

Доклинические исследования лекарственных средств на биологических моделях инсульта

А.А. ШМОНИН^{1,2*}, М.Н. МАЛЬЦЕВА¹, Е.В. МЕЛЬНИКОВА¹, Т.Д. ВЛАСОВ^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия; ²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Доклинические исследования — это исследования с использованием экспериментальных моделей инсульта у животных, а также на нейронах, клеточных нейрональных культурах и переживающих срезах мозга, направленные как на тестирование эффективности и оценку механизмов действия лекарственных средств, так и на изучение механизмов ишемического повреждения для поиска новых мишеней в лечении инсульта. В статье приведены данные о базовых принципах организации, планирования моделировании ишемического инсульта на животных. Рассмотрены особенности моделирования ишемии головного мозга на различных моделях и у разных видов животных, современные принципы оценки повреждения головного мозга.

Ключевые слова: ишемический инсульт, ишемия мозга, модель заболевания, доклинические исследования.

Preclinical studies of drugs on animal stroke models

A.A. SHMONIN, M.N. MALTSEVA, E.V. MELNIKOVA, T.D. VLASOV

Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia; Almazov Federal North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia

Preclinical studies are studies using experimental models of stroke in animals as well as on neurons, cell neuronal cultures and surviving brain slices. They directed both towards testing the efficacy and evaluation of the mechanisms of action of drugs, and the study of the mechanisms of ischemic damage to search for new targets for stroke treatment. This article shows the basic principles of the organization and planning of animal models of ischemic stroke. Modeling of cerebral ischemia on the different models and animal species, the modern principles of assessment of brain damage are considered as well.

Keywords: ischemic stroke, cerebral ischemia, model of disease, preclinical research.

В последние годы опубликовано значительное количество статей, посвященных доклиническим и клиническим исследованиям лекарственных средств в ангионеврологии [1–4]. Большая часть исследований была посвящена нейропротекторам, т.е. лекарственным средствам, которые направлены на блокирование основных звеньев ишемического поражения головного мозга или на восстановление его поврежденной ткани [1, 2, 4]. Согласно данным обзоров и метаанализов [1, 2, 5–7], наблюдается разрыв между результатами экспериментальных и клинических исследований. Многие препараты (NXY-059, сульфат магнезии, нимодипин и др.) или нейропротективные вмешательства (прекондиционирование, гипотермия, магнитная стимуляция) показали хороший результат в экспериментальных исследованиях на разных моделях инсульта, но не смогли доказать своей эффективности во II и III фазах клинических испытаний у пациентов в остром периоде инсульта [1–3, 5, 6, 8, 9]. Очевидно, что это связано в том числе с ошибками в планировании и проведении клинических исследований, и имеются возможности для улучшения клинических испыта-

ний. Опубликовано множество статей и книг, проведены дискуссии на тему повышения качества доклинических исследований [8, 10–14].

Имеющаяся модель эмболического инсульта у крыс и мышей [15, 16] позволила разработать эффективную и доказанную технологию тромболитической терапии ишемического инсульта. Тромболитическая терапия уже спасла тысячи жизней пациентов во всем мире и привела к снижению инвалидизации при инсульте. Факты показывают, что экспериментальные исследования нужны и могут быть эффективным инструментом в разработке новых технологий лечения инсульта в современных условиях.

Доклинические исследования — это исследования с использованием экспериментальных моделей инсульта на животных, а также на нейронах, клеточных нейрональных культурах и переживающих срезах мозга, направленные как на тестирование эффективности лекарственных средств, так и на изучение механизмов ишемического повреждения для поиска новых способов для лечения инсульта. Следует обратить внимание исследователей на то, что ни одна экспериментальная модель не способна

полностью воспроизвести инсульт, подобный инсульту у человека. Доклинические исследования на экспериментальных моделях призваны решать лишь отдельные задачи. Результаты этих исследований не могут быть напрямую перенесены в лечебную практику [5]. Однако при планировании любого исследования необходимо рассматривать возможность проведения трансляционных испытаний, когда за успешной доклинической фазой будет проведено клиническое испытание на больных с инсультом [5, 17].

В обзоре авторы не планируют останавливаться на вопросах организации и оснащения экспериментальной лаборатории [18], содержания животных [17] и оценке безопасности, фармакодинамики и фармакокинетики лекарственных средств [19]. Основное внимание уделяется особенностям моделирования инсульта. Исследования в области экспериментальной ангионеврологии включают использование моделей острой фокальной или общей ишемии мозга, хронической ишемии мозга и внутримозгового или субарахноидального кровоизлияний. Обзор сфокусирован на экспериментальной острой ишемии мозга и рассматривает общие вопросы планирования, организации и интерпретации результатов экспериментального исследования. Предполагается, что соблюдение обозначенных позиций позволит повысить качество исследования и будет способствовать внедрению новых нейропротекторов. Однако следует отметить, что в ситуациях пилотных исследований и нестандартных подходов к лечению инсульта от исследователя может потребоваться отойти от обозначенных базовых принципов.

Любой исследователь может найти книги о моделировании ишемии головного мозга у крыс [8, 11, 14, 20], рекомендации STAIR [17, 21] и открытые опубликованные дискуссии [5]. Представленный обзор объединяет обозначенные в вышеупомянутых статьях и книгах материалы для русскоговорящих исследователей, а также собственный опыт авторов [10, 21–24].

Планирование исследования, выбор животного и статистическая обработка

Первым шагом в моделировании экспериментального инсульта является выбор вида животного. Традиционно в исследованиях используются следующие виды: крыса, мышь, песчанка, кошка, свинья, собака, шимпанзе и макака-резус [25]. Многие исследователи отмечают, что при создании новых лекарственных препаратов следует проводить доклинические исследования минимум на двух, а лучше трех видах животных [5, 26]. Предпочтительнее выбирать не только грызунов, но также собак и других крупных млекопитающих.

Для доклинических тестирований лекарственных средств предпочтительнее использовать модели *in vivo*, чем модели на культуре нейронов или на пе-

реживающих срезах. Работы на культуре нейронов или на переживающих срезах следует использовать для изучения отдельных механизмов патогенеза ишемии, а не для оценки эффективности воздействия.

Вторым этапом после выбора вида животного является планирование эксперимента. Проект экспериментального исследования должен быть создан до начала исследования и утвержден на заседании локального этического комитета (ЛЭК). В проекте следует подробно указать характер и особенность модели инсульта, анестезию в ходе основного этапа исследования, продленное послеоперационное обезболивание и способ разрешенной эвтаназии животных после завершения обследования. Также заранее требуется описать статистические методы, которые используются на всех этапах исследования [11]. При малой выборке нецелесообразно использовать методы параметрической статистики (в том числе критерий Стьюдента, среднее арифметическое и стандартное отклонение как в расчетах, так и в графиках), даже при доказательстве правильности распределения. В случае получения негативного результата считается неправомерным менять описанный в проекте статистический метод для подгонки результатов. Документы об утверждении проекта должны храниться в ЛЭК и в исследовательском центре.

Для экспериментов необходимо использовать здоровых линейных животных. Требуется предоперационное тестирование животных по общему соматическому здоровью, на наличие неврологического дефицита и особенностей поведения. При использовании неврологических и иных шкал рекомендуется предоперационное тестирование. Использование стандартных и общепринятых шкал позволит в будущем использовать материал опубликованных результатов для метаанализа.

Многие тесты для правильного использования требуют учета доминантности полушарий, следовательно при проведении поведенческих тестов предпочтительнее оценить доминантность полушарий (право/леволапость) у каждого животного.

Приветствуется проведение предварительных (пилотных) исследований на небольшой группе животных для последующего более эффективного планирования экспериментов. Однако следует отметить, что нельзя ограничиваться небольшими исследованиями, так как они не могут составлять основную часть работы и используются для обоснования дизайна крупного исследования.

При работе с крысами и мышами опыт и содержание животных следует планировать таким образом, чтобы исключить все возможные варианты незапланированного стресса для экспериментальных животных. Есть ряд видовых особенностей, которые могут predispose к развитию стресса у грызу-

нов. Для профилактики стресса у крыс и мышей во время эксперимента следует учитывать следующее: 1) нельзя брать крысу за холку и конец хвоста, необходимо брать животное за хвост ближе к середине его длины; 2) клетки с крысами и мышами должны быть достаточно высокими; 3) в клетку следует помещать не более 5 здоровых животных, не рекомендуется селить в клетку по одному животному; после операции — не более чем по 3 крысы в клетке; 4) видеокамера и приборы включаются заранее до опыта, чтобы животные привыкли к их звуку; 5) необходимо выключить мобильные телефоны во время работы с животным; 6) у крыс должен быть свободный доступ к воде и питанию; 7) световой режим должен составлять 8—10/14 ч свет/темнота для крыс и мышей [27]; 8) подстилка после операции должна быть та же, что и до нее (иметь запах этого животного); 9) не рекомендуется шуршать бумагой; 10) требуется исключить вызывающий панику у норных животных звук ссыпания (например, корм и опилки); 11) отличие по массе тела у крыс одной группы не должно быть более 10—20 г; 12) после транспортировки отводится не менее 2, но не более 7 дней для карантина; 13) животным следует в течение эксперимента давать корм одного типа и производителя; нельзя менять питание в течение исследования.

Модели инсульта

Наиболее ответственным и принципиальным этапом исследования является выбор экспериментальной модели инсульта. В настоящей работе предложены следующие требования клинициста к эксперименту, т.е. звенья патогенеза и восстановления после повреждения, которые необходимо смоделировать для тестирования лекарственных средств, новых технологий и реабилитации. К ним относятся: 1) окклюзия сосуда (собственно ишемия), которая позволяет смоделировать почти все современные модели инсульта; 2) нарушение в системе гемостаза (синдром гиперкоагуляции), которое не позволяет сделать ни одна современная модель; использование модели с бенгальским розовым и облучением лазером [28] приближает к поставленной задаче, но механизм гиперкоагуляции отличается от такового при инсульте; 3) сопутствующие инсульту состояния и заболевания, оказывающие влияние на работу головного мозга (сахарный диабет, артериальная гипертензия, ожирение, гиперлипидемия); 4) отек головного мозга; 5) ремоделирование нервной ткани и дегенеративные постинсультные изменения (деменция, депрессия, аффективные расстройства и эпилепсия); общепринятых моделей этих постинсультных состояний у животных на данный момент не существует; 6) неврологические (функциональные) нарушения (дефицит), возникшие вследствие инсульта (спастичность, нарушение афферентации, речи, парез, потеря навыков пере-

движения и др.), требуют от исследователя-экспериментатора осмысления и создания новых методов наблюдения за животными, основанными на видовых особенностях; 7) последствия инсульта для всего организма (синдром иммунодефицита, гиподинамия, нарушение питания, гиперкатаболизм, трофические нарушения и др.); имеются данные о развитии данных синдромов в эксперименте [11]; 8) сосудистые события и их развитие в условиях различного физиологического состояния (сон и бодрствование).

Учитывая негативный опыт расхождения результатов экспериментальных и клинических исследований нейропротекторов и вышеобозначенные позиции, необходимо создавать новые модели инсульта, пригодные для тестирования эффективности нейропротекторов и реабилитационных мероприятий. При разработке моделей ишемии головного мозга необходимо понимать различия между состояниями гипоксии и ишемии, между неполной и полной ишемией, принимать во внимание то, что тяжесть и обратимость ишемических и реперфузионных повреждений зависят не от условий развития ишемии (*in vivo* или *in vitro*, в эксперименте или в клинике), а от глубины нарушения кровообращения и сохранения оттока метаболитов из органа. Внимание исследователя должно быть привлечено к различиям многочисленных моделей ишемии, большинство из которых обеспечивает создание лишь неполной (глобальной или регионарной) ишемии, тяжесть которой широко варьирует в зависимости от вида животного, индивидуального развития коллатералей, срока, прошедшего со времени создания ишемии [23, 24, 29]. Большую однородность повреждения и меньшую зависимость от вида животных и степени развития коллатералей обеспечивают модели полной ишемии, которые вследствие четкой зависимости от времени и условий протекания ишемии легче дозировать. Данные об ишемических и реперфузионных изменениях должны оцениваться с обязательным учетом модели ишемии.

По характеру нарушения мозгового кровотока все модели ишемии мозга можно разделить на два типа: методы глобальной ишемии мозга, когда происходит нарушение кровообращения во всем мозге без формирования очага, и методы фокальной ишемии мозга, при которой нарушается кровообращение в определенном участке мозга, ограниченном здоровой тканью [14, 30, 31]. Обычно при фокальной ишемии формируется очаг, также можно выделить характерную зональность (пенумбра и ядро ишемии). Следует отметить, что все модели ишемии мозга можно разделить на полную и неполную ишемию. В зоне полной ишемии кровотока не наблюдается, при неполной ишемии кровотока сохраняется. Полнота окклюзии определяет степень вовлеченности коллатерального кровообращения [23, 24, 29, 32].

Методы фокальной ишемии мозга являются наиболее подходящими для тестирования новых лекарственных препаратов, поскольку позволяют получить значимый неврологический дефицит и четкое морфологическое повреждение [2]. Предпочтительнее выбирать общепринятые модели инсульта и сходный дизайн исследования, поскольку это позволит в будущем использовать результаты исследования для метаанализа.

Наиболее используемыми моделями фокальной ишемии головного мозга в каротидном бассейне являются: 1) филаментная окклюзия средней мозговой артерии (СМА) по Коидзуми [8, 11, 21, 22, 24, 33, 34] — самая малоинвазивная модель ишемии, которая не требует трепанации черепа [35, 36]; 2) фототромбоз СМА, для повышения свертываемости крови вводится фотосенсибилизатор бенгальский розовый [11, 21, 28]; 3) эмболизация СМА [11, 15, 16, 21]; 4) манипуляции со СМА требуют выполнения трепанации черепа в проекции артерии [11, 21, 23] — перевязка СМА (перманентная фокальная ишемия) [20, 37], транзитная окклюзия СМА на 30—40 мин [37, 38], аппликация эндотелина-1 в проекции СМА (вазоспастическая модель ишемии мозга) [39], перевязка СМА и обеих сонных артерий (перманентная фокальная ишемия) [20], перевязка СМА с одновременным снижением артериального давления (АД) за счет депонирования крови в шприц (модель транзитной ишемии) [20, 40, 41], окклюзия СМА и гомолатеральной общей сонной артерии (перманентная фокальная ишемия) [20], перевязка СМА и обеих сонных на 40 мин (стандартно на 30, 40, 60 мин — транзитная фокальная ишемия) [42].

В настоящем исследовании модели, связанной с манипуляциями на сонных и СМА у крысы, продемонстрировали, что наиболее воспроизводимым методом является перевязка СМА и одновременная окклюзия обеих общих сонных артерий на 40 мин, позволяющие получить значимый однородный неврологический дефицит и размер инфаркта [23, 29]. Модели, связанные с изолированной перевязкой СМА или совместной перевязкой СМА и гомолатеральной СМА, не позволяют получить значимый неврологический дефицит и большой размер инфаркта [23, 32].

Модели ишемии в вертебрально-базилярной системе менее распространены из-за несовершенства методологии и трудности воспроизведения, поэтому они используются крайне редко.

Методы глобальной ишемии мозга [26, 28] используются для разработки интраоперационных нейропротекторов, поскольку этот патогенетический вариант ишемии чаще встречается как проявление периоперационного инсульта или послеоперационных когнитивных нарушений. В отечественной литературе представлены следующие наиболее используемые и интересные модели общей ишемии

мозга [43]: 1) четырехсосудистая модель — перевязка позвоночных и сонных артерий [44, 45]; 2) окклюзия обеих сонных артерий у животных с незамкнутым виллизиевым кругом, например у монгольской песчанки [46]; 3) окклюзия обеих общих сонных артерий у крыс [20, 46] в сочетании с управляемой гипотензией [20, 40, 47]; 4) декапитация [46]; 5) остановка сердца животного [46, 48]. Модель общей ишемии не может быть рассмотрена как основной метод для тестирования нейропротекторов и предназначена для решения отдельных экспериментальных задач, связанных с разработкой интраоперационной защиты от ишемии мозга [43].

Распространенной моделью экспериментально-го ишемического инсульта для тестирования нейропротекторов является филаментная окклюзия СМА у крыс или мышей, выполненная по методу Коидзуми [33]. Использование этой модели для изучения нейропротективных вмешательств считается оптимальным. При разной продолжительности окклюзии можно получить повреждения разных зон головного мозга. Так, при использовании 30-минутной окклюзии СМА можно смоделировать преимущественное повреждение области стриатума [35, 36]. При более длительной ишемии повреждение распространяется на все области, включая кору головного мозга [10, 24, 35, 36].

Распространенной моделью экспериментально-го эмболического ишемического инсульта для тестирования тромболитиков и нейропротекторов является эмболическая окклюзия СМА у крыс или мышей. Применение этой модели позволит использовать полученные данные для дальнейшего метаанализа или систематического обзора [11, 15, 16, 21, 49].

Для крыс и мышей рекомендуется применять следующие виды анестезии: золетил и флюраны. Также могут быть использованы: хлоралгидрат, тиопентал или нембутал. Неприемлемыми для крыс и мышей являются ромитар, хлорэтил, для мышей — кетамин.

Современные представления о патогенезе ишемического инсульта свидетельствуют, что размер инфаркта мозга зависит не только от продолжительности ишемии, но также от дополнительных факторов [11, 17]. Так, к факторам, способствующим увеличению размеров повреждения головного мозга, относятся лихорадка, снижение АД, дыхательная гипоксия, хроническая инфекция, активность животного, физическая нагрузка, стресс и др. Факторы, уменьшающие повреждение мозга: снижение температуры тела (часто бывает во время операции из-за релаксации и наркоза), использование антибиотиков в кормах (они могут обладать нейропротективными эффектами), инфекционные заболевания животных (феномен инфекционного прекодиционирования). Поэтому при моделировании ин-

сульта в эксперименте необходимо контролировать газы крови (spO_2 , CO_2 , H^+), уровень АД, степень анестезии и миорелаксации, характер дыхания, температуру тела. Зарегистрированные в ходе эксперимента данные должны быть отражены в публикации. Для их результативного использования целесообразно ввести критерии невключения и критерии исключения, где необходимо указать конкретные данные витальных показателей, при которых животное не включается в исследование или выбывает из него.

Для исследования эффективности препаратов целесообразно использовать не только здоровых животных, но и животных с хроническими заболеваниями (сахарный диабет, артериальная гипертензия, дислипидемия, ожирение и др.) [21, 46]. Тестирование должно проводиться как на самцах, так и на самках.

Следует планировать наименьшее количество животных в группе, необходимое для получения достоверного результата, избегая неоправданного использования животных. У каждого животного, по возможности, необходимо выбирать как можно больше показателей, избегая дополнительных групп для контроля отдельных параметров [18].

Для объективизации результатов исследования рекомендуется использовать плацебо-контроль. В качестве плацебо должен быть применен либо инактивированный белок (если исследуемый препарат белкового происхождения), либо растворитель [5, 11, 17, 21].

Для объективизации результатов следует ввести маскирование групп (для ослепления исследователей) и рандомизацию. Возможно двойное ослепление — оператор не знает, что вводит животному, а статистик не знает, какие группы анализирует [5, 17]. Для рандомизации могут быть использованы метод конвертов или специальные программы.

Важной особенностью доклинических испытаний лекарств для лечения инсульта является способность лекарственного средства проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Этот аспект фармакодинамики следует рассматривать неразрывно с эффективностью и механизмом действия препарата. Возможны три варианта: препарат не проникает через ГЭБ; препарат проникает через ГЭБ; препарат проникает через ГЭБ при наличии ишемического или гипоксического повреждения (здесь следует говорить о терапевтическом окне для препарата, связанного с открытием ГЭБ) [8, 11, 21]. Ряд лекарственных средств имеет пассивную способность для проникновения через ГЭБ, и обычно это молекулы небольшого размера, другие обладают специальными транспортными системами для проникновения через ГЭБ (например, эритропоэтин) [50, 51]. Во всех исследованиях на моделях инсульта у животных должна быть учтена проницаемость препарата через ГЭБ.

Активно обсуждается вопрос терапевтического окна для тромболитической терапии и нейропротекции [5]. Следует отметить, что временные рамки терапевтического окна могут отличаться у человека и животного, поскольку многие физиологические процессы протекают с разной скоростью. Терапевтическое окно для нейропротекторов с разными механизмами действия может отличаться, поскольку зависит от активности физиологических процессов на различных этапах ишемического или вторичного постишемического повреждения. Кроме того, сопутствующие состояния и заболевания могут также влиять на временные рамки терапевтического окна. Известно, что терапевтическое окно для тромболитической терапии церебрального инсульта у человека зависит от бассейна поврежденной артерии. Так, рассматривается точка зрения, что терапевтическое окно для тромболитической в вертебрально-базиллярной системе может быть значительно больше, чем 4,5 ч.

В рекомендациях STAIR [17] приводится список важных вопросов, которые следует учитывать при планировании исследования на моделях инсульта: 1) при исследовании фармакологических средств следует использовать адекватную дозу препарата; 2) следует приводить доказательства того, что препарат достигает мишени, т.е. попадает в зону ишемии; 3) рекомендуется соблюдать терапевтическое окно; 4) эффективность должна быть исследована прежде на молодых здоровых животных-самцах с использованием перманентной ишемии, а затем на пожилых; 5) вначале исследования проводятся в отношении ствола и белого вещества, далее в отношении серого вещества головного мозга; 6) проявившие эффективность препараты проверяют дополнительно в сериях с самками, пожилыми животными, животными с коморбидными состояниями (гипертензия, диабет, гиперхолестеринемия); 7) целесообразно проводить диффузионную и перфузионную магнитно-резонансную томографию и исследование сывороточных маркеров повреждения для оценки эффективности препаратов [52]; 8) проверка взаимодействия с наиболее часто используемыми препаратами базовой терапии может снизить риск нежелательных явлений при комбинированной терапии, которая часто бывает в реальной клинической практике и др.

Методы оценки повреждения мозга

Оценка повреждения мозга является основой в современной экспериментальной неврологии. От методов оценки зависит интерпретация результатов исследования. Так, в дискуссии, опубликованной в статье J. Vagon и соавт. [5], указано, что в настоящий момент в большинстве экспериментов используются биологические конечные точки — размер инфаркта мозга и концентрация биомаркеров в крови. В клинических исследованиях используются оценка

функциональных исходов и неврологические шкалы, но почти не учитываются размер инфаркта и лабораторные биомаркеры. Экспериментальных аналогов данным функциональным исходам и тестам пока не разработано. Одной из современных задач является создание новой шкалы для оценки функциональных нарушений с учетом видовых особенностей морфологии, физиологии, поведения, зоопсихологии и этологии. Такая шкала должна решать те же задачи, которые ставятся для неврологических и реабилитационных шкал у человека, но с учетом видовых особенностей выбранного животного.

Для оценки валидности наиболее используемых неврологических шкал предпринималась попытка тестировать их на модели 30-минутной ишемии головного мозга у крыс [53]. Были выбраны следующие тесты: тест хождения по балке, тест установки позы, угловой тест, вытягивание лапы, шкала mNSS, Бедерсон-тест и шкала Гарсия на 2, 7, 14, 21 и 28-й дни постишемического периода. Были получены результаты, согласно которым все выбранные тесты позволяли выявить и количественно оценить неврологический дефицит у крыс. Наиболее чувствительными и репрезентативными оказались шкала Гарсия, тест с вытягиванием лапы и Бедерсон-тест. Именно эти тесты можно рекомендовать для оценки в эксперименте.

При фокальной транзиторной 30-минутной ишемии головного мозга крысы развиваются поведенческие нарушения и очаговый неврологический дефицит в виде двигательных, чувствительных и координаторных нарушений, которые постепенно регрессируют к 28-м суткам. Данная модель ишемии у крыс позволяет воспроизводить ишемический инсульт с регрессом неврологических симптомов в течение месяца, что может в некоторой степени соответствовать лишь небольшой группе пациентов [21]. Модель инсульта у крыс формирует только транзиторный неврологический дефицит, но это позволяет при изучении долговременных эффектов лекарственных средств оценивать и сравнивать скорость восстановления после церебральной ишемии.

Таким образом, для эффективной оценки повреждения целесообразно использовать комплекс методов, включающих [5]: определение размера очага повреждения мозга (витальная окраска трифенилтетразолия хлоридом, магнитно-резонансная или компьютерная томография), оценку неврологического дефицита, мозгового кровотока (ультразвуковая или лазерная флоуметрия, позитронно-эмиссионная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография и др.). Результаты показывают, что возможно изменение выраженности симптомов поражения головного мозга в эксперименте без изменения размеров очага, поскольку его изменение не всегда влечет за собой уменьшение неврологического дефицита [24].

Все тесты для оценки кровотока и физиологических показателей могут быть использованы как для оценки действия исследуемого лекарственного препарата, так и для контроля качества экспериментальной ишемии головного мозга [22, 24]. При моделировании ишемии на протяжении всего опыта необходим контроль степени окклюзии СМА и степени реперфузии с применением соответствующих инструментальных методов. Используются следующие точки для контроля: до ишемии, в начале ишемии, в конце ишемии и после реперфузии [22, 24]. При тестировании новых лекарственных препаратов следует исследовать их эффективность в зависимости от дозы. Рекомендуется использовать не менее 4 точек (доз) [20].

Для комплексной оценки эффективности нейропротективных препаратов и вмешательств целесообразно использовать как введение препарата до ишемии (профилактический режим), так и во время ишемии и после реперфузии (терапевтические режимы). Для всеобъемлющей оценки требуется отсроченное введение через 24 ч и более. Предполагается, что препарат, обладающий нейропротективным эффектом при всех режимах введения, имеет высокий потенциал клинического внедрения, однако возможно, что некоторые препараты будут воздействовать в определенные периоды ишемического повреждения. Например, антиоксиданты эффективны при реперфузии, а ангиопоптолитические средства — в отдаленном постишемическом периоде [17].

Тестирование нейропротекторов должно происходить как на моделях с ишемией без реперфузии, так и с реперфузией. Использование разных сроков длительности ишемии повышает эффективность исследования нейропротективного эффекта.

Для окончательной оценки важно длительное наблюдение за животным и отсроченная оценка. Целесообразны длительные эксперименты с оценкой повреждения мозга через 1—2 мес после ишемии [5, 17]. Этот подход позволяет оценить влияние ишемии на дегенеративные процессы в головном мозге, постинсультные когнитивные (поведенческие) нарушения и депрессию.

Публикация результатов

Завершающей стадией любого исследования является подготовка публикации (статьи). Согласно исследованиям, качество научной статьи и работы не всегда зависит от уровня журнала [54, 55].

При публикации результатов в виде статьи рекомендуется подробное описание места проведения (лабораторная база, ее соответствие требованиям GLP [18]), времени проведения исследования (месяц и год), указание адреса этического комитета, статистических методов, способов анестезии и послеоперационного обезболивания, метода эвтана-

зии, поставщика животных, всех этапов моделирования, витальных показателей во всех группах на протяжении всего исследования (температура тела, spO_2 , CO_2 , H^+ , АД) [17].

Для авторов и исследователей было бы целесообразно направлять материалы не только в зарубежные высокорейтинговые журналы, но и в отечественные с целью развития экспериментальной ангионеврологии в России. Причем необходимы публикации как положительных результатов, где препараты продемонстрировали ожидаемый лечебный эффект, так и негативных, где препараты увеличивали повреждение мозга при ишемии или не влияли на размер повреждения. Качество научной работы и оформление статьи, где получен негативный результат, не должно отличаться от таковых при публикации положительных результатов.

В конце статьи необходимо выделить раздел — ограничения, в котором указывать, какие позиции рекомендаций STAIR [17] и данного обзора не были соблюдены в авторской статье, какие были отклонения в отношении дизайна и как можно было бы улучшить исследование в этой области с учетом результатов, полученных в настоящей статье.

В заключение следует еще раз отметить, что использование экспериментальных моделей является необходимым условием для разработки методов лечения при цереброваскулярной патологии. К сожалению, не всегда эффекты, получаемые при опыте, будут повторяться и в клинике. Во многом причиной этому служит несовершенство экспериментальных моделей, для устранения которого необходимо учитывать механизмы конкретного вида церебральной патологии, в том числе ишемии. Соблюдение вышеупомянутых принципов позволит унифицировать общие подходы и повысить качество доклинических исследований в ангионеврологии. Единые принципы позволят создать доклинические консорциумы по аналогии с многоцентровыми исследованиями, когда одновременно в нескольких лабораториях, расположенных в разных странах, проводится тестирование новых препаратов по общим правилам, а статистический анализ проводится с учетом статистики по всем центрам.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Ginsberg MD. Current status of neuroprotection for cerebral ischemia: synoptic overview. *Stroke*. 2009;40(3):111-114. <https://doi.org/0.1161/STROKEAHA.108.528877>
- Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*. 2008;55(3):363-389.
- Labiche LA, Grotta JC. Clinical trials for cytoprotection in stroke. *NeuroRx*. 2004;1(1):46-70.
- Majid A. Neuroprotection in stroke: past, present, and future. *ISRN Neurol*. 2014;21:515716. <https://doi.org/10.1155/2014/515716>
- Baron JC, Macrae IM, Adams HP Jr, Dirnagl U. ESC-BRAIN: experimental and clinical stroke research-do they connect? Meeting report of the ESC-BRAIN joint symposium held in London and Shanghai in May 2013. *Cerebrovasc Dis*. 2013;36(4):306-321. <https://doi.org/10.1159/000355027>
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol*. 2006;59(3):467-477.
- Philip M, Benatar M, Fisher M, Savitz SI. Methodological quality of animal studies of neuroprotective agents currently in phase II/III acute ischemic stroke trials. *Stroke*. 2009;40(2):577-581. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.524330>
- Dirnagl U, Hakim A, Macleod M, Fisher M, Howells D, Alan SM, Steinberg G, Planas A, Boltz J, Savitz S, Iadecola C, Meairs S. A concerted appeal for international cooperation in preclinical stroke research. *Stroke*. 2013; 44(6):1754-1760. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.000734>
- Sena E, van der Worp HB, Howells D, Macleod M. How can we improve the pre-clinical development of drugs for stroke? *Trends Neurosci*. 2007;30(9):433-439.
- Шмонин А.А., Байса А.Е., Мельникова Е.В., Вавилов В.Н., Власов Т.Д. Защитные эффекты раннего ишемического preconditionирования при фокальной ишемии мозга у крыс: роль коллатерального кровообращения. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2011;97(2):203-213. [Shmonin AA, Baisa AE, Melnikova EV, Vavilov VN, Vlasov TD. Protective effects of early ischemic precondition in focal cerebral ischemia in rats: the role of collateral circulation. *Russian Journal of Physiology I.M. Sechenov*. 2011;97(2):203-213. (In Russ.)].
- Dirnagl U. *Rodent Models of Stroke*. 2010. Publisher: Humana Press; 2010.
- Kahle MP, Bix GJ. Successfully Climbing the «STAIRs»: Surmounting Failed Translation of Experimental Ischemic Stroke Treatments. *Stroke Res Treat*. 2012;374098. <https://doi.org/10.1155/2012/374098>
- Wang MM, Xi G, Keep RF. Should the STAIR criteria be modified for preconditioning studies? *Transl Stroke Res*. 2013;4(1):3-14. <https://doi.org/10.1007/s12975-012-0219-0>
- Wang-Fischer Y. *Manual of Stroke Models in Rats*. USA. NY. Publisher: Taylor & Francis Group; 2009.
- Chopp M, Zhang RL, Zhang ZG, Jiang Q. The clot thickens: thrombolysis and combination therapies. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1999;73:67-71.
- Zhang RL, et al. A rat model of focal embolic cerebral ischemia. *Brain Res*. 1997;766:83-92.
- Albers GW, Goldstein LB, Hess DC, Wechsler LR, Furie KL, Gorelick PB, Hurn P, Liebeskind DS, Nogueira RG, Saver JL; STAIR VII Consortium. Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke*. 2011;42(9):2645-2650. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.618850>
- Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development — 2nd ed World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Publisher: «WHO Library Cataloguing-in-Publication Data». 2009;327.
- Миронова А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Издательство «ГрифиК»; 2012. [Mironova AN. *A guide to preclinical drug research*. Part one. M.: Publisher GrifiK; 2012. (In Russ.)].
- Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricq H, Balentine JD. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke*. 1986;17(4):738-743.
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hum PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH. STAIR Group. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke*. 2009;40(6):2244-2250. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.541128>
- Шмонин А.А., Дайнеко А.С., Просвирнина М.С., Зухурова М., Мельникова Е.В., Власов Т.Д. Контроль качества эксперимента при

- моделировании фокальной транзиторной ишемии головного мозга у крыс по методике Koizumi. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2014;3:74-79. [Shmonin AA, Daineko AS, Prosvirina MS, Zuhurova M, Melnikova EV, Vlasov TD. Control of the quality of the experiment in the modeling of focal transient brain ischemia in rats using the Koizumi technique. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2014;3:74-79. (In Russ.)].
23. Шмонин А.А. Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга у крысы. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2011;3:68-76. [Shmonin AA. Ligation of the middle cerebral artery of the rat: a comparison of modifications of models of focal cerebral ischemia in a rat. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2011;3:68-76. (In Russ.)].
 24. Шмонин А.А. Эндогенная нейропротекция при ишемии мозга: эритропоэтин пре- и посткондиционирование. Germany: Издательство «LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co»; 2012. [Shmonin AA. *Endogenous neuroprotection in cerebral ischemia: erythropoietin pre- and post-conditioning*. Germany: Publisher «LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co»; 2012. (In Russ.)].
 25. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. М.: Издательство «Профиль 2С»; 2010. [Karkishchenko NN, Gracheva SV. *A Handbook on Laboratory Animals and Alternative Models in Biomedical Research*. М.: Publisher «Profil 2S»; 2010. (In Russ.)].
 26. McConnell VC. *Calculations for the Veterinary Professional*. Publisher: Ames, IA: Iowa State University Press; 2000.
 27. Мальцева М.Н., Бармин А.В. Влияние содержания экспериментальных животных на некоторые биологические показатели. Материалы международной научной конференции «Биотехнологии и ветеринария. Состояние и перспективы развития», 14 февраля 2011;88. [Mal'tseva MN, Barmin AV. *The effect of the content of experimental animals on certain biological indices*. Materials of the international scientific conference «Biotechnologies and veterinary science. State and development prospects», February 14, 2011;88. (In Russ.)].
 28. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985;17(5):497-504.
 29. Shmonin AA, Baisa AE, Melnikova EV, Vavilov VN and Vlasov TD. Protective Effects of Early Ischemic Preconditioning in Focal Cerebral Ischemia in Rats: The Role of Collateral Blood Circulation. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2012;42(6):643-650.
 30. Graham SM, McCullough LD, Murphy SJ. Animal models of ischemic stroke: balancing experimental aims and animal care. *Comp Med*. 2004;54(5):486-496.
 31. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J*. 2003;44(2):85-95.
 32. Shmonin AA, Melnikova EV, Galagudza MM, Vlasov TD. The characteristics of cerebral ischemia in major rat stroke models of middle cerebral artery ligation through craniectomy. *International Journal of Stroke*. 2014;9(6):793-801. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4949.2012.00947.x>
 33. Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986;8:1-8.
 34. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20:84-91.
 35. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Байса А.Е., Власов Т.Д. Моделирование одностороннего ишемического повреждения нейронов стриатума с помощью непродолжительной окклюзии средней мозговой артерии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009;147(2):217-219. [Korzhevsky DE, Kirik OV, Baisa AE, Vlasov TD. Simulation of unilateral ischemic injury of striatum neurons with the help of a short occlusion of the middle cerebral artery. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2009;147(2):217-219. (In Russ.)].
 36. Коржевский Д.Э., Кирик О.В., Сухорукова Е.Г., Власов Т.Д. Структурная организация микроглиоцитов стриатума после транзиторной фокальной ишемии. *Морфология*. 2012;141(2):28-32. [Korzhevsky DE, Kirik OV, Sukhorukova EG, Vlasov TD. Structural organization of striatum microgliaocytes after transient focal ischemia. *Morphology*. 2012;141(2):28-32. (In Russ.)].
 37. Sundt TM Jr, Waltz AG. Experimental cerebral infarction: Retro-orbital extradural approach for occluding the middle cerebral artery. *Mayo Clin Proc*. 1966;41(3):159-168.
 38. Полякова Е.А., Дранишников Н.В., Власов Т.Д. Метод моделирования обратимой окклюзии средней мозговой артерии. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2004;3:61-63. [Polyakova EA, Dranishnikov NV, Vlasov TD. A method for modeling reversible occlusion of the middle cerebral artery. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2004;3:61-63. (In Russ.)].
 39. Windle V, Szymanska A, Granter-Button S, White C, Buist R, Peeling J, Corbett D. An analysis of four different methods of producing focal cerebral ischemia with endothelin-1 in the rat. *Exp Neurol*. 2006;201(2):324-334.
 40. Тельпухов В.И., Теренин С.О., Князева Г.Д., Лапкина Т.И. Пролонгирование безопасных сроков ишемии головного мозга. *Вестник академии медицинских наук*. 1985;4:65-71. [Tel'pukhov VI, Terenin SO, Knyazeva GD, Lapkina TI. Prolongation of safe periods of cerebral ischemia. *Bulletin of the Academy of Medical Sciences*. 1985;4:65-71. (In Russ.)].
 41. Perez-Pinzon MA, Guang-Ping X, Dietrich VD and all. Rapid preconditioning protects rats against ischemic neuronal damage after 3 but not 7 days of reperfusion following global cerebral ischemia. *J of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1997;17:175-182.
 42. Zhao L, Nowak TS Jr. CBF changes associated with focal ischemic preconditioning in the spontaneously hypertensive rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(9):1128-1140.
 43. Цыган Н.В. *Повреждение и защита головного мозга при кардиохирургических операциях в условиях искусственного кровообращения (экспериментально-клиническое исследование)*: Дис. ... канд. мед. наук. СПб. 2014. [Tsygan NV. *Damage and protection of the brain during cardiac surgery in conditions of artificial circulation (experimental clinical study) [dissertation]*. SPb. 2014. (In Russ.)]. Ссылка активна на 15.04.17. <http://medical-diss.com/docreader/514714/d#?page=10>
 44. Шербак Н.С., Галагудза М.М. Экспериментальные модели ишемического инсульта. *Бюллетень ФЦСКЭ им. В.А. Алмазова*. 2011;3:39-47. [Shcherbak NS, Galagudza MM. Experimental models of ischemic stroke. *Bulletin of the FCSKE them V.A. Almazova*. 2011;3:39-47. (In Russ.)].
 45. Шербак Н.С., Галагудза М.М., Овчинников Д.А., Кузьменков А.Н., Митрофанова Л.Б., Баранцевич Е.Р., Шлякто Е.В. Новый способ моделирования обратимой глобальной ишемии головного мозга у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011;152(11):592-595. [Shcherbak NS, Galagudza MM, Ovchinnikov DA, Kuzmenkov AN, Mitrofanova LB, Barantsevich ER, Shlyakhto EV. A new way of modeling reversible global cerebral ischemia in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;152(11):592-595. (In Russ.)].
 46. Биленко М.В. *Ишемические и реперфузионные повреждения органов*. М.: Медицина; 1989. [Bilenko MV. *Ischemic and reperfusion injury of organs*. М.: Medicine; 1989. (In Russ.)].
 47. Chen J, Simon R. Ischemic tolerance in the brain. *J Neurology*. 1997;48(2):306-311.
 48. Корбачев В.Г., Сысенков С.П. Моделирование клинической смерти и постренимационной болезни у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 1982;3:78-80. [Korbachev VG, Sisenkov S.P. Modeling of clinical death and postresuscitation disease in rats. *Pathological physiology and experimental therapy*. 1982;3:78-80. (In Russ.)].
 49. Zhang RL, Zhang ZG, Lu M, Wang Y, Yang JJ, Chopp M. Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(6):857-863.
 50. Захаров Ю.М. Неэритропоэтические функции эритропоэтина. *Российский физиологический журнал им. И.С. Сеченова*. 2007;93(6):592-608. [Zakharov YuM. Non-erythropoietic properties of erythropoietin. *Russian Physiological Journal. I.S. Sechenov*. 2007;93(6):592-608. (In Russ.)].
 51. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;64(2):159-171.
 52. Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Front Neurol*. 2014;19(5):19. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00019>
 53. Дайнеко А.С., Шмонин А.А., Шумеева А.Г., Коваленко Е.А., Мельникова Е.В., Власов Т.Д. Методы оценки неврологического дефицита у крыс после 30-минутной фокальной ишемии мозга на ранних и поздних сроках постишемического периода. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2014;13(1):49-68-78. [Daineko AS, Shmonin AA, Shumeeva AG, Kovalenko EA, Melnikova EV, Vlasov TD. Assess mentof neurological deficitinthe early and late phase after a 30-minute of focal cerebral ischemia in rats. *Regional blood circulation and microcirculation*. 2014;13(1):49-68-78. (In Russ.)].
 54. Minnerup J, Wersching H, Diederich K, Schilling M, Ringelstein EB, Wellmann J, Schäbitz WR. Methodological quality of preclinical stroke studies is not required for publication in high-impact journals. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010;30(9):1619-1624. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.74>
 55. van der Worp HB, de Haan P, Morrema E, Kalkman CJ. Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischemia. *J Neurol*. 2005;252(9):1108-1114.