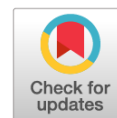


УДК 616-092.9

DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF21157-68>

Научная статья



Влияние внутрижелудочного введения на морфологию желудочно-кишечного тракта лабораторных крыс

Я.А. Гушин¹, М.Н. Макарова¹, П.Д. Шабанов²¹ НПО «Дом фармации», г.п. Кузьмолловский, Ленинградская область, Россия;² Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Актуальность. В доклинических исследованиях с использованием лабораторных животных широко востребовано пероральное введение тестируемых веществ при помощи специального зонда. Большинство исследований посвящено психофизиологической и клинико-биохимической реакции организма животного на это воздействие, но чрезвычайно мало исследований, рассматривающих влияние самой манипуляции на развитие патологии в тканях желудочно-кишечного тракта, связанных с неизбежным механическим воздействием зонда на слизистые оболочки.

Цель — выявить патологические изменения в органах желудочно-кишечного тракта лабораторных крыс, связанные с воздействием процедуры внутрижелудочного введения тестируемых веществ, и сравнить полученные данные с частотой возникновения спонтанных заболеваний.

Материалы и методы. Были использованы данные патоморфологических наблюдений, полученные от крыс линии Wistar, задействованных в ходе научных работ, выполненных в НПО «Дом фармации» в период с 2018 по 2021 г. Проанализированы 1400 сентинельных животных и такое же количество крыс интактных групп, которым многократно на протяжении 14 дней внутрижелудочно вводили контрольное вещество (дистиллированную воду).

Результаты. У менее 5 % клинически здоровых животных можно выявить незначительные по своей интенсивности и распространенности воспалительные заболевания во всех отделах кишечника. В результате проведения манипуляции внутрижелудочного введения было отмечено почти двукратное увеличение количества случаев катарального эзофагита и гастрита, эрозивно-язвенного поражения слизистой оболочки пищевода и желудка в его железистом отделе и гиперкератоза в безжелезистой части.

Выводы. Определены вид и частота развития фоновой патологии желудочно-кишечного тракта лабораторных крыс. Доказано, что многократная травматизация слизистой оболочки, связанная с механическим контактом твердого металлического зонда с эпителием, провоцирует развитие воспалительных заболеваний пищевода и желудка, без влияния на нижележащие отделы кишечника.

Ключевые слова: биомедицинские исследования; крысы; пути введения лекарств; фармацевтические носители; пищеварительная система; исторический контроль данных.

Как цитировать:

Гушин Я.А., Макарова М.Н., Шабанов П.Д. Влияние внутрижелудочного введения на морфологию желудочно-кишечного тракта лабораторных крыс // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии 2023. Т. 21. № 1. С. 57–68. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF21157-68>

DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF21157-68>

Research Article

Effect of intragastric administration on the morphology of laboratory rats' gastrointestinal tract

Yaroslav A. Gushchin¹, Marina N. Makarova¹, Petr D. Shabanov²¹ Research and manufacturing company "Home of Pharmacy", Kuzmolovskiy t. s., Leningrad Region, Russia;² Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

BACKGROUND: In preclinical studies on laboratory animals, oral administration with special probe for test substances is very in demand. Most studies are devoted to the psychophysiological and clinical-biochemical reaction of the animal's body to this effect, but extremely few studies consider the effect of the manipulation itself on the development of pathology in the tissues of the gastrointestinal tract associated with the inevitable mechanical impact of the probe on the mucous membranes.

AIM: To identify pathological changes in the organs of the gastrointestinal tract of laboratory rats that are associated with the effects of intragastric administration of the tested substances, and compare the data obtained with the frequency of spontaneous diseases.

MATERIALS AND METHODS: The data of pathomorphological observations obtained from Wistar rats involved in the course of scientific work carried out at NPO Dom Pharmacy in the period from 2018 to 2021 were used. 1400 sentinel animals were analyzed, and the same number of intact rats. Intact animals were gavaged with a control substance (distilled water) for 14 days.

RESULTS: In less than 5% of clinically healthy animals, inflammatory diseases of insignificant intensity and prevalence in all parts of the intestine can be detected. As a result of the manipulation of intragastric administration, an almost twofold increase in the number of cases of catarrhal esophagitis and gastritis, erosive and ulcerative lesions of the mucous membrane of the esophagus and stomach in its glandular part and hyperkeratosis in its non-glandular part was noted.

CONCLUSIONS: The type and frequency of occurrence of the background pathology of the gastrointestinal tract of laboratory rats were determined. It has been proven that repeated traumatization of the mucous membrane associated with mechanical contact of a solid metal probe with the epithelium provokes the development of inflammatory diseases of the esophagus and stomach, without affecting the underlying parts of the intestine.

Keywords: biomedical research; rats; drug administration routes; pharmaceutical vehicles; digestive system; historical control data.

To cite this article:

Gushchin YaA, Makarova MN, Shabanov PD. Effect of intragastric administration on the morphology of laboratory rats' gastrointestinal tract. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2023;21(1):57–68. DOI: <https://doi.org/10.17816/RCF21157-68>

Received: 26.01.2023

Accepted: 21.03.2023

Published: 31.03.2023

АКТУАЛЬНОСТЬ

Прием препаратов перорально — наиболее распространенный способ доставки лекарственных средств как в медицине, так и в ветеринарии. В доклинических исследованиях с использованием лабораторных животных, особенно это касается веществ, которые проверяются на безопасность, пероральное введение также широко востребовано, поскольку имитирует самый популярный в клинической практике метод применения лекарств. Пероральный способ введения удобен, относительно прост, в большей степени безопасен для животных, не требует долгого обучения персонала и наличия дорогостоящего оборудования, кроме того некоторых животных можно обучить добровольно принимать вещество. Хотя самостоятельное употребление вводимого соединения является идеальной ситуацией, тем не менее этот метод дозирования в большинстве случаев ненадежный и подходит не для всех животных, лекарственных форм и в случае долгосрочных исследований вследствие индивидуальных вкусовых предпочтений животных, их поведенческих реакций, а также из-за органолептических качеств самого препарата. Кроме того, страдает и точность дозирования. Хорошей альтернативой служит применение внутрижелудочного зонда. Это широко используемый метод точного введения растворов для перорального применения [1, 2], когда доставляемое вещество не может быть добавлено в корм или невкусное [3]. Опытный сотрудник выполняет процедуру быстро, без ущерба для животного, что позволяет доставить точный объем (или дозу) вещества непосредственно в желудок и далее в кишечник, откуда оно может абсорбироваться [4]. Внутрижелудочные зонды довольно разнообразны, различаются материалом (резина, пластик, силикон, металл), жесткостью (гибкие и жесткие), формой (прямые и изогнутые) [5], также есть возможность использовать смазочные материалы. Несмотря на столь широкий ассортимент, могут возникнуть проблемы, связанные с использованием зондов, особенно при длительном использовании [1] или когда требуется многократное ежедневное введение [2]. Эти осложнения можно разделить на физиологические, включающие в себя ответ организма животных на стрессорное воздействие манипуляции, и на ятрогенные, связанные с самой процедурой и квалификацией персонала, такие как аспирационная пневмония, непреднамеренное введение в воздухоносные пути, тяжелые травмы пищевода и разрыв желудка [2, 6–8]. И если большинство исследований посвящено именно психофизиологической и клинико-биохимической реакции организма животного на, несомненно, неприятные для него действия, то чрезвычайно мало исследований рассматривают влияние самой манипуляции на развитие патологии в тканях желудочно-кишечного тракта (ротовой полости, пищевода и желудка), связанных с неизбежным механическим воздействием зонда на слизистые оболочки.

Это и стало основной целью исследования — определить влияет ли, а главное как, использование внутрижелудочного зонда на патоморфологические изменения в строении органов желудочно-кишечного тракта лабораторных животных. Но встал еще один вопрос: выявленная патология — это результат нашего воздействия или это спонтанные (фоновые) изменения? То есть проявления уже имеющихся у животных на момент исследования отклонений, которые могут быть врожденными или приобретенными, физиологическими или патологическими, а могут являться уникальным свойством для данного вида. Таким образом, это изменения морфологии тканей за пределами диапазона нормальных вариаций в популяции [9, 10]. Зачастую они могут помешать анализу морфологии тканей, поэтому исследователь должен знать о них и быть способным интерпретировать полученные данные, дифференцировав возможное негативное действие исследуемых веществ от спонтанно возникающих заболеваний лабораторных животных. К сожалению, данная проблема, хоть и освещается в доступной литературе, но крайне в небольшом количестве работ и носит разрозненный, скорее, описательный характер [11, 12], констатирующий возможное наличие заболеваний, но не дающий информации о доли их в популяции. Мы попытались исправить данную ситуацию, что и стало следующей задачей — определить фоновую патологию органов желудочно-кишечного тракта лабораторных крыс и выявить частоту ее встречаемости у клинически здоровых крыс. Полученные нами сведения помогут исследователям в области доклинических исследований в интерпретации получаемых ими данных, но не стоит забывать, что доля возможной патологии зависит не столько от вида и линии животных, сколько от условий содержания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Перед началом исследования, с целью выявить частоту встречаемости фоновой патологии желудочно-кишечного тракта лабораторных крыс, а также влияние манипуляции внутрижелудочного введения на данный показатель, были проанализированы литературные источники, доступные в базах данных PubMed, Medline и eLibrary. Поиск был проведен без учета года публикации, по ключевым словам «spontaneous», «background», «lesions», «gastrointestinal», «control animals». Далее по названию работ и абстракту были отобраны наиболее релевантные исследования, число которых составило менее ста. Среди этих немногочисленных работ крайне трудно было найти не описательную, а количественную оценку встречаемости заболеваний. Только в двух источниках указано, что у около 5–7 % крыс присутствуют дегенеративные и воспалительные изменения эпителия пищевода, а воспаление слизистой оболочки желудка встречается у менее 5 % животных [13, 14]. Еще хуже дело обстояло с определением степени воздействия

внутрижелудочного введения на морфологию тканей. При дополнительном поиске по ключевым словам «gavage» и «intra-gastric» лишь в четырех статьях можно было косвенно определить, что катаральный гастрит и эзофагит могут быть обнаружены у 1–11 % животных, получавших контрольное вещество внутрижелудочно на протяжении от 2 до 52 нед. исследований [8, 12, 13, 15].

Опираясь на эти данные, было сделано предположение, что фоновая патология может быть обнаружена максимум у 7 % сентинельных животных, и максимум у 11 % крыс на фоне проведения манипуляции. В соответствии с этими значениями при помощи программного обеспечения Statistica 10 был рассчитан требуемый объем выборки, который определен исходя из двустороннего независимого Z-критерия, используемого для сравнения пропорций, и необходимости обеспечения не менее 80 % мощности при уровне значимости $\alpha = 5\%$. Определено, что необходимое количество животных в исследовании составит не менее 1356 единиц в каждой группе.

В качестве биологических тест-систем были использованы половозрелые крысы линии Wistar, без учета половой принадлежности, массой 200–300 г. Для исследования отбирали животных, подлежащих плановой эвтаназии в ходе текущих научных работ, проводившихся в НПО «Дом фармации» (Ленинградская обл., Россия), в период с 2018 по 2021 г. Специально для данного исследования животных не использовали.

Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218–14 и с Директивой 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. За весь обозначенный выше период времени рацион питания животных не менялся, состав используемого корма соответствовал ГОСТ Р 50258–92, а качество воды — требованиям СанПиН 2.1.4.1074–01.

Таким образом, в нашем исследовании были использованы данные патоморфологических наблюдений, полученные от 1400 сентинельных животных, которые не подвергались процедуре внутрижелудочного введения или иным манипуляциям, влияющим на их здоровье. Такое же количество крыс интактных групп, которым многократно на протяжении 14 дней внутрижелудочно вводили контрольное вещество, в качестве которого была использована дистиллированная вода. Манипуляцию введения осуществляли опытные лаборанты, прошедшие соответствующее обучение, один раз в сутки при помощи специального жесткого металлического зонда, оснащенного «оливой» на конце. При этом диаметр «оливы» и длина зонда, а также объемы введения не превышали рекомендованные для данного вида животных [16, 17].

Во всех случаях эвтаназию осуществляли согласно планам-графикам на 14-й день исследований при помощи диоксида углерода (CO_2) в специальной камере, после чего был проведен внешний осмотр животных

с последующим вскрытием и эвисцерацией внутренних органов. Полученный материал был зафиксирован в 10 % формалине и передан в лабораторию гистологии и патоморфологии, где осуществляли гистологическую обработку образцов по общепринятой методике с последующим изготовлением микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином.

Статистический анализ

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения. Проверку на соответствие закону нормального распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Сравнение номинальных данных проводили при помощи точного критерия Фишера. Статистическую значимость оценивали на уровне $p < 0,05$. Статистический анализ выполнен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У большинства животных в обеих группах строение исследованных органов желудочно-кишечного тракта соответствовало норме, как макроскопически, так и микроскопически. Однако у части животных были выявлены отдельные патологии (см. таблицу).

Исходя из анализа полученных данных, было выявлено, что статистически значимые отличия по встречаемости патологии между группами были обнаружены, как и ожидалось, исключительно в верхних отделах желудочно-кишечного тракта — в пищеводе и желудке, которые подвергались механическому воздействию зонда. Кроме того, стоит отметить сопоставимость макро- и микроскопических проявлений заболеваний, что еще раз доказывает необходимость тщательного визуального осмотра объектов исследования (макроскопическое исследование), а не только сбор «коллекции тканей» для последующего гистологического анализа.

Пищевод

У животных в обеих группах макроскопически определялась незначительная гиперемия и небольшие точечные эрозии. При этом гиперемии при проведении процедуры введения наблюдали в два раза чаще.

При гистологическом анализе ткани пищевода были выявлены заболевания, которые примерно в два раза чаще возникали у животных при внутрижелудочном введении. Эзофагит, представляющий небольшие скопления лимфоцитов и плазматических клеток с небольшой примесью нейтрофильных гранулоцитов, расположены преимущественно в собственной пластинке слизистой оболочки (рис. 1, а). Довольно часто можно было также обнаружить участки гиперкератоза, при котором увеличивалась толщина рогового слоя, с незначительным утолщением шиповатого слоя.

Таблица. Встречаемость патологии желудочно-кишечного тракта (%) у крыс линии Wistar

Микроскопически			Макроскопически		
Выявленная патология	Группы		Выявленная патология	Группы	
	ВЖ (n = 1400)	Сентин. (n = 1400)		ВЖ (n = 1400)	Сентин. (n = 1400)
Пищевод					
Эзофагит	4,5*	2,4	Эрозивно-язвенное пораж.	1,5	0,9
Эрозии	2,1*	1,0	Гиперемия	2,2*	1,1
Язвы	0,8*	0,1	Перфорация	0,6*	0,0
Гиперкератоз	2,9*	1,7			
Перфорация	0,6*	0,0			
Гиперплазия эпителия	2,6	2,0			
Желудок					
Эрозии безжелезистой части	1,1	0,6	Эрозивно-язвенное поражение безжелезистой части	1,5	0,9
Эрозии железистой части	2,2*	1,1	Эрозивно-язвенное поражение железистой части	3,1*	1,9
Гастрит	6,9*	5,0	Гиперемия	10,6*	8,4
Язвы безжелезистой части	1,0	0,4	Кровоизлияния	5,3	4,4
Язвы железистой части	1,9*	0,8			
Гиперкератоз	5,0*	3,3			
Расширение желез	5,2	3,9			
Гиперплазия эпителия	0,8	0,5			
Двенадцатиперстная кишка					
Дуоденит	2,6	2,2	Гиперемия	3,9	4,2
Эрозии	0,5	0,6	Кровоизлияния	2,2	1,7
Язвы	0,4	0,2			
Тонкая кишка					
Энтерит	4,0	2,9	Гиперемия	3,8	3,4
Эрозии	0,7	0,6	Эрозивно-язвенное поражение	0,6	0,8
Язвы	0,6	0,5	Кровоизлияния	2,8	3,1
Толстая кишка					
Колит	5,4	4,4	Гиперемия	3,3	3,8
Эрозии	1,2	1,0	Эрозивно-язвенное по- ражение	0,6	0,4
Язвы	0,6	0,7	Кровоизлияния	2,4	1,9

Примечание. ВЖ — животные, подвергнутые процедуре внутрижелудочного введения; Сентин. — сентинельные животные.

*Отличия статистически значимы по сравнению с группой сентинельных животных, точный критерий Фишера, $p < 0,05$.

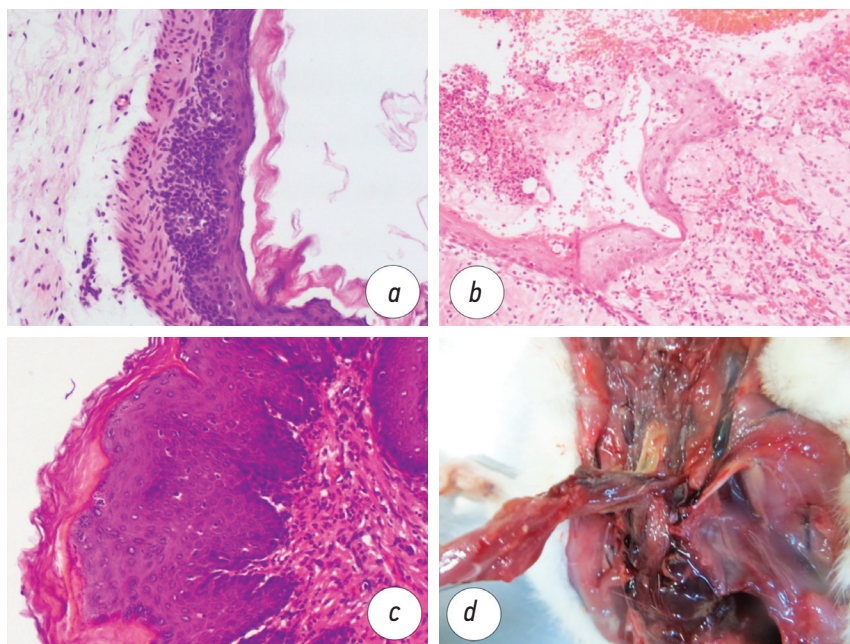


Рис. 1. Патоморфологические изменения пищевода крыс: *a* — катаральный эзофагит, окраска гематоксилином и эозином, увел. $\times 100$; *b* — острая язва, окраска гематоксилином и эозином, увел. $\times 100$; *c* — гиперплазия эпителия, окраска гематоксилином и эозином, увел. $\times 100$; *d* — флегмона мягких тканей шеи в результате перфорации стенки пищевода зондом

Эрозии слизистой оболочки пищевода, на фоне слабо и умеренно выраженной смешанной лимфо-плазматической воспалительной инфильтрации с умеренным количеством нейтрофильных гранулоцитов, затрагивали небольшие по протяженности участки эпителия и распространялись вглубь стенки до собственной пластинки слизистой оболочки, не проникая глубже подслизистого слоя.

Более глубокое поражение — язвенное, преимущественно без признаков заживления, глубиной до мышечного слоя, с умеренной и выраженной воспалительной инфильтрацией с большим количеством нейтрофильных гранулоцитов (рис. 1, *c*). Однако в ряде случаев отмечены признаки заживления дефекта слизистой оболочки: краевая гиперплазия и «нависание» эпителия по краю язвы, слабо выраженный фиброз в области дна, при этом количество нейтрофилов значительно снижено, а воспалительная инфильтрация представлена большей частью лимфоцитами, плазматическими и макрофагами.

Исключительно у животных, подвергшихся процедуре внутрижелудочного введения, визуально наблюдали последствия ятрогенной патологии — перфорации стенки пищевода зондом, в результате которого развился гнойный процесс (флегмона), ограниченный фасциями шеи, а в двух случаях — распространяющийся в средостение (рис. 1, *d*). В дальнейшем при гистологическом исследовании патологический процесс определялся, как разлитое воспаление, затрагивающее все слои стенки пищевода и окружающие мягкие ткани. Клеточный состав воспалительного инфильтрата был смешанный с большим количеством нейтрофильных гранулоцитов. В центре и по периферии очага присутствуют большие участки некроза тканей. У нескольких животных воспалительный процесс

переходил из альтеративной стадии в пролиферативную, и по периферии очага можно было наблюдать процесс замещения некротизированной ткани на соединительную с формированием абсцесса.

Примерно в равной мере в обеих группах отмечены случаи возникновения очаговой гиперплазии многорядного плоского эпителия слизистой оболочки пищевода преимущественно за счет базальных слоев (рис. 1, *c*).

Желудок

У большинства животных в обеих группах строение желудка как макроскопически, так и микроскопически соответствовало норме. Желудок представлен двумя отделами — безжелезистым и железистым, с четкой границей между ними. Слизистая оболочка блестящая, складчатость сильно выражена.

В группе животных, подвергшихся процедуре внутрижелудочного введения, достоверно чаще можно было наблюдать гиперемия слизистой оболочки желудка, которая преимущественно затрагивала богато васкуляризованную железистую его часть, и развитие эрозивно-язвенного поражения. Небольшие точечные эрозии и язвы можно было наблюдать большей частью также в железистой части желудка крыс, и отличались они от кровоизлияний видимым глазом изменением блеска слизистой оболочки в месте дефекта, наличием «кратерообразного вдавления» и, изредка, черным дном (рис. 2, *a*). Но оценить глубину распространения макроскопически не представляется возможным, и более детальная дифференцировка была выполнена при гистологическом исследовании.

Точечные, от единичных до множественных, кровоизлияния, а также эрозивно-язвенное поражение

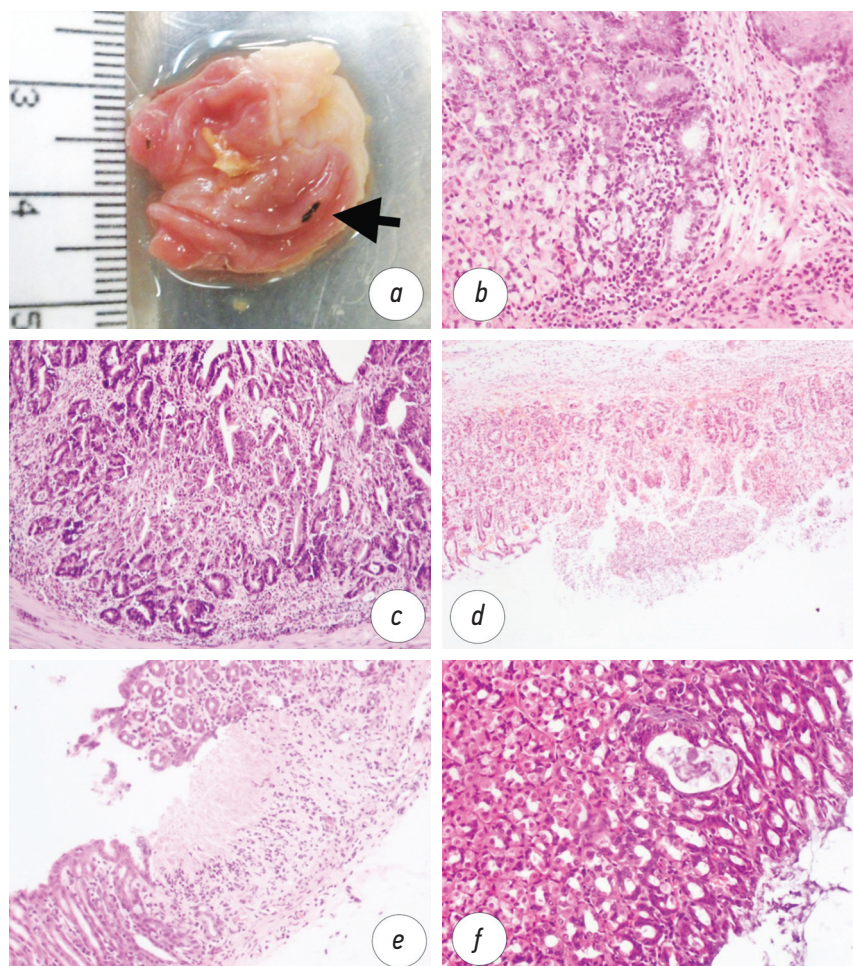


Рис. 2. Патоморфологические изменения желудка крыс: *a* — эрозивно-язвенный дефект в железистом отделе (стрелка); *b* — острый катаральный гастрит, увел. $\times 100$; *c* — гастрит с признаками хронизации, увел. $\times 100$; *d* — острая эрозия железистого отдела, окраска гематоксилином и эозином, увел. $\times 40$; *e* — язва железистого отдела в стадии заживления, увел. $\times 40$; *f* — расширение желез, увел. $\times 200$, окраска гематоксилином и эозином

безжелезистой части желудка встречались в обеих группах животных статистически с одинаковой частотой.

Гистологическое исследование

У животных в обеих группах были выявлены минимальные проявления катарального гастрита (рис. 2, *b*): очаговые лимфоцитарные скопления с небольшим или умеренным количеством нейтрофилов, сопровождающиеся незначительным отеком и полнокровием сосудистого русла. Воспалительная инфильтрация ограничивалась собственной пластинкой слизистой оболочки, но было отмечено распространение и на подслизистую основу, и на железистый эпителий, что часто сопровождалось расширением желез, а в единичных случаях, в их просвете формировались микроабсцессы. У нескольких животных гастрит имел признаки перехода в хроническое течение заболевания (рис. 2, *c*). В безжелезистой части желудка воспаление встречалось в единичных случаях. При проведении манипуляции внутрижелудочного введения количество выявленных случаев гастрита было статистически выше (точный критерий Фишера, $p < 0,05$), чем у сентинельных животных. Почти в два раза чаще

у животных из экспериментальной группы было выявлено развитие эрозий и язв в железистом отделе желудка. В большинстве случаев поражение было острым и сопровождалось выраженной перифокальной воспалительной реакцией ткани (рис. 2, *d*). Реже можно было наблюдать старые язвы, которые прошли острую фазу и находились в фазе заживления (рис. 2, *e*). При этом в безжелезистой части слизистой оболочки желудка процедура введения не оказала столь значимого влияния на развитие эрозий и язв, хотя имела место тенденция к увеличению частоты их встречаемости в данной области (примерно с 0,5 до 1 %). В обеих группах животных в безжелезистой отделе были выявлены небольшие участки гиперкератоза многослойного плоского эпителия, который часто сочетался с гиперплазией эпителия. Однако количество обнаруженных случаев патологии в группе сентинельных животных было достоверно ниже, чем в группе экспериментальных животных (3,3 и 5 % соответственно, при $p < 0,05$).

В равной мере ($p > 0,05$) в обеих группах животных можно было наблюдать небольшие участки

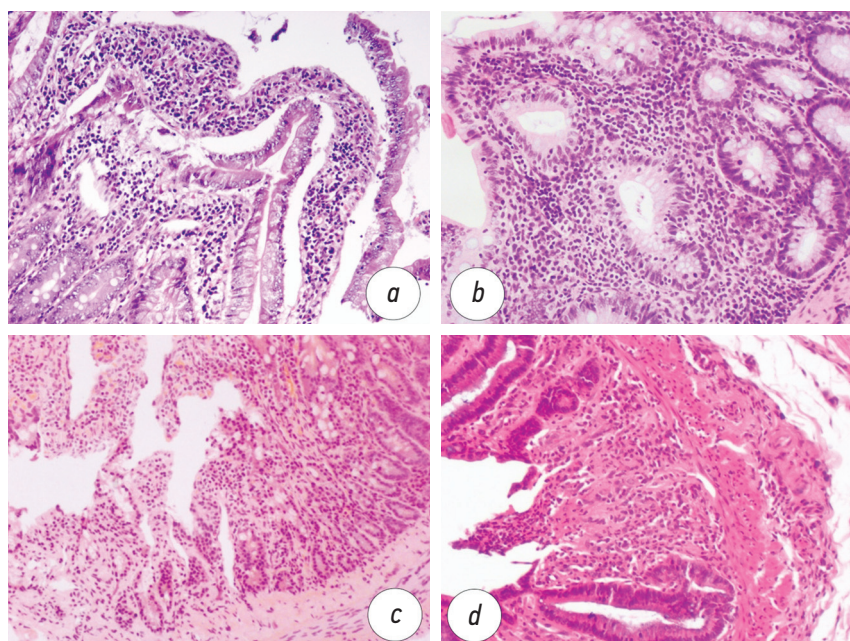


Рис. 3. Патоморфологические изменения в кишечнике крыс: *a* — катаральный энтерит, увел. $\times 100$; *b* — катаральный колит, $\times 100$; *c* — острая язва тонкой кишки, $\times 40$; *d* — острая язва толстой кишки, $\times 100$. Окраска гематоксилином и эозином

слабовыраженной гиперплазии железистого эпителия, но встречалась она менее чем у 1 % животных.

Не редким явлением, обнаруженным у 3,9 % сентинельных животных и у 5,2 % крыс экспериментальной группы, оказалось наличие локальных участков расширения желез: в просвете тесно расположенных, увеличенных желез можно было наблюдать накопление слабо базофильной слизи, эпителиальные клетки при этом приобретали кубическую форму или уплощались, но не проявляли признаков атрофии, кроме того данное состояние не сопровождалось какими-либо воспалительными явлениями вокруг области поражения (рис. 2, *f*).

Кишечник

Все обнаруженные патологические изменения присутствовали в обеих группах животных, как у сентинельных, так и у животных на фоне проведения манипуляции внутрижелудочного введения, и не имели статистически значимых различий по частоте встречаемости (точный критерий Фишера, $p > 0,05$).

При макроскопическом анализе во всех отделах тонкой и толстой кишки у 3,2–4,7 % животных обеих групп можно было наблюдать гиперемии отдельных участков кишечника, протяженностью от 0,5 до 4,5 см. В большинстве случаев при дальнейшем гистологическом исследовании было выявлено, что в данных участках микроскопическая структура стенки кишки не была нарушена, и отмечали только расширение кровеносных сосудов без какой-либо сопутствующей воспалительной реакции.

У 1,9–2,2 % животных в обеих группах диагностированы мелкие точечные кровоизлияния от единичных до рассеянных на продолжительных участках. Микроскопически

они представляли собой ограниченные области имбибированные кровью, преимущественно в подслизистом слое, частично затрагивающие собственную пластинку слизистой оболочки. Принимая во внимание отсутствие какой-либо вторичной воспалительной реакции, можно предположить, что их появление оказалось следствием эвтаназии животных.

Частота развития эрозивно-язвенных поражений слизистой оболочки кишечника так же не зависела от проведения манипуляции внутрижелудочного введения ($p > 0,05$). Небольшие единичные размером до 0,2 см эрозии и язвы были выявлены в обеих группах менее чем у 1 % крыс.

Гистологическое исследование

Использование интрагастрального зонда для введения веществ так же не повлияла на частоту встречаемости воспалительных заболеваний кишечника, которые можно охарактеризовать как проявления катарального дуоденита, энтерита и колита минимальной активности (рис. 3, *a*, *b*). Представленную лимфоцитами, плазмócитами, гистиоцитами и нейтрофилами воспалительную инфильтрацию слабой или умеренной степени выраженности можно было обнаружить на небольших участках слизистой оболочки кишечника как у сентинельных, так и у экспериментальных животных. Чаше она ограничивалась поверхностным эпителием и собственной пластинкой. Только у небольшого числа животных носила выраженный характер, распространяясь на подслизистую основу и, в немногочисленных случаях, на мышечный слой. При этом несколько снижалась высота ворсинок двенадцатиперстной и подвздошной кишки, была отмечена реактивная гиперплазия лимфоидных фолликулов.

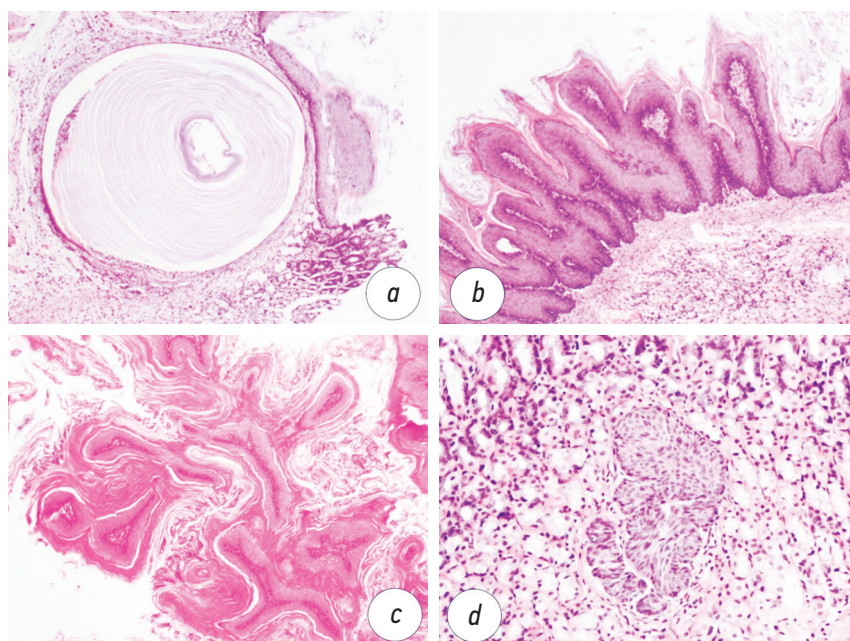


Рис. 4. Патоморфологические изменения в кишечнике крыс: *a* — плоскоклеточная киста желудка, $\times 40$; *b* — плоскоклеточная гиперплазия в безжелезистом отделе желудка, $\times 100$; *c* — плоскоклеточная папиллома безжелезистого отдела желудка, $\times 40$; *d* — базальноклеточная гиперплазия железистого эпителия желудка, $\times 100$. Окраска гематоксилином и эозином

В толстой кишке крипты немного укорачивались, имело место незначительная гипертрофия бокаловидных клеток и увеличение числа и размера лимфоидных фолликулов. Только у единичных животных патология имела признаки хронизации воспалительного процесса в виде атрофии слизистой оболочки с обеднением ее структурных элементов и склерозированием.

Не было статистических различий между группами животных (точный критерий Фишера, $p > 0,05$) по частоте обнаружения эрозий и язв слизистой оболочки кишечника. Эрозии и язвы встречались менее чем у 1 % животных, только в толстой кишке количество эрозий увеличивалось до 1,3 %. Преимущественно небольшого размера, единичные находились в острой стадии (рис. 3, *c*, *d*), но можно было наблюдать в разных стадиях заживления в виде краевой эпителизации, воспалительной инфильтрации лимфоцитами, плазмócитами и нейтрофилами по периферии дефекта слизистой оболочки, а в области дна большое количество фибробластов. В отдельных случаях отмечены признаки рубцевания.

Стоит описать находки, которые не были включены в статистический анализ, поскольку были исключительно редки и обнаружены в единичных случаях.

У одного животного был выявлен врожденный порок развития мягких тканей слизистой оболочки желудка в виде плоскоклеточной кисты, расположенной в области гребня, распространяющейся на подслизистую и мышечную оболочки (рис. 4, *a*). Четко отграниченная от окружающих тканей киста содержала в центре пластины кератина, по периферии присутствовала очень слабо выраженная лимфоцитарная инфильтрация.

У одного сентинельного животного и двух, подвергавшихся процедуре введения, были выявлены участки плоскоклеточной гиперплазии в безжелезистом отделе желудка (рис. 4, *b*). В данных областях плоский эпителий был резко утолщен на уровне шиповатого слоя, отмечена выраженная пролиферация эпителиальных клеток с усиленной митотической активностью, повышенная кератинизация. Отмечено образование неразветвленных папиллярных выростов без выраженного фиброваскулярного слоя. В одном случае была выявлена плоскоклеточная папиллома, которая имела разветвленную хорошо выраженную строму, эпителий при этом без признаков дисплазии, но с выраженным гиперкератозом (рис. 4, *c*).

У одной крысы была выявлена базальноклеточная гиперплазия: участок базофильно окрашенных клеток, четко отграниченный от железистого эпителия желудка неповрежденной базальной мембраной (рис. 4, *d*).

ВЫВОДЫ

Как показало исследование — спонтанные патологии желудочно-кишечного тракта в популяции лабораторных крыс линии Wistar не редкость. У клинически здоровых животных можно выявить незначительные по своей интенсивности и распространенности воспалительные заболевания во всех отделах кишечника. Но данные патологические состояния спорадические, и обнаружить их можно не более чем у 5 % животных по отдельным заболеваниям. Важно понимать, что данные показатели не являются абсолютными для всего вида животных, а отражают состояние здоровья в конкретном виварии. На частоту их развития могут повлиять не только пол, возраст

животных, но, хоть и стандартизированные, но относительно различные условия содержания в вивариях, такие как состав используемого корма или подстила, качество воды, кроме того не маловажным фактором становится психологическое состояние животных [11, 19, 20].

Определение частоты возникновения фоновой патологии у сентинельных и у интактных животных дало возможность доказать, что непосредственно манипуляция внутрижелудочного введения оказывает влияние на морфологическое состояние органов и тканей пищеварительной системы, но исключительно в верхнем ее отделе. Неминуемая многократная травматизация слизистой оболочки, связанная с механическим контактом твердого металлического зонда с эпителием, провоцирует развитие воспалительных заболеваний пищевода и желудка. В ходе исследования было отмечено почти двукратное увеличение количества случаев катарального эзофагита и гастрита, эрозивно-язвенного поражения слизистой оболочки пищевода и желудка в железистом его отделе и гиперкератоза в безжелезистой его части. Но на ниже лежащие отделы кишечника процедура введения влияния не оказала, и отличий по частоте развития патологии выявлено не было.

Исключительно повреждающим действием манипуляции можно объяснить немногочисленные случаи ятрогенной патологии — перфорация пищевода с последующим развитием тяжелых гнойных процессов в мягких тканях. Однако вероятность такого грубого повреждения напрямую зависит от квалификации персонала, длительности периода введения и психологического состояния животных — их готовности переносить данную манипуляцию [1–3].

Кроме того, в ходе изучения морфологии желудочно-кишечного тракта было выявлено несколько единичных патологий, которые описаны в литературе [10, 11, 20], но встречаются крайне редко. Это плоскоклеточная киста, базальноклеточная и плоскоклеточная гиперплазия эпителия желудка и папиллома его безжелезистого отдела. И если в ходе изучения органов и тканей животных патоморфологу «посчастливиться» обнаружить данные структуры, то не стоит сразу приписывать их появление воздействию изучаемых веществ. Необходимо оценить, как сам тестируемый объект, его предполагаемый механизм действия, так и длительность исследования. Впрочем, это относится и к чаще наблюдаемым патологиям пищеварительной

системы. Исследователь должен не только фиксировать наличие заболеваний, а также, формируя заключение, дифференцировать фоновую патологию от патологии, спровоцированной вводимым веществом. Ведь, например, после однократного введения не стоит ожидать картины хронического атрофического гастрита, а в конце отсроченного двухнедельного наблюдения — острой язвы.

Тем не менее это тема отдельной дискуссии, а результаты данного исследования будут полезны как врачам-патоморфологам, непосредственно изучающим органы и ткани лабораторных животных, так и специалистам-исследователям, ведущим доклинические исследования, для анализа полученной информации и более полноценного сопоставления результатов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого автора: Я.А. Гущин, М.Н. Макарова — написание статьи, анализ данных; М.Н. Макарова, П.Д. Шабанов — редактирование статьи, разработка общей концепции.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study. The contribution of each author: Ya.A. Gushchin, M.N. Makarova — manuscript drafting, writing and pilot data analyses; M.N. Makarova, P.D. Shabanov — paper reconceptualization and general concept discussion.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Germann P.G., Ockert D. Granulomatous inflammation of the oropharyngeal cavity as a possible cause for unexpected high mortality in a Fischer 344 rat carcinogenicity study // *Lab Anim Sci*. 1994. Vol. 44. P. 338–343.
2. Hoggatt A.F., Hoggatt J., Honerlaw M., Pelus L.M. A spoonful of sugar helps the medicine go down: a novel technique to improve oral gavage in mice // *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010. Vol. 49, No. 3. P. 329–334.
3. Turner P.V., Vaughn E., Sunohara-Neilson J., et al. Oral gavage in rats: animal welfare evaluation // *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012. Vol. 51, No. 1. P. 25–30.
4. Nebendhal C. Routes of administration. In: *The laboratory rat*. Ed. by G.J. Krinke. London: Academic Press, 2000. P. 463–483. DOI: 10.1016/B978-012426400-7.50063-7
5. Murphy S.J., Smith P., Shaivitz A.B., et al. The effect of brief halothane anesthesia during daily gavage on complications and body

weight in rats // *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2001. Vol. 40. No. 2. P. 9–12.

6. Larcombe A.N., Wang K.C.W., Phan J.A., et al. Confounding Effects of Gavage in Mice: Impaired Respiratory Structure and Function // *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019. Vol. 61, No. 6. P. 791–794. DOI: 10.1165/rcmb.2019-0242LE

7. Arantes-Rodrigues R., Henriques A., Pinto-Leite R., et al. The effects of repeated oral gavage on the health of male CD-1 mice // *Lab Anim*. 2012. Vol. 41, No. 5. P. 129–134. DOI: 10.1038/labani0512-129

8. Turner P.V., Pekow C., Vasbinder M.A., Brabb T. Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation // *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011. Vol. 50, No. 5. P. 614–627.

9. Long G.G., Hardisty J.F. Regulatory forum opinion piece: thresholds in toxicologic pathology // *Toxicol Pathol*. 2012. Vol. 40, No. 7. P. 1079–1081. DOI: 10.1177/0192623312443322

10. McInnes E.F. Background Lesions in Laboratory Animals. A Color Atlas. Elsevier Health Sciences, 2011. 256 p.

11. Sahota P.S., Popp J.A., Hardisty J.F., et al., editors. Toxicologic Pathology: Nonclinical Safety Assessment. 2nd ed. CRC Press, 2018. 1224 p. DOI: 10.1201/9780429504624

12. Blankenship B., Skaggs H. Findings in Historical Control Harlan RCCHanTM: WIST Rats from 4-, 13-, 26-Week Studies // *Toxicol Pathol*. 2013. Vol. 41, No. 3. P. 537–547. DOI: 10.1177/0192623312460925

13. Tucker M.J. Diseases of the wistar rat. London: Taylor & Francis, 1997. 254 p.

14. Damsch S., Eichenbaum G., Looszova A., et al. Unexpected Nasal Changes in Rats Related to Reflux after Gavage Do-

sing // *Toxicologic Pathology*. 2011. Vol. 39, No. 2. P. 337–347. DOI: 10.1177/0192623310388430

15. Damsch S., Eichenbaum G., Tonelli A., et al. Gavage-Related Reflux in Rats: Identification, Pathogenesis, and Toxicological Implications (Review) // *Toxicologic Pathology*. 2011. Vol. 39, No. 2. P. 348–360. DOI: 10.1177/0192623310388431

16. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В. и др. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным // *Международный вестник ветеринарии*. 2013. № 3. С. 78–84.

17. Рыбакова А.В., Макарова М.Н., Кухаренко А.Е., и др. Существующие требования и подходы к дозированию лекарственных средств лабораторным животным // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018. Т. 8, № 4. С. 207–217. DOI: 10.30895/1991-2919-2018-8-4-207-217

18. McInnes E.F., Scudamore C.L. Review of approaches to the recording of background lesions in toxicologic pathology studies in rats // *Toxicol Lett*. 2014. Vol. 229, No. 1. P. 134–143. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.06.005

19. Nolte T., Brander-Weber P., Dangler C., et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse // *J Toxicol Pathol*. 2016. Vol. 29, No. 1S. P. 1S–125S. DOI: 10.1293/tox.29.1S

20. Walker M.K., Boberg J.R., Walsh M.T., et al. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice // *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012. Vol. 260, No. 1. P. 65–69. DOI: 10.1016/j.taap.2012.01.025

REFERENCES

1. Germann PG, Ockert D. Granulomatous inflammation of the oropharyngeal cavity as a possible cause for unexpected high mortality in a Fischer 344 rat carcinogenicity study. *Lab Anim Sci*. 1994;44:338–343.

2. Hoggatt AF, Hoggatt J, Honerlaw M, Pelus LM. A spoonful of sugar helps the medicine go down: a novel technique to improve oral gavage in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010;49(3):329–334.

3. Turner PV, Vaughn E, Sunohara-Neilson J, et al. Oral gavage in rats: animal welfare evaluation. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(1):25–30.

4. Nebendhal C. Routes of administration. In: *The laboratory rat*. Ed. by G.J. Krinke. London: Academic Press; 2000. P. 463–483. DOI: 10.1016/B978-012426400-7.50063-7

5. Murphy SJ, Smith P, Shaivitz AB, et al. The effect of brief halothane anesthesia during daily gavage on complications and body weight in rats. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2001;40(2):9–12.

6. Larcombe AN, Wang KCW, Phan JA, et al. Confounding Effects of Gavage in Mice: Impaired Respiratory Structure and Function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2019;61(6):791–794. DOI: 10.1165/rcmb.2019-0242LE

7. Arantes-Rodrigues R, Henriques A, Pinto-Leite R, et al. The effects of repeated oral gavage on the health of male CD-1 mice. *Lab Anim*. 2012;41(5):129–134. DOI: 10.1038/labani0512-129

8. Turner PV, Pekow C, Vasbinder MA, Brabb T. Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(5):614–627.

9. Long GG, Hardisty JF. Regulatory forum opinion piece: thresholds in toxicologic pathology. *Toxicol Pathol*. 2012;40(7):1079–1081. DOI: 10.1177/0192623312443322

10. McInnes E.F. Background Lesions in Laboratory Animals. A Color Atlas. Elsevier Health Sciences, 2011. 256 p.

11. Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, et al., editors. *Toxicologic Pathology: Nonclinical Safety Assessment*. 2nd ed. CRC Press; 2018. 1224 p. DOI: 10.1201/9780429504624

12. Blankenship B, Skaggs H. Findings in Historical Control Harlan RCCHanTM: WIST Rats from 4-, 13-, 26-Week Studies. *Toxicol Pathol*. 2013;41(3):537–547. DOI: 10.1177/0192623312460925

13. Tucker MJ. *Diseases of the wistar rat*. London: Taylor & Francis, 1997. 254 p.

14. Damsch S, Eichenbaum G, Looszova A, et al. Unexpected Nasal Changes in Rats Related to Reflux after Gavage Dosing. *Toxicologic Pathology*. 2011;39(2):337–347. DOI: 10.1177/0192623310388430

15. Damsch S, Eichenbaum G, Tonelli A, et al. Gavage-Related Reflux in Rats: Identification, Pathogenesis, and Toxicological Implications (Review). *Toxicologic Pathology*. 2011;39(2):348–360. DOI: 10.1177/0192623310388431

16. Makarenko IE, Avdeeva OI, Vanati GV, et al. Possible ways of administration and standard drugs in laboratory animals. *International Bulletin of Veterinary Medicine*. 2013;(3):78–84. (In Russ.)

17. Rybakova AV, Makarova MN, Kukharensko AE, et al. Current requirements for and approaches to dosing in animal

studies. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(4):207–217. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2018-8-4-207-217

18. McInnes EF, Scudamore CL. Review of approaches to the recording of background lesions in toxicologic pathology studies in rats. *Toxicol Lett*. 2014;229(1):134–143. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.06.005

19. Nolte T, Brander-Weber P, Dangler C, et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Gastrointestinal Tract, Pancreas and Salivary Glands of the Rat and Mouse. *J Toxicol Pathol*. 2016;29(1S):1S–12S. DOI: 10.1293/tox.29.1S

20. Walker MK, Boberg JR, Walsh MT, et al. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;260(1):65–69. DOI: 10.1016/j.taap.2012.01.025

ОБ АВТОРАХ

***Ярослав Александрович Гушин**, руководитель отдела лабораторной диагностики; адрес: Россия, Ленинградская обл., 188663, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, корп. 245;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7656-991X>;
e-mail: gushin.ya@doclinika.ru

Марина Николаевна Макарова, д-р мед. наук, директор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>;
e-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Петр Дмитриевич Шабанов, д-р мед. наук, профессор, заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1464-1127>;
eLibrary SPIN: 8974-7477; e-mail: pdshabanov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

***Yaroslav A. Gushchin**, head of the Department of Histology and Pathomorphology;
address: 3-245, Zavodskaya st., Kuzmolovskiy t.s., Vsevolzhskiy district, Leningrad Region, 188663, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7656-991X>;
e-mail: gushin.ya@doclinika.ru

Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.), director general;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>;
e-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Petr D. Shabanov, Dr. Sci. (Med.), professor and head of the S.V. Anichkov Department of Neuropharmacology;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1464-1127>;
eLibrary SPIN: 8974-7477; e-mail: pdshabanov@mail.ru