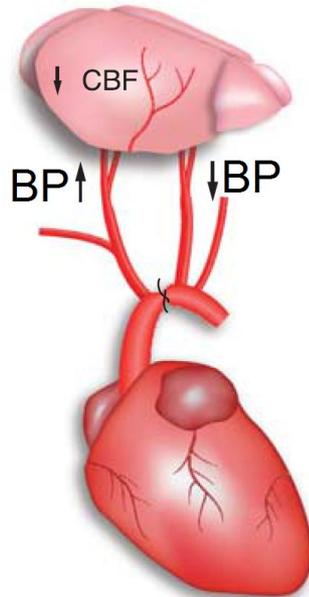
## Атеросклероз

ApoE<sup>-/-</sup>



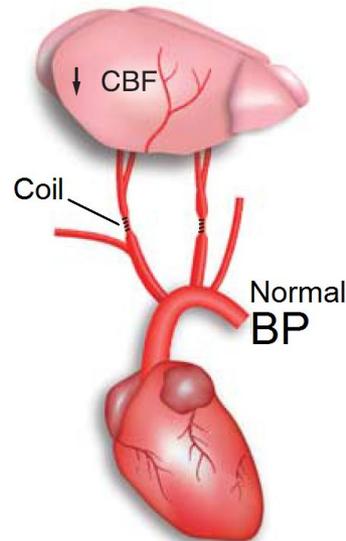
## ХСН

Transverse  
aortic  
constriction



## Гипоперфузия мозга

Bilateral  
carotid  
stenosis



## Атеросклероз:

- ApoE<sup>-/-</sup>
- hApoB Tg
- LDLr<sup>-/-</sup>
- LDLr<sup>-/-</sup> × hApoB

## Сердечная недостаточность:

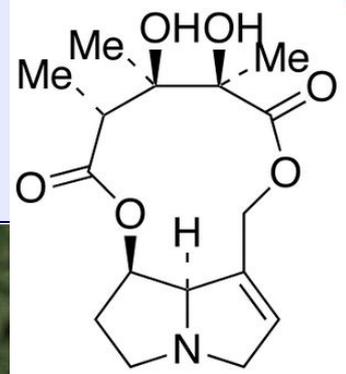
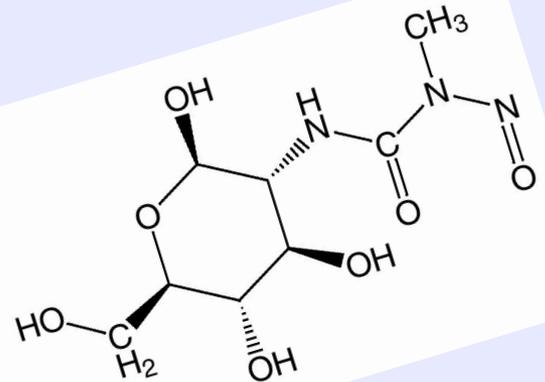
- Констрикция аорты
- Инфаркт миокарда

## 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  $\beta$ -клеток островков Лангерганса  $\rightarrow$  модель **сахарного диабета 1 типа**
- Введение **монокроталина** (алкалоид из *Crotalaria species*)  $\rightarrow$  повреждение эндотелия ветвей легочной артерии с последующей пролиферацией гладкомышечных клеток  $\rightarrow$  модель **легочной гипертензии**

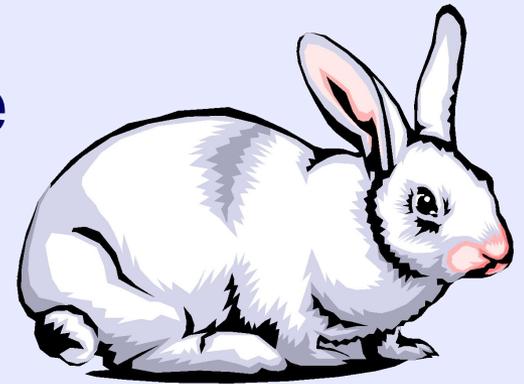


# Основные лабораторные животные

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

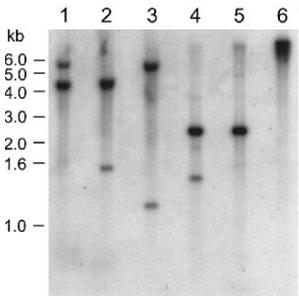
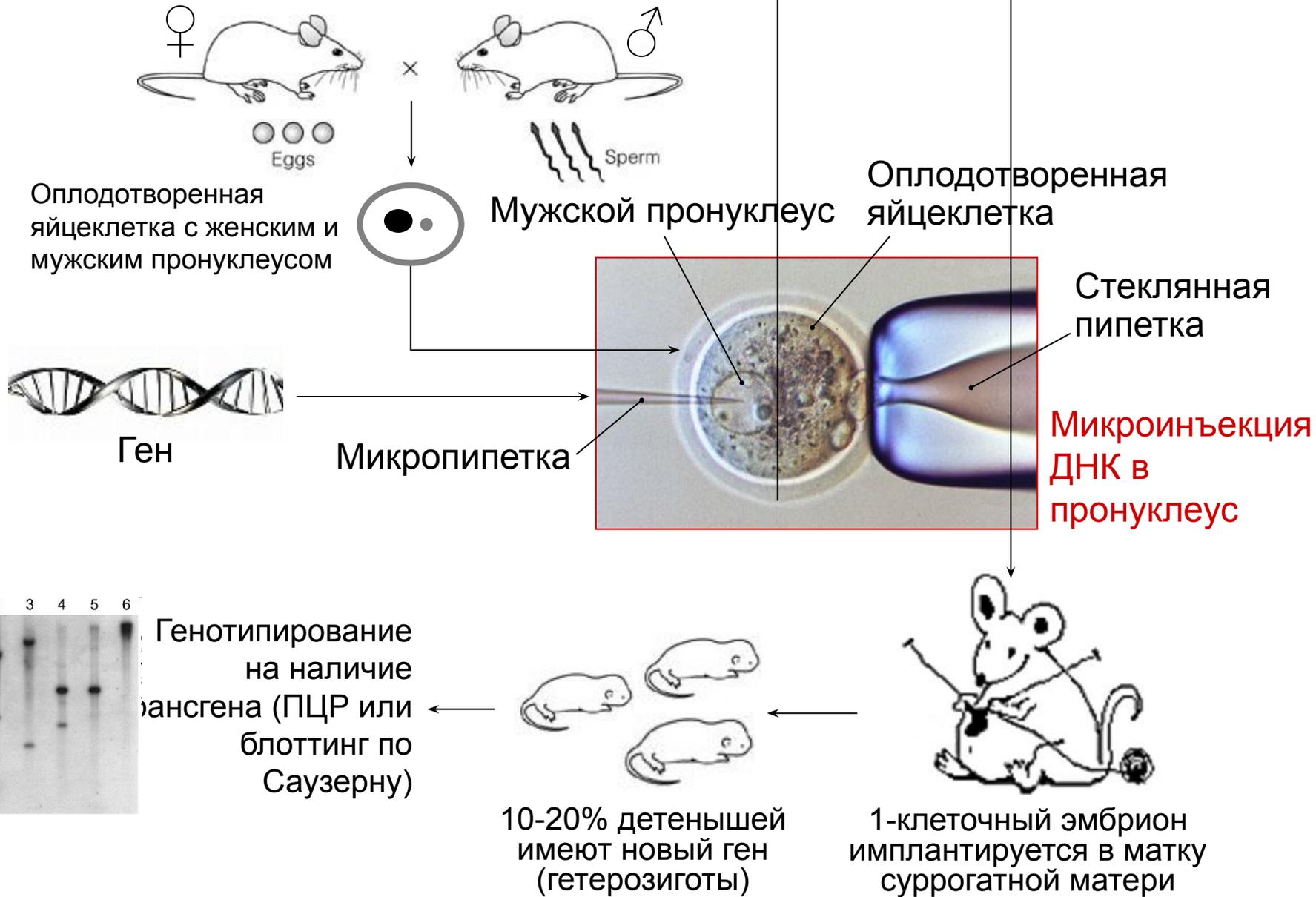


# Какие виды животных наиболее часто используются в экспериментах?

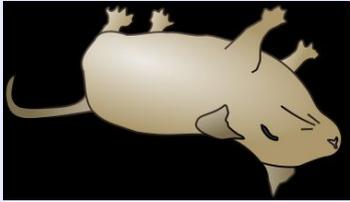


- Наиболее часто используются мыши;
- Вместе с другими грызунами (крысы, хомяки), мыши используются в 90% всех экспериментов;
- 20 миллионов грызунов в год выводятся для исследований;
- Другие животные (собаки, кошки, лягушки и др.) используются только в 10% случаев.

# 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



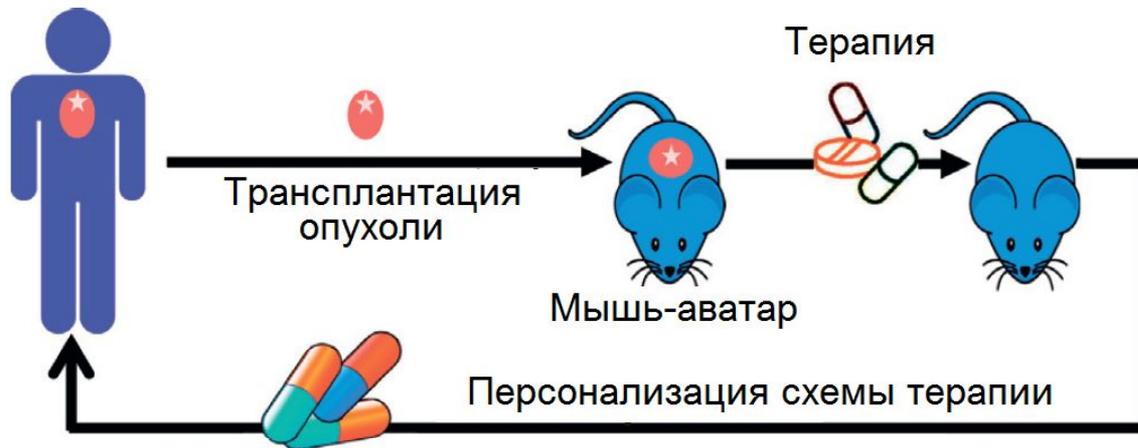
Норма

Ген-мишень  
неважен или  
избыточен

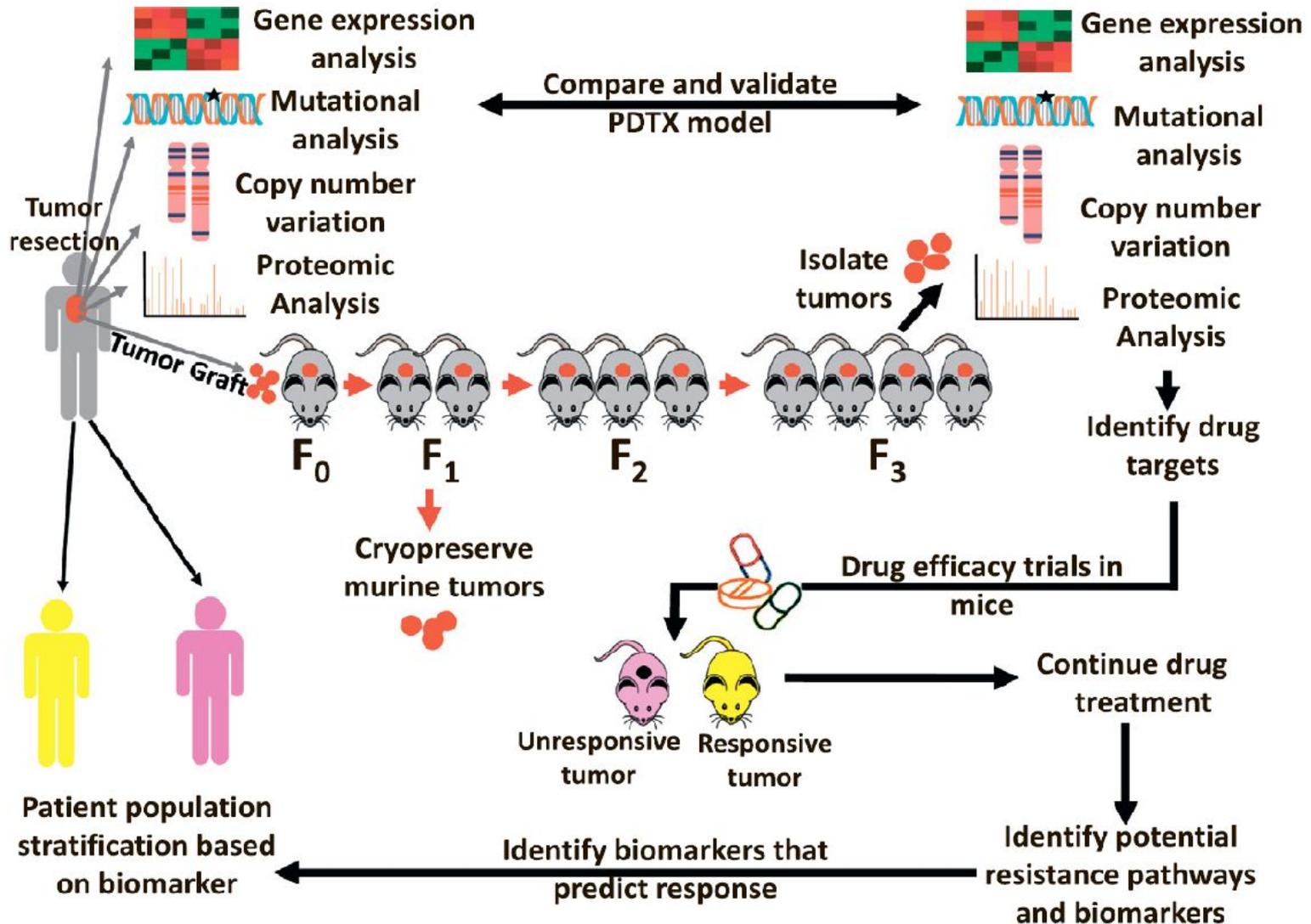


Вначале я обрадовался, что мне удалось создать этих трансгенных мышей!

# Мыши-аватары



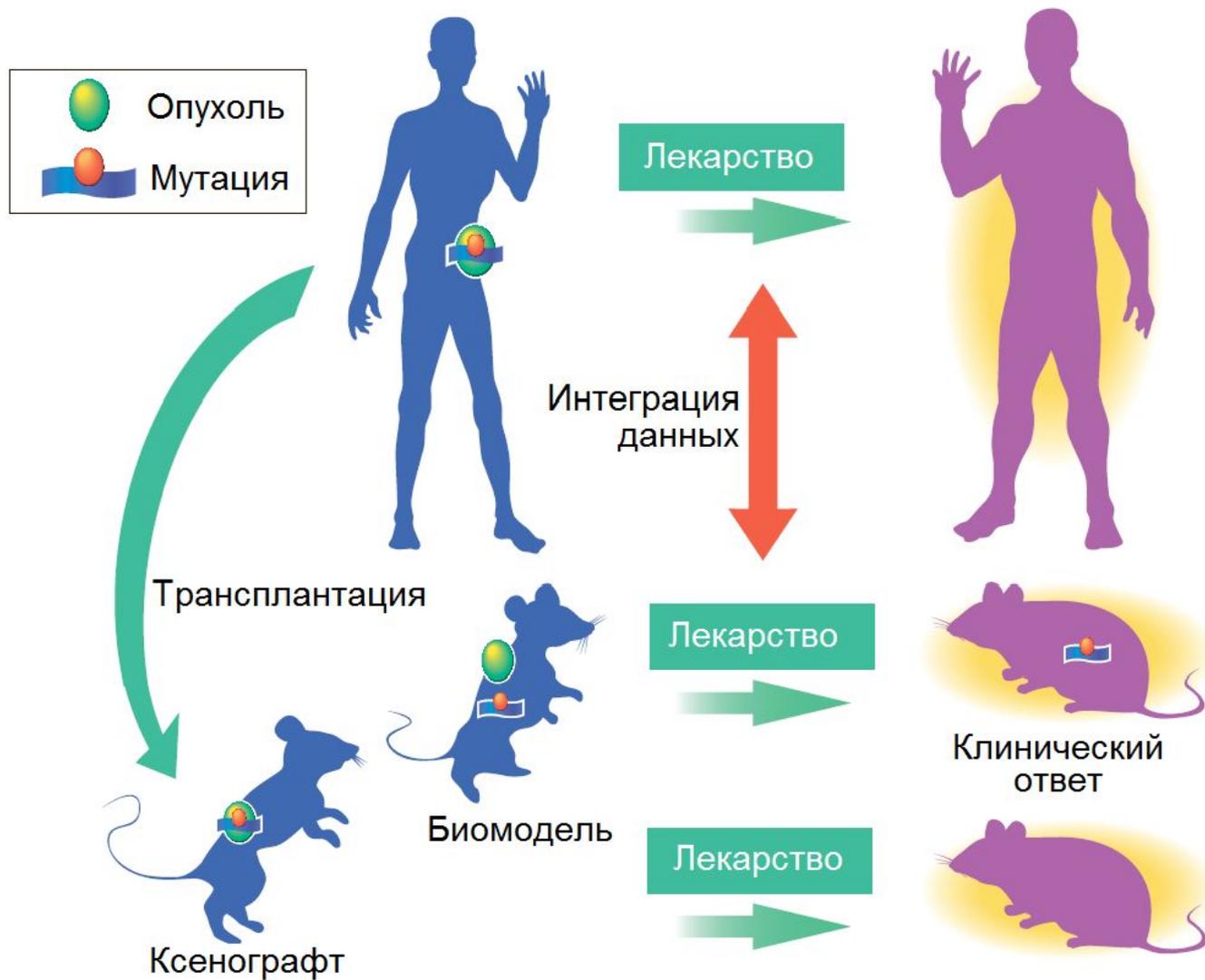
# Мыши-аватары



# 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



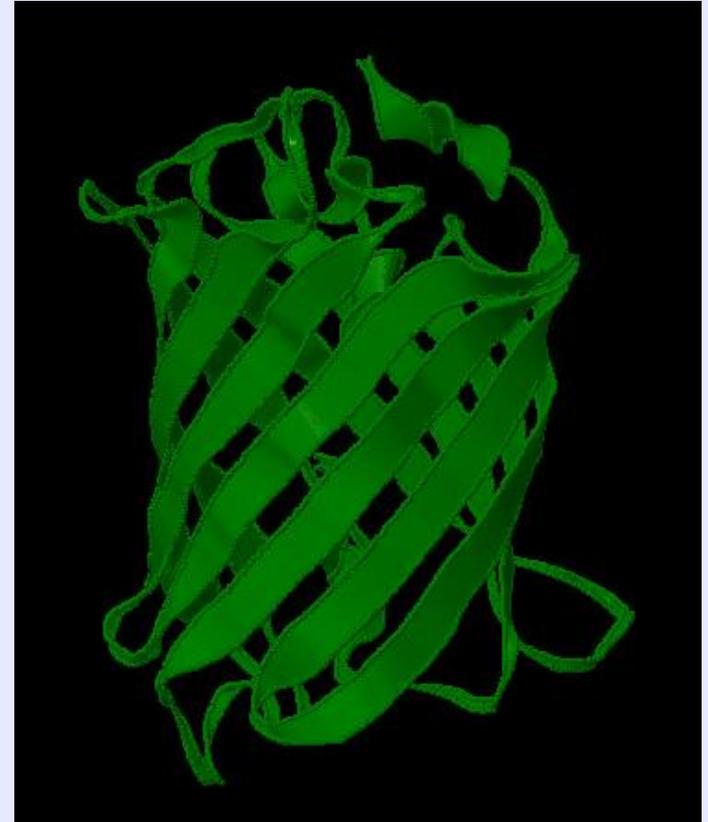
# «Прозрачная» лягушка для неинвазивного наблюдения внутренних органов и сосудов



*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



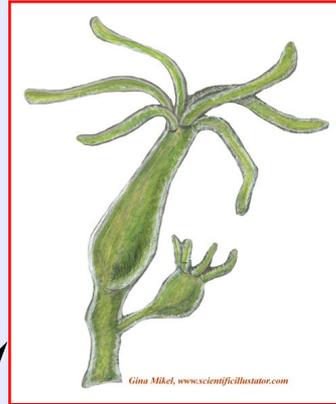
# ZebraLab – программно-аппаратный комплекс для изучения поведенческих реакций у рыб



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



Простейшие



Гидра



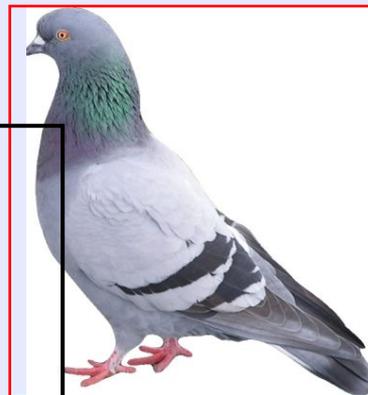
Амфибии



Рептилии



Млекопитающие



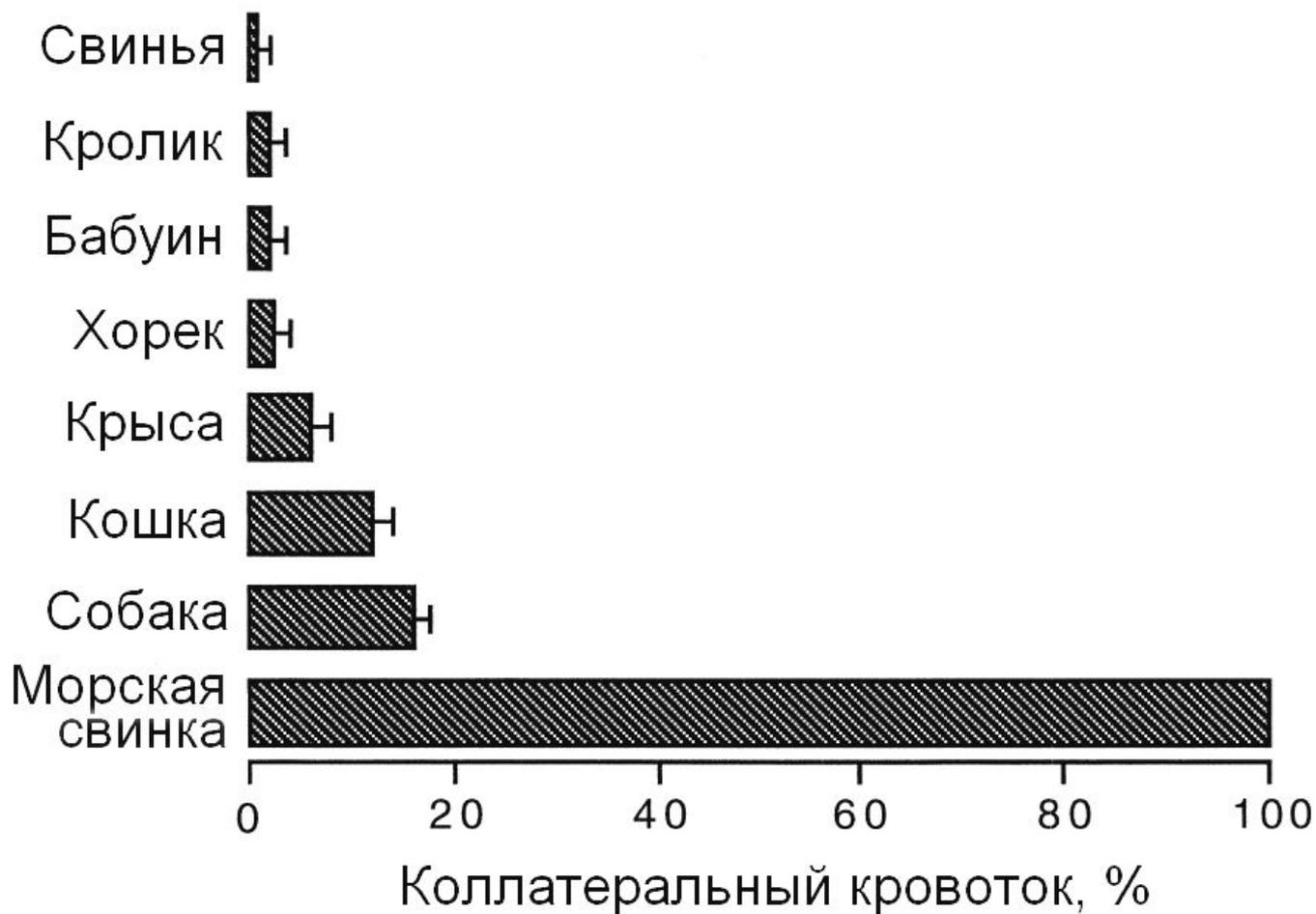
Птицы



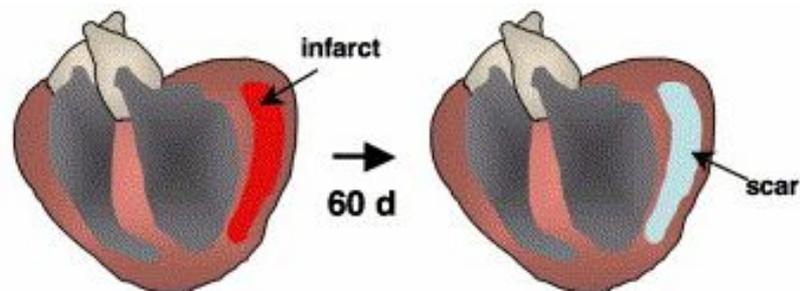
# Условия проведения эксперимента на ЖИВОТНЫХ

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

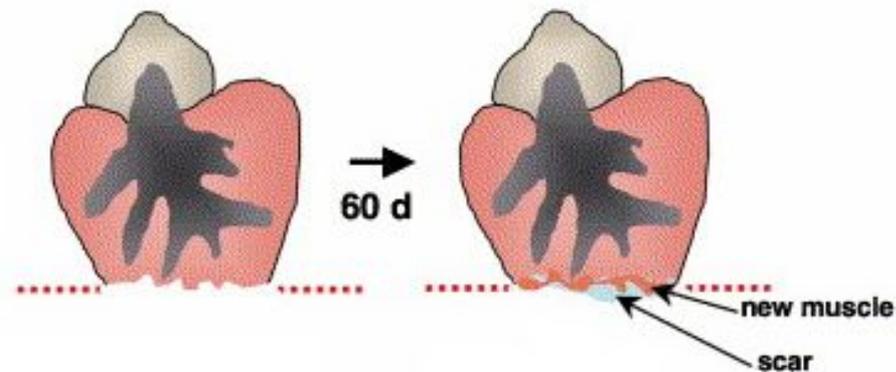
# Вариабельность коронарного коллатерального кровотока у различных представителей млекопитающих



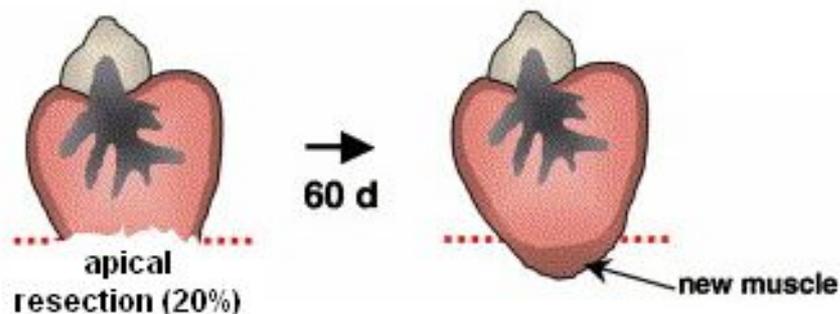
# Регенерация миокарда у разных видов животных



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 м<sup>2</sup>



## 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

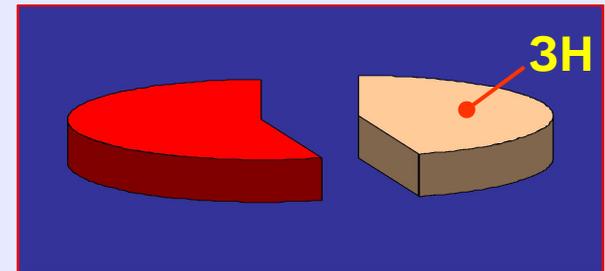
Избыточность количественных данных (наука будущего): анализ огромных массивов цифровых данных (баз данных) обеспечивает понимание ранее неизвестных закономерностей без предварительной формулировки гипотезы

# Феномен прекондиционирования миокарда: история открытия

## Протокол эксперимента Murry и соавт., 1986

Контроль

Коронароокклюзия 40'

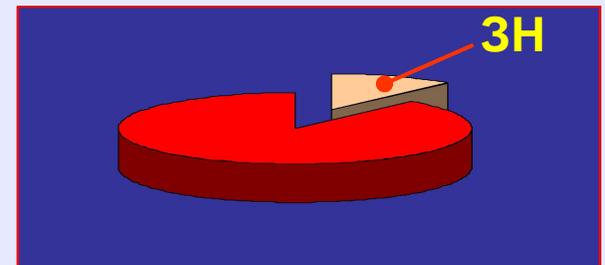


Относительный объем зоны некроза (ЗН) в контроле

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*

Preconditioning работает за счет усиления коллатерального кровотока

*Проверка гипотезы*

Preconditioning существует у животных, лишенных коронарных коллатералей

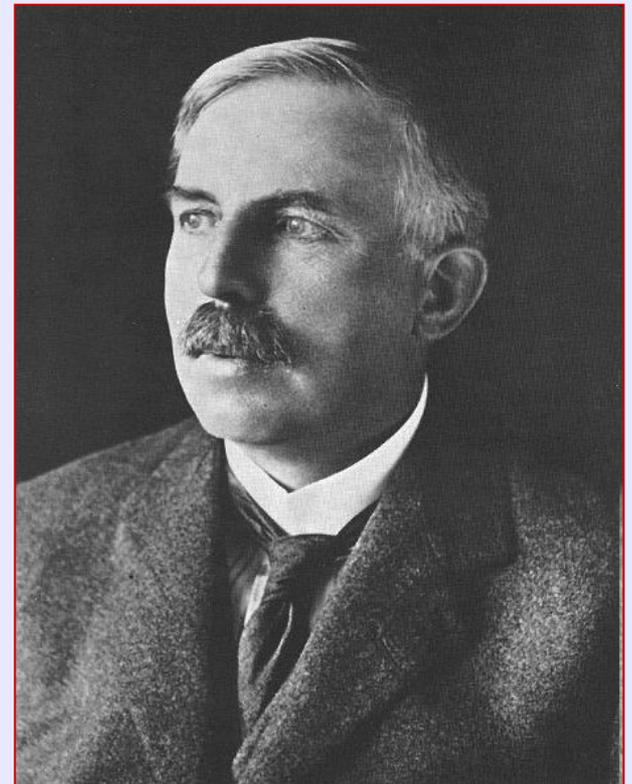
У животных с наличием коллатералей повышения кровотока не происходит

*Гипотеза неверна*

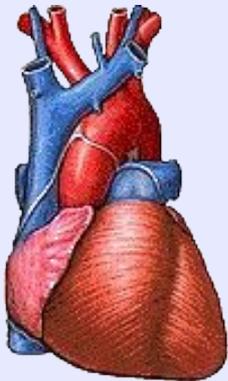
Недостаток современной парадигмы исследований, основанной на формулировке гипотез: *заранее известно, какой результат нужно (не нужно) получить*

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

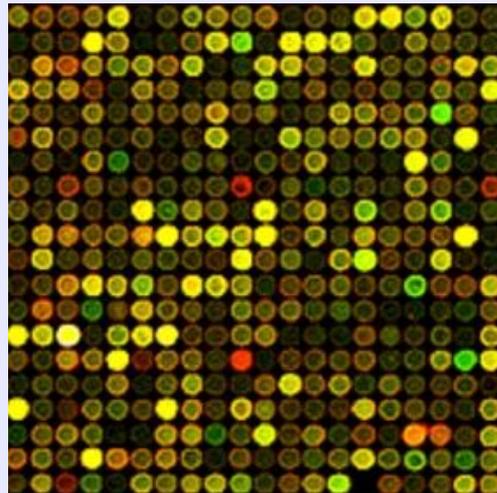
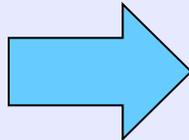
Э. Резерфорд (1871-1937)



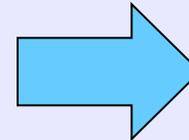
# Пример использования массивов данных для получения новых знаний



**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?

