

Научный журнал. Основан в 2005 году  
Научным центром биомедицинских  
технологий РАМН

---

## Главный редактор

*Н.Н.Каркищенко,  
академик РАРАН, член-корреспондент РАМН*

## Редакционный совет:

Dr. Hans-W.Ackerlmann, профессор (Канада)  
И.П.Ашмарин, академик РАМН (Россия)  
Dr. Iorgen Backmen, профессор (Германия)  
В.А.Быков, академик РАМН и РАСХ (Россия)  
Витан Влахов, профессор (Болгария)  
Dr. Ralf Edwards, профессор (Швеция)  
В.Б.Герасимов, профессор (Россия)  
В.Н.Гурин, академик НАН (Беларусь)  
А.А.Кубатиев, академик РАМН (Россия)  
В.Г.Кукес, академик РАМН (Россия)  
В.К.Лепяхин, член-корреспондент РАМН (Россия)  
Michael Orme, профессор (Великобритания)  
М.А.Пальцев, академик РАН и РАМН (Россия)  
Ю.Л.Перов, член-корреспондент РАМН (Россия)  
К.В.Судаков, академик РАМН (Россия)  
В.П.Фисенко, академик РАМН (Россия)  
В.Н.Ярыгин, академик РАМН (Россия)  
Dr. Solemene Umberto, профессор (Италия)

## Редакционно-издательская группа:

Е.В.Брайцева, М.Н.Жадин, Е.В.Иванова,  
Г.Д.Капанадзе, Ф.З.Магкоева, Ю.С.Макляков,  
Е.Л.Матвеевко, В.А.Михайлов, Г.В. Назаров,  
О.И.Степанова, В.В.Хоронько, Е.Ф.Шмидт

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати  
Свидетельство о регистрации: ПИ № ФС77-21324  
09.06.2005 г.

---

Охраняется Законом Российской Федерации № 5351-1  
«Об авторском праве и смежных правах» от 9 июля 1993 года  
и иными нормативно-правовыми актами. Воспроизведение  
всего издания, а равно его части (частей) без письменного  
разрешения издателя влечет ответственность в порядке,  
предусмотренном действующим законодательством

---

## Адрес редакции:

105064, Москва  
Малый Казенный пер. 5, стр. 1  
res.c.bmt@mail.ru  
Тел.: 561-52-64, 917-32-17

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

- Н.Н. Каркищенко.* Через критерии подобия и аллометрии к валидации и экстраполяции в биомедицине . . . . . 5
- В.Г.Кукес, Д.А.Сычев, Г.В.Раменская, И.В.Игнатъев.*  
Фармакогенетика системы биотрансформации  
и транспортеров лекарственных средств: от теории к практике . . . . . 29
- С.Н.Ларина, И.В.Игнатъев, Н.В.Чебышев, Г.В.Раменская, О.Е.Пасхина.* Оптимизация моделирования биотрансформации лекарственных средств цитохромами СYP-системы . . . . . 48

### ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД

- В.Н. Каркищенко, Е.Ф. Шмидт, Е.В. Брайцева.*  
Исследователи предпочитают мышей BALB/c . . . . . 57
- Г.Д. Капанадзе, Ж.А. Ашуев.* Светлогорская популяция мини-свиней . . . . . 71

### РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

- Ж.А. Ашуев, А.А. Кулаков, Г.Д.Капанадзе.* Использование мини-свиней в экспериментальной дентальной имплантологии . . . . . 81
- Э.Н. Гахова, Н.А. Ивлиева.* Культура дифференцированных нейронов взрослого моллюска – альтернативная модель изучения процессов регенерации нервной системы. . . . . 89
- М.Н. Жадин, Н.М. Захарова, А.Н. Карнеев, И.И. Марушак.*  
Изменения электрической активности переживающего среза неокортекса морской свинки как прогностический показатель эффективности лазерной терапии у больных, страдающих рассеянным склерозом. . . . . 97

### ФАРМАКОЛОГИЯ

- И.П. Ашмарин, Р.А. Данилова, О.И. Рудько.*  
Исследование пролонгированного действия короткоживущих анксиогенных олигопептидов на крысах. . . . . 103
- Ю.С. Макляков, В.В. Хоронько, А.А. Степанов, С.А. Сергеева, И.М. Мякота.*  
Сравнительное изучение фармакокинетики бемитила и его влияния на циркуляторно-метаболическое обеспечение нейронного модуля соматосенсорной коры мозга . . . . . 111
- В.А. Злобин, В.А. Павлов, А.И. Шеньшин, Е.В. Назарова.*  
Изучение воздействия фармакологических соединений на структуру гидратных оболочек. . . . . 120

### ГЕНЕТИКА

- Н.Ю. Сахарова, А.М. Малашенко, Е.Ф. Вихлянцева, Ю.А. Ковалицкая.*  
Влияние аллелей  $Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}$  мутации dominant spotting на продолжительность стадий дробления и жизнеспособность ранних эмбрионов мышей. . . . . 126

<i>Ф.З. Магкоева, Т.Б. Бескова, И.Г. Лильн, А.М. Малащенко, И.И. Полетаева.</i> Влияние мутантных аллелей на поведение мышей в тесте открытого поля . . . . .	136
<i>А.Г. Пирицелани, Н.А. Пирицелани, Н.В. Мамаладзе, Г.А. Пирицелани, Н.Г. Джаджанидзе, Г.Д. Капанадзе.</i> Влияние интерферона на мутагенное и цитотоксическое действие вируса гриппа у лабораторных мышей . . . . .	143

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>В.В. Мартынов, А.М. Малащенко, В.Н. Каркищенко, А.А. Степанов, Т.Б. Бескова.</i> Использование ДНК-маркеров для генотипирования инбредных линий лабораторных мышей . . . . .	149
<i>С.Н. Мякишева, Н.Ю. Сахарова, Н.А. Ивличева.</i> Криоконсервация культивируемых клеток нейробластомы мыши N1E-115 . . . . .	153
<i>Э.Х.Абдрашитова.</i> Морфологическая характеристика болезни Тиззера у лабораторных грызунов . . . . .	158

## ПРАКТИКУМ

<i>Т.Б.Бескова.</i> Модификация метода реципрокной трансплантации кожи у лабораторных мышей . . . . .	161
<i>Л.А.Болотских.</i> Способы стерилизации гранулированного корма для гнотобиотических животных . . . . .	164
<i>Ж.А. Аушев, А.А. Кулаков, Г.Д. Капанадзе.</i> Рентгенологический контроль за процессами костеобразования при непосредственной установке имплантата в лунку удаленного зуба в эксперименте . . . . .	167

## CONTENTS

### REVIEWS

<i>N.N.Karkischenko.</i> From the criterions of similarities and allometry to validation and extrapolation in biomedicine . . . . .	5
<i>V.G.Kukes, D.A.Sychev, G.V.Ramenskaja, I.V.Ignat'ev.</i> Pharmacogenetics of system of biotransformation and drugs transporters: from the theory to practice . . . . .	29
<i>S.N.Larina, I.V.Ignatiev, N.V.Tchebyshev, G.V.Ramenskaya, O.E.Pashkina</i> Optimization of modelling of drug biotransformation by cyp- system cytochromes. . . . .	48

### LABORATORY ANIMALS: MODERN VIEW

<i>V.N. Karkischenko, E.F. Schmidt, E.V. Braitseva.</i> The researchers prefer of BALB/c mice . . . . .	57
<i>G.J.Kapanadze, G.A. Aushev.</i> Svetlogorskaya minipig population . . . . .	71

### RELEVANT AND ALTERNATIVE BIOMODELLING

<i>G.A.Ashuev, A.A.Kulakov, G.J. Kapanadze.</i> Using of minipigs in experimental dental implantology. . . . .	81
<i>N.A.Ivlicheva, E.N. Gakhova</i> The in vitro culture of the differentiated neurons from adult molluscs – is the model for study of regenerative processes of nervous system in cryomedicine . . . . .	89
<i>M.N. Zhadin, Zakharova, A.N. Karneev, N.M. I.I. Marushak.</i> Change of electrical activity of neocortical surviving slices	

of guinea-pig as a prognostical index of laser therapy efficacy in the patients with multiple sclerosis . . . . .	97
--	----

**PHARMACOLOGY**

<i>I.P.Ashmarin, R.A.Danilova, O.I.Rud'ko.</i> Prolonged action of shortlived anxiogenic oligopeptides . . . . .	103
<i>Yu.S. Makljakov, V.V. Khoronko, A.A.Stepanov, S.A. Sergeeva, I.M. Mjakota.</i> Comparative studies pharmacokinetics of bemitile and its influence on the circulatoric-metabolic support somatosensoric cortex neuronal modules . . . . .	111
<i>V.A.Zlobin, V.A.Pavlov, A.I.Shanshin, E.V.Nazarova.</i> Studying of pharmacological compounds influence on the structure of hydrate coats . . . . .	120

**GENETICS**

<i>N.Yu. Sakharova, A.M.Malashenko, E.F.Vikhlyantseva, Yu.A.Kovalitskaya.</i> Influence of mutant alleles Dominant spotting Kit <sup>w-v</sup> and Kit <sup>w-y</sup> on cleavage stages and viability of early mouse embryos . . . . .	126
<i>F.Z.Magkoeva, T.B.Beskova, I.G.Lil'p, A.M.Malashenko, I.I.Poletaeva.</i> The mutant alleles influence on the behavior mice in open-field test. . . . .	136
<i>A.Pirtskhelani, N.Pirtskhelani, N.Mamaladze, G.Pirtskhelani, N.Jajanidze, G.J.Kapanadze.</i> The influence of interferon on the mutagenic and cytotoxic effect of influenza virus in white mice and embryonic . . . . .	143

**BRIEF REPORTS**

<i>V.V.Martynov, A.M.Malashenko, V.N.Karkischenko, T.B.Beskova</i> Using of DNA markers in the genotyping of inbred strains of laboratory mice . . . . .	149
<i>S.N. Myakishveva, N.Yu. Sakharova, N.A Ivlicheva.</i> Cryopreservation of cultivated cells of the mouse N1E-115 neuroblastoma . . . . .	153
<i>E.Kh. Abdrashitova.</i> Morphological characteristic of Tyzzers Disease of Laboratory animals . . . . .	158

**PRACTICE**

<i>T.B. Beskova.</i> Modification of skin grafting method in laboratory mice . . . . .	161
<i>L.A. Bolotskih.</i> Sterilization methods of granulated feeds for gnotobiotic animals . . . . .	164
<i>G.A. Ashuev, A.A. Kulakov, G.J. Kapanadze.</i> X-ray control of boneforming process under direct intraosseons in experiment . . . . .	167



## Через критерии подобия и аллометрии к валидации и экстраполяции в биомедицине

Н.Н.Каркищенко

Научный Центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Аллометрические подобия – это не только взаимные измерения, а, прежде всего, установление сходства морфо-функциональных и иных важнейших параметров животных и человека в целях биомоделирования и экстраполяции. Хотя валидация модели является функцией, аккумулирующей процессы сопоставления и нахождения подобия, она лимитирована подтверждением лишь тех аспектов, которые уже были известны к моменту начала исследований при альтернативном моделировании. Она мало приложима к аспектам экстраполяции с животных на человека. Аллометрические или пространственные подобия подразумевают сходство жизненно важных процессов. При этом необходим учет временного подобия, когда момент времени численно определяется величиной интервала с другим моментом, принятом за начало отсчета. Если все константы аллометрического нелинейного подобия одинаковы, то любое аддитивно безразмерное отношение, найденное в модели, можно переносить на прототип.

**Ключевые слова:** виды подобия, аллометрия, экстраполяция, альтернативное моделирование, валидация.

Эмпирическая аналогия отношений и экстраполяции между человеком и животными лежит в основе биомедицины. Развитие практики моделирования привело к необходимости решения ряда логических проблем этих умозаключений. Поскольку традиционная логика игнорировала как эти проблемы, так и саму форму вывода, врачи и биологи взялись за их решение сами. Важнейшими из них являются проблемы условий правомерности использования таких аналогий для экстраполяционного моделирования [7].

Главный вопрос, который интересует и волнует человечество, это вопрос, что есть «человек», а что есть «личность»? Животные являются зеркальным отражением этой концепции, когда происходит поворот от описания существенных отличий между человеком и животными к поиску подобия между ними. Любое религиозное мировоззрение описывает различия в категориях «человек» и «животное» прежде всего с позиции разума и с позиций ду-

ши. Наличие разума и души считается главными отличиями человека от животного, хотя и ряд других признаков далеки от полной аналогии и подобия, лежащих в основе экстраполяции [7, 9].

**NB!** Исходным понятием теории подобия в её простейшей форме является пространственное подобие. В биомедицинских моделях под ними понимается, прежде всего, сходство морфо-функциональных параметров.

В медико-биологических исследованиях в основном используется *три вида моделей: лабораторные животные, альтернативные тест-объекты и математические модели*. Для того чтобы перенос экспериментальных данных с модели на человека был правомерен, надежен и в принципе допустим, необходимо соблюдение основного условия моделирования, а именно, принципа подобия экспериментальной модели оригиналу, отклик которого на воздействие любого внешнего

фактора окружающей среды она должна воспроизвести. Условия, понятия и принцип подобия реализуется через критерии и константы подобия.

### Многообразия подобия

Остановимся на необходимых условиях подобия и признаках, входящих в определение понятия подобия, *делающих их подобными*. Всегда ли эти признаки совместимы друг с другом и не противоречит ли в некоторых случаях требование тождественности основного уравнения, описывающего явления, требованию наличия преобразований подобия? Уравнение должно описывать подобные явления, иметь одну и ту же форму для целой группы, отвечать условиям гомогенности функций.

Проблема выбора констант подобия связана с определением конкретной формы ограничений, накладываемых на этот выбор. Рассмотрим условия инвариантности функции по отношению к масштабным преобразованиям при экстраполяции.

Пусть функция имеет вид  $F(u_1, \dots, u_n) = 0$ . Такое уравнение описывает целый класс явлений. Выберем из них два явления, для которых имеют место масштабные преобразования  $\forall u$ :

$$\forall u F(u'_1, \dots, u'_n) = 0; \quad (1)$$

$$\forall u F(u''_1, \dots, u''_n) = 0. \quad (2)$$

Здесь  $u'_1, \dots, u'_n; u''_1, \dots, u''_n$  – различные значения величин  $u_1, \dots, u_n$ .

Если два выбранных нами явления подобны, то имеют место масштабные преобразования:

$$u''_1 = k_1 u'_1; \quad (3)$$

$$u''_n = k_n u'_n. \quad (4)$$

Согласно определению подобия, для того чтобы два явления были подобны, требуется сосуществование уравнений:

$$F(u_1, \dots, u_n) \Rightarrow 0; \quad (5)$$

$$\forall u F(k_1 u_1, \dots, k_n u_n) \Rightarrow 0 \quad (6)$$

Для этого необходимо, чтобы  $F(k_1 u_1, \dots, k_n u_n)$  тождественно обращалось в нуль при значениях переменных, удовлетворяющих  $F(u_1, \dots, u_n) = 0$ . Это возможно лишь при:

$$\begin{aligned} \forall u F(k_1 u_1, \dots, k_n u_n) &\Rightarrow \\ &\Rightarrow \varphi(k_1, \dots, k_n) F(u_1, \dots, u_n), \end{aligned} \quad (7)$$

когда равенство нулю правой части неминуемо влечет за собой равенство нулю левой.

Таким образом, в том случае, если  $F$  описывает подобные явления при умножении всех величин, стоящих под знаком функции на постоянные множители, все постоянные выносятся из-под знака функции, образуя некоторый множитель для функции в целом. Масштабное преобразование отдельных переменных биомодели приводит к масштабному преобразованию всей функции в целом. Функции, обладающие таким свойством, носят название *гомогенных*. Уравнение же, которое при переносе всех его членов в левую часть принимает вид  $H=0$ , где  $H$  – гомогенная функция, называется *гомогенным уравнением*.

Итак, чтобы функция могла описывать подобные явления, необходимо, чтобы она, так же как и соответствующее уравнение, была гомогенной в биомодели. Существует класс *степенных* функций, которые являются гомогенными независимо от выбора множителей  $k_i$ . Возьмем уравнение, в левой части которого находится степенное выражение:

$$\forall u F(u_1, \dots, u_n) \Rightarrow u_1^{a_1}, \dots, u_n^{a_n} \Rightarrow 0. \quad (8)$$

Подставляя  $u_i = k_i u_i$ , получим:

$$\begin{aligned} \forall u F(k_1 u_1, \dots, k_n u_n) &\Rightarrow \\ \Rightarrow (k_1 u_1)^{\alpha_1} \dots (k_n u_n)^{\alpha_n} &\Rightarrow 0. \end{aligned} \quad (9)$$

или

$$\begin{aligned} \forall u F(k_1 u_1, \dots, k_n u_n) &\Rightarrow \\ \Rightarrow (k_1^{\alpha_1}, \dots, k_n^{\alpha_n}) (u_1^{\alpha_1}, \dots, u_n^{\alpha_n}) &= 0. \end{aligned} \quad (10)$$

то есть, полагая  $k_1^{\alpha_1} \dots k_n^{\alpha_n} \Rightarrow k$ , получим:

$$\begin{aligned} \forall u F(k_1 u_1, \dots, k_n u_n) &\Rightarrow \\ \Rightarrow k F(u_1, \dots, u_n) &\Rightarrow 0. \end{aligned} \quad (11)$$

Такие функции можно назвать, *безусловно гомогенными*. Они остаются инвариантными по отношению к любым масштабным преобразованиям, как следствие самой структуры функции. Остальные функции являются инвариантными лишь по отношению к определенным типам масштабных преобразований, удовлетворяющих тем или иным условиям. Эти функции называются *условно гомогенными*. К ним относится подавляющее большинство функций, с которыми приходится встречаться при решении задач биомедицинского моделирования. В биомедицине, как и в целом в формально-логическом моделировании, общепринятыми являются пять критериев подобия. Остановимся на первых четырех:

- **первый критерий подобия** отображает *пространственное сходство* или *общность морфо-функциональных характеристик* органов и систем у прототипа человека и его биологической или альтернативной модели (экстраполяция 1-го уровня);
- **второй критерий подобия** отображает единство или сходство метаболических, нейрорегуляторных, двигательных, эндокринных и экзокринных *функций или их аналогов* в альтернативных моделях (экстраполяция 2-го уровня);
- **третий критерий подобия** отображает единство или максимальное сходство

эффектов *критических систем и органов* по их реагированию на выбранное или исследуемое воздействие (экстраполяция 3-го уровня);

- **четвертый критерий подобия** выражает *сопоставимость констант* или *иных параметров*, количественно оцениваемых и математически описываемых в системе гомогенных функций у прототипа, животного или альтернативного объекта (экстраполяция 4-го уровня).

Соблюдение в модели этих критериев подобия, казалось бы, позволяет осуществлять *эффективную экстраполяцию* с модели на прототип и обратно. Некоторые авторы априорно полагают, что при соблюдении этих критериев можно достигнуть идеальной однозначности в биомоделировании. К сожалению это не так, а точнее — далеко не так.

## Пятый вид подобия

Мы считаем сомнительным излишний оптимизм ряда авторов, считающих выполнение условий четырех критериев подобия достаточным для объявления эффективности экстраполяции, проиллюстрируем наш скепсис. Представим себе, что мы зафиксируем в прыжке или беге человека и разные виды животных и будем снимать параметры. На первом прыжке и на сотом мы получим абсолютно разные показатели, а уж на многотысячном — лошадь или кенгуру не только оставят всех позади по скоростным показателям, но и по чисто материальным проявлениям, если не в виде трупов, то уж полутрупов точно. Иными словами, мы должны внести еще ряд критериев, которые бы оценили массу динамических, энергетических, силовых, психофизических и т.д. характеристик [1, 9, 11, 15]. Как мы видим, казалось бы, крайне простая проблема неожиданно и существенно усложнилась. Каков же выход из этого тупика?

Существуют формулировки достаточных условий подобия, в которых исключено понятие о критериях. Так как условия однозначности относятся и к любой подсистеме, составляющей часть рассматриваемой системы, то понятие подобия условий однозначности уже должно содержать в себе и условие инвариантности их критериев. Поэтому можно сказать: *системы подобны, если их условия однозначности подобны*. При этом все время предполагается, что уравнения, описывающие оба явления, имеют одну и ту же форму. Таким образом, понятие подобия можно сформулировать как подобие условий однозначности при тождественности основной системы уравнений. Это дает достаточное основание для утверждения подобия явлений. То есть для подобия явлений, кроме тождественности уравнений необходимы: геометрические подобия, *временные подобия*, подобия биологических констант и подобия начальных и граничных условий, функций и эффектов.

Итак, мы столкнулись с *пятым, временным видом подобия*, не входящим в одно из подмножеств пространственного подобия. Определим его место в биомоделировании.

**NB!** Временное подобие определяется аналогично геометрическому. Момент времени численно определяется величиной интервала между ним и другим моментом, принятым за начало отсчета. Отрезок времени, в течение которого происходит явление, состоит из бесконечного множества таких моментов – временных «точек».

Два биологических явления будут подобными во временном отношении в том случае, если все временные точки одного из них можно получить при помощи умножения в одно и то же  $k$  число раз чисел, выражающих соответственные временные точки другого биологического же явления:

$$\tau'' = k\tau'. \quad (12)$$

Например, такое преобразование во времени аналогично однородной конформации биомолекул в пространстве, при помощи которой определяется пространственное подобие. Его можно рассматривать как *масштабное преобразование*. Тогда, как и в случае пространственного подобия, соответственные временные точки подобных явлений будут эквивалентны в числовом отношении, отличаясь друг от друга лишь масштабом.

Поскольку для любых двух пар соответственных точек:

$$\begin{aligned} \tau_1'' &= k\tau_1' \text{ и } \tau_2'' = k\tau_2', \\ \text{то } \tau_1'' - \tau_2'' / \tau_1' - \tau_2' &= k, \end{aligned} \quad (13)$$

то есть отношение любого временного отрезка явления к соответственному отрезку подобного ему явления есть величина постоянная. Она, как и в случае пространственного подобия, носит название *множителя преобразования*.

Группы подобных во временном отношении явлений отличаются друг от друга лишь абсолютной величиной множителя преобразования. Временное подобие носит название *гомохронии*. В частном случае при  $k = 1$  оно переходит в *синхронию*, так же, как пространственное подобие при  $k=1$  превращается в равенство.

О биологическом подобии систем, то есть о подобии их параметров, определяющих физиологические свойства, можно говорить лишь в том случае, если эти параметры *не являются величинами постоянными*. В противном случае любые две биосистемы были бы подобны, так как отношение двух постоянных есть величина постоянная. Иными словами, мы имели бы *в качестве модели кошки не другую кошку, а ее саму*. Это конечно идеальная модель, но вряд ли она нам интересна с точки зрения биомоделирования и экстраполяции.

При моделировании любых характеристик, изменяющихся во времени и пространстве, будь то скорость развития лекар-

ственных эффектов или побочных проявлений, параметров фармакокинетики, динамики процессов воспаления и репарации при воздействии микробных факторов и т. д. [3, 7, 10], необходимость определения степени подобия используемой модели по временному критерию обязательна и требует внесения соответствующих констант.

Однако, даже при соблюдении всех условий, результаты единичного медико-биологического опыта, выраженные в форме зависимостей между размерными величинами, не могут быть распространены на другие явления. Такие результаты характеризуют лишь единичное. Например, с учетом временного подобия, возможно, перенести некоторые критерии моделирования гидродинамики на рыбках зебробришах в отношении дельфина или тюленя, но не в отношении слона или человека. Иными словами, если мы будем выражать результаты опытов не в форме зависимостей между размерными величинами, а, пользуясь критериями подобия, то записанный в таком виде результат будет характеризовать уже не единичное явление, а целую группу явлений, то есть все явления, подобные друг другу. Пусть удастся показать, что  $\pi = k$ , где  $\pi$  – критерий подобия,  $k$  – определенное число. Данное равенство соответствует различным условиям опыта со все возможными численными результатами. Оно утверждает, что при всем разнообразии числовых данных определенные их комбинации, составляющие критерии подобия, подчинены соотношению, выраженному в данном равенстве. Поскольку таких комбинаций множество, устанавливается связь между разнообразными явлениями, которые, однако, все должны принадлежать к одной группе, то есть быть подобными друг другу.

Установив эмпирически зависимость  $\pi = k$ , мы получим право переносить результаты опытов с одних явлений на другие явления, существенно отличающихся от первых. Например, результаты, полученные при наблю-

дении движения крови в артерии определенного размера, могут быть перенесены на движение жидкости с другими физическими свойствами при других определяющих размерах системы. Таким образом, мы можем использовать не биологическую, а физическую или физико-химическую модель сосуда, насытить ее датчиками и поэтапно исследовать все интересующие нас параметры крови: скорость движения, вязкость, изменения агрегатного состояния и т.д. Это может оказаться весьма полезным устройством для изучения влияния и временных параметров лекарств и ксенобиотиков [2, 5]. Последующие математические описания процесса дадут нам право использования принципов *максимально полного подобия* систем для биомоделирования на животных и *экстраполяции 5-го уровня* в отношении человека.

### Альтернативы аллометрии и проблем переноса

Структурно-функциональные сходства субмолекулярных, молекулярных и клеточных образований живых существ наталкивают многих исследователей на мысль легкости или, уже, по крайней мере, принципиальной возможности экстраполяции данных практически с любого объекта на человека. Многие характеристики функционирования человека *невозможно смоделировать* в эксперименте [3, 5]. Иногда в этом нет и необходимости, но зачастую этому препятствуют непреодолимые пока методологические, методические или технические ограничения [20, 22]. Но даже в методически доступных исследованиях мы не всегда просто получаем искомые данные.

Рассмотрим пример клеточного уровня, дабы удобнее было сравнить с альтернативными моделями. В таблице 1 показаны численные характеристики пулов эритроидной и миелоидной линии крови у человека и животных.

**Абсолютные и относительные к человеку (в скобках)  
показатели эритропоэза и миелопоэза**

Показатель		Мышь	Крыса	Собака	Мини-свинья	Человек
Эритроидная линия	Продукция, (кл/сут × кг) × 10 <sup>9</sup>	10,8 (0,77)	2,9-3,3 (0,21-0,24)	13 (0,93)	13,7 (0,98)	14,0 (1,0)
	Содержание клеток в делящемся пуле, (кл/кг × 10 <sup>9</sup> )	2,27 (0,5)	1,85 (0,41)	5,48-10,3 (1,2-2,27)	4,1-5,7 (0,9-1,25)	4,55 (1,0)
	Время пребывания в крови, сут.	23 (0,18)	50 (0,40)	90-135 (0,71-1,07)	115-130 (0,92-1,03)	126 (1,0)
Миелоидная линия	Продукция, (кл/сут × кг) × 10 <sup>9</sup>	0,57-0,61 (0,26-0,28)	0,48-0,55 (0,22-0,25)	0,78-3,05 (0,35-1,38)	1,7-2,6 (0,77-1,18)	2,2 (1,0)
	Содержание клеток в делящемся пуле, (кл/кг × 10 <sup>9</sup> )	1,78-1,82 (0,63-0,64)	1,52-1,7 (1,88-0,6)	2,34-5,5 (0,82-1,93)	2,2-3,5 (0,77-1,23)	2,85 (1,0)
	Время пребывания в крови, сут.	0,18-0,2 (0,6-0,67)	0,15-0,18 (0,5-0,6)	0,23-0,4 (0,77-1,33)	0,3-0,35 (1-1,12)	0,3 (1,0)

Это наглядный пример статического, зафиксированного во времени экспериментального материала, вполне или частично отвечающего одному из четырех критериев подобия. Чтобы исходные параметры были более конгруентны, следует сделать экспериментальный шаг к пятому критерию подобия, а в нашем случае к оценке кинетических характеристик процессов кроветворения у животных и человека по времени пребывания в крови, т.е. экстраполяции 5-го уровня.

Поскольку суть экспериментальных исследований состоит в изучении наиболее общих закономерностей изменений в организме человека под влиянием внутренних процессов и факторов среды, необходимы, безусловно, корректные подходы, пути и методы экстраполяции и переноса данных с биообъектов, будь то животные или тест-системы. Следует всегда помнить, что механизмы работы клеток в сложных системах животных-макроорганизмах, в клеточных культурах и одноклеточных организмах могут быть столь различны, что речь

будет идти уже не о количественных различиях, а об иных качественных особенностях и существенно иных закономерностях.

**NB!** Возникает вполне закономерный вопрос: а как далеко может простираться *понятие аллометрии* и может ли оно быть применено в отношении альтернативных моделей. Ведь буквально *allos* (греч.) – другой, иной. Аллометрия – это сравнительные измерения разных видов живых организмов по каким-то общим признакам. Но аллометрия – это не только взаимные измерения, а прежде всего установление сходства морфо-функциональных характеристик и иных важнейших параметров в целях, прежде всего, экстраполяции.

Корректность экстраполяции особенно важна при использовании в исследованиях альтернативных биологических моделей. Наиболее часто используемые альтернативные модели, как дафнии, рыбы, инфузории, светящиеся бактерии, сперматозоиды быка,

клеточные культуры, по всем или многим критериям не подобны человеку [12, 26]. В силу особенностей таксономических механизмов организации живых структур имеет место резкое и теоретически почти непредсказуемое варьирование различий концентраций реагирования биотест-объектов на отдельные вещества значимых, т.е. близких к предельно допустимым концентрациям этих соединений для человека [3, 7, 12]. Независимо от того, какой метод биотестирования используется, почти во всех случаях для большинства тестируемых веществ концентрации реагирования биотест-объектов в тысячи и миллионы раз превышают ПДК для человека [7, 16, 26].

*Меганечувствительность биотестов* к концентрациям для ряда веществ, значимым для человека, помимо биологического *неподобия моделей*, имеет и другие причины, одна из которых — экстраполяция данных кратковременных, большей частью острых, опытов на биотест-объектах на условия хронического воздействия на человека, когда летальные (или близкие к ним) концентрации, полученные при биотестировании, приравниваются к уровням предельно допустимых концентраций. Кроме того, такой фактор, как кумуляция, весьма мало значим для биотест-объектов по сравнению с человеком. В частности, различия в оценках кумулятивности веществ для человека и дафний, достигают 4–6 порядков. Поэтому биотестирование изначально непригодно для оценки кумулятивных свойств веществ для человека.

### Корректность дозопереноса

Математические уравнения, связывающие протекающие во времени биологические реакции организма с массой тела, дают возможность рассчитать коэффициенты или константы подобия относительных скоростей этих реакций для лабораторных животных и человека. *Константы подобия* показы-

вают, во сколько раз быстрее или медленнее может развиваться, например, интоксикация у животного по сравнению с человеком из-за большей или меньшей интенсивности биологических процессов [13, 19, 29]. Они составляют, по нашим расчетам, если *человека принять за единицу*: для мыши — 9,7, крысы — 5,2, морской свинки — 4,3, кролика — 2,5, собаки — 1,7, овцы — 1,4, мини-свиньи — 0,95 и лошади — 0,75 (табл. 2). При переходе на реальное время это означает, что, например, интоксикация или побочная реакция лекарств, развивающаяся у крысы за 3 месяца, проявится у мыши уже через 1,5 месяца, у кролика — через 6 месяцев, собаки — 1 месяц, человека — 16 месяцев, а у лошади — только через 22 месяца воздействия вещества. Существование аллометрических зависимостей времени для развития эффектов интоксикации необходимо принимать во внимание, оценивая достаточность длительности фармакологических и токсикологических опытов при экстраполяции данных с животных на человека [13, 14, 24, 27].

Мы убедились в том, что коэффициенты переноса при оценке токсичности ксенобиотиков и фармвеществ с биотест-объектов на человека могут иметь значения нескольких миллионов. Здесь есть еще одно кардинальное различие, носящее пока непреодолимый характер для многих альтернативных моделей. Оно связано необходимостью оценки эффективных доз для фармакологических, биологически активных веществ, ксенобиотиков и токсикантов. Клеточные культуры не позволяют судить о фармако- и токсикодинамике веществ, выявить механизмы их системного действия (*а ведь в этом вся соль научного поиска!*), осуществить выбор первой дозы нового лекарственного средства, даже для первой фазы клинической оценки [5, 6]. Сомнительно также, что это возможно будет сделать на насекомых, рыбах и амфибиях в требуемом объеме. Но и на животных они бывают весьма значительны, и достигать сотен единиц (табл. 2).

## Примерные соответствия дозопереноса

Биообъекты	Мышь 20 г	Крыса 200 г	Мор- ская свинка 400 г.	Кролик 1,5 кг	Кошка 2 кг	Обезья на 4 кг	Собака 12 кг	Мини- свинья 40 кг	Человек 70 кг
Мышь, 20 г	1	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	221,7	387,9
Крыса, 200 г	0,14	1	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	37,7	66,0
Морская свинка, 400 г	0,08	0,75	1	2,25	2,4	5,2	10,2	17,8	31,2
Кролик, 1,5 кг	0,01	0,25	0,44	1	1,08	2,4	4,5	8,1	14,2
Кошка, 2 кг	0,03	0,23	0,41	0,92	1	2,2	4,1	7,4	13,0
Обезьяна, 4 кг	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1	1,9	4,6	8,1
Собака, 12 кг	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1	1,77	3,1
Мини-свинья, 40 кг	0,0015	0,01	0,018	0,04	0,034	0,09	0,18	1	1,77
Человек, 70 кг	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,31	1,03	1

Необходимо предупредить, что эта таблица, построенная по расчетным параметрам удельной поверхности тела человека и животных, т.е. наиболее представительной отражающей всеобщую аллометрическую закономерность не только для животного, но и растительного мира, тем не менее, не может быть принята за абсолют. Эффекты и дозовые характеристики будут меняться в зависимости от сезона, климато-географических параметров, условий содержания и, бог знает, от скольких еще неучтенных переменных.

В отличие от научных ортодоксов (очень несимпатичные типы), достаточно гибкие ученые-конформисты (более приятные в общении) решили не брать на себя всю меру ответственности по *экстраполяционным коэффициентам*, а предложили самим экспериментаторам взять на себя труд по вычислению величин переноса

( $E$ ) и ответственность по обоснованию прогностических параметров:

$$E = \frac{1}{R} \times \sum_{k=1}^{k=\tau} X_k \times \sum_{i=1}^{i=g} \frac{D_i}{X_{jk}} \times \left[ \begin{matrix} j=g & j=g \\ S_1 : S_2 \\ j=1 & j=1 \end{matrix} \right] (X_k - X_{jk}) \quad (14)$$

где  $R$  — число принятых параметров, в которых приведены характеристики основного обмена одновременно для человека ( $X_k$ ) и всех видов ( $X_{jk}$ ,  $X_{jk}$ ) животных, используемых для прогнозирования. Предполагается, что в каждом первоисточнике приведены материалы, полученные одним методом в одних и тех же условиях; если же в источнике приведены результаты для разных условий, например для зимы и лета, тогда количество источников надо считать увеличенным на единицу.<sup>1</sup>  $D_i$  — величины равноэффективных доз препарата для каждого ( $i$ ) вида животных;  $G$  —

число видов животных, используемых для экстраполяции;  $S_1$  и  $S_2$  – ряды значений в диапазоне  $j$  от 1 до  $g$ , при  $j$ , которые являются сомножителями, равными числу  $j$  в пределах от 1 до  $G$ . При этом величина равноэффективной дозы у вида животных с максимальной удельной поверхностью тела должна быть наименьшей. Если же она велика, то вместо  $D$  надо подставлять обратные относительные величины, полученные в результате деления равноэффективной дозы у животных с минимальной удельной поверхностью тела на величину равноэффективной дозы  $i$ -го вида млекопитающих.

Это вряд ли можно привести как пример корректного математического моделирования, но, по крайней мере, выглядит угрожающе серьезно. Кстати, далеко не все математические описания можно отнести к моделям, несмотря на то, что авторы их так величают.

### Оптимизация аллометрических уравнений

Общеизвестно и общепринято, что величины биологического параметра  $p$ , (период полувыведения лекарства в плазме, очищенного от выделения почками, рис. 1), ежедневные потребности в энергии, частота сердечных сокращений, масса почек, является масштабом от веса тела ( $W$ , кг) для широкого ряда видов позвоночных. Их типичная кривая взаимоотношений становится очевидной. Хотя в случае оценки частоты сердечных сокращений, например, прослеживается тенденция, при которой, чем больше масса, тем меньше частота, тем не менее, градиент линии все же показывает на повышение [25].

1 Предполагается, что в каждом первоисточнике приведены материалы, полученные одним методом в одних и тех же условиях; если же в источнике приведены результаты для разных условий, например для зимы и лета, тогда количество источников надо считать увеличенным на единицу.

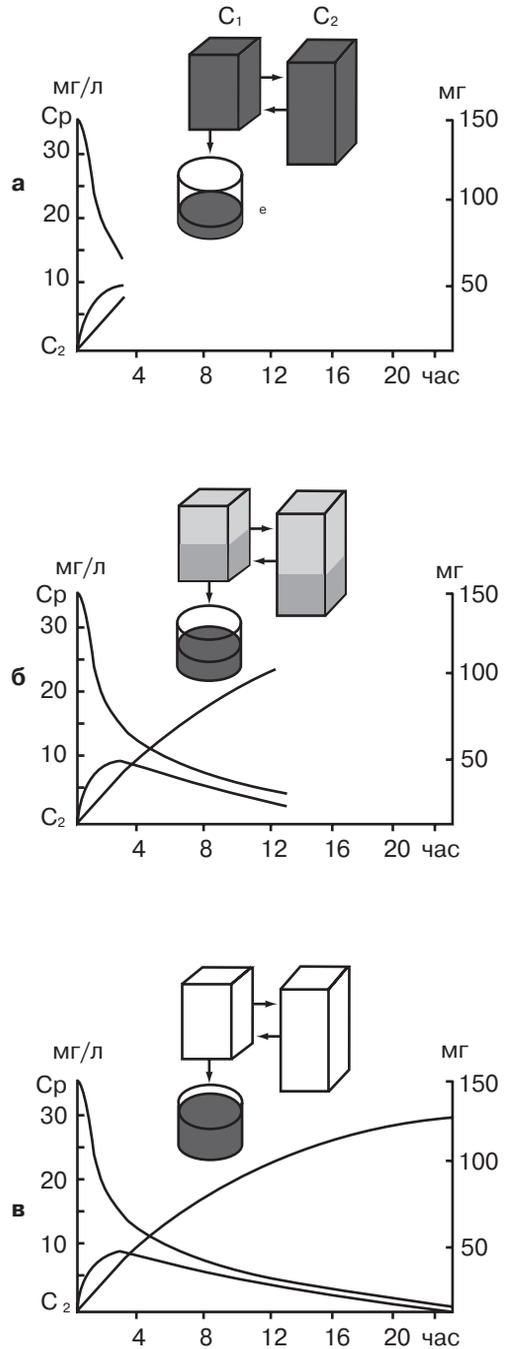


Рис. 1. Изменения концентрации ( $C_p$ ) лекарственного препарата в центральной камере модели ( $C_1$ ) и в периферической модели ( $C_2$ ).

а, б, в – периоды фармакокинетики

Отображение любых экспериментальных данных в логарифмическом масштабе и для оси  $y$  и для оси  $x$  как на рис. 1, т.е.  $\log p$  от  $\log W$ , обычно дает расположение точек на прямой линии (рис.2). Такая линия может быть выражена уравнением:

$$\log p = \log c + b \times \log W, \quad (15)$$

где  $b$  – градиент (наклон) линии и  $c$  – отрезок, отсекаемый на оси  $y$ . Это уравнение может быть трансформировано через антилогарифмы до аллометрической формы:

$$p = a/W^b, \quad (16)$$

где  $a$  – антилогарифм  $c$ . Значения  $a$  и  $b$  можно определить этим способом, эти аллометрические уравнения можно очень просто решить, используя компьютер для прогнозирования  $p$  из известного  $W$ , для видов по которым этот параметр не измерен.

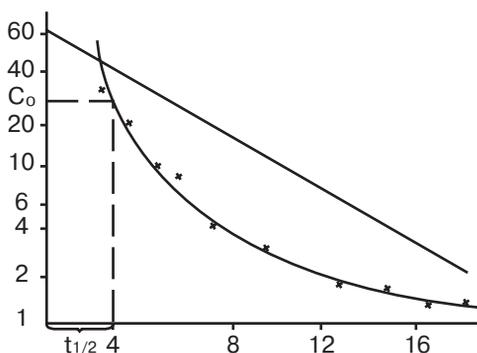


Рис 2. Изменение концентрации лекарственного препарата в зависимости от времени. Ось ординат – концентрация  $C$ ; ось абсцисс – время  $t$ . Время убывания концентрации препарата в 2 раза – период полувыведения  $t_{1/2}$ .

Дополнительно к прогнозированию значений величин, аллометрические уравнения необходимы для обобщения данных. Определение величины  $b$  полезно в отбрасывании биомеханизмов, которые не зависят от веса тела. Например, если некоторые параметры, описываемые нормой физиологического процесса, определены как соотношение с  $W^{0.67}$ , это может быть вызвано

эффектом поверхности площади, т.е. площадь поверхности  $S$  между телами разных видов также будет масштабирована в такой же пропорции  $W^{0.67}$  [7, 13, 14].

Когда используют аллометрические уравнения для оценки, например, соответствующих интервалов в дозах лекарств или дневных потребностях в энергии, важно понимать относительность этих процедур оценки. Следует иметь в виду, что аллометрические уравнения не описывают абсолютных математических величин [24].

Эти статистические обобщения дают описание того, что параметры зависят от количества и природы данных, на которых они основаны и статистических методов, которыми они были получены. Существуют методологические проблемы, которые должны быть решены прежде, чем будет сделан анализ вариации между видами и даны основные прогнозы между объектами, с учетом факторов, которые ограничивают относительность и точность оценок, сделанных на основе аллометрических уравнений [23].

## Об удельной поверхности и массе тела

Аллометрические уравнения являются выражением регрессии, которая описывает вариацию одного параметра в зависимости от другого, обычно от веса тела. Есть несколько видов уравнений регрессии (линейная регрессия, основная ось и снижение от основной оси), и, если корреляция  $r$  от  $W$  не слишком велика, найденные величины градиента и отрезок, отсекаемый на оси  $y$ , будут зависеть от выбранного метода для нахождения регрессии. Короче, аллометрические уравнения зависят от способа выбранного для их нахождения, т.к. они являются статистической аппроксимацией, а не функциональной математической зависимостью. Но во всех этих случаях возникает «философская» проблема курицы и яйца. Действи-

тельно, что же первично, что следует взять за базис — массу тела или его удельную поверхность? Технически массу измерить неизмеримо проще, нежели поверхность. К счастью, многочисленными исследованиями показана связь между массой тела и его поверхностью, приведенной в формуле шара в условиях земной гравитации [29].

Хотя математические модели уже давно и успешно используются в биологии и медицине, проблемы оптимизации и систематизации таких моделей, оценки их эвристической значимости, определения граничных условий применения в конкретных условиях нуждаются в дальнейших исследованиях и интерпретациях.

Важнейшее значение для интерпретации экспериментов, проведенных на животных, с учетом размера тела и основных физиологических показателей различных видов млекопитающих позволяет делать некоторые заключения относительно экс-

траполяционных характеристик организма человека и его функций.

Важными в этом отношении являются такие показатели, как интенсивность метаболизма, анатомия, частота сердечных сокращений и химия организма. Существуют впечатляющие корреляции этих показателей с размерами организма [6, 14, 22].

Одним из таких показателей, как мы уже указывали, является использование в фармакологии и токсикологии *единицы удельной поверхности* тела млекопитающих [7]. Как это ни странно, но мы все с паранойальным упорством рассчитываем *ED, MD, LD, CD* в мг/кг, а не в мг/см<sup>2</sup>. В то же время многочисленные данные для огромного количества лекарств и ксенобиотиков показывают, что если равноэффективные дозы для человека и животных различаются *в разы* по соотношению поверхности тела, то по соотношению массы тела *в сотни и тысячи раз*. Это легко пересчитать исходя из данных табл. 3.

Таблица 3

**Интегральные показатели и соотношения масс, поверхностей и констант подобия биореакций у животных и человека**

Вид животного	Интегральные показатели			
	Средняя масса тела	Удельные поверхности тела, см <sup>2</sup>	Отношение масса, поверхность	Константы подобия биореакций
Мышь	30 (0,0003)	61 (0,003)	0,49 (7,94)	9,7
Хомяк	130 (0,002)	250 (0,014)	0,52 (7,48)	7,8
Крыса	200 (0,003)	304 (0,017)	0,66 (5,894)	5,2
Морская свинка	400 (0,006)	480 (0,027)	0,84 (4,631)	4,3
Кролик	1500 (0,02)	1240 (0,07)	1,21 (3,215)	2,5
Собака	12000 (0,17)	4890 (0,27)	2,46 (1,58)	1,7
Овца	60000 (0,858)	7000 (0,389)	8,58 (0,454)	1,4
Мини-свинья	45000 (0,64)	5000 (0,278)	9,0 (0,433)	0,95
Человек	70000 (1,0)	18000 (1,0)	3,89 (1,0)	1,0

Представленные в табл. 3 параметры отношений массы тела и его поверхности у разных животных, соотносительно к таковым у человека, коррелирует с константами подобия относительных скоростей биологических реакций у них в большей степени, нежели любые абсолютные показатели.

Наиболее наглядным явлением и поразительным примером является постоянство удельной поверхности тела. Как видно на рис.3, внешняя удельная поверхность тела млекопитающих и других позвоночных остается равной удвоенной удельной поверхности сферы с таким же объемом при изменении массы тела в 107 раз. Более высокие значения на графике относятся к буковым деревьям. Отсюда следует, что эта удивительная закономерность распространяется даже на растения.

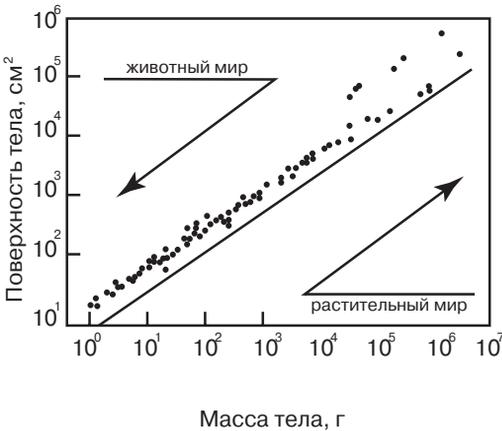


Рис. 3. Зависимость между поверхностью и массой тела у позвоночных. Сплошной линией показана зависимость между поверхностью и массой для шара плотностью 1,0. Точки в правом верхнем углу относятся к буковым деревьям, а остальные отражают все многообразие растительного и животного мира.

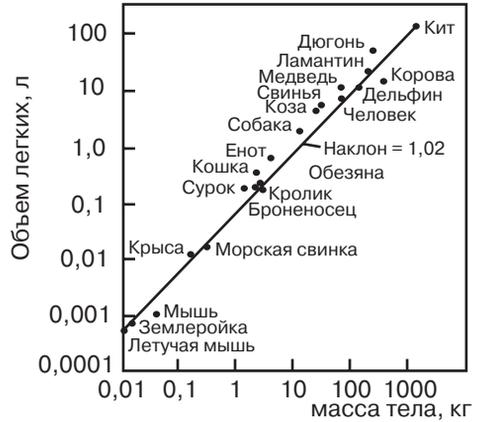


Рис. 4. Зависимость между объемом легких и массой тела у млекопитающих. Наклон линии указывает на простую пропорциональную зависимость.

Относительный объем, занимаемый отдельными органами, по существу не зависит от размеров тела, как показано на рис. 3, на примере объема легких млекопитающих. Это справедливо даже для таких крупных обитателей океана, как дельфины и киты. Отсутствие такой зависимости характерно и для других органов. Однако иногда встречаются некоторые видовые особенности, и они, как правило, не являются неожиданными. Так, например, обычно сердце составляет 0,5-0,6% от массы тела почти всех млекопитающих, кроме скаковых лошадей и борзых собак, у которых оно крупнее.

Однако эта анатомическая закономерность не может распространиться на все уровни, поскольку живые организмы существуют в условиях некоторых ограничений, зависящих от их размеров. Одним из таких ограничений для наземных животных является необходимость в механической опоре для противодействия силе тяжести, в связи с чем наблюдается утяжеление скелета у более крупных животных. Однако утяжеление скелета поразительно мало. Было найдено, что масса скелета возрастает пропорционально массе тела в степени 1,13; для круп-

ных животных многие авторы рассматривают это как большое техническое достижение природы.

Галилео Галилей считал [21], что «...если деревянный брус выдерживает тяжесть, скажем, десяти равных ему брусев, то подобная ему, но больших размеров балка не сможет выдержать веса десяти одинаковых с нею балок. Кто не знает, что лошадь, упав с высоты трех-четырёх локтей, ломает себе ноги, тогда как собака при этом не страдает, а кошка остается невредимой, будучи брошенной, с высоты восьми-десяти локтей, точно так же как сверчок, упавший с верхушки башни, или муравей, упавший на Землю хотя бы из лунной сферы...». Понятно, что лошадь не спит на деревьях, и ей не нужно взбираться туда или спрыгивать. Тем не менее, при моделировании и использовании аллометрических характеристик для экстраполяции следует основываться на *критериях подобия*, в данном случае, безусловно, на *третьем и четвертом*.

### **Животные и альтернативные модели в границах их валидности**

Касаясь вопроса о применимости понятий аллометрии к альтернативным моделям, по-видимому, нет ограничений для них в соответствии с четвертым и третьим критериями подобия, пока это касается переноса экспериментальных данных в отношении клеточных элементов и их пулов у человека. Речь, естественно, идет об альтернативных моделях, выполненных на переживающих клетках и одноклеточных организмах. В то же время трудно даже представить любое построение в виде биологической модели, в которой мы смогли бы проигнорировать и пятое подобие, т.е. *временной вектор модели*.

Наряду с уже ставшими классическими принципами биомоделирования на животных, Рассел и Бурч [28] предложили для до-

стижения наибольшей ясности новую терминологию *альтернативного моделирования*:

- *частичное замещение* — когда альтернативный метод частично замещает эксперимент на животных и требует дополнительной альтернативной методики без животных, что является частью общей стратегии или последовательности проведения или полного замещения тестов с использованием животных;
- *батарея тестов* (test battery) — серия тестов, выполненных в одно и то же время или в тесной связи друг с другом. Каждый тест внутри последовательности строится для получения дополнительной информации от предыдущего, а также для измерения различий дополнительного многофакторного токсического эффекта;
- *стратегия последовательных тестов* (tiered test strategy) — тесты проводятся в строгой последовательности, а выбор каждого определяется достоверными результатами предыдущего уровня исследований. Это последовательный процесс в виде серии тестов, проводимых в определенном порядке и приводящий к искомому результату.

Количество альтернативных методов в настоящее время ограничено для практического применения. Наиболее приемлемые альтернативы применяются либо в токсикологических областях, либо для оценки безопасности лекарств и ксенобитотиков. Для большинства областей фармакологии и токсикологии, наиболее значимых и имеющих ключевое значение, *валидные* (лицензированные) альтернативные тесты отсутствуют.

В продвижении новых методов тестирования, определенных ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods — Европейский центр по валидации альтернативных методов) существует 5 ступеней: разработка теста; предварительное обоснование; официальное обоснова-

ние; независимая оценка специалистов; ввод в регулярное использование.

Перечисленными выше степенями в определении *валидности метода* тестирования экспертами, дается оценка токсикологической области *релевантности* в лекарственной безопасности. Получение валидной квалифицированной методики оценивается в соответствии с выделенными шагами процесса, сроками выполнения, материально-техническими, экономическими затратами, квалификацией персонала, а главное соблюдением требований *экстраполяции* и *принципов подобия* биомодели в отношении прототипа-человека.

Оппоненты использования животных в опытах считают, что такие исследования имеют 50% вероятность. Этот уровень говорит о том, что гипотеза, подтвержденная на модели и проверенная там, не работает на объекте. Статистически гипотеза на объекте меньше 0,05, даже если на модели она была подтверждена. 50%-ный уровень вероятности должен быть сравнен и проверен *не на животных-моделях*, которые служили для выработки гипотезы, а в клинических наблюдениях [5, 6, 15, 27]. Если другие пути проверки гипотезы дадут 25%-ю норму вероятности, то *животные-модели являются более эффективным путем* для генерирования гипотезы.

**NB!** Модель будет хорошей, если не будет существовать серьезных дисаналогий между моделью и моделируемым объектом, хотя в принципе модель и целевой объект не могут быть абсолютно идентичны или «изоморфны».

Повышенный интерес вызывает вопрос, являются ли животные-модели и моделируемый объект подобными или различными и могут ли они быть в достаточной степени, подобными для экстраполяции данных, полученных в модели, на моделируемый объект до степени такого различия, когда они могут быть невалид-

ными. И, кроме того, если они подобны, можем ли мы использовать их? Эти данные говорят о том, что подобие/различие не является нижним уровнем в оценке животных-моделей для биомедицинских и психологических исследований. Критичным является факт, изучается ли (*фундаментальный вопрос науки*) или улучшаются сделанные ранее выводы через использование моделей (*прикладной вопрос науки*). А практически более важно доказать непосредственно *валидность* и *подобность* или, напротив, *различия* и *невалидность*. Важнее показать, что животные или альтернативные модели могут и должны быть оценены независимо по *подобию/различию*.

### **Метаморфозы подобия или «сила» и «мощь» упрощения**

Некоторые авторы пытаются доказать возможность полного исключения животных-моделей, пользуясь понятиями «сила» или «мощь» упрощения для прямой экстраполяции данных альтернативного моделирования на человека. Но в том то и суть, что цель использования животных-моделей лимитирована общими гипотезами, которые изначально должны быть валидны по контексту человеку, и что в оценке животных-моделей, валидность не является критичной точкой. Исследователь должен различать реальную практику с одной стороны, и защитников животных, в том числе существующих в средствах массовой информации и на бумаге — с другой.

*Опыты в прошлой практике*, например, при исследовании пищеварения на животных-моделях после работ И.П.Павлова показывали, что они являлись всего лишь исследованиями, подтверждающими уже описанные в литературе процессы, их повторением или углублением, а в целом такая модель была невалидна, даже если написано было иначе.

*Опыты как они существуют* и ожидаемый результат — модель даст те же результаты, что и моделируемый объект. Например, заражение животных инфекционными болезнями. При помощи генной инженерии можно получить модель человеческих генов, и они будут абсолютно идентичны генам человека, на полученных тканях можно моделировать многие взаимодействия [11, 27]. Однако, течение болезни получить на такой модели нельзя, результаты не будут идентичны течению болезни в организме человека. Такие модели должны быть дополнены альтернативными моделями, такими как человеческие ткани или культуры органов, или непосредственное наблюдение за процессом на основе высоких технологий.

*Опыты как они ожидаются в будущем.* Так как модель не может быть идентичной объекту, животное-модель может служить генератором гипотез. В научных исследованиях можно использовать и другие виды моделей для генерирования гипотез, без использования животных. Например, машины (компьютер для моделирования нервной системы), математические модели (для предсказания действия лекарств и токсических веществ на клеточном уровне). Такое моделирование может стать целью само по себе. Однако, в клинической практике, которая имеет дело с человеком, не может быть формального тестирования.

**NB!** Сначала все должно быть протестировано на животных при тщательном контроле, и, только потом должны быть проведены клинические испытания. Кроме того, должны быть проверены те показатели, которые на животных-моделях носили статистический и нелинейный характер.

Выше мы рассмотрели принципы подобия и соответствующего им анализа размерностей к мультипликативным отношениям между величинами. В этом случае отношение одной величины к другой означает, во сколько одна из них больше другой.

В биомедицине все более активно разрабатываются методы, позволяющие анализировать *неполное*, приближенное *подобие*. Создание новой «неклассической» теории подобия, позволяет показать как переменные, характеризующие элементы сравниваемых систем, преобразуются друг в друга иным, более сложным образом в исследованиях на моделях-животных.

В отличие от обычного, линейного подобия, основанного на мультипликативных отношениях между величинами, нами в этих случаях предлагается использование *нелинейного подобия* биомодели и прототипа.

Например, рассматриваются  $n$  переменных величин  $x_{11}, x_{21}, \dots, x_{n1}$ , которые находятся в функциональных зависимостях с переменными  $x_{12}, \dots, x_{n2}$ .

$$\begin{aligned} x_{12} &= f_{12} x_{11}; \\ x_{22} &= f_{22} x_{21}; \dots; \\ x_{n2} &= f_{n2} x_{n1} \end{aligned} \quad (17)$$

Заданные функции  $f_{I2} (1 \leq I \leq n)$  представляются как функции от переменных  $x_{11}, x_{21}, \dots, x_{n1}$ . На них накладывается ряд ограничений. Динамические биологические параметры должны быть непрерывными и дифференцируемыми, однозначными или, конечно, многозначными. В этом случае предполагается особое условие о выборе однозначной ветви соответствующей функции. Еще одним ограничивающим условием являются непрерывные и дифференцируемые частные производные. Функции  $f_{12}, \dots, f_{n2}$ , удовлетворяющие приведенным условиям, называются функциями нелинейного преобразования переменных  $x_{11}, \dots, x_{n1}$ .

Затем формулируются положения, являющиеся аналогичными обычным положениям классической теории подобия. При этом, если два явления нелинейно подобны, то искомые *нелинейно-относительные величины* явлений удовлетворяют тождественным замкнутым системам уравнений, выраженных в нелинейно-относительной форме.

Мы убедились, что в модельных построениях, которые мы проводили, любые попытки линеаризации подобий могут не только исказить, но и извратить конечные результаты, порождая метаморфные иллюзии.

Тем более странно, что «сила» или «мощь» упрощения, как его именуют некоторые авторы, становится зачастую самоудовлетворяющей и даже философской категорией. Они доказывают, что это необходимо *пока* (!) в просветительных и педагогических целях, а вот на следующем этапе.... Но такой будущий этап не только не нужен, но и вреден, поскольку создает, простите за выражение, только заморочку. Поэтому следует иметь в виду, что такие популистские упрощения не имеют ничего общего с понятиями приближенного или неполного подобия, подменяя явления нелинейных подобий явно линейными процессами, что и создает *нереальные метаморфозы* в биологическом моделировании и явные натяжки при попытках экстраполяции на прототип.

### **От линейных различий к нелинейным подобиям**

Известные математики высказались о том, что наступивший XXI век будет веком *нелинейной математики*, поскольку линейные процессы достаточно изучены, а многообразии нелинейностей бесконечно. Вряд ли это абсолют, хотя в том, что касается биомоделирования, они, несомненно, правы. Действительно, требуются новые взгляды и решения, особенно при попытках экстраполяции с животных на человека.

Переход от обычного подобия к нелинейному представляет собой существенный шаг в развитии математического аппарата. Это развитие вполне естественно, потому что нет оснований для предпочтения мультипликативных отношений всем остальным.

Для органов чувств человека характерны именно тождественные мультипликатив-

ные отношения, например, мы, воспринимаем как одну и ту же форму мультипликативно подобные фигуры. Если же фигуры будут нелинейно подобны друг другу, то их форма будет восприниматься как разная. Но нет никакой уверенности в том, что это имеет место у всех живых существ. Если человек различает вариации геометрических фигур как разные, то для многих животных важен общий облик, а не разные формы начертания многоугольника — это ещё одна *метаморфоза упрощения*.

Мы должны отдавать себе отчет в том, что при построении моделей сложных систем, в том числе психических процессов, научное лукавство является почти обязательным элементом. По мере развития математики и техники, мозг эволюционировал в умах ученых от аппарата Морзе, релейной станции, компьютера до некоей голографической конструкции по Прибраму. Эти «модели» являются временной уступкой обстоятельствам на определенном уровне развития науки

При построении модели на основе нелинейной теории подобия необходимо иметь в виду трудность, связанную с *проблемой измерения*. Обычно измерение связано с определением мультипликативного отношения между измеряемой величиной и некоторой другой, принятой за единицу измерения, на которой строится теория подобия.

Суть медицинских исследований заключается, прежде всего, в поиске различий. Сам принцип диагностики основан на отбрасывании тех показателей, жалоб больного или данных инструментального обследования, которые «затуманивают» суть дифференциального диагноза. Хочу подчеркнуть, что в медицине нет понятия «интегральный диагноз», но «дифференциальный диагноз» звучит как гимн врачу-диагносту. Не дальше ушли и медико-биологические исследования. В целом это не так и плохо, но беда в том, что мы живем в мире *нелинейных процессов*, а подобия и различия описываем с помощью линейной математики.

NB! Числовые показатели, как правило, нейтральны. Значимость их приоритета лишь в системе измерений. Числовые значения миллиона кубометров бетона и миллиона песчинок подобны по количеству числовых знаков, но не в системе измерений.

В биологии и медицине между мультипликативным и аддитивным физическим подобием имеется существенное различие. В одном случае рассматривается совокупность разнородных величин, характеризующих один и тот же объект. Тогда константы подобия различны для разных величин и требуется уравнение связи для *переноса отношений* с модели на оригинал. Сам по себе этот факт не вытекает из идеи биологического подобия. В самом деле, если нам известно, что один объект подобен другому, то мы можем переносить соотношения между размерами одного на другой, не интересуясь уравнением. В биомедицине, если сравниваемые одностипные величины, например параметры, отношения, будут иметь безразмерный характер, мы можем их корректно математически описать.

Аддитивное биологическое подобие ближе к пространственному подобию. Поскольку соотношения подобия аддитивны, имеет смысл сопоставлять в сравниваемых системах также аддитивные, а не мультипликативные соотношения. Тогда величины  $x_1', \dots, x_n'$  и, соответственно,  $x_1'', \dots, x_n''$  нужно *складывать* и *вычитать*, а не *множить* и *делить*. Это означает, что они должны быть одностипными. Бессмысленно складывать и вычитать, например, длину и массу.

NB! В то время как в обычной теории подобия модель, так же как и прототип, представляет собой группы свойств одного объекта, в аддитивной теории, наоборот, модель и образец должны представлять одно свойство, распределенное на множество различных объектов.

Например, измеряя артериальное и венозное давление, скорость пульсовой волны и  $\Delta P$  между ними у разных животных и человека, мы имеем дело с разными значениями одной величины, характеризующей многие биообъекты.

Однородность сопоставляемых величин дает возможность делать выводы от модели к человеку без анализа уравнений, связывающих все характеризующие их величины. Очевидно, что в случае аддитивного подобия речь идет о переносе аддитивных соотношений. Эти соотношения должны быть *аддитивно безразмерными* и при делении друг на друга дают величины одинаковой размерности. Мультипликативное отношение, не зависящее от абсолютных значений сравниваемых величин, определит *нелинейное подобие* [7, 8].

Можно определить аддитивное отношение, если из одной величины вычесть другую. Полученная разность будет выражать отношения при самых различных значениях соотносящихся величин. Если мы из одной длины вычтем другую, то получим величину той же размерности, но связанную с мультипликативным отношением к единице измерения. В качестве такой единицы можно взять одну из соотносящихся величин. В аддитивном случае роль *единицы* играет *нуль*. В качестве нуля берется значение одной из сравниваемых величин. Полученная разность показывает, насколько другая величина превышает этот нуль. Вспомним гениального Н.И. Лобачевского, который, декларируя « $1=2$ », выводил следствия из разряда «всякое число равно нулю». Маститые ученые считали это чудачеством, а автора определили в безграмотные шутники. Поистине, никогда нельзя торопиться с преждевременными заключениями. Стоит посоветоваться с Историей, она достаточно беспристрастная Дама, ибо без геометрии Лобачевского теперь нельзя описать ни одну из проблем мироздания.

NB! Если все константы нелинейного аддитивного подобия одинаковы, то любое аддитивно безразмерное отношение, найденное в модели, можно переносить на прототип.

Совокупность всех аддитивно безразмерных отношений между отдельными величинами, характеризующими модель и образец, можно рассматривать как одно отношение —  $RI$ . Если константы подобия  $c_1, \dots, c_n$  различны для разных величин, то отношения между отдельно взятыми величинами  $x_1', \dots, x_n'$  и соответственно  $x_1'', \dots, x_n''$  не будут одинаковыми. Но при условии тождественности формы уравнений, связывающих  $x_1', \dots, x_n'$  и соответственно  $x_1'', \dots, x_n''$ , можно приравнивать друг к другу соответствующие отношения отдельных элементов по всем остальным, вместе взятым. Поэтому тождественность уравнений означает вместе с тем тождественность отношений, понимаемых в указанном смысле.

Наличие констант подобия и тождественность уравнений связи необходимо совместить для того, чтобы явления могли считаться подобными и равняться единице. Приведем рассуждение, соответствующее тому, которое имеет место в обычной теории подобия, но уже для случая *нелинейного подобия*.

Пусть одна из сравниваемых систем описывается уравнением

$$\varphi_i(x_1', \dots, x_n') = 0. \quad (18)$$

Для второй будет верно

$$\varphi_i(x_1'', \dots, x_n'') = 0. \quad (19)$$

Подставляя в (19) равенство (18), получим

$$\varphi_i(c_1 + x_1', \dots, c_n + x_n'). \quad (20)$$

Параллельное существование уравнений (19) и (20) будет возможно только в

том случае, когда все константы аддитивного подобия выйдут из-под знака функций  $\varphi_i$  в виде одного

$$\begin{aligned} \varphi_i(c_1 + x_1', \dots, c_n + x_n') &= \\ &= \psi_i(c_1, \dots, c_n) + \varphi_i(x_1', \dots, x_n') = 0. \end{aligned} \quad (21)$$

При условии  $\psi(c_1, \dots, c_n) = 0$  уравнения  $\varphi_i = 0$  будут инвариантными по отношению к произведенному преобразованию.

Функции  $\varphi_i$ , обладающие указанным свойством, и отвечающие им уравнения можно назвать аддитивно гомогенными. В теории мультипликативности свойством гомогенности обладают функции типа степенных комплексов  $x_1^{\alpha_1}, \dots, x_n^{\alpha_n}$ , в которых степени  $\alpha_1, \dots, \alpha_n$  — отвлеченные числа. В аддитивном случае аналогичную роль будут играть функции типа  $\alpha_1 x_1 + \dots + \alpha_n x_n$ , где  $\alpha_1, \dots, \alpha_n$  — отвлеченные числа. Если  $\alpha_1 x_1' + \dots + \alpha_n x_n' = 0$  и  $\alpha_1 x_1'' + \dots + \alpha_n x_n'' = 0$ , то, пользуясь соотношениями подобия, получим

$$\begin{aligned} (\alpha_1 x_1 + \dots + \alpha_n x_n) + \\ + (\alpha_1 x_1' + \dots + \alpha_n x_n') = 0. \end{aligned} \quad (22)$$

Такое равенство (22) можно записать в виде

$$\begin{aligned} (\alpha_1 c_1 + \dots + \alpha_n c_n) + \\ + (\alpha_1 x_1' + \dots + \alpha_n x_n') = 0. \end{aligned} \quad (23)$$

Отсюда очевидно, что условием инвариантности уравнения по отношению к аддитивным преобразованиям подобия будет следующее соотношение:  $\alpha_1 c_1 + \dots + \alpha_n c_n = 0$ . Левую часть этого уравнения можно назвать подобием аддитивности.

В этом случае все члены уравнения соединены знаком плюс. Очевидно, что некоторые из членов должны иметь отрицательное значение. Ноль правой части означает, что сумма положительных членов равна сумме отрицательных:  $\sum \alpha_i c_i - \sum \alpha_k c_k = 0$ .

Вместо  $c_i$  и  $c_k$  подставим их значения из уравнений (19) и получим

$$\sum \alpha_i (x''_i - x'_i) = \sum \alpha_k (x''_k - x'_k). \quad (24)$$

Эти соотношения преобразуем так, чтобы каждая часть уравнения содержала величины, относящиеся к одной системе:

$$\begin{aligned} \sum \alpha_i x''_i - \sum \alpha_k x''_k &= \\ = \sum \alpha_i x'_i - \sum \alpha_k x'_k. \end{aligned} \quad (25)$$

Безусловно, аддитивно безразмерные комбинации величин можно рассматривать в качестве *аналогов критериев подобия*. Это уже *аддитивные критерии нелинейного подобия*. Как и в обычном случае, такие критерии одинаковы у обеих сравниваемых систем и могут стать базой для расчетов в реальных условиях биологического моделирования и экстраполяции, а также в наиболее трудных для трактовки случаях переноса, например, в построении моделей психофармакологического воздействия на мнестические и сложные психические функции. Стохастический принцип организации нейрональных механизмов мозга обуславливает сложность извлечения информации из интегральных электрограмм. Это требует привлечения современных методов анализа случайных процессов и использования компьютеров с программами математики нелинейных процессов.

### **Валидность и экстраполяция в материальных и виртуальных моделях**

Развитие альтернативных методов и компьютерных технологий не только не отвергает, но и существенно обостряет проблему оптимизированного и рационального, а значит и гуманного использования животных-

моделей. В этом ключе по-прежнему наибольший интерес вызывает проблема, являются ли животные-биомодели и моделируемый объект подобными или различными. Они могут быть, в достаточной степени, подобными для *экстраполяции* данных, полученных в модели, на моделируемый объект и до степени такого различия, когда они являются не валидными модели, а если они *валидны*, можно ли их использовать?

В качестве примера можно использовать клише «как сравнивать яблоки и апельсины» для доказательства того, что эти два предмета несопоставимы друг с другом [30]. Если яблоко является моделью апельсина, можно ли узнать что-либо об апельсине, изучая яблоко. Это и фундаментальный и прикладной вопрос науки. Визуально эти два фрукта существенно отличаются друг от друга. На анатомическом уровне они имеют шарообразную форму, подобные размеры, покрыты кожурой, имеют семена и мякоть, растут на деревьях и имеют схожие стадии развития, оба имеют в составе высокое содержание воды, кислоты и клеточную структуру. Однако на тонком морфологическом, молекулярном и функциональном уровне они во многом различны и не являются идентичными, имеющими меньше сходств, чем различий.

Валидность лимитирована как критерий оценки животных-моделей, т.к. она ограничена в идентификации подобий и экстраполяций между моделью и объектом моделирования.

Сравнительная морфология, физиология, фармакология и токсикология обеспечивают глубину познания, которую не дает прикладная анатомия или физиология из-за огромного набора переменных. Сравнение различий поможет получить этот ряд. В одном случае индивидуальные отличия приводят к болезни, в другом случае — нет. Различия между двумя нелинейными последовательно-

стями будут информативными для понимания и углубления знаний о болезни и её лечении. В дальнейшем, если подобию не подтверждаются, модель является невалидной, и можно получить возможности для повышения информативности или углубления ожиданий, что зачастую и предопределяет прогресс науки. Ибо думать – значит творить!

Европейский Центр по утверждению (валидации) альтернативных методов (ECVAM) способствует разработке альтернативных (заменяющих эксперименты на животных) методов, экспертирует, проверяет и утверждает адекватность новых или уже имеющихся методов.

Новые методы тестирования вводятся в процесс превалидации. Если этот процесс прошел успешно, они проходят процесс официальной валидации.

**NB!** Валидация (validation) – это крупномасштабное внутрилабораторное исследование, подготовленное в условиях независимости и организованное для получения более определенной оценки релевантности и надежности оптимизированного метода для практических целей. Валидность модели означает, что модель и моделируемый объект подобны или модель правильно отражает действительность.

Кроме того, валидация может быть рассмотрена как крупномасштабная версия третьей стадии превалидации, на которой тестируется большое количество химических средств и, при этом нет необходимости иметь большое количество лабораторий. Валидация альтернативного метода – это процесс, при котором уместность применения и его надежность устанавливается для конкретной практической цели.

Протокол и имитационная модель метода тестирования на первой стадии изменяется в пользу использования альтерна-

тивных методов (refine) в обычной лаборатории (с приоритетным экспериментом по использованию теста). Сделанная оценка на второй стадии вносится в протокол, передаваемый в следующую лабораторию с внесением любых необходимых изменений по использованию альтернативных методов в протокол и имитационную модель. На третьей стадии оценивается релевантность и надежность тестов в условиях независимости в трех или большем количестве лабораторий (две первые также включены в это число). Результатом превалидационных исследований является то, что в оптимизационный протокол вносится то, что может быть использовано в официальном валидационном исследовании. В превалидации и валидации могут принимать участие на стадии исследования различные национальные и международные институты с достаточным количеством знаний и опыта. В стадии *превалидированных продуктов* (prevalidation) описываются методы, которые следуют за превалидацией и дается представление о критериях для повторимости и прогнозирования результатов.

*Стадия предшествующая валидации* (undergoing validation) включает статус метода, предшествующего официальной валидации.

**NB!** Превалидация (prevalidation) – внутрилабораторное исследование, имеющее незначительный масштаб, проводимое в три этапа для гарантии того, что протокол и имеющаяся модель метода тестирования достаточно оптимизированы и стандартизированы для включения в официальное изучение валидности

Высокоточная модель отражает существенные моделируемые механизмы, низкоточная – соответствует моделируемым механизмам в малой степени. В опытах по токсичности, исследователи работают с моделью, от которой требуют такой же ре-

акции на лекарства, как и у целевого объекта в терминах существенности, эффективности и токсичности. В этом случае точность модели является критичной. Модель, чтобы быть полезной, должна функционировать аналогично объекту, учитывая, что лекарства и другие продукты тестируются ради использования для людей. В противовес этому, в фундаментальных и прикладных исследованиях функционирование модели рассматривается с других позиций и гораздо шире. Изначально низкоточные модели используют для выдвижения гипотезы, которая будет проверена для моделируемого объекта.

**NB!** Валидность является следствием надежности: содержание проблемы, повторности и точности измерений, формируют степень того, что измерялось, и что должно было быть измерено. В терминологии моделирования надежность не является следствием подобия или точности соответствия модели объекту, а соответствием измерения соответствующих переменных модели в целях дальнейшей экстраполяции.

Соотношения между валидностью и проблемой оценки животных — моделей являются комплексными и часто трудно понимаемыми. Worth A.P.[31] сделал несколько попыток классифицировать животных-моделей в три группы:

- животное-модель никогда не является конечной и полностью валидированной моделью;
- животные-модели, для которых некоторая степень валидации продемонстрирована, не являются необходимым вложением в понимание или углубление эффективности;
- большинство животных-моделей в биомедицинских и психологических исследованиях не являются валидными, даже в хорошо описанных случаях.

Поэтому замену животных во всех случаях обучения людей на альтернативные модели ругает Международная Сеть (InterNICHE). Этой Сетью предлагается включать в процессы исследований и обучения исключительно альтернативные и компьютерные методы [17, 18, 19]. Кроме того, имеются: книга с CD, DVD, базой данных и web-версией «от морской свинки к компьютерной мышши», переведенная на 12 языков, в которой авторы из разных стран представили свои материалы в разнообразной форме; видеофильмы; библиотека мультимедийных компакт-дисков; web-сайт. Это в значительной мере оправдано, поскольку валидность относится к модели, а модель и целевой объект никогда не могут быть полностью повторяющими друг друга, она относится только к некоторым моделируемым аспектам или взаимодействиям.

**NB!** Степень валидности модели является функцией, аккумулирующей аспекты сопоставления и нахождения подобия. Валидность часто лимитирована подтверждением тех аспектов, которые уже были известны к моменту начала исследований, т.е. они никогда не станут моделью для новых знаний.

Валидность постоянно развивается и она не является конечным критерием оценки. Исследователи никогда не могут сказать, что они имеют модель депрессии, в строгом смысле слова, но они могут изучать на модели гипотезы, касающиеся этого нарушения. При окончательном анализе необходимо пересмотреть гипотезы относительно человека, помня о том, что модель, возможно, не соответствует человеку и не годится для экстраполяции.

Валидность является отправной точкой для достижения цели, но даже при достижении высокой точности альтернативной модели, она, в этом случае, не даст исследователям ничего нового или не позволит углубить знания.

## Литература

Потенциальная же эффективность экстраполяции с животного-модели заключается в анализе функционирования, а не в подтверждении или оценке более или менее известных фактов [4, 15, 27]. Последнее заблуждение часто эксплуатируется исследователями, которые, даже не претендуя на новые знания, лишь умножают страдания животных. Они не должны использовать животные-модели для подтверждения уже известных гипотез о недомоганиях у человека.

Образно говоря, валидация является «анатомией», а экстраполяция «физиологией» процессов биомоделирования, т.к. первая представляет собой отражение структуры процесса и поиска изоморфности, а вторая – в самой своей сути ориентирована на нахождение прежде всего динамических составляющих в критериях подобия и переноса. Концептуальное пространство валидации на сегодняшний день не выходит за пределы топологии альтернативного моделирования, представляя собой формализацию принципов и критериев аллометрии.

Экстраполяция же пока лимитирована как критерий оценки животных-моделей, т.к. она ограничена в идентификации подобий между моделью и объектом моделирования. Однако, как мы уже показали, можно учиться на линейных различиях, подразумевая путь к нелинейным подобиям. Важнейшая теория, принадлежащая лингвистике и философии, гласит, что суть вещей можно познать на контрасте. Большая часть того, что мы знаем о понятии «добра», пришла через понятие «зла», «правильно» – из «неправильно», «живой» – из «неживой», «вверх» – из «вниз». Многое познается из контекста – некоторые термины и их значения могут иметь диаметрально противоположный смысл, связанный с контекстом, как «аллометрия» – «валидация», «подобия» – «экстраполяция» или любые их перестановки. Сравнением контраста и различия познается мир подобия.

1. Батулин В.А., Манвелян Э.А., Булгакова М.Д. Зависимость от пола и времени суток интенсивности галоперидоловой каталепсии у крыс. // *Биомедицина*, № 4, с. 78-79, 2006.
2. Бондарев А.А., Смирнов В.В., Удут В.В. Уравнение состояния лекарственного вещества в организме. // *Биомедицина*, №2, с. 71-74. 2006.
3. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В. и др. Экстраполяция экспериментальных данных на человека в физиологии и радиологии. – М.-Воронеж: ИСТОКИ. 232 с. 2004.
4. Капанадзе Г.Д. Использование миниатюрных свиней в биомедицинских экспериментах. // *Биомедицина*, № 2, с. 40-51, 2006.
5. Каркищенко Н.Н. О возможности экстраполяции преclinical психофармакологических исследований на человека. // *V симпозиум по клинич. фармакологии*, Венгрия, с. 333, 1980.
6. Каркищенко Н.Н. Экстраполяция экспериментальных данных на методику испытания лекарственных средств в клинике. // *Фармакология и токсикология*, № 3, с. 22, 1982.
7. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М., Изд-во ВПК, 608 с., 2004.
8. Каркищенко Н.Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины. // *Биомедицина*, № 1, с. 5-17. 2005.
9. Каркищенко Н.Н. Инновационные лекарства и нелетальные технологии XXI века. // *Биомедицина* № 3, с. 5-21, 2006.
10. Каркищенко Н.Н. Классические и альтернативные модели лекарственной токсикологии. // *Биомедицина* № 4, с. 5-23, 2006.
11. Каркищенко В.Н., Мартынов В.В. Фармакология, генополиморфизм и кло-

- нирование генов NAT у человека и животных-моделей. // *Биомедицина* № 4, с.85-87, 2006.
12. Красовский Г.Н. Прикладные аспекты использования аллометрии в экологии человека. // *Вестник РАМН*, № 7, 39-42, 2000.
  13. Boxenbaum H. *Interspecies Scaling, Allometry, Physiological Time, and the Ground Plan of Pharmacokinetics*. // *J.Pharmacometrics and Biopharm.*, Vol. 10, No. 2, p.201-227, 1982.
  14. Boxenbaum H. Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance: extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. // *J. Phar-macokin, Biopharm*, 8, 165-176, 1980.
  15. Bhogal N., Combes R. The Relevance of Genetically Altered Mouse Models of Human Disease. // *ATLA* 34, с.429-454, 2006.
  16. Cox M. Progress on regulations for human-derived therapeutic products. // *Medical Device Technology* 14, 32-34, 2003.
  17. Cui S., Wang X., Liu S. et al. Predicting toxicity of benzene derivatives by molecular hologram derived quantitative structure-activity relationships (QSARS). // *SAR and QSAR in Environmental Research* 14, 223-231, 2003.
  18. Drexler H.G., Quentmeier H., MacLeod R.A. Malignant hematopoietic cell lines: in vitro models for the study of MLL gene alterations. // *Leukemia*, 18, 227-232, 2004.
  19. Harvey P.H., Mace G.M. Comparisons between taxa and adaptive trends: problems of methodology. // *In Current Problems in Sociobiology* (ed. King's College Sociology Group), pp. 343-361, 1982.
  20. Hudson M. The welfare and scientific advantages of non-invasive imaging of animals used in biomedical research. // *Animal Welfare* 14,303-317, 2006.
  21. Galilei G. Dialogues concerning two new sciences, 1637 translated by H. Crew and A. De Salvio. — *New York, Macmillan, 1914*.
  22. Karkishchenko N.N. Psychounitropism in the drug action. // *Proc. of 7<sup>th</sup> Int. Conf. on Clinical Pharm. of CMEA countries, Plzen, 103, 1987*.
  23. Karkishchenko N.N. Designing of the drugs based on cytokines with determined pharmacokynetical properties. // *Eur. Cytokine Netw.*, 11, 156, 2000.
  24. Kirkwood J.K. Use and Pitfalls of Allometry: A Valuable Tool in Comparisons and Extrapolations Between Species and in Ethical Considerations Concerning the Use of One Species to Model Another. // *ATLA* 32, *Suppl. 1*, p.209-213, 2004.
  25. Kirkwood J.K., Bennett P.M. Approaches and limitations to the prediction of energy requirements in wild animal husbandry and veterinary care. // *Proceedings of Nutrition Society* 51, p. 117-12, 2003.
  26. Krasovskii G.N. Extrapolation of Experimental Data from Animals to Man. // *Environmental Health Perspectives. Vol.13, 51-58, 1976*.
  27. Mestas, J., Hughes, C.C.W. Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology. // *Journal of immunology* 172, 2731-2738, 2006.
  28. Russell, W.M.S., Burch, R.L. The principles of Humane Experimental Technique. — *London, UK: Methuen, 238 pp, 1959*.
  29. Riggs D. S. Mathematical Approach to Physiological Problems. — *Baltimore, Williams and Wilkins, 295-296, 1963*.
  30. Shapiro K.J. Animal Model Research: The Apples and Oranges Quandary. // *ATLA* 32, *Suppl. 1*, p. 405-409, 2004.
  31. Worth A.P., Balls M. The principles of validation and the ECVAM validation process. // *ATLA* 32, p.623-629, 2004.

**FROM THE CRITERIONS OF SIMILARITIES AND ALLOMETRY  
TO VALIDATION AND EXTRAPOLATION IN BIOMEDICINE**  
**N.N. Karkischenko**

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** kinds of similarities, allometry, extrapolation, alternative modeling, validation.

Allometry similarities is not only mutual measurings but first of all it is establishment of likeness of morphofunctional and other important parameters of animals and human beings in order to biomodeling and extrapolation. Although the model validation is the function, which accumulates the processes of comparison and detects of similarity, it is limited by confirmation of only those aspects, which was already known to the moment of the beginning of investigations with alternative modeling. It has small corresponding to the aspects of extrapolation from animals to man. Allometry or spatial similarities mean likeness of important life processes. Moreover it is necessary to take into consideration the temporal similarities when the time moment is numerically defined by the value of interval with another moment, which is considered as the beginning of reading. If all constants of allometry non-linear similarities are identical, it is possible to endure any additive unlimited rates, which was founded in the model to the prototype.

## Фармакогенетика системы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств: от теории к практике

В.Г.Кукес, Д.А.Сычев, Г.В.Раменская, И.В.Игнатьев

*Филиал «Клиническая фармакология» НЦ БМТ РАМН, Москва*

*Институт клинической фармакологии ФГУ «НЦ ЭСМП», Москва*

На основании данных литературы, а также результатов собственных исследований изложены современные представления о системе биотрансформации и транспортеров лекарственных средств, а также о факторах, влияющих на ее активность. Подробно освещены вопросы влияния генетических особенностей человека на активность системы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств и их клиническое значение для оптимизации фармакотерапии. Сформулированы основные этапы проведения фармакогенетических исследований системы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств. Обозначены проблемы внедрения в клиническую практику фармакогенетических исследований системы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств и пути их решения.

**Ключевые слова:** фармакогенетика, биотрансформация, цитохром P-450, транспортеры лекарственных средств.

Недостаточно эффективная и безопасная фармакотерапия остается одной из самых острых проблем современной медицины. Так, по данным разных авторов у 10-40% пациентов применение лекарственных средств (ЛС) оказывается не эффективным, в то же время у 10% развиваются нежелательные лекарственные реакции (НЛР). Только в США ежегодно НЛР являются причиной госпитализации около 8 миллионов пациентов, причем 100000 пациентов ежегодно умирают от НЛР [11, 26].

В чем же причина различий фармакологического ответа на ЛС у пациентов? Очевидно, что это связано с индивидуальными особенностями фармакокинетики и фармакодинамики ЛС у того или иного пациента. «Судьба» ЛС в организме представляет собой ряд фармакокинетических процессов: всасывание, распределение, биотрансформация, выведение [2]. На все эти процессы могут влиять различные факторы (пол, возраст, кон-

ституция, сопутствующие заболевания, совместно применяемые ЛС, особенности пищевого рациона, курение и т.д.), приводя, при этом, к изменению фармакокинетики [2]. Однако, в настоящее время не вызывает сомнения, что полиморфизм генов, кодирующих ферменты биотрансформации и транспортеров ЛС является одним из важнейших, если не самым важным фактором, определяющим индивидуальные особенности фармакокинетики, а следовательно и фармакологического ответа [3].

### Современные представления о системе биотрансформации и транспортеров лекарственных средств

Благодаря достижениям биомедицины последних лет, представления о системе биотрансформации и транспортеров ЛС претерпели значительные изменения. На сегодняшний день, принято считать, что

целями функционирования системы биотрансформации и транспортеров ЛС являются [3, 28]:

- предотвращение проникновения ксенобиотиков (в т.ч. и ЛС) в организм человека (в системный кровоток, органы и ткани);
- снижение биологической (фармакологической) активности ксенобиотиков (в т.ч. и ЛС);
- снижение липофильности и повышение гидрофильности ксенобиотиков (в т.ч. и ЛС) для «облегчения» их выведения;
- выведение ксенобиотиков (в т.ч. и ЛС) из организма.

Все эти процессы осуществляются специализированными белками, являющимися «участниками» системы биотрансформации и транспортеров [2, 19, 24, 28]:

1. ферменты биотрансформации, осуществляющие реакции I и II фаз метаболизма ксенобиотиков и ЛС (см. табл. 1 и 2);
2. гликопротеин-Р (Р-рр) – транспортный белок, основными функциями которого являются: препятствие всасыванию ксенобиотиков и ЛС в кишечнике; при их попадании в организм – предотвращение их проникновения через гисто-гематические барьеры, а также скорейшее выведение печенью в желчь и почками в мочу;

3. транспортеры органических анионов и катионов, осуществляющие выведение ксенобиотиков и ЛС печенью в желчь и почками в мочу.

С этих позиций нам представляется целесообразным выделить следующие фазы элиминации ксенобиотиков [3]:

- 0 фаза – препятствие всасыванию ксенобиотиков в кишечнике, осуществляемое гликопротеина-Р;
- I фаза – представляет собой реакции I фазы биотрансформации, в процессе которых, ксенобиотики переходят в более гидрофильные соединения, за счет присоединения или освобождения активных функциональных групп (например, -ОН, -NH<sub>2</sub>, -SH), осуществляемые, главным образом, изоферментами цитохрома Р-450;
- II фаза – представляет собой реакции II фазы биотрансформации или синтетические реакции- соединение (конъюгацию) ксенобиотиков и/или их метаболитов с эндогенными веществами, в результате чего образуются гидрофильные конъюгаты;
- III фаза – активная секреция ксенобиотиков и/или их метаболитов в мочу или в желчь, осуществляемая гликопротеином-Р, транспортерами органических анионов и катионов.

Таблица 1

**Характеристика ферментов I фазы биотрансформации ксенобиотиков [3, 28]**

Изофермент	Локализация	Функция	Субстраты – ЛС	Ингибиторы – ЛС	Индукторы – ЛС
CYP1A2	Микросомы гепатоцитов	Окисление ксенобиотиков	Теофиллин, кофеин	Фторхинолоны, циметидин	Рифампицин, фенobarбитал
CYP2C9	Микросомы гепатоцитов	Окисление ксенобиотиков	НПВС, непрямые антикоагулянты, антагонисты ангиотензиновых рецепторов, пероральные гипогликемические ЛС	Циметидин, сульфаниламиды	Рифампицин, фенobarбитал

окончание Табл. 1

Изофермент	Локализация	Функция	Субстраты – ЛС	Ингибиторы – ЛС	Индукторы – ЛС
CYP2C19	Микросомы гепатоцитов	Окисление ксенобиотиков	Ингибиторы протонного насоса, антиконвульсанты	Циметидин, флуоксетин, циметидин	Рифапацин, фенобарбитал, карбамазепин
CYP2D6	Микросомы гепатоцитов	Окисление ксенобиотиков	Бета-адреноблокаторы, антидепрессанты, нейролептики	Пароксетин, флуоксетин, сертралин, амитриптилин, циметидин	–
CYP2E1	Микросомы гепатоцитов	Окисление ксенобиотиков	Этанол, парацетамол	Дисульфирам, ритонавир	Этанол, изониазид
CYP3A4	Микросомы гепатоцитов и энтероцитов	Окисление ксенобиотиков	Блокаторы медленных кальциевых каналов, статины, местные анестетики, оральные контрацептивы, антигистаминные ЛС	Макролиды, противогрибковые ЛС – производные азолов, циметидин, сок грейпфрута	Рифампицин, карбамазепин, глюкокортикостероиды, зевроной, фенобарбитал

Таблица 2 (а)

**Характеристика ферментов II фазы биотрансформации ксенобиотиков [3, 28]**

Фермент	Локализация	Функция	Субстраты – ЛС	Ингибиторы – ЛС	Индукторы – ЛС
N-ацетилтрансфераза 2 (NAT2)	Цитозоль гепатоцитов	Ацетилирование ксенобиотиков	Сульфаниламиды, гидролазин, прокаинамид, изониазид, ПАСК	Не известно	Не известно
УДФ-глюкуронилтрансферазы	Микросомы гепатоцитов	Глюкуронирование билирубина, ксенобиотиков	Наркотические анальгетики, антиконвульсанты, ацетаминофен, хлорамфеникол	Не известно	Барбитураты
Сульфонтрансферазы	Цитозоль гепатоцитов	Сульфатирование гормонов (тиреоидные, стероидные, катехоламины) и ксенобиотиков	Салицилаты, ацетаминофен, морфин	Не известно	Не известно
Глутатион-SH-S-трансферазы	Цитозоль и микросомы гепатоцитов	Конъюгация с глутатионом	Ацетаминофен, циклофосфан	Не известно	Не известно

Таблица 2 (б)

**Характеристика основных транспортеров ЛС [196 24]**

Транспортер	Локализация	Функция	Субстраты – ЛС	Ингибиторы – ЛС	Индукторы – ЛС
Гликопротеин-Р (MDR1)	«Внешняя» мембрана энтероцитов	«Выкачивание» из энтероцитов в просвет кишечника липофильных ксенобиотиков	Амитриптиллин, аторвастатин, верапамил, дексаметазон, дигоксин, домперидон, дилтиазем, интраконазол, лозартан, лоперамид, морфин, ондасетрон, пароксетин, ранитидин, спарфлоксацин, талинолол, терфенадин, тетрациклин, фексофенадин, фенитоин, хинидин, циклоспорин, эритромицин	Амиодарон, аторвастатин, бромокриптин, верапамил, дипиридамо, интраконазол, карведилол, кетоконазол, кларитромицин, метадон, никардипин, пропafenон, сертралин, спиронолактон, флуоксетин, хинидин, циклоспорин	Зверобой, морфин, рифампин
	Базолатеральная мембрана гепатоцитов	Активная секреция липофильных ксенобиотиков в желчь			
	Базолатериальная мембрана клеток проксимальных почечных канальцев	Активная секреция липофильных ксенобиотиков в мочу			
	Внешняя» мембрана эндотелиоцитов гемато-энцефалического, гематоовариального, гематотестикулярного и гематоплацентарного барьеров	«Выкачивание» из эндотелиоцитов в просвет сосуда липофильных ксенобиотиков- предотвращение их проникновения в ЦНС, яичники, яички и через плаценту			
ОАТР-С (полипептид С, транспортирующий органические анмоны)	Синусоидальная мембрана гепатоцитов	Поглощение гепатоцитами органических анионов из крови в т.ч. билирубина и его глюкуронидов, гормонов щитовидной железы, желчных кислот и их глюкуронированных конъюгатов	Правастатин, церивастатин, аторвастатин, росувастатин, текокаприлат, фексофенадин, бромсульфоталеин	Рифампицин, гемфиброзил, циклоспорин	Фруктовые соки: грейпфрутовый, апельсиновый, яблочный

окончание Табл. 2(б)

<b>Транспортер</b>	<b>Локализация</b>	<b>Функция</b>	<b>Субстраты – ЛС</b>	<b>Ингибиторы – ЛС</b>	<b>Индукторы – ЛС</b>
ОАТР-8 (полипептид 8, транспортирующий органические анионы)	Синусоидальная мембрана гепатоцитов	Поглощение гепатоцитами органических анионов из крови	Дигоксин, пеницилламин, холецистокин-ин-8	Не известно	Не известно
ОАТ-1 (транспортер 1 органических анионов)	Базолатеральная мембрана проксимальных почечных канальцев	Активная секреция органических анионов в мочу	Тиазидные диуретики, озелтамивир, метотрексат, ибупрофен, босентан	Пробеницид, озелтамивир, цефалотин, цефалотаксим, НПВС	Не известно
ОАТ-3 (транспортер 3 органических анионов)	Базолатеральная мембрана проксимальных почечных канальцев	Активная секреция органических анионов в мочу	Петлевые диуретики, метотрексат	Цефтриаксон, цефазолин, НПВС	Не известно
ОАТ-4 (транспортер 4 органических анионов)	Внешняя мембрана эпителиоцитов проксимальных почечных канальцев	Активная секреция органических анионов в мочу	Буметанид, цефалоридин, босентан	Цефтриаксон, цефазолин, цефалотаксим	Не известно
ОСТ-1 (транспортер 1 органических катионов)	Базолатеральная мембрана гепатоцитов, эпителиоцитов почечных канальцев	Активная секреция органических катионов в желчь и мочу	Циметидин, ранитидин, метформин, буметанид, допамин, амантадин, азидотимедин, N1-метилникотинамид	Не известно	Не известно
MRP2 (протеин 2, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью)	Каналикулярная мембрана гепатоцитов	Активная секреция органических анионов в т.ч. глюкуронидных конъюгатов ЛС и конъюгатов с глутатионом в желчь	Правастатин, грепафлоксацин, цефтазидим, цефтриаксон, глюкуронид диклофенака, метотрексат, темокаприлат, фозиноприл	Пробеницид	Не известно

## **Фармакогенетика системы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств**

Фармакогенетика представляет собой, науку, возникшую на стыке фармакологии и генетики, которая изучает генетические особенности пациента, влияющие на фармакологический ответ [1]. В основе этих генетических особенностей лежит полиморфизм генов белков, участвующих в фармакокинетике или фармакодинамике лекарственных средств (ЛС) [4, 9]. Как раз к первой группе относятся гены, кодирующие ферменты биотрансформации и гены транспортеров, участвующих во всасывании, распределении и выведении ЛС из организма. В настоящее время, активно изучается клиническое значение полиморфизма генов, кодирующих ферменты биотрансформации, в частности изоферментов цитохрома Р-450 (*CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*) и ферментов II фазы биотрансформации (N-ацетилтрансферазы, УДФ-глюкуронилтрансферазы, тиопуринметилтрансферазы, глутатион SH-S-трансферазы и т.д.) [6]. В последние годы начато изучение влияния на фармакокинетику ЛС полиморфизма генов т.н. транспортеров ЛС: транспортеров органических анионов (*OATP-C*, *OAT-1*, *OAT-3*), транспортеров органических катионов (*OCT-1*) и гликопротеина-Р (*MDR1*) [17, 19, 24]. Очевидно, что носительство функционально измененных в результате однонуклеотидных замен аллелей генов, кодирующих ферменты биотрансформации и транспортеры, может приводить к изменению концентраций липофильных и гидрофильных ЛС, а, следовательно, и к изменению фармакологического ответа у пациентов [15, 17]. Клиническое значение аллельных вариантов генов, кодирующих ферменты биотрансформации и транспортеры, для проведения эффективной и безопасной фармакотерапии во

многом зависит от особенностей фармакокинетики липофильных и гидрофильных ЛС [20, 21, 22, 23].

## **«Судьбы» липофильных и гидрофильных лекарственных средств в организме**

Липофильные ЛС, обычно, хорошо всасываются, однако, проникнув в энтероциты они могут вновь «выбрасываться» в просвет кишечника гликопротеином-Р. Все же попав в энтероциты, а затем и в гепатоциты липофильные ЛС подвергаются биотрансформации до гидрофильных метаболитов, которые либо попадают в системный кровоток, либо активно секреторируются в желчь транспортерами органических анионов и катионов. Находясь в гепатоцитах, не успевшие метаболизироваться липофильные ЛС, также способны активно секретироваться в желчь с помощью гликопротеина-Р. «Обойдя» описанные процессы липофильные ЛС могут достигнуть системного кровотока, однако их проникновение в ткани затруднено функционированием гликопротеина-Р эндотелиоцитов кровеносных сосудов: ЛС, попав в эндотелиоцит, вновь «выбрасывается» гликопротеином-Р в просвет сосуда. Не метаболизовавшиеся липофильные ЛС способны активно секретироваться в проксимальных почечных канальцах в мочу гликопротеином-Р. Гидрофильные метаболиты ЛС легко фильтруются в почечных клубочках, и, кроме того, могут активно секретироваться в проксимальных почечных канальцах в мочу транспортерами органических анионов и катионов [2, 3].

Гидрофильные ЛС плохо всасываются в кишечнике. Все же всосавшись, гидрофильные ЛС плохо проникают через мембраны гепатоцитов путем простой диффузии, поэтому они активно транспортируются в гепатоциты транспортерами органических анионов и катионов. В гепатоцитах,

гидрофильные ЛС слабо метаболизируются, и, как правило, в неизменном виде могут активно секретироваться в желчь также транспортерами органических анионов и катионов. Однако, достигнув системного кровотока, гидрофильные ЛС, плохо проникают в ткани, фильтруются в почечных клубочках, и, кроме того, могут активно секретироваться в проксимальных почечных канальцах в мочу транспортерами органических анионов и катионов [2, 3].

### Изучение влияния полиморфизма генов, кодирующих ферменты биотрансформации и транспортеры, на фармакологический ответ

На первом этапе изучения клинического значения генетического полиморфизма необходимо найти и доказать наличие ас-

социации между носительством конкретного аллельного варианта того или иного гена и неблагоприятным фармакологическим ответом на определенное ЛС (развитие НЛР или недостаточная эффективность) [20]. В таблицах 3, 4 и 5 приводятся обнаруженные к настоящему времени ассоциации между носительством аллельных вариантов генов, кодирующих I и II фазы биотрансформации, транспортеры и неблагоприятными фармакологическими ответами.

При изучении полиморфизма генов ферментов биотрансформации и транспортеров ЛС, проводят определение концентрации ЛС в группах лиц, разделенных в зависимости от носительства того или иного аллельного варианта [27]. Как правило, это ЛС, для которых уже известно, что они являются субстратами для фермента биотрансформации или транспортера, поли-

Таблица 3

#### Ассоциации между носительством аллельных вариантов генов, кодирующих I фазу биотрансформации и неблагоприятными фармакологическими ответами

Ген	Аллельные варианты	Изменение активности фермента	Лекарственные средства	Изменение фармакологического ответа
CYP2D6	«Медленные» аллельные варианты: CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*6, CYP2D6*7, CYP2D6*8, CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*41	Снижение активности изофермента цитохрома P-450 2D6 (CYP2D6)	Метопролол	Бронхоспазм, гипотония, брадикардия, AV-блокада, асистолия
			Флекаинид	Желудочковые тахикардии
			Пропафенон	Нейротоксичность, бронхоспазм
			Фенформин	Молочнокислый ацидоз
			Пропафенон	Нейротоксичность
			Нортриптилин и другие трициклические антидепрессанты	Гипотония, ажитация, сонливость
			Галоперидол	Экстрапирамидные расстройства
			Дексфенфлурамин <sup>А</sup>	Тошнота, рвота, головная боль

Ген	Аллельные варианты	Изменение активности фермента	Лекарственные средства	Изменение фармакологического ответа
CYP2D6	«Медленные» аллельные варианты: CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*6, CYP2D6*7, CYP2D6*8, CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*41	Снижение активности изофермента цитохрома P-450 2D6 (CYP2D6)	Симвастатин	Повышение уровня трансаминаз, миалгии
			Пергексиллина малеат <sup>а</sup>	Гепатотоксичность
			Прокаинамид	Снижение риска развития волчаночноподобного синдрома
			Трамадол	Недостаточное анальгетическое действие
			Кодеин	Недостаточное анальгетическое действие
	Копии функциональных аллелей CYP2D6*1, CYP2D6*2	Повышение активности изофермента цитохрома P-450 2D6 (CYP2D6)	Миртазапин	Гипотония
			Трициклические антидепрессанты	Отсутствие антидепрессивного действия
			Антидепрессантов из группы ингибиторов обратного захвата серотонина	Отсутствие антидепрессивного действия
			Симвастатин	Отсутствие гиполлипидемического действия
			Ондансетрон	Отсутствие противорвотного действия
CYP2C9	«Медленные» аллельные варианты: CYP2C9*2, CYP2C9*3	Снижение активности изофермента цитохрома P-450 2C9 (CYP2C9)	Непрямые антикоагулянты	Кровотечения
			НПВС	Желудочно-кишечные кровотечения

окончание табл. 3

Ген	Аллельные варианты	Изменение активности фермента	Лекарственные средства	Изменение фармакологического ответа
CYP2C9	«Медленные» аллельные варианты: CYP2C9*2, CYP2C9*3	Снижение активности изофермента цитохрома P-450 2C9 (CYP2C9)	Пероральные гипогликемические ЛС	Гипогликемия
			Лозартан	Ослабление гипотензивного действия
			Ирбесартан	Усиление гипотензивного действия
			Торсемид	Увеличение экскреции калия, натрия, хлора. Угнетение экскреции мочевой кислоты.
CYP2C19	«Медленные» аллельные варианты: CYP2C19*2, CYP2C19*3	Снижение активности изофермента цитохрома P-450 2C19 (CYP2C19)	Ингибиторы протонного насоса	Усиление антисекреторного действия
CYP2B6	«Медленные» аллельные варианты: CYP2B6*5, CYP2B6*6	Снижение активности изофермента цитохрома P-450 2B6 (CYP2B6)	Циклофосфамид	Нефротосичность
CYP3A4	«Медленные» аллельные варианты: A290G, CYP3A4*4	Снижение активности изофермента цитохрома P-450 3A4 (CYP3A4)	Аторвастатин, симвастатин	Усиление гиполипидемического действия
DPDG	Asp971Ala, Cys24Arg, Arg886His	Снижение активности дигидропири-мидиндигидро-геназы (DPDG)	5-фторурацил	Нейротоксичность, кардиотоксичность
BCHE	«Медленные» аллельные варианты: A209G и некоторые другие аллельные варианты	Снижение активности бутрилхолин-эстеразы (BCHE)	Суксаметоний (дитилин)	Длительное апноэ
Примечание: <sup>А</sup> – препарат в России не зарегистрирован				

Таблица 4

**Ассоциации между носительством аллельных вариантов генов,  
кодирующих II фазу биотрансформации,  
и неблагоприятными фармакологическими ответами**

<b>Ген</b>	<b>Аллельные варианты</b>	<b>Изменение активности фермента</b>	<b>Лекарственные средства</b>	<b>Изменение фармакологического ответа</b>
<i>UGT1A1</i>	«Медленные» аллельные варианты: <i>UGT1A1*1B</i> , <i>UGT1A1*28</i> , <i>UGT1A1*60</i>	Снижение активности изофермента глюкуронил-трансферазы 1A1 ( <i>UGT1A1</i> )	Иринотекан	Гипербилирубинемия, диспепсия
<i>NAT2</i>	«Медленные» аллельные варианты: <i>NAT2*5</i> , <i>NAT2*6</i> , <i>NAT2*7</i> , <i>NAT2*14</i> и др. (всего более 20)	Снижение активности ацетилтрансферазы 2 ( <i>NAT2</i> )	Изониазид	Полиневриты
			Сульфасалазин	Диспепсия
			Гидралазин	Волчаночноподобный синдром
			Прокаинамид	Волчаночноподобный синдром
<i>TPMT</i>	«Медленные» аллельные варианты: <i>TPMT*2</i> , <i>TPMT*3</i> , <i>TPMT*8</i>	Снижение активности тиопуриин-метилтрансферазы ( <i>TPMT</i> )	6-меркаптопурин, азатиоприн	Миелотосичность
<i>GSTT1</i>	Нулевые аллели	Снижение активности глутатион-трансферазы <i>GSTT1</i>	Троглитазон	Гепатотосичность
<i>GSTM1</i>	Нулевые аллели	Снижение активности глутатион-трансферазы <i>GSTM1</i>	Троглитазон	Гепатотосичность
			D-пеницилламин	Повышение эффективности терапии ревматоидного артрита

Таблица 5

**Ассоциации между носительством аллельных вариантов генов, кодирующих транспортеры лекарственных средств, и неблагоприятными фармакологическими ответами**

Ген	Аллельные варианты	Изменение активности транспортера	Лекарственные средства	Изменение фармакологического ответа
<i>MDR1</i>	<i>C3435T, G2677T, G2677A, C1236T</i>	Снижение активности гликопротеина-Р	Дигоксин	Гликозидная интоксикация
			Лоперамид	Миоз (сужение зрачка)
			Нортриптиллин	Гипотония
			Циклоспорин	Нефротоксичность, нейротоксичность
			Ингибиторы протонного насоса	Усиление антисекреторного действия
			Антиконвульсанты	Повышение эффективности терапии эпилепсии
			Аторвастатин	Усиление гиполипидемического действия
<i>OATP-C</i>	<i>OATP-C*1b, OATP-C*15, T521C, – G11127A</i>	Снижение активности транспортера органических анионов С (OATP-C)	Правастатин, аторвастатин, симвастатин	Ослабление гиполипидемического действия

морфизм гена которого изучается. На первом этапе в клинические испытания (КИ) включают небольшое количество здоровых добровольцев (12-30 человек), а ЛС применяется однократно, при этом анализируются не только фармакокинетические параметры, но и, если это возможно, фармакодинамические эффекты (например, АД – для антигипертензивных ЛС, уровень глюкозы в крови – для пероральных гипогликемических ЛС и т.д.). Однако в случаях, если изучаемое ЛС вызывает фармакодинамические эффекты только при длительном применении (статины) или только при наличии патологии (анальгетики), то ограничиваются анализом только их фармакокинетики. Уже на этом этапе могут быть найдены различия фармакокинетических параметров (клиренс, период полувыведения, АУС и т.д.) у лиц, являющихся носи-

телями того или иного аллельного варианта изучаемого гена, по сравнению с теми, кто его не несет. В последующем, проводятся КИ, также с участием здоровых добровольцев, при этом ЛС применяется длительно. В этих КИ, как правило, изучается равновесная концентрация ЛС, регистрируются фармакодинамические эффекты в т.ч. и НЛР. После этого проводятся КИ с участием пациентов. Они также делятся в зависимости от носительства аллельных вариантов того или иного гена и получают ЛС в течение длительного времени. При этом иногда проводятся фармакокинетические исследования ЛС, как правило, укороченные (до 4-6 часов), однако чаще ограничиваются определением равновесной концентрации ЛС. В данных КИ, наряду с НЛР, изучается и эффективность ЛС в зависимости от генотипа.

Подобные рода КИ и стали основными источниками большинства данных по ассоциациям полиморфизма различных генов с изменениями фармакокинетики и, как следствие, развитием НЛР или недостаточной эффективностью ЛС.

Кроме того, одним из способов изучения ассоциаций между НЛР и аллельными вариантами является изучение их частот в группах пациентов, у которых были зарегистрированы НЛР. Например, подобное исследование проводилось в Германии. Woottke и соавт. (2002) опросив 1200 немецких врачей, изучили генотип *CYP2D6* у 26 пациентов с серьезными нежелательными реакциями метопролола (коллапс, асистолия, выраженная брадикардия, А-V блокады III степени) показали, что 38% из них были гомозиготами по функционально дефектным аллельным вариантам гена *CYP2D6*. Эта частота была в 5 раз выше по сравнению с пациентами, у которых не наблюдались серьезные НЛР при применении метопролола [31]. Однако количество подобного рода исследований ограничено.

Очевидно, что наиболее достоверно доказать ассоциацию между носительством аллельного варианта того или иного гена и неблагоприятным фармакологическим ответом можно только в мультицентровом КИ. Этот подход можно назвать фармакогенетикой с позиций доказательной медицины. Лишь небольшое количество подобных ассоциаций подтверждено в мультицентровых исследованиях. Кроме того, не секрет, что большинство проводимых в настоящее время мультицентровых КИ дополняются определением у пациентов аллельных вариантов различных генов. Если спонсором мультицентрового исследования являются государственные структуры, то, как правило, результаты анализа ассоциаций становятся известны широкой медицинской общественности. Однако большинство КИ финансируются крупными фармацевтическими компаниями, при

этом нет гарантий, что данные по найденным ассоциациям всегда публикуются [25].

После выявления и доказательства ассоциации между носительством аллельного варианта того или иного гена и неблагоприятным фармакологическим ответом, разрабатывают тактику фармакотерапии в зависимости от результатов фармакогенетического теста. После этого необходимо провести специальные КИ в которых сравнивались бы эффективность и безопасность ЛС при традиционном подходе и с учетом результатов фармакогенетического теста. Немаловажным аспектом является изучение и фармакоэкономического преимущества применения ЛС с учетом результатов фармакогенетического теста.

Следует отметить, что основные принципы проведения фармакогенетических исследований изложены в специальных рекомендациях FDA, принятых в марте 2005 [16].

### **Перспективы внедрения в клиническую практику фармакогенетических исследований системы биотрансформации и транспортеров**

Следует отметить, что к настоящему времени для большого числа аллельных вариантов различных генов данные по подобным ассоциациям, полученные в КИ, противоречивы или они получены только в единичных КИ. Так, в настоящее время проведено 8 КИ в которых изучалось влияние аллельного варианта *C3435T* гена *MDR1*, кодирующего гликопротеин-P, на фармакокинетику дигоксина. В 5 исследованиях показано, что уровень дигоксина в плазме крови выше у лиц с *TT* генотипом, в 2 КИ- у лиц с *CC* генотипом, и в 1 исследовании не найдено ассоциации между носительством аллельного варианта *C3435T* и уровнем дигоксина в плазме крови [9]. Исключение составляют несколько генов ферментов биотрансформации, для которых фармакогенетические тесты уже раз-

работаны и внедрены в клиническую практику (таблица 4). Кроме того, не все ассоциации между носительством аллельного варианта того или иного гена и неблагоприятным фармакологическим ответом проверены в мультицентровых КИ. Этому есть объективные причины, такие как незаинтересованность фирм-спонсоров в подобных исследованиях или умышленно утаивание результатов. Такие исследования скорее являются исключением, чем правилом.

Очевидно, что фармакогенетический тест целесообразно внедрять в клиническую практику только если частота выявляемого аллельного варианта в популяции составляет более 1%. Однако, если носительство аллельного варианта ассоциируется с опасной для жизни НЛР, то такой тест необходимо использовать, даже если частота данного аллельного варианта менее 1%. Например, частота «медленных» аллельных вариантов гена, кодирующего тиопуринометилтрансферазу (*TPMT*) составляет 0,3%. При этом, в связи с тем, что носительство «медленных» аллельных вариантов гена *TPMT* ассоциируется с серьезными поражениями костного мозга при применении 6-меркаптопурина, выявление подобных генетических особенностей пациентов используются для индивидуализированного выбора режима дозирования данного ЛС, что значительно повышает безопасность проводимой терапии [25]. Однако, частота аллельных вариантов может значительно отличаться в различных этнических группах. Так, фармакогенетический тест может быть клинически значимым в регионах, в которых частота выявляемого аллельного варианта в этнических группах, проживающих на данной территории, высокая. В тоже время, внедрение того же фармакогенетического теста будет менее актуальным, если частота выявляемого аллельного варианта в этнических группах, проживающих на данной территории, наоборот низкая. Например, частота «медленных» аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и

*CYP2C9\*3*, носительство которых ассоциируется с высоким риском кровотечением при приеме варфарина, в европейских этнических группах составляет 11% и 7%, а в азиатских 0,1% и 3% соответственно [32]. Из этого следует, что перед внедрением в клиническую практику фармакогенетического теста в определенном регионе необходимо изучить частоту выявляемого аллельного варианта в этнических группах, проживающих в нем. Подобные исследования активно проводятся в различных странах и, на наш взгляд, особенно актуальны для многонациональных государств, таких как Россия. Так, в Воронеже проведено исследование частоты аллельных вариантов генов, кодирующих изоферменты цитохрома P-450 и гликопротеина-P в этнической группе русских [14]. Нами изучалась частота «медленных» аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* в этнических группах Чукотского АО, а именно у чукчей, эвенов и русских. Оказалось, что частота «медленных» аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у чукчей составляет 3% и 9%, эвенов — 3% и 7% и у русских — 7,4% и 6,6%, соответственно.

Важными характеристиками фармакогенетического теста являются значения чувствительности, специфичности, предсказательной ценности положительного (PPV) и отрицательного результата (NPV). При низких значениях этих показателей внедрение фармакогенетического теста окажется, скорее всего, экономически не оправданным. Кроме того, применение подобного фармакогенетического теста может привести к тому, что у пациента не будет использовано высокоэффективное ЛС, которое может оказаться у него и высоко эффективным и безопасным, несмотря на результаты теста. Эта ситуация наиболее значима в случаях фармакотерапии злокачественных новообразований, ВИЧ-инфекции и других прогностически неблагоприятных заболеваний [25]. Значения PPV и NPV некоторых фармакогенетических тестов представлены в таблице 6.

Таблица 6

**Предсказательные ценности положительного  
и отрицательного результатов некоторых фармакогенетических тестов**

Лекарственное средство	Прогнозируемое изменение фармакологического эффекта	Фармакогенетический тест	PPV %	NPV %
Трициклические антидепрессанты	Гипотония, ажитация, сонливость	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>CYP2D6</i>	63	80
Варфарин	Кровотечения	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>CYP2C9</i>	16	97
D-пеницилламин	Высокая эффективность при ревматоидном артрите	Выявление нулевых аллелей гена <i>GSTM1</i>	30	87
Изониазид	Полиневриты	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>NAT2</i>	24	94

Примечание: PPV – предсказательная ценность положительного результата  
NPV – предсказательная ценность отрицательного результата

Тактика применения ЛС в зависимости от результатов фармакогенетических тестов разработаны только для тех тестов, которые уже применяются в клинической практике (таблица 7).

Таблица 7

**Фармакогенетические тесты, используемые  
в клинической практике для индивидуализации фармакотерапии**

Лекарственные средства	Показания к применению	Фармакогенетический тест	Тактика
Трастузумаб * (Херцептин)	Рак молочной железы	Выявление экспрессии HER2 в опухоли	При выявлении экспрессии HER2 в опухоли показано применение трастузумаба
6-меркаптопурин*	Лимфобластный и миелобластный лейкозы	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>TPMT</i>	При выявлении гетерозиготного носительства «медленных» аллельных вариантов показано назначение 6-меркаптопурина в минимальной дозе (50 мг/м <sup>2</sup> /сутки); при выявлении гомозиготного носительства- воздержаться от применения 6-меркаптопурина.
Тиоридазин*	Шизофрения, маниакально-депрессивный психоз	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>CYP2D6</i>	Выявление «медленных» аллельных вариантов является противопоказанием для применения тиоридазина

окончание табл. 7

Лекарственные средства	Показания к применению	Фармакогенетический тест	Тактика
Трициклические антидепрессанты	Депрессии	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>CYP2D6</i>	При выявлении «медленных» аллельных вариантов необходимо начинать применение антидепрессантов с минимальных доз
Атомоксетин * <sup>А</sup> (Страттера)	Синдром гиперактивности и нарушения внимания у детей	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>CYP2D6</i>	При выявлении «медленных» аллельных вариантов: допускается применение атомоксетина только под контролем терапевтического мониторинга (концентрация атомоксетина в плазме крови); не допускаются комбинации с пароксетином, флуоксетином, хинидином
Пергексила малят ** <sup>А</sup>	Стенокардия напряжения	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>CYP2D6</i>	При выявлении «медленных» аллельных вариантов следует отказаться от применения пергексила
Варфарин	Профилактика и лечение тромбозов и тромбозоболоческих осложнений	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>CYP2C9</i>	При выявлении гетерозиготного носительства «медленных» аллельных вариантов начинать терапию варфарином следует с дозы 2,5 мг/сутки, при выявлении гомозиготного носительства – 1,25 мг/сутки
Сукцинилхолин (дитилин)	Миорелаксация при проведении оперативных вмешательств	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>BCHE</i>	При выявлении «медленных» аллельных вариантов следует отказаться от применения сукцинилхолина
Сульфасалазин	Ревматоидный артрит, неспецифический язвенный колит	Выявление «медленных» аллельных вариантов гена <i>NAT2</i>	При выявлении «медленных» аллельных вариантов поддерживающая доза сульфасалазина не должна превышать 1,5 г/сутки.

Примечание: \* – фармакогенетический тест одобрен FDA

\*\* – фармакогенетический тест применяется только в Австралии и Новой Зеландии

А – препарат в России не зарегистрирован

Экономические последствия внедрения фармакогенетических тестов в клиническую практику, в большинстве случаев рассчитаны лишь теоретически. Так, по подсчетам, сделанным в США, выявление «медленных» аллельных вариантов гена *CYP2C19* для прогнозирования антисекреторного эффекта ингибиторов протонного насоса и выбора их режима дозирования, может сохранить примерно 5000 долларов на каждые 100 протестированных пациентов из азиатских этнических групп [29]. Только для двух фармакогенетических тестов продемонстрировано, что их применение приводит к снижению затрат на лечение. Это тесты, в которых выявляются «медленные» аллельные варианты гена *CYP2C9* для прогнозирования кровотечений при применении варфарина и «медленные» аллельные варианты, а также функциональных аллелей гена *CYP2D6* для прогнозирования НЛР и эффективности трициклических антидепрессантов [10]. Так, при сравнении стоимости лечения варфарином с использованием выявления «медленных» аллельных вариантов гена *CYP2C9* и без него, оказалось, что данный фармакогенетический тест позволяет снизить расходы на 4700 долларов на каждые 100 пациентов, пролеченных в течение 1 года [33].

Таким образом, существование ряда пока неразрешенных проблем связанных с фармакогенетикой является причиной того, что фармакогенетические тесты в клинической практике применяются крайне редко. По данным Gardiner S.J., Begg E.J. (2005) в Австралии и Новой Зеландии за 1 год проводится не больше 1000 тестов. При этом наиболее часто используются определение аллельных вариантов генов *TPMT* (400 тестов в год) и *BCHE* (250 тестов в год). А определение «медленных» аллельных вариантов генов *CYP2D6* и *NAT2* за исследуемый год не

применялись ни разу [15]. В России фармакогенетические тесты в клинической практике также редко используются. Их иногда выполняют в некоторых НИИ РАМН и крупных коммерческих медицинских центрах. Хотя, в России существует законодательная база для использования фармакогенетических тестов в практическом здравоохранении. Так в приказе Минздрава №494 от 22.10.03 «О совершенствовании деятельности врачей-клинических фармакологов» говорится о том, что в крупных ЛПУ должны быть организованы специальные лаборатории фармакогенетики в которых будут проводиться подобные исследования, результаты которых должны использовать клиницисты для персонализированного подхода к выбору ЛС и его режима дозирования [5]. Однако, в приказе нет указаний на то, какие именно фармакогенетические тесты должны быть использованы и как они должны интерпретироваться. Кроме того, не указана техническая база подобной лаборатории (примерный перечень оборудования и расходных материалов). Поэтому пока, указанный приказ носит лишь декларативный характер. Серьезным препятствием к внедрению фармакогенетических тестов в клиническую практику является низкий уровень знаний в области клинической фармакогенетики у врачей и организаторов здравоохранения [8, 12].

## Заключение

За последние несколько десятков лет фармакогенетика системы биотрансформации и транспортеров достигла серьезных успехов. Количество фармакогенетических исследований растет как снежный ком. В сети Internet даже существует постоянно обновляемый ресурс, на котором

собраны результаты всех проведенных фармакогенетических исследований: [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org) [27]. И в настоящее время уже нет никаких сомнений в том, что внедрение фармакогенетических тестов в клиническую практику, является реальным путем к персонализированной медицины, и, как следствие повышение эффективности и безопасности фармакотерапии [13, 30]. Уже разработан ряд фармакогенетических тестов, кроме того активно ведется разработка генетических микрочипов (microarray-technology), позволяющих выявлять одновременно целые серии мутантных аллелей, ответственных за изменение фармакологического ответа. Однако, темпы внедрения достижений фармакогенетики системы биотрансформации и транспортеров в реальную клиническую практику нельзя признать стремительными. Предстоит еще решить ряд проблем, для того чтобы клиническая фармакогенетика стала прикладной наукой, а фармакогенетические тесты стали бы рутинными исследованиями в повседневной клинической практике.

### Литература

1. Бочков Н.П. Генетические подходы к оценке безопасности и эффективности лекарственных средств. // *Клинические исследования лекарственных средств в России*; 2: 4-6, 2002.
2. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева Л.А. Каркищенко В.Н. Фармакогенетика. — Ростов-на-Дону: Феникс, 383 с., 2001.
3. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. — М.: Реафарм, с. 113-120, 2004.
4. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гришанова А.Ю., Макарова С.И., Коваленко С.П. Фармакогенетика и современная медицина. // *Вестник РАМН*; 10: 40-45, 2004.
5. Приказ Минздрава РФ от 22 октября 2003 г. N 494 «О совершенствовании деятельности врачей-клинических фармакологов». [http://www.pharmvestnik.ru/issues/0320/documents/0320\\_17.html](http://www.pharmvestnik.ru/issues/0320/documents/0320_17.html)
6. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. — М.: МИА, 303 с. 2004.
7. Сычев Д.А. Клиническая фармакогенетика. // В кн. *Клиническая фармакология под ред. Кукеса В.Г.* — М.: ГЭОТАР-МЕД, с. 154-167, 2004.
8. Сычев Д.А., Кукес В.Г. Место фармакогенетики в преподавании клинической фармакологии. // В кн. *Развитие образовательного в ММА им. И.М. Сеченова в связи с реализацией болонского процесса. Под ред. Литвицкого П.Ф., Денисова И.Н.* Москва, с. 42-43, 2005.
9. Сычев Д.А., Игнатъев И.В., Раменская Г.В., Колхир С.В., Кукес В.Г. Значение полиморфизма гена MDR1, кодирующего гликопротеин-P, для индивидуализации фармакотерапии. // *Клиническая фармакология и терапия*. 1: 92-96, 2005.
10. Chou W.H., Yan F.X., de Leon J., Barnhill J., Rogers T., Cronin M. Extension of a pilot study: impact from the cytochrome P450 2D6 polymorphism on outcome and costs associated with severe mental illness. // *J Clin Psychopharmacol*. 20:246-251, 2000.
11. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics—drug disposition, drug targets, and side effects. // *N Engl J Med*. Feb 6;348(6):538-49. 2003.
12. Fruech F.W. Education in pharmacogenomics: closing the gap between possibility and reality. <http://www.fda.gov/cder/genomics/presentations.htm>.
13. Huang S.M. Effect of pharmacogenetics and drug-drug interactions on exposure-response: what needs to be done. <http://www.fda.gov/cder/genomics/presentations.htm>.
14. Gaikovičh E.A., Cascorbi I., Mrozikiewicz P.M. et al. Polymorphisms of drug-metab-

- olizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. // *Eur J Clin Pharmacol*. Aug;59(4):303-12, 2003.
15. Gardiner S.J., Begg E.J. Pharmacogenetic testing for drug metabolizing enzymes: is it happening in practice? // *Pharmacogenet Genomics*. May;15(5): 365-9, 2005.
  16. Guidance for industry. Pharmacogenomics data submissions. — FDA. March 2005.
  17. Kalow W. Pharmacogenomics: historical perspective and current status. // *Methods Mol Biol.*;311:3-16, 2005.
  18. Kewal J. Personalized Medicine // *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. Basel: Current Drugs. 2002. Vol. 4 (6). P. 548–558 <http://www.genomica.net/FAR-MACI/Genaisance.htm>.
  19. Kim R.B. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. // *Drug Metab Rev*;34:47-54, 2002.
  20. Kirchheiner J., Fuhr U., Brockmoller J. Pharmacogenetics-based therapeutic recommendations — ready for clinical practice? // *Nat Rev Drug Discov*. Aug;4(8): 639-47, 2005.
  21. Lindpaintner K. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. // *Methods Mol Med.*;108:235-60, 2004.
  22. McLeod H.L., Evans W.E. Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy. // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*;41:101-121, 2001.
  23. Meyer U.A. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. // *Lancet*; 356:1667-1671, 2000.
  24. Mizuno, Takuro Niwa, Yoshihisa Yotsumoto, Yuichi Sugiyama. Impact of Drug Transporter Studies on Drug Discovery and Development. // *Pharmacol Rev* 55:425-461, 2003.
  25. Pharmacogenomics / edited by Rothstein M.A. — New Jersey: Willy-liss. 368 p. 2003.
  26. Silber B.M. // in «Pharmacogenomics», Ed. Kalow W., Meyer U., Tyndale R.F. New York, NY, USA: Marcel Dekker, 2001.
  27. Thorn C.F., Klein T.E., Altman R.B. PharmGKB: The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base. // *Methods Mol Biol.*; 311:179-92, 2005.
  28. Weber W.W. Pharmacogenetics. — Oxford: Oxford University Press, 1997.
  29. Wedlund P.J. The CYP2C19 enzyme polymorphism. // *Pharmacology*; 61:174-83, 2000.
  30. Weinshilboum R. Inheritance and drug response. // *N Engl J Med*; 348:529-537, 2003.
  31. Wuttke H., Rau T., Heide R. et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. // *Clin Pharmacol Ther.*, Oct;72(4):429-37, 2002.
  32. Xie H.G., Prasad H.C., Kim R.B., Stein C.M. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance // *Adv Drug Deliv Rev*;54:1257-1270, 2002.
  33. You J.H., Chan F.W., Wong R.S., Cheng G. The potential clinical and economic outcomes of pharmacogenetics-oriented management of warfarin therapy — a decision analysis. // *Thromb Haemost.* Sep;92(3):590-7, 2004.

**PHARMACOGENETICS OF SYSTEM OF BIOTRANSFORMATION AND  
DRUGS TRANSPORTERS: FROM THE THEORY TO PRACTICE**

**V.G.Kukes, D.A.Sychev, G.V.Ramenskaja, I.V.Ignat'ev**

*Branch «Clinical pharmacology» of the RC BMT of RAMS, Moscow  
Institute of clinical pharmacology FGU «NC ESMP», Moscow*

**Key words:** pharmacogenetics, biotransformation, cytochrome P-40, drug transporters.

On the basis of given literatures, and also results of own researches are stated modern representations about system of biotransformation and drugs transporters, and also about the factors influencing its activity. Questions of influence of genetic features of the person on activity of system of biotransformation and drugs transporters and their clinical value for optimization of pharmacotherapy are in detail covered. The basic stages of realization pharmacogenetics researches of system of biotransformation and drugs transporters are formulated. Problems of introduction in clinical practice pharmacogenetics researches of system of biotransformation and drugs transporters and a way of their decision are designated.

## Оптимизация моделирования биотрансформации лекарственных средств цитохромами СYP-системы

С.Н.Ларина, И.В.Игнатьев, Н.В.Чебышев, Г.В.Раменская, О.Е.Пасхина

*Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова,*

*Институт клинической фармакологии ФГУ НЦЭСМП, Москва*

Цитохромы СYP450 играют решающую роль в осуществлении I фазы биотрансформации ксенобиотиков (в т.ч. лекарственных средств) в организме человека и животных. Для разработки новых лекарств, оценки лекарственных взаимодействий, также как для лучшего понимания путей метаболизма различных ксенобиотиков необходимо изучать метаболизм опосредованный цитохромами P450. В обзоре обсуждается возможность применения разных видов животных с наиболее адекватными системами цитохромов. Различные виды, по-видимому, могут быть использованы для оценки путей биотрансформации и взаимодействия лекарств опосредованных различными системами. Для СYP1A опосредованного метаболизма возможно использование обычных модельных животных, за исключением собаки. Напротив, собака может быть удобна для моделирования СYP2D опосредованного метаболизма. Адекватными представителями для изучения СYP2C путей могут быть обезьяны. СYP3A, по-видимому, хорошо моделируется СYP3A29 свиней или минисвиной. Детальное изучение механизма индукции цитохромов позволяет выявить различные типы регуляции этого процесса. Регуляция индукции СYP450 также является в значительной мере видоспецифической. Важную роль в этом процессе играют ядерные рецепторы PXR, CAR, RXR. Выбор соответствующего модельного животного должен проводиться с учетом механизмов регуляции индукции СYP450.

**Ключевые слова:** биотрансформация, цитохром P450, животные-био модели, индукция, ингибирование.

Цитохромы P450 (СYP) — это ферменты, метаболизирующие малополярные вещества. Они возникли на заре эволюции и имеются у всех современных организмов. Все СYP связывают два атома кислорода. Данные ферменты называются оксидазами со смешанной функцией и относятся к классу монооксигеназ (систематический номер 1.14.14.1). Они катализируют многие типы реакций: гидрокселирование углеводов; эпоксидирование двойных связей; окисление и деалкилирование гетероатов; перенос окислительной группы; расщепление эфиров; дегидрогенизация; восстановление дегалогенирование и др.

У млекопитающих известно более 60 СYP, объединенных в 17 семейств. Члены одного семейства имеют более 40% идентичности аминокислотного состава, члены одного подсемейства — более 55%. Ферменты СYP

можно условно разделить на два класса. Первый класс участвует в биосинтезе. Пример — образование стероидных гормонов из холестерина [7]. Второй класс принимает участие в метаболизме ксенобиотиков.

Важность изучения СYP для практической медицины возросла после того, как несколько лекарственных средств (ЛС) пришлось снять с продаж из-за возникновения не изученных лекарственных взаимодействий, приведших к опасным для жизни последствиям. Это происходит либо при индукции фермента принимаемым лекарством, когда повышение уровня СYP приводит к изменениям метаболизма данного лекарства, либо при ингибировании метаболизма лекарства в результате конкуренции за фермент с другим ЛС субстратом, принимаемым совместно. Примером первого случая является изменение

уровня циклоспорина на фоне приема лекарств, содержащих гиперидин, что приводит к серьезным осложнениям у пациентов после пересадки органов [17]. Второй механизм можно проиллюстрировать на примере взаимодействия терфенадина с противогрибковыми лекарственными средствами (интраконазол, кетоконазол и др.) [35]. При этом у пациентов повышается уровень терфенадина, вызывая опасные для жизни нарушения ритма и частоты сердечных сокращений.

CYP3A4 и сходный с ним CYP3A5 метаболизируют большинство лекарств [6]. Очевидно, что возможно взаимодействие между препаратами, являющимися субстратами CYP3A4. Ингибиторами CYP3A4 являются азоловые противогрибковые средства, некоторые макролидные антибиотики, статины, блокаторы кальциевых каналов и др.

Другие важнейшие представители CYP, принимающие участие в метаболизме лекарств, это:

- CYP2D6, метаболизирующий бета-блокаторы, ингибиторы обратного захвата

серотонина и трициклические антидепрессанты;

- CYP2C9, метаболизирующий S-варфарин, нестероидные противовоспалительные средства, пероральные антидиабетические препараты;
- CYP2C19, метаболизирующий трициклические антидепрессанты;
- CYP2E1, метаболизирующий парацетамол, галотан, этанол, ацетон, ацетонитрил, нитрозамины;
- CYP1A2, метаболизирующий теofilлин, кофеин, клозапин, такрин.

### Экспериментальные животные и их особенности

Одной из важнейших задач фармакологии является изучение молекулярных основ лекарственного метаболизма. Для этого необходимы адекватные экспериментальные модели. Поскольку методы *in vitro* не позволяют должным образом моделировать процессы, происходящие в сложном многоклеточном

Т а б л и ц а 1

### Главные ферменты P450 микросом печени человека и экспериментальные модели для их изучения

CYP	Содержание в печени человека	Доля метаболизируемых ЛС-субстратов	Маркерная активность ферментов	Модельная система
1A2	12%	4%	Кофеин	Крысы, кролики, свиньи
2C9/19	20%	11%	Диклофенак/ (S)мефенитоин	Приматы
2D6	4%	30%	Спартеин, дебризохин, декстрометорфан	Собаки
2E1	6%	2%	хлорзоксазон	Крысы, кролики, свиньи
3A4	30%	52%	Нифедипин, эритромицин, алпразолам, декстрометорфан	Свиньи

организме, огромное значение имеют экспериментальные животные.

### **Крысы**

CYP1A2 крысы имеет высокое сходство со своим аналогом у человека [9]. То же верно и для CYP2E1. Поэтому, крыса является хорошим модельным объектом для изучения лекарств, метаболизируемых этими ферментами.

Вместе с тем, ортологичный CYP3A4 человека CYP3A1 крыс не индуцируется рифампицином [16] и имеет иной набор субстратов [9]. Самое многочисленное подсемейство CYP у крыс – CYP2C, выполняет ту же функцию, что CYP3A у человека [18]. Другому важному для метаболизма лекарств ферменту человека CYP2D6 соответствует ортологичный фермент крысы CYP2D1. Эти два фермента имеют сходную субстратную специфичность. Однако это сходство недостаточно для того, чтобы переносить на человека данные, полученные на крысах [23]. Часто одни и те же вещества у крыс и у человека индуцируют разные CYP [24].

### **Кролики**

CYP кроликов были подробно изучены одними из первых [10]. Ферменты CYP1A2, CYP2E1 и CYP2B4 кроликов сходны с человеческими аналогами [5, 28].

У кроликов, как и у крыс, главную роль в метаболизме ксенобиотиков играет подсемейство 2C (в отличие от 3A у человека) [36].

На данный момент у кроликов не известны ферменты, соответствующие CYP2D6 человека. Известные на настоящий момент CYP2D23 и CYP2D24 пока еще мало изучены [38].

Таким образом, кролики не подходят для большинства фармакологических исследований.

### **Собаки**

CYP собак сильно отличаются от CYP человека [16]. Поэтому они являются пло-

хим объектом для изучения большинства цитохромов.

Исключение составляет CYP2D15 собак, который по своей активности сходен с CYP2D6 человека [26]. Это позволяет рассматривать собак, как перспективную модель для исследования соответствующих ЛС.

У собак также обнаружены CYP2C21 и CYP2C41. Однако эти ферменты изучены недостаточно, что не позволяет проводить параллели с человеком [3].

Интересно, что собаки являются единственными млекопитающими, способными к метаболизму полициклических ароматических углеводов (ПАУ) с помощью CYP 2B11 [9].

### **Приматы**

Среди приматов наиболее популярными модельными объектами являются макаки и мармазетки, хотя у них наблюдаются внутривидовые различия в активности CYP [29]. CYP2E1 приматов имеет сходство с человеческим аналогом по субстратной специфичности [29], однако отличается по механизму индукции [14]. Члены подсемейства цитохромов 2C у приматов имеют высокое сходство с таковыми у человека [29]. Если не будет найдено существенных различий, приматов можно будет считать лучшим модельным объектом для изучения лекарств, метаболизируемых 2C подсемейством.

### **Мини-свиньи**

У свиней обнаружены все аналоги CYP человека [1, 20].

CYP1A2 и CYP2E1 мини-свиньи имеют высокое сходство с соответствующими CYP человека [22, 20]. Несмотря на высокое структурное сходство CYP2D25 свиней с CYP2D6 человека [22], их свойства различаются [20]. У мини-свиней подсемейство 2C представлено довольно широко [7], но изучено недостаточно.

CYP3A29 и CYP3A39 также демонстрируют высокое сходство со соответствующи-

ми формами изоферментов у человека [20, 22] и являются преобладающими среди прочих CYP свиней [32]. Структурное сходство CYP3A29 свиньи и CYP3A4 человека делает мини-свиней хорошим объектом для изучения лекарств, метаболизируемых CYP3A4 [1, 20, 32].

Таким образом, для фармакологического исследования лекарств, метаболизируемых CYP1A2, экспериментальные животные модели являются релевантными, за исключением собак. Как модельный объект, собаки подходят для изучения лекарственных форм, метаболизируемых CYP2D6. Для подсемейства 2C оптимальными модельными животными являются, по-видимому, приматы, хотя при их использовании могут возникать проблемы этического характера. Для моделирования метаболизма под действием CYP3A4 хорошо подходят мини-свиньи.

Отметим, что необходимо параллельное использование моделей *in vitro*, поскольку, несмотря на сходство модельных животных с человеком, межвидовые различия в строении и функциональные особенности ферментов могут вызывать значительные модификации ответа на лекарственное воздействие.

Работа ферментов 1A и 2E сходна у различных видов. Напротив, каталитическая активность цитохромов 2C демонстрирует широкий диапазон межвидовых различий. Различаются как сами изоформы, так и механизмы их регуляции. Различные лекарства могут регулировать работу CYP генов путем связывания в качестве лигандов с соответствующими ядерными рецепторами или транскрипционными факторами. Существуют различные механизмы регуляции работы CYP генов.

Свиньи представляются перспективной моделью для фармакологических исследований, однако, в отличие от грызунов, их система биотрансформации изучена недостаточно.

## Регуляция экспрессии гена CYP1A1

### Механизм индукции и регуляция AhR/DRE

Ген *CYP 1A1* кодирует фермент CYP1A1, катализирующий окисление многих ксенобиотиков, включая ПАУ [1]. Рецептор ароматических углеводородов (AhR) находится в цитоплазме, в комплексе с HSP90 и AIP. При связывании с ПАУ происходит диссоциация AhR от HSP90 и AIP, после чего он связывается со своим ядерным переносчиком (Arnt), происходит проникновение в ядро и связывание гетеродимера AhR/Arnt с диоксин-регулируемым энхансером (DRE), что вызывает активацию транскрипции *CYP 1A1*. По такому механизму происходит индукция целого ряда генов: *CYP 1A2*, *CYP 1B1* и др. [24]. Исследования на мышах выявили влияние генетического полиморфизма AhR на эффективность данного процесса [34]. В настоящее время ведется изучение генетического полиморфизма AhR у человека. Поскольку AhR является основным белком-индуктором CYP1A1, нарушения в кодирующем его гене могут приводить к изменению характера индукции и субстратной специфичности CYP1A1. В гене, кодирующем AhR, выявлен полиморфный маркер *G1721A* (Arg554Lys) [31], ассоциированный с усилением индукции CYP 1A1.

### Экспрессия генов CYP, индуцируемая фенобарбиталом

Молекулярный механизм активации транскрипции генов *CYP* фенобарбиталом долгое время оставался неясным. Однако в последние годы в 5'-нетраслируемых областях ряда генов были обнаружены последовательности, на которые фенобарбитал может воздействовать. [37]. Вероятно, при этом происходит активация ядерных рецепторов, которые, в свою очередь, индуцируют транскрипцию генов CYP.

Фенобарбитал активирует многие гены (более 50), продукты которых принимают участие в биотрансформации [8]. Он является прототипом группы ксенобиотиков – барбитурат подобных индукторов. Эта группа включает в себя лекарства (барбитураты, фенитоин, карбамазепин, клофимазол, ловастин, примидон, циклофосамид), пестициды (диэлдрин, хлордан, метоксихлор), растворители (ацетон, пиридин) и др.

Предполагалось, что фенобарбитал регулирует экспрессию генов, стимулирует синтез стероидов и стероид-индуцированную активацию транскрипции посредством стероидных рецепторов [30]. Попытки идентифицировать эти рецепторы пока не увенчались успехом [19]. Перспективным представляется дальнейшее изучение промоторов барбитурат-индуцируемых генов и белков, которые связываются с этими последовательностями.

Последовательность *Barbie box* обнаружена в промоторных областях почти всех генов, индуцируемых фенобарбиталом [37]. Высокая консервативность данной последовательности позволяет предположить, что она играет важную роль в механизме барбитурат зависимой индукции. [11].

Исследования регуляторных элементов, находящихся на разном расстоянии от точки начала трансляции показали, что участки, находящиеся от нее на расстоянии более 800 п.н., более важны для ответа на фенобарбитал [25]. Эта область также ответственна за специфическую для клеток печени экспрессию генов. Дальнейшие исследования выявили присутствие в ней барбитурат-отвечающих элементов. Эти последовательности содержат энхансерный модуль, отвечающий на фенобарбитал (PBREM). Продолжаются поиски рецепторных белков, которые экспрессируются и связываются с PBREM после введения фенобарбитала.

Ядерные гормональные рецепторы (NHR) – это суперсемейство транскрипционных факторов, активируемых эндо-

генными веществами, такими как стероиды, тиреоидные гормоны, ретиноиды и пр. В настоящее время насчитывают более 70 членов этого суперсемейства. Они имеют значительное сходство с классическими стероидными и тиреоидными гормональными рецепторами. Членами этого суперсемейства являются так называемые орфан-рецепторы. Эти рецепторы в составе димера с RXR связываются с ДНК в области (AG[G/T]TCA)*n* повторов. Специфичность связывания рецептора определяется ориентацией, последовательностью и расстоянием между повторами [18]. Два члена семейства NHR – PXR и CAR являются наиболее важными для индукции многих CYP у различных видов млекопитающих.

CAR является рецептором млекопитающих и дрожжей, который может индуцировать экспрессию генов в ответ на воздействие ретиноевой кислоты [4]. Ген, кодирующий CAR, транскрибируется в отсутствие лиганда. При связывании CAR с соответствующим фрагментом регулируемого гена происходит инактивация последнего. Инактивация CAR лигандом, напротив, приводит к включению контролируемого гена. Активация CAR также происходит под воздействием лиганд-независимого коактиватора, такого как коактиватор стероидного рецептора 1 (SRC1). Вероятно, CAR может также участвовать в ответе на фенобарбитал, однако прямое связывание индуктора с CAR не было показано.

PXR является другим барбитурат индуцируемым рецептором [15]. Он селективно экспрессируется в печени и эпителии кишечника, там же, где идет экспрессия CYP3A4. PXR активируется неродственными индукторами CYP3A4 человека и CYP3A1 крыс: макролидными антибиотиками, противогрибковыми препаратами, синтетическими глюкокортикоидами, барбитурат подобными индукторами и пр. [37]. PXR димеризуется с RXR и активирует гены CYP 3A. PXR разных видов акти-

вируется аналогичными индукторами. Однако гомологичные PXR человека и животных могут значительно различаться по степени связывания лигандов. Различная степень активации PXR является возможной причиной видовых различий в экспрессии генов 3A подсемейства.

Идентичный рецептор был обнаружен у человека, он был назван SXR (стероидный рецептор ксенобиотиков) [2]. Лекарства, индуцирующие CYP 3A, используют его для активации промотора CYP 3A. Был обнаружен природный лиганд этого рецептора. Им оказался гиперфорин, фуранокумарин зверобоя продырявленного, индуцирующий CYP 3A4 [21]. Это открытие дало старт изучению лекарственного взаимодействия, вызываемого этим ЛС.

Показано, что лекарства, индуцирующие CYP 3A4, являются лигандами для PXR [12].

### **Видовые различия в индукции CYP 3A и CYP 2B**

Интересные видовые различия в индукции CYP 3A наблюдались при использовании типичного индуктора CYP 3A крыс PCN. Ни у кроликов, ни у человека не происходило индукции CYP 3A в ответ на PCN [13]. Так же один из самых эффективных индукторов CYP 3A человека и кроликов, рифампин, не индуцировал CYP 3A у крыс [13].

Сравнение PXR, выделенного из крыс [39], кроликов [12] и человека [15] показало, что аминокислотное сходство составило более 90% для ДНК-связывающего домена и лишь около 70% для лиганд-связывающего [12, 39]. Профиль активации лигандами PXR у различных видов соответствует профилю индукции CYP 3A *in vivo*, однозначно доказывая, что видовые различия в индукции CYP 3A лекарствами и стероидами является результатом различий в лиганд-связывающем домене PXR.

### **Взаимодействие ядерных гормональных рецепторов, CYP и ABC-транспортеров**

Ядерные гормональные рецепторы PXR и CAR являются интегрированной частью биологического ответа на токсины. Перед исследователями стоит задача не просто выявить все гены, участвующие в контроле этого процесса, но и понять характер взаимодействия между ними. PXR и CAR регулируются по принципу прямой связи. Например, таксол активирует PXR [33], приводя к усилению своей элиминации, так как PXR, в свою очередь, индуцирует ген *MDR1*, кодирующий Р-гликопротеин (Pgp). Поскольку Pgp выводит многие лиганды PXR, он служит тонким регулятором концентрации лиганда, доступного для PXR. Степень индукции CYP3A лекарствами, являющимися лигандами PXR и субстратами Pgp, определяется его уровнем в клетке [27]. Менее изучены компоненты обратной связи этого молекулярного пути. Вещества, контролируемые PXR по типу обратной связи, регулируют силу и длительность PXR активации.

### **Заключение**

Таким образом, организм имеет строго контролируемую систему метаболизма и выведения ксенобиотиков и продуктов обмена. Эффективность работы этой системы зависит от состояния всех ее элементов. Поэтому, воздействуя на один из таких элементов, можно разбалансировать всю систему, что приведет к тяжелым для организма последствиям. В ходе доклинических испытаний необходимо тщательно проверять лекарственные средства в плане того, на какие элементы данной системы и в какой степени они могут воздействовать. Для этого нужно

широко задействовать весь спектр возможностей современной науки, так как, в конечном счете, речь идет о человеческой жизни. И модельные животные дают хороший шанс заранее отбраковать препараты, вызывающие нежелательные эффекты. Надо лишь правильно использовать модельные объекты для эксперимента, учитывая их особенности.

### Литература

1. Anzenbacher P., Souè ek P., Anzenba-cherová E., et al. Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. // *Drug Metab. Dispositio*, 26:56, 1998.
2. Blumberg B., Sabbagh W., Juguilon H. et al. SXR, a novel steroid and xenobiotic sensing nuclear receptor. // *Genes Dev.* 12, 3195-3205, 1998.
3. Chauret N., Gauthier A., Martin J., Nicoll-Griffith D.A. In vitro comparison of cytochrome P450-mediated metabolic activities in human, dog, cat, and horse. // *Drug Metab. Disposition.* 25: 1130, 1997.
4. Czekaj P. Interakcje receptorow hormone tarczycy I pochodnych witamin A I D z DNA. // *Post. Biol. Kom. (in Polish)*, 23, 261-278, 1996.
5. Ding X., Pernecky S.J., Coon M.J. Purification and characterization of cytochrome P450 2E2 from hepatic microsomes of neonatal rabbits. // *Arch. Biochem. Biophys.*, 291: 270, 1991.
6. Dresser G.K., Spencer D.J., Bailey D.G. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. // *Clin. Pharmacokinet.*, 38: 41, 2000.
7. [http://drnelson.utmem.edu/cytochrome P450.html](http://drnelson.utmem.edu/cytochrome%20P450.html)
8. Frueh F., Zanger U., Meyer U. Extent and character of Phenobarbital-mediated changes in gene expression in the liver. // *Mol. Pharmacol.*, 51, 363-369, 1997.
9. Guengerich F.P. Comparisons on catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. // *Chem.-Biol. Interact.*, 106: 161, 1997.
10. Haugen D.A., Coon M.J. Properties of electrophoretically homogenous Phenobarbital- inducible and beta naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. // *J. Biol. Chem.*, 251: 7929, 1976.
11. He J., Fulco A. A barbiturate-regulated protein binding to a common sequence in the cytochrome P450 genes of rodents and bacteria. // *J. boil. Chem.*, 226, 7864-7869, 1991.
12. Jayyosi Z., Muc M., Erick J. et al. Catalytic and immunochemical characterization of cytochrome P450 isozyme induction in dog liver. // *Fundam. Appl. Toxicol.*, 31: 95, 1996.
13. Kobayashi K., Urashima K., Shimada T., Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: Screening with cDNA-expressed system of the rat. // *Biochem. Pharmacol.*, 63: 889, 2002.
14. Kocarek T.A., Schuetz E.G., Strom S.C. et al. Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit and human hepatocytes. // *Drug Metab. Dispos.*, 23, 415-421, 1995.
15. Larsen M.C., Jefcoate C.R. Phenobarbital induction of CYP2B1, CYP2B2 and CYP3A1 in rat liver, genetic differences in a common regulatory mechanism. // *Arch. Biochem. Biophys.*, 321, 67-476, 1995.
16. Lehmann J., McKee D., Watson M. et al. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. // *J. Clin. Invest.*, 102, 1016-102, 1998.
17. Mai I., Krüger H., Budde K. et al. Hazardous pharmacokinetic interaction of Saint John's wort (*Hypericum perforatum*) with the immunosuppressant cyclosporine. // *Int. J. Clin. Pharmacol. Therapeutics*, 38: 500, 2000.

18. Mandelbaum A., Pertyborn F., Martin/Facklam M., Wiesel M. Unexplained decrease of cyclosporine trough levels in a compliant renal transplant patient. // *Nephrol. Dialysis Transplantation.*, 15: 1473, 2000.
19. Mangelsdorf D.J., Evans R.M. The RXR Heterodimers and Orphan Receptors. // *Cell*, 83, 841-850, 1995.
20. Miller E., Miller J.A. Mechanisms of chemical carcinogenesis. // *Cancer*, 47, 1055-64, 1981.
21. Monshouwer M., van't Klooster G.A.E., Nijmeijer S.M. et al. Characterization of cytochrome P450 isoenzymes in primary cultures of pig hepatocytes. // *Toxicol. In Vitro*, 12: 715, 1998.
22. Mulling M.E., Horowitz B.Z., Linden D.H. et al. Life-threatening interaction of mibefradil and beta-blockers with dihydropyridine calcium channel blockers. — *JAMA*. 280: 157, 1998.
23. Myers M.J., Farrell D.E., Howard K.D., Kawalek J.C. Identification of multiple constitutive and inducible hepatic cytochrome P450 enzymes in market weight swine. // *Drug Metab. Disposition*, 29: 908, 2001.
24. Prasad R., Prasad N., Harrel J.E. et al. Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and lymphoblast formation in lung cancer patients. // *Int. J. Cancer*, 23, 316-320, 1979.
25. Quattrochi L.C., Tukey R.H. The human CYP 1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene. // *J. Biol. Chem.*, 269: 6949, 1994.
26. Ramsden R., Sommer K.M., Omiecinski C.J. Phenobarbital induction and tissue-specific expression of the rat CYP2B2 gene in transgenic mice. // *J. Biol. Chem.*, 268, 21722-21726, 1993.
27. Roussel F., Duignan D.B., Lawton M.P. et al. Expression and characterization of canine cytochrome P450 2D15. // *Arch. Biochem. Biophys.*, 357: 27, 1998.
28. Schuetz E.G., Schinkel A.H., Relling M.V., Schuetz J.D. P-glycoprotein, a major determinant of rifampicin-inducibile expression of cytochrome P4503A in mice and humans. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4001-4005, 1996.
29. Schwartz P.S., Waxman D.J. Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. // *Mol. Pharmacol.*, 60: 1268, 2001.
30. Sharer J.E., Shipley L.A., Vandenbrande M.R. et al. Comparisons of phase I and phase II in vitro hepatic enzyme activities of human, dog, rhesus monkey, and cynomolgus monkey. // *Drug metab. Disposition*, 23: 1231, 1995.
31. Shehin S.E., Stephenson R.O., Green-lee W.F. Transcriptional regulation of the human CYP1B1 gene. Evidence for involvement of an aryl hydrocarbon receptor response element in constitutive expression. // *J. Biol. Chem.*, 275, 6770-6776, 2000.
32. Smith G., Henderson C., Parker M. et al. 1,4-Bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene, an extremely potent modulator of mouse hepatic cytochrome P-450 gene expression. // *Biochem. J.*, 289, 807-813, 1993
33. Sueyoshi T., Kawamoto T., Zelko I. et al. The repressed nuclear receptor CAR responds to Phenobarbital in activating the Human CYP2B6 Gene. // *J. Biol. Chem.*, 274, 6043-6046, 1999.
34. Synold T.W., Dussault I., Forman B.M. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. // *Nat. Med.*, 5: 584-90, 2001.
35. Thomas P.E., Kouri R.E., Hutton J.J. The genetics of aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mice: a single gene difference between C57BL-6J and DBA-2J. // *Biochem. Genet.*, 6, 157-68, 1972.
36. Thummel K.E., Wilkinson G.R. In vitro and in vivo drug interaction involving human CYP3A. // *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38: 389, 1998.
37. Wei P., Zhang J., Egan-Hafley M. et al. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. // *Nature*, 407, 920-923, 2000.

38. *Whitlock J., Denison M.* Human cytochrome P450 enzymes; in *Cytochrome P450: Structure, Mechanisms and Biochemistry* (Ortiz de Montellano, P., ed.) – *New York, Plenum Press, pp. 367-390, 1995.*
39. *Yamamoto Y., Ishizuka M., Takada A., Fujita S.* Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel rabbit cytochrome P450 isozymes, CYP2D23 and CYP2D24. // *J. Biochem. (Tokyo), 124: 503, 1998*

**OPTIMIZATION OF MODELLING  
OF DRUG BIOTRANSFORMATION BY CYP-SYSTEM CYTOCHROMES  
S.N.Larina, I.V.Ignatiev, N.V.Tchebyshev, G.V.Ramenskaya, O.E.Paskhina**

*Moscow Sechenov Medical Academy,  
Institute of Clinical Pharmacology NC ESMP, Moscow*

**Key words:** biotransformation, cytochrome P450, animal models, induction, inhibition.

Cytochrome P450 (CYP) are enzymes known for their role in I phase of xenobiotics (and drug) biotransformation in human and animal organism. For the development of new drugs, evaluation of drug-drug interactions, as well as for better understanding of different xenobiotics metabolism is necessary to study drug metabolism mediated by cytochromes P450. In this review is discussed the possibility to use different animal species with adequate CYP systems involved. Different species, seem to be, available to biotransformation and drug interaction mediated by different CYP systems. For CYP1A1-mediated pathways, all the commonly used experimental models are appropriate except probably the dog. On the contrary the dog, seems to be suitable for modeling of processes depending on the CYP2D. The adequate system for CYP2C studying can be based on monkey (*Macaca rhesus*). The CYP3A may be well modelled by pig or minipig CYP3A29. Detailed studying of CYP450 induction reveals the different types of this process regulation. CYP450 induction is also species-specific. Nuclear receptors PXR, CAR, RXR play important role in this process. The mechanisms of CYP450 induction should be taken in to account when evaluation of appropriate animal models occurs.



## ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ: НОВЫЙ ВЗГЛЯД

### Исследователи предпочитают мышей BALB/c

**В.Н. Каркищенко, Е.Ф. Шмидт, Е.В. Брайцева**

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Мыши инбредной линии BALB/c чаще других используются в экспериментах. Это одна из наиболее старых линий. Она считается нераковой, хотя частота опухолей молочных желёз, лёгких и почек составляет в некоторых сублиниях 20-40%. Самки BALB/c не имеют фактора молока, их используют как кормилиц. Мыши этой линии подвержены заболеваниям сердечно-сосудистой системы и отличаются высоким систолическим давлением крови. Они чувствительны к желудочно-кишечным инфекциям. Их используют в разработке новых биомедицинских технологий.

**Ключевые слова:** инбредные мыши, BALB/c, использование в эксперименте.



BALB/c – наиболее широко используемая в экспериментах линия мышей. Она является одной из древнейших инбредных линий, считается нераковой (хотя ретикулоэндотелиальные опухоли и опухоли молочных желёз в некоторых сублиниях встречаются у 20% старых животных, первичные опухоли лёгких – у 30%, а опухоли почек – у 40% животных). Окрас шерсти белый, цвет глаз красный (эффект гена альбинизма). Обладают большой (для мышей) продолжительностью жизни, хорошо размножаются и являются прекрасными кормилицами, почему их часто используют для выкармливания мышат из других линий и стоков, к тому же самки BALB/c не несут фактор молока. Самки этой линии служат одним из родительских партнёров для производства гибридов F1. Мыши большинства субли-

ний не склонны к ожирению, старые животные нередко выглядят истощёнными, что, по-видимому, связано с повышенной стачиваемостью и хрупкостью зубов. Подвержены заболеваниям сердечно-сосудистой системы (тромбоз левого предсердия), нарушениям системы свёртывания крови, отличаются высоким систолическим давлением крови. Чувствительны к желудочно-кишечным инфекциям. В последние годы мышей этой линии активно используют в разработке новейших биомедицинских технологий: в производстве плазмочитов, предназначенных для получения моноклональных антител, и для создания генетически модифицированных животных – нокаутных и трансгенных.

**Фенотип окраски:** белые (альбиносы)

**Генотип:** b (Турр 1b), c (Турр c), H-2d

**Инбредный возраст:** F186

**Происхождение:** Линия происходит от мышей-альбиносов, приобретённых Баггом в 1913 г. (США). Инбридинг начал Мак-Дауэлл в 1923 г., от него в 1932 г. линия была передана Снеллу на F26. В Ях мыши BALB/c попали в 1947 г. на F41; в Лас (Великобритания) – на F61, в Сто (СССР) – в 1958 г. на F70; в Y – в 1971 г. на F105.

## Биологическая характеристика (фенотипические особенности и реакции, обусловленные генотипом):

### Онкология

*Традиционно считается нераковой линией. У интактных животных редко возникают опухоли молочных желёз, но при введении фактора молока их частота значительно увеличивается.* Она различна в разных сублиниях, но если по данным Helston и Vlahakis эти опухоли встречаются у 20% самок в возрасте 16,5 месяцев, то у самок BALB/c, вскормленных самками СЗН, они наблюдаются у 100% животных. Частота первичных опухолей легких колеблется в разных сублиниях от 10% до 32%; лейкемии от 0 до 5%; опухолей почек от 25% до 40%; ретикулоэндотелиальных опухолей от 11% до 20%; синовиальных от 2% до 8% [38,39].

В сублинии StoY опухоли молочных желёз наблюдались у 1,8% размножавшихся самок в возрасте 473 дней. Опухоли лёгких были обнаружены у 12,2% самок той же сублинии на 582 день, тогда как в других сублиниях их частота выше в 2-3 раза. У 5% самок StoY 572 дней были злокачественные ретикулярные новообразования. У старых мышей изредка встречаются ангиомы, опухоли яичников и надпочечников, лимфосаркомы [4]. Причиной снижения частоты опухолей лёгких в сублинии Sto может быть предрасположенность мышей этой линии к пневмонии, ведущая к сокращению продолжительности жизни [33]. При асцитной форме опухоли L-1210 происходит увеличение числа лейкоцитов в 2 раза [25].

У *безмикробных мышей* частота опухолей 43%: опухолей легких 21%, ангиом 6%, лимфосарком 5% и других опухолей менее чем по 3% каждой. [38].

Несут аллель Fv-1<sup>b</sup>, обуславливающий *способность репликации В-тропных вирусов*

*лейкоза мышей*, а также экотропных эндогенных вирусов, относящихся к В-типу. *Служат моделью спонтанной регрессии саркомы Молони*, которая происходит в случае заражения взрослых мышей вирусом M-MuLV. В то же время заражение новорожденных мышей или взрослых животных, обработанных облучением или антилимфоцитарной сывороткой, ведет к прогрессивному необратимому развитию опухоли [14].

При экспериментальном *вирусном лейкозе Френда*, происходит нарастание числа лейкоцитов периферической крови с последующим их снижением на 19 сутки. Общее количество клеток костного мозга в первые дни после заражения снижается, а к 14-19 дням поднимается до 17. Лейкозное поражение костного мозга обнаруживается на 4-5 день появлением в мазках до 6-8% бластных клеток, а к 14-19 суткам число их достигает 19,8-23,8%. Число проэритроцитов до 19 дня не превышает 5%. По мере развития лейкоза число зрелых клеток костного мозга снижается с 42,7% (норма) до 30,7-23%. Количество лимфоцитов уменьшается с 28-30% до 22,0-18,1% [21]. Высоко чувствительны к вирусу лейкемии BALB/Tennet. Передача вируса мышью лейкемии через три последовательных поколения происходит в 100% случаев. Высоко чувствительны к развитию лейкемии при *заражении вирусом Френда* [38].

При введении *вируса Раушера* наблюдается увеличение селезёнки в 30-40 раз, 100% гибель животных к 40-у дню после инфицирования (при низком содержании интерферона и антител в сыворотке крови). У инфицированных 1-2-месячных животных развивается гломерулонефрит [4]. *Резистентность к лейкомогенному действию ретровируса Раушера может быть индуцирована* путём избирательного подавления аутоиммунной реакции против антигенов H-2 системы. Для этого живот-

ным вводили (подкожно в дозе 40 мкг белка на мышь) иммуносорбент антител, полученных из сыворотки мышей этой же линии с развивающимся лейкозом. Через 2 недели животных иммунизировали трёхкратно с недельными интервалами подкожными инъекциями сонгенных клеток вируса Раушера, после чего, вводили вирус. Иммунизированные мыши оказались высокорезистентными, лейкоз не развился у них на протяжении 3 месяцев наблюдения, тогда как контрольные животные погибали от лейкоза в течение 1,5 месяцев с момента введения вируса [30].

*Благодаря низкой частоте спонтанных опухолей животных этой линии широко используют в долгосрочных экспериментах наряду с гибридами F1. По этой же причине мыши BALB/c стали популярными для генноинженерных проектов: большое количество трансгенных и нокаутных мышей выведено на их основе.*

### Морфологические особенности и дефекты развития

*У самок самый высокий вес мозга, как абсолютный, так и относительный к весу тела, из всех испытанных линий.* Относительный вес мозга довольно высок и у самцов. В мозге мышей BALB/c некоторых сублиний *нет мозолистого тела* (признак наследуется полигенно с эпистатическим взаимодействием генов) [4] в других сублиниях *оно отсутствует* у 39% животных. [38]. *Нервный пучок свода часто сталкивается с передней комиссурой*, которая у некоторых мышей этой линии перемещена и проходит позади или через нервный пучок свода (дефект обусловлен полигенным аддитивным наследованием с пороговым проявлением) [4]. Большой относительный объем переднего мозга и гипоталамуса. *Строение Аммониева рога* (гиппокамп и борозда Аммониева рога) отличается от такового у 7 других линий мышей. *Гипофиз*

*маленький.* Большое число А10-допамиnergических нейронов в области среднего мозга. Изредка (менее чем у 2% мышей) наблюдаются случаи висцеральной инверсии. *Большая масса спинного мозга по сравнению с массой тела.* [38,39].

Имеют *сравнительно высокий относительный вес подчелюстной железы* среди восьми испытанных линий, у самок — *самый высокий относительный вес надпочечников.* Для них характерны *очень большие ретикулоэндотелиальные органы* по сравнению с весом тела. Почти у всех самцов к 20 месяцам развивается *амилоидоз селезёнки* [4]. *Большой относительный вес почек. Селезёнка большая* в любом возрасте. Добавочную селезёнку имеют около 21% животных. Низкая смертность после *неонатальной тимэктомии* [38,39]. Абсолютный и относительный *вес тимуса* в 1,5 раза, а селезёнки в 2 раза больше, чем у CBA/Lac, тогда как *число Пейеровых бляшек* в тонком кишечнике достоверно ниже и последние мельче по размеру [10]. *У мышей BALB/c по сравнению с мышами C57BL/6 относительный вес селезёнки выше*, и в ней содержится в 1,5 раза больше кардиоцитов, однако белая пульпа в селезёнке составляет не более 25% всей площади органа (тогда как у B6 — 40%). Средняя площадь фолликула значительно меньше, чем у B6. В селезенке понижено относительное содержание Т-лимфоцитов, и в ней находится больше blastов, больших и средних Т-лимфоцитов и меньше малых и более дифференцированных Т-клеток. В селезенке содержится в 2-3 раза меньше клеток, спонтанно образующих розетки с эритроцитами барана, количество ЕАС-РОК в ней в 1,5 раза выше [31].

### Чувствительность к физическим факторам

Наиболее чувствительны к *радиации* из 10 испытанных линий: ЛД50:30 самцов < 570 рад, ЛД50:30 самок = 585 рад. После *рентгеновского облучения* самок на 10-й

день беременности (доза 150 Р) у 5-8% эмбрионов наблюдается полидактилия задних конечностей (это значительно ниже, чем у C57BL/6) [4]. Соматическая радиочувствительность обусловлена высокой чувствительностью систем гематопоэза, клеток костного мозга. Не выявлено отличий радиационных эффектов в половых клетках самцов линии BALB/c от таковых у других линий (данные, полученные ранее в бельгийском центре ядерных исследований города. Моль) [40]. Линия обладает нормальными системами генетической репарации хромосомных повреждений. Известный репароген ПАБК практически не влиял на радиочувствительность мышей BALB/c [23]. Отсутствие корреляции между соматической и генетической радиочувствительностью установлено в опытах с гамма-излучением [20].

В эпителии пищевода в разные сроки после инверсии фоторежима происходит постепенный фазовый *сдвиг ритмов митотического индекса и индекса меченых ядер*. Через 17 дней происходит полная перестройка этих ритмов, причем параметры клеточного цикла остаются одинаковыми [24].

Резистенты к *гипербарическому действию* кислорода [38]. Высокая выживаемость в среде со 100% кислородом при давлении в 3 атмосферы (среди 18 испытанных линий) [11]. Под воздействием *острой гипоксии* («подъем» на барокамере на «высоту» 7 тысяч м на 1 час) исходно низкая интерлейкин-1-подобная активность перитониальных макрофагов существенно не меняется, а активность бутирилхолинэстеразы достоверно снижается [15].

Неполовозрелые мыши BALB/c по частоте *судорожных припадков* (26%), в ответ на звук высокой интенсивности (электрический звонок, 110 децибел), занимают промежуточное положение среди 9 испытательных линий; летальных исходов не наблюдается [35].

*Используются для изучения действия коротковолнового излучения на организм млекопитающих, фотопериодизма.*

### Чувствительность к химическим факторам

**Летальное действие:** Чувствительны к озону вследствие дефицита тирозиназы и пероксидазы в лёгких и коже. Летальная доза составляет 34-36 ppm/час. Самцы чувствительны к *тиоТЭФ*, у них обнаружен резко выраженный пороговый эффект: при ЛД = 23,75 мг/кг; смертность от 0 до 100% колеблется в диапазоне доз от 22,5 до 25 мг/кг [4]. Чувствительны к токсическому действию *хлороформа*. Резистентны к токсическому эффекту *изониазида* [38,39]. Резистентны к токсическому действию *циклофосамида* [29].

**Канцерогенный эффект:** Способность к индукции микросомных монооксигеназ печени при введении *полициклических ароматических углеводородов (ПАУ)*, обладающих канцерогенной активностью, обусловлена у мышей этой линии доминантным аллелем аутосомного гена Ah<sup>b</sup>. Поэтому у мышей, чувствительных к индукции бензпиренгидроксилаз ПАУ, при обработке *3-метилхолантrenom* саркомы возникают в 5-10 раз чаще, чем у животных, несущих рецессивный аллель Ah<sup>d</sup> [14]. Чувствительны к индукции опухолей *3-метилхолантrenom*. Высокая частота опухолей легких после внутрижелудочного введения *метилхолантрена*. Чувствительны к индукции лейкемии, но резистентны к индукции опухолей печени *неонатальным введением ДМБА*. Высокая частота интерстициальных опухолей семенников, индуцированных *стилбэстролом*, высокая частота гемангиоэндотелиом, особенно в межлопаточной жировой подушке и легких у мышей, обработанных О-аминоазотолуеном. Введение *минерального масла* (внутрибрюшинно) индуцирует развитие трансплантируемых плазмцитом (миелом) [38,39]. Минеральное масло вызывает обра-

зование плазмоклеточных опухолей, при этом ослабляется интенсивность иммунных реакций. Уретан индуцирует опухоли у обоих полов [4].

**Тератогенный эффект:** Обладают слабой чувствительностью к действию временной гипоксии на 9-м дне беременности; уродства позвоночника и рёбер возникают у 17% эмбрионов. Чувствительны к 7,12-диметилбензантрацену. Инсулин вызывает слабый эффект. Относительно резистентны к тератогенному действию 5-флуороурацила на задние конечности.

**Цитогенетический эффект:** Занимают среднее положение по чувствительности к кластогенному эффекту тиюТЭФ в клетках костного мозга и сравнительно устойчивы к индукции хромосомных aberrаций в сперматогониях самцов среди 11 испытанных линий [2]. Однократное внутрибрюшинное введение самцам циклофосфамида в дозе 50 мг/кг вызывает aberrации 28,8% метафаз (меньше, чем у DBA/2, но больше, чем у 2 других [4] испытанных линий) [9]. Имеют минимальный уровень внепланового синтеза ДНК среди 22-х линий и стоков мышей при репарации химически индуцированных повреждений хромосом после введения метилметансульфоната в дозе 75 мг/кг и минимальный уровень внепланового синтеза ДНК в преспермиогенных клетках. Несовпадение повышенной чувствительности к тиюТЭФ с пониженным уровнем внепланового синтеза ДНК, индуцированным метилметансульфонатом отражает различия в молекулярных механизмах повреждения хромосом и различия в путях репарации [19]. Кластогенный эффект канцерогена бенз(а)пирена не зависит от микробиологического статуса животных [3].

**Повреждающее действие:** Чувствительны к индукции нефрозов дауномицином. Чувствительны к изъязвлению кожи под действием ДМБА [38,39]. Семенники резистентны к повреждающему действию кадмия [4]. Чувствительны к инсулину [38,39].

**Иммунодепрессивный эффект:** Относительно резистентны к иммунодепрессивному действию циклофосфана, тиофосфамида и сарколизина – алкитирующих агентов, различающихся по химической структуре и фармакологическому действию [28]. К иммунодепрессивному действию циклофосфана более резистентны, чем DBA/2 и CBA/Lac, хотя микросомы печени эффективно его [27]. Чувствительность к иммунодепрессивному действию ЦФ такая же как у WR, а к действию тиюТЭФ – ниже, чем у последних [13].

**Другие эффекты:** Никотин улучшает обучаемость избеганию шока. Слабое двигательное возбуждение после обработки D-амфетамином. Нечувствительны (по эозинфильному ответу) к ацетату кортизона [38,39].

Чувствительны к индукции монооксигеназы печени под воздействием полициклических ароматических углеводов (введение 3-метилхолантрена вызывает 4-6-кратное увеличение скорости гидроксилирования 3,4-бензпирена в микросомах печени) [17].

При суммарной активности холинэстераз (ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы), выраженной в микромолях субстрата в миллилитре крови в час, у животных в возрасте 45 дней этот показатель в норме составляет у самок 260, у самцов 239 мкМ/мл/час. Через 24 часа после обработки хлорофосом и «Дерматозолем» активность ферментов повышается до 396-480 у самок и 386-460 у самцов, на 5-12 день она возвращается к норме [36].

### Фармакология и токсикология

Продолжительность гексобарбиталового сна у самок BALB/c больше, чем у NZWi AKR, но меньше, чем у DBA/1, DBA/2, C57BL/Lac, C3H/He, CBA/Ca, C57L и 129. У самцов – средняя среди 15 испытанных линий [11].

### Чувствительность к инфекционным заболеваниям

Средний уровень смертности при спонтанной эпизоотии экстремелии из 8 испытанных линий [11]. При *экспериментальной коли-инфекции* у взрослых мышей этой линии на ранних стадиях опыта патологические изменения в кишечнике менее выражены чем у СВА/Lac. Через 2-е суток эти межлинейные различия нивелируются: На 1-е сутки после заражения (per os E.coli штаммом 0III) некротические процессы в подвздошной кишке у мышей BALB/c проявляются слабее, чем у СВА/Lac, репаративные процессы, которые начинаются у них на 2-е сутки в слизистой оболочке подвздошной кишки, также менее выражены, чем у СВА/Lac. Через 4 суток процессы репарации в кишечнике завершаются [12].

Восприимчивы к Salmonella typhimurium, вирусам Раушера, саркомы Молони, Френда, Коксаки, жёлтой лихорадки, оспенной вакцины, гриппа, диареи инфантильных мышей. Чувствительны к лейшмании. Резистентны к вирусу ЛХМ, вирусу Графи, стафилококковой инфекции. Наиболее резистентны к Eimeria из 8 испытанных линий. По чувствительности к V. Antracis и вирусу кори занимают среднее положение [4].

NB! Мыши BALB/c могут служить удобной моделью для изучения медленных вирусных инфекций.

Высокочувствительны к *нейротропному штамму вируса гепатита мышей МНУ-ЛНМ*. Сравнительно резистентны к *вирусу лимфоцитарного хориоменингита (ЛХМ)*. Умеренно восприимчивы к респираторному синцициальному вирусу. Несут аллель FV-1b обуславливающий резистентность к заболеванию центральной нервной системы, которое вызывается *вирусом диких мышей WM-E*, относящимся к гру-

ппе *онкорнавирусов*, и *представляет собой удобную модель медленной вирусной инфекции* [18]. Низкочувствительны к диабетогенному *эффекту М-варианта вирусов энцефаломиокардита и Коксаки В4* [5].

Высоко чувствительны к заражению Salmonella typhimurium (штамм С5). Относительно резистентны к гельминтозам. Чувствительны к Mycobacterium marium и дают хороший высев колоний M. leprae через 8 месяцев после заражения. Чувствительны к вирусу мышиноного гепатита типа 3. Резистентны к индукции несахарного диабета вирусом энцефаломиокардита. Чувствительны к заражению глистами Angiostrongylus costaricensis. Чувствительны к индукции кариеса вследствие заражения Streptococcus mutans. Чувствительны к развитию хронической кардиомиопатии Чагаса после острой инфекции Trypanosoma cruzi [38,39].

На 30 день после экспериментального заражения *описторхами* введением *метацеркарий* в пищевод отдельные неполовозрелые *трематоды* обнаруживаются в желчном пузыре [8]. У самцов BALB/c, зараженных *трихинеллами*, интенсивность кишечной инвазии на 7 день при заболевании средней тяжести на 44% выше, чем у гибридов F1(В6хСВА); на 30 день – в три раза ниже, а при тяжелой форме – в 2 раза ниже. Уровень свободного гистамина в печени на 7 и 30 день при трихинеллёзе средней тяжести выше нормы на 18% и 30%, соответственно, при тяжелой форме он на 7 день не отличается от нормы, а на 30 день превышает её на 34% [6].

### Иммунология

Резистентны к *экспериментальному аллергическому энцефаломиелииту*. Высокий лимфоцитарный ответ на *фитогемагглютинин*. Хороший иммунный ответ на *пневмококковый полисахарид III типа*. Хороший иммунный ответ антителообразующих клеток селезенки на *пневмококковый поли-*

*сахарид*. Слабый иммунный ответ на *синтетическую двунитевую РНК*. Даёт иммунный ответ на *синтетический полипептид*. Очень хороший иммунный ответ на А и В холерные антигены, а также на *декстран-1,3-гликозил-соединения*. Хороший первичный иммунный ответ по гемолизину и гемагглютиниону. Слабый иммунный ответ на *липополисахарид Salmonella anatum, S. senftenberg и S. strasbourg*. Хороший иммунный ответ на *Vi-антиген. Преципитирующие и кожно-сенсibiliзирующие антитела* обладают быстрой электрофоретической подвижностью. Не различают «тяжелые» и «легкие» эритроциты барана. *Эритроциты обладают низкой способностью к агглютинации*. Резистентны к индукции *экспериментальных аутоиммунных тиреоидитов*. Резистентны к индукции *анафилактического шока овалбумином* [38]. Интенсивность иммунной реакции на *менингококковый полисахаридный антиген группы А*, используемый в качестве профилактической вакцины, значительно выше, чем у мышей линий В6 и DBA/2 [22].

Через 24-72 часа после внутрибрюшинного *введения латекса* со стороны мононуклеарной фагоцитирующей системы (МФС) – моноцитофагов. В первые 2-6 часов бесклеточный фильтрат перитонеального экссудата проявляет моноцитозиндуцирующую активность (МИА) при внутривенном введении интактным сингенным мышам. Через 18 часов МИА перестает выявляться в перитонеальной жидкости, а появляется в сыворотке крови тех же животных. Установлено, что продукты, секретируемые макрофагами при фагоцитозе частиц латекса, повышают пролиферативную активность промоноцитов костного мозга мышей и ускоряют их дифференцировку в направлении макрофагов, что свидетельствует о существовании саморегуляции МФС [32].

Низкая выработка интерферона на *вирус опухолей молочных желёз, вирус болезни*

*Ньюкасла, вирус лейкоза Раушера*. Высокая активность *комплемента*. Высокий иммунный ответ на *эритроциты барана, на полисахариды сальмонелл и пневмококков, на стрептококки группы А и липополисахариды* [4].

На 5-е сутки после иммунизации эритроцитами барана в селезенке накапливается в 5-7 раз больше антителообразующих клеток, чем у мышей C57BL/6. Способность клеток селезенки супрессировать иммунный ответ к эритроцитам барана снижена [31].

В сублинии Sto у самцов в сыворотке крови – *наиболее высокий уровень иммуноглобулинов IgG и IgA* по сравнению с мышами линий CBA/Lac и В6 [1].

### Биохимия и эндокринология

Высокий уровень *декарбоксилазы L-глутаминовой кислоты* мозга, также как *холин-ацетилтрансферазы* и *катехол-О-метилтрансферазы*. Низкий уровень *ацетилхолинэстеразы* в мозге и активности оксидазы моноамина. Высокая активность *гидроксилазы тирозина* в мозге и *плазмогена* мозга. Высокое отношение Na/K в эритроцитах. Низкий уровень *сывороточного церулоплазмينا* у самцов. Низкий уровень *гантоглобина* в сыворотке. Низкая активность *холинэстеразы* плазмы у самок. Высокий уровень *каталазы эритроцитов*. Высокий уровень холестерина плазмы. Высокий уровень *гипоксантин-гуанин-фосфорибозил-трансферазы* в таламусе (зрительном бугре). Низкая активность *оксидазы N-метилникотинамида*. Высокая активность *арилсульфатазы* почек. Низкий базальный уровень *пролактина* сыворотки. Низкая активность *бета-глюкуронидазы* сперматозоидов [38,39].

Содержание изоформ цитохрома P-450 (*цитохрома P-450B*) в печени выше, чем у DBA/2, так же, как содержание свободных SH-групп в печени и селезенке (SH-

группы — соединения, инактивирующие активность продуктов циклофосамида). *Активность альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы* в печени такое же, как у DBA/2. *Показатели репликативного и репаративного синтеза ДНК* в клетках селезёнки выше, чем у DBA/2 [29].

У мышей BALB/c по сравнению с C57BL/6 в 1 мл периферической содержится меньше лимфоцитов, ниже доля клеток с высокой *активностью неспецифической эстеразы*, выше *активность лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы*, ниже *активность альфа-глицерофосфатдегидрогеназы* [31].

Высокая активность *щелочной фосфатазы* в межальвеолярных перегородках. Наиболее высокая активность *фенилэтанолламин-N-метилтрансферазы* по сравнению с CBA/J и DBA/2J, причём не обнаружена связь между активностью фермента и весом надпочечников. Содержание фактора *тимической активности* в крови 1:32. Уровень *норадреналина* в гипоталамусе — 0,499 мг/кг (в три раза выше, чем у C57BL/6. Средний темп *секреции щитовидной железы* составляет 2,44 мг L-тироксина на 10 г массы тела (в два раза выше, чем у C57BL/6). Средняя чувствительность к действию *инсулина*. *Кортизон* вызывает эозинопению, максимальный эффект наблюдается при введении 96 мг (высокая доза по сравнению с другими линиями). *Яичники* неполовозрелых самок отвечают на введение гонадотропина человеческого хориона высокой добавочной овуляцией. У гонадэктомированных самок через 30 дней *после кастрации* наблюдается уменьшение надпочечников, тогда как дополнительная обработка эстрадиол-бензолом вызывает их увеличение [4].

Уровень суперовуляции у половозрелых самок BALB/c под действием гонадотропного гормона, выделенного из сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК) — самый высокий из 5-и испытанных линий [7].

Средний уровень эпинефрина надпочечников (больше, чем у C57BL/Ка и C57BL/10, но меньше, чем у CBA и DBA/2 [11].

### Физиология

Половозрелые самцы этой линии по сравнению с CBA/Са имеют более высокий *среднесуточный уровень энергообмена* — 63,0 +2,6 мл/кг мин., что коррелирует с большей массой мозга, большей двигательной активностью и меньшей продолжительностью жизни [26]. Высокая *скорость периферической нервной проводимости*. Высокое отношение *времени сна* к *времени бодрствования* и высокое отношение сна «медленной волны» к парадоксальной фазе сна. Низкая *температура прямой кишки* и хвоста. Моча имеет сильный запах [38, 39].

### Гематология

*Высокое число эритроцитов, высокий гематокрит, высокий уровень гемоглобина* [38].

Эритроцитов 10,51±0,16 млн./мм<sup>3</sup>; гематокрит 48,0±0,7%; гемоглобин 15,0±0,2 г/100 см<sup>3</sup>; ретикулоцитов 8,54±1,04 тыс./мм<sup>3</sup>; гранулоцитов у самок 14,9±2,1%, у самцов 15,3±3,8%. В костном мозге дифференцировано 17 типов клеток. У мышей в возрасте от одного до четырёх месяцев количество клеток зернистого ряда возрастает на 4—5% каждый месяц [4]. *Средний уровень холестерина в плазме* среди 8 линий [11].

### Сердечно-сосудистая система

Высокое *систолическое давление крови*. Медленный ритм сокращений сердца, но высокий ритм его адаптации [38,39]. Систолическое давление крови у 9-месячных самцов составляет 105±2,0 мм рт. ст.; частота пульса 494±11 удара в минуту.

У мышей этой линии наблюдаются *электрокардиографические нарушения* в де-

ятельности сердца, изменена кривая левожелудочкового давления: фаза расслабления меньше, чем у мышей других линий (0,04 по сравнению с 0,07), а длительность фазы покоя почти вдвое больше.

У самок наблюдаются поражения сердца и атеросклероз у старых животных обоих полов (в большинстве сублиний этой линии). Поражение сердца выражается в *тромбозе левого предсердия*, что приводит к 3-5-кратному его увеличению. Данная патология отмечается у 60-66% многократно рожавших самок в возрасте от 270 до 800 дней и связана с повторными беременностями, так как почти не встречается у виргинных самок и у самцов, нарушений клапанного аппарата сердца при этом не наблюдается [4].

В других сублиниях спонтанные поражения миокарда правого желудочка найдены у 60% самок и 30% самцов. Эти, видимые невооруженным глазом, дегенеративные фибросклеротические поражения могут представлять собой *последнюю фазу миокардита воспалительного характера*, наблюдающегося у внешне нормальных мышей. Наблюдается высокая частота *минерализации эпикарда* (у 11% самцов и 4% самок), которая незначительно увеличивается с возрастом. Частота *пороков сердца*, включая кардиакальный кальциноз, составляет 17-62% [38,39].

Парадоксально, но, несмотря на частые тромбозы, у беременных самок незадолго перед родами обнаруживаются аномалии протромбинового комплекса, проходящие через несколько дней после рождения детёнышей. Эти аномалии выражаются в серьёзном *дефиците необходимых для коагуляции крови факторов*: фактор IX (компонент плазменного тромбопластина, фактор Christmas) — около 40%; фактор X (фактор Stuart-Prower) — 50%; фактор XIII (антигемофилический фактор) — около 60%; протромбин — 33%. При этом содержание других компонентов, таких

как фактор Hageman и фактор V (лабильный фактор, проакцелерин, акселератор-глобулин), всегда в норме.

Отдача плазменного протромбина может составлять на 20-25% больше нормы в течение 2 дней после родов. Фаза отдачи является умеренной или же совсем не выражена в первой стадии протромбинового времени. Фибринолитическая активность в крови тромботических мышей настолько мала, что её невозможно измерить.

**NB!** Мыши BALB/c без дополнительных экспериментальных воздействий моделируют состояние пациентов, получавших антикоагулянты.

*Явление протромбиновой отдачи у мышей этой линии чрезвычайно сходно с состоянием инфарктных больных, подвергающихся лечению дикумарином и гепарином.*

Сравнительное изучение *антисвёртывающей системы* у BALB/c и C57BL/6 показало, что уровень антигемофилического глобулина и скорость свёртывания контрольной плазмы у мышей этих линий не отличаются. Судя по реакции на введение тромбина также нет оснований полагать, что причиной тромбоза левого предсердия является угнетённое состояние антисвёртывающей системы [4].

Резистентны к развитию *атеросклероза*. Диета с высоким содержанием *холестерина* не приводит к изменению в плазме крови концентрации липопротеинов высокой плотности. Чувствительность к атеросклерозу контролируется локусом, локализованным на хромосоме 1 [16].

### Клеточные культуры и культуры тканей

Мыши этой линии служат для поддержания *трансплантируемых опухолей: меланомы HP и полиморфной саркомы 5180* [38], используются при получении *плазмоцитом и гибридом* [1].

Вирус *осповакцины* активизирует экспрессию белка р30 латентных онковирусов в первичных культурах клеток мышей BALB/c и в клетках неклонированного штамма BALB/c 3Т3 [18]. Описана трансформация этого штамма под действием ряда канцерогенов. В настоящее время штамм активно используется для эффективного определения опухолевых промоторов [44].

Штамм BALB/c 3Т3 применяется также как тест-система при изучении цитотоксичности [37, 41].

В *культурах легкого эмбрионов* мышей через 18-24 часа от начала эксплантации явления дегенерации менее выражены, чем у CBA/Lac. Гистiotипических разрастаний соединительной ткани не обнаруживается. На 14-15 сутки (позже, чем у CBA/Lac) альвеолы зарастают, легкие становятся безвоздушными, отмечается резкая гиперплазия эпителия бронхов. На 25 сутки эксплантаты полностью теряют свою органотипичность. В *культурах, зараженных E.coli*, в первые 1-3 часа при сохранении нормального строения лёгкого, на поверхности некоторых клеток и в макрофагах периферической зоны наблюдаются бактерии. Через 18-24 часа процессы дегенерации гораздо менее выражены, чем в культурах от CBA/Lac. На 2-3 сутки эксплантаты погибают [12].

NB! Мыши BALB/c являются продуцентами плазмцитом в производстве моноклональных антител.

### Зоотехнические показатели

Вес половозрелых самок в возрасте 2 месяцев  $21,2 \pm 0,10$  г, самцов —  $24,3 \pm 0,12$  г. Созревание: мыши этой линии опережают других в скорости морфологического созревания по времени появления первой пары сосков и открытия влагалища, которое происходит на 37 день после рождения [4].

**Плодовитость:** *Хорошая способность к размножению и продолжительный репродуктивный период.* Число детёнышей в помете при объеме 5,2. Высокие доимплантационные и низкие постимплантационные потери эмбрионов [38]. Самое большое количество детёнышей, получаемых в месяц от одной самки из 23 линий [11].

**Самая высокая потенциальная плодовитость** из 11 испытанных линий:  $7,8 \pm 0,4$  живых эмбрионов на самку. В то же время, у мышей этой линии — самый **высокий уровень эмбриональных потерь** — 49,4%. При разведении племенного ядра сублинии Y — 98,4% фертильных самок; длительный период размножения (в среднем приносят 4,96 помётов на самку); 5,4 мышонка при отсадке [4].

**Средняя продолжительность жизни:** у самок сублинии StoY —  $417 \pm 9,78$  дня, самок сублинии J — 575 дней, самцов — 539 дней. **Продолжительность жизни у конвенциональных мышей BALB/c существенно не отличается от таковой у SPF животных** (данные по сублинии Lac) [1].

### Поведение

Мыши сублинии LacStoY **неагрессивны** (в отличие от J, тогда как мыши сублинии Не занимают промежуточное положение по этому признаку). Низкая активность в **тесте открытого поля**. Высокая **двигательная активность**. Высокая частота **подергивания хвоста**, но низкая частота **умывания во время драк**. Длительный период неподвижности в **принудительном плавательном тесте**. Короткий латентный период **прохождения лабиринта**, высокая частота **мочеиспускания и дефекации** в аппарате для тестирования. Низкая **активность в колесе**. Низкая способность к **условно-рефлекторному избеганию**, и низкая **обучаемость избеганию шока** у самцов. Высокое **доминирование** самцов в конкуренции с самками. Низкий уровень **предпоч-**

**тения алкоголя.** Высокая **активность грызения древесины** бальзы [38,39].

Менее подвижны, чем CBA, но более, чем DBA/2? С3Н и С57BL/6. Средняя исследовательская активность в лабиринте у самок, но самая высокая у самцов; средняя частота стоек в Y-образном лабиринте у животных обоих полов из 7 линий. Средняя способность к ориентации в лабиринте Лешли из 9 линий. Средняя способность находить пищу (среди 7 испытанных линий), средний период выжидания до атаки в тесте охоты на сверчка. Самая слабая способность к социальному взаимодействию при столкновении с агрессором из 14 испытанных линий [11].

У самок потребление **этанол в тесте свободного предпочтения составляет** 2,14 г абсолютного спирта на 1 кг массы тела за 1 сутки – среднее среди 10 испытанных линий. Наличие в клетке гнездостойтельного материала не оказывает на него существенного влияния [34].

### Использование

Наиболее востребованная инбредная линия мышей. Используется во всех областях медико-биологических исследований, классических и новейших. От мышей BALB/c ведут своё происхождение многие **клеточные культуры и культуры тканей**, широко применяемые в биомедицинских экспериментах, проводимых **альтернативными методами**: например, штамм BALB/c 3Т3, который служит для тестирования канцерогенного эффекта и цитотоксичности. Эти животные являются **продуцентами плазмоцитом** (опухолей формирующих основу для производства **моноклональных антител**), а также служат для получения **гибридом**. Мыши BALB/c используются для создания **генетически модифицированных животных (нокаутных и трансгенных)**. Рекомендуется для поддержания трансплантируемых **опухолей: меланомы НР и полиморфной саркомы 5180**. Подходят в

качестве биологических моделей для изучения медленных вирусных инфекций. Служат для исследования **фибринолитических компонентов, лизиса** и процессов формирования **тромбозов; нарушений репродуктивной функции**, вызванной микоплазмой. Широко используются в изучении **поведения**. Являются хорошими **кормилицами**. Используются для **производства гибридов F1** (обычно самки).

### Литература

1. Алёшкин В.А., Неверова М.С. Уровень иммуноглобулинов у мышей как показатель исходного состояния В-системы иммунитета. // В кн.: *Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. Тезисы всесоюзной конференции. Часть II. М.: 1988, с. 103-105.*
2. Бескова Т.Б., Малащенко А.М. Кластогенный эффект тиофосамида в сперматогониях мышей инбредных линий. // *Генетика, т. 27, №2, с. 285-289, 1991.*
3. Бескова Т.Б., Малащенко А.М., Болотских Л.А. Сравнение кластогенного эффекта канцерогена бенз(а)рипена у мышей, выращенных в гнотобиологическом изоляторе и в открытой среде. // *Биомедицина, №1, с.108-111, 2005.*
4. Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: *Наука, 1983, с.54-59.*
5. Блох К.О., Полторак В.В. Генетический контроль чувствительности к диабетогенным воздействиям. // *Успехи современной биологии, том 108, 1989, вып. 3, № 6, с. 386-400.*
6. Бурак И.И., Острейко Н.Н. Значение генетических особенностей хозяина в формировании инвазионного процесса при трихинеллёзе. // В кн.: *Актуальные вопросы стандартизации лабораторных*

- животных для медико-биологических исследований. Тезисы всесоюзной конференции. Часть I. М.: 1988, с. 68-70.
7. Голубица А.Н., Амтиславский С.Я., Файзуллин Р.З., Егорин В.И., Мвксимовский Л.Ф. Супероуляция в ответ на введение гонадотропных препаратов. // В кн.: Проблемы сохранения и поддержания генетических коллекций лабораторных животных. Серия «Консервация генетических ресурсов». Пушино: 1991, с. 93-97.
  8. Душкин В.А., Забозлаев А.Г., Новикова Р.Ф., Кузовлёв А.П., Емельянова Э.Д. Экспериментальная модель возбудителя описторхоза. // В кн.: Биологические характеристики лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. Материалы всесоюзной конференции. М.: 1980, с.348-349.
  9. Журков В.С., Выскубенко И.Ф. Сравнительное изучение чувствительности мышцей разных линий к цитогенетическому эффекту мутагенов. // В кн.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. Тезисы всесоюзной конференции. Часть I. М.: 1988, с. 75-76.
  10. Зайцев Т.И. Особенности органов лимфоидной системы лабораторных животных. // В кн.: Основные принципы организации биомедицинских экспериментов на животных. Тезисы докладов международного семинара. М.: 1979, с. 64-71.
  11. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. — М.: Межкакадемическое издательство ВПК, 2004, с. 88-104.
  12. Кениг Э.Э., Сорокина Ю.Д., Абдрашитова Э.Х., Зотова Т.А. Морфологические изменения в кишечнике мышцей линий СВА и BALB/c при экспериментальной коли-инфекции. // В кн.: Морфологический контроль биомедицинских экспериментов на животных. Тезисы докладов. М.: 1978, с. 67-68.
  13. Ким Нам Ир, Телегин Л.Ю., Певницкий Л.А., Малашенко А.М. Чувствительность мышцей линий BALB/c и WR к иммунодепрессивному действию циклофосфамида и тиофосфамида. // Бюлл. эксперим. биологии и мед. 1984, № 5, с. 598-600.
  14. Клепиков Н.Н., Хрусталёв С.А. Линейные мышцей в онкологических исследованиях. // Вестник АМН СССР, 1983, № 9, с. 43-51.
  15. Коляда Т.И., Хорева С.А., Баталина А.В. Межлинейные различия в реакции иммуноэндокринологических показателей на острую гипоксию у инбредных мышцей. В кн.: Лабораторные животные для медико-биологических исследований. Тезисы конференции. М.: 1990, с. 105-106.
  16. Конюхов Б.В. Мутантные линии лабораторных животных как модели наследственных аномалий человека. // В кн.: Проблемы сохранения и поддержания генетических коллекций лабораторных животных. Серия «Консервация генетических ресурсов». Пушино: 1991, с. 8-13.
  17. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. — Новосибирск: Наука, 1981, с. 135, 178, 197.
  18. Майборода А.Д. Линейные мышцей и собственные им вирусы как объекты для моделирования в вирусологии. // Вестник АМН СССР. 1983, № 9, с. 68-77.
  19. Малашенко А.М. Использование линейных мышцей в исследованиях химического мутагенеза. // Вестник АМН СССР. 1983, № 9, с. 349-351.
  20. Малашенко А.М., Бескова Т.Б., Померанцева М.Д., Рамая Л.К. Сравнение трёх инбредных линий мышцей по общей и генетической радиочувствительности. // Генетика, т. 39, №9, с.1247-1251, 2003.
  21. Португалова В.В. К вопросу о гемопоэзе при вирусном лейкозе Френд. // В кн.: Морфологический контроль биомедицинских экспериментов на животных. Тезисы докладов. М.: 1978, с. 36-37.
  22. Пухальский А.Л., Аллилуева А.П., Котельникова О.В. Иммуноный ответ мышцей разных генотипов на менингококковый по-

- лисахаридный антиген группы А. // *В кн.: Первый всесоюзный съезд медицинских генетиков, Киев, 15-18 апреля 1984 г. Тезисы докладов. М.: 1983, с. 272.*
23. Рамая Л.К., Померанцева М.Д., Малащенко А.М. Влияние парааминобензойной кислоты на радиочувствительность мышей разных линий. // *Радиационная биология, Радиоэкология, т. 42, №2, с. 169-172, 2002.*
  24. Романов Ю.А., Рыбаков В.П., Кузин С.М., Филиппович С.С. Фотопериодические условия содержания животных и их значение для регуляции деления клеток. // *В кн.: Биологические характеристики лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. Материалы всесоюзной конференции. М.: 1980, с. 132-134.*
  25. Савчик А.Б., Ивасивка С.Б., Савчук Л.Ф., Трусов А.В. Сравнительная характеристика некоторых гематологических показателей периферической крови опухолевых и интактных животных различных линий. // *В кн.: Биологические характеристики лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. Материалы всесоюзной конференции. М.: 1980, с. 152-153.*
  26. Саонов В.С., Лазаренко П.В. Среднесуточный энергообмен и уровень двигательной активности у мышей линий BALB/c и CBA/Ca. // *В кн.: Лабораторные животные для медико-биологических исследований. Тезисы конференции. М.: 1990, с. 30-31.*
  27. Телегин Л.Ю., Жирнов Г.Ф., Мазуров А.В., Певницкий Л.А. Иммунодепрессивный эффект циклофосфамида, активированного *in vitro* микросомами печени мышей разных линий. // *Бюлл. эксперим. биологии и мед. 1981, № 7, с. 57-60.*
  28. Телегин Л.Ю., Ким Нам Ир. Чувствительность мышей разных генотипов к имунодепрессантам. // *В кн.: Первый всесоюзный съезд медицинских генетиков, Киев, 15-18 апреля 1984 г. Тезисы докладов. М.: 1983, с. 327-328.*
  29. Телегин Л.Ю., Шербаков В.М., Корнева Е.Н., Девиченский В.М., Корчагин Н.В., Певницкий Л.А. Возможные причины контрастной чувствительности мышей BALB/c и DBA/2 к острому токсическому действию циклофосфамида. // *Материалы I-го съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГИС). Саратов, 20-25 декабря 1994 г. М.: 1994, с. 155.*
  30. Тер-Григорос В.С., Ягужинская О.Е., Мамилева З.Х., Новиков В.А., Пивник А.В., Москвина О.Я. Индукция резистентности к лейкомогенному действию ретровируса Раушера у генетически чувствительных мышей линии BALB/c иммунизацией аутоантителами против антигенов гистосовместимости H-2<sup>d</sup>. // *В кн.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. Тезисы всесоюзной конференции Часть I. М.: 1988, с. 140-141.*
  31. Труфакин В.А., Робинсон М.В., Нопте Т.П. Морфофункциональные особенности лимфоидных органов и клеток у мышей разных генотипов. // *В кн.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. Тезисы всесоюзной конференции. Часть II. М.: 1988, с. 156-158.*
  32. Фрейдлин И.С., Кравицов В.Д. Некоторые теоретические предпосылки экстраполяции на человека данных о саморегуляции мононуклеарной фагоцитирующей системы, полученных в экспериментах на мышах. // *В кн.: Биологические характеристики лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. Материалы всесоюзной конференции. М.: 1980, с. 261-262.*
  33. Хрусталёв С.А., Харьковская Н.А. Онкологическая характеристика линейных мышей и значение её стандартизации для экспериментально-онкологических

- исследований. // *В кн.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. Тезисы всесоюзной конференции. Часть I. М.: 1988, с. 142-145.*
34. Шмидт Е.Ф. Изменчивость предпочтения алкоголя у лабораторных мышей в зависимости от генотипа и среды. // *Биомедицина, 2005, №1, с. 81-87.*
35. Шмидт Е.Ф. Инбредные мыши в моделировании эпилептиформных аудиогенных припадков для тестирования противосудорожных препаратов. // *Биомедицина, 2006, №4, с. 121-123.*
36. Юнин А.Н., Полещук В.Д., Кусельтан И.В. Действие некоторых акарицидов на холинэстеразную активность крови линейных мышей, крыс и человека. // *В кн.: Биологические характеристики лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. Материалы всесоюзной конференции. М.: 1980, с. 235-236.*
37. Borenfreund E., Puerner J. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. // *Toxicology Letters 24, 119-124, 1985.*
38. Festing M.F.W. Inbred strains in biomedical research. — London: The Macmillan Press Ltd., 1979.
39. Festing M.F.W. Origin and characteristics of inbred strains of mice. // *Mouse Genome (continuation of Mouse Newsletter). 1993, Vol. 91, (3), p. 393-509.*
40. Leonard A, Dekhnudt G.H. Chromosome rearrangements after low X-ray doses given to spermatogonia of mice. // *Canadian J.Genet. Cytol. Vol.10, no.1, p. 119-124, 1968.*
41. Prieto P., Clemedson C., Menegus A., Pfaller W., Sauer U.G, Westmoreland C. Subacute and Subchronic Toxicity. // *ATLA 33, Suppl. 1, 109-116, 2005.*
42. Umedo M. Cell Transformation Assay Using Balb/c 3T3 Cells or Bhas 42 Cells for Efficient Detection of Tumor Promoters. // *ATLA 32, Suppl. 1, 673-677, 2004.*

## THE RESEARCHERS PREFER BALB/c MICE V.N. Karkischenko, E.F. Schmidt, E.V. Braitseva

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** inbred mice, BALB/c, using in experiment.

Mice of inbred strain BALB/c are used in experiments more often than others. It is one of the oldest strains. It is considered not cancer though frequency of mammas, lung and kidney tumours makes in some substrains 20-40%. BALB/c female have not milk factor, and they can be used as wet nurses. Mice of this strain are subject to diseases of cardiovascular system and differ of high systolic blood pressure. They are sensitive to gastroenteric infections. They are used in development of new biomedical technologies.

## Светлогорская популяция мини-свиней

Г.Д. Капанадзе, Ж.А. Ашуев

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Центральный НИИ Стоматологии Росздрава, Москва

В работе даны основные морфофизиологические и зоотехнические характеристики светлогорской популяции мини-свиней. Описана история создания и различные аспекты их использования в медико-биологических исследованиях.

**Ключевые слова:** светлогорские мини-свиньи, стандартизация, эксперимент.

Свиньи с давних пор успешно используются в эксперименте. В последнее время всё большее внимание исследователей привлекают мини-свиньи. Они удобны для содержания в лабораторных условиях и проведения на них различных манипуляций, поскольку обладают небольшой живой массой и малыми размерами.

В нашей стране выведены и с успехом используются в различных экспериментах две разновидности лабораторных миниатюрных свиней: «Минисибс» — созданные с 1969 по 1980 годы сотрудниками Института цитологии и генетики СО АН СССР (Новосибирск) и светлогорская популяция миниатюрных свиней. Светлогорская популяция была создана к 1974 году (Научно-исследовательская лаборатория экс-

периментальных биомоделей АМН СССР (до 2002 г.) — ныне ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАМН).

Светлогорские мини-свиньи (СМС) являются анатомически и физиологически нормальными животными — в их генотипе отсутствуют гены карликовости, но они отселектированы по малым размерам и небольшой массе тела. Эти количественные признаки закреплены в генотипе светлогорских свиней в результате сложного кроссбридинга, а также последующего отбора на протяжении ряда поколений. При создании популяции была использована отдаленная гибридизация свиней «шведский ландрас», геттингенских, вьетнамских черных свиней «Й», диких кабанов европейского и среднеазиатского подвидов (рис. 1).

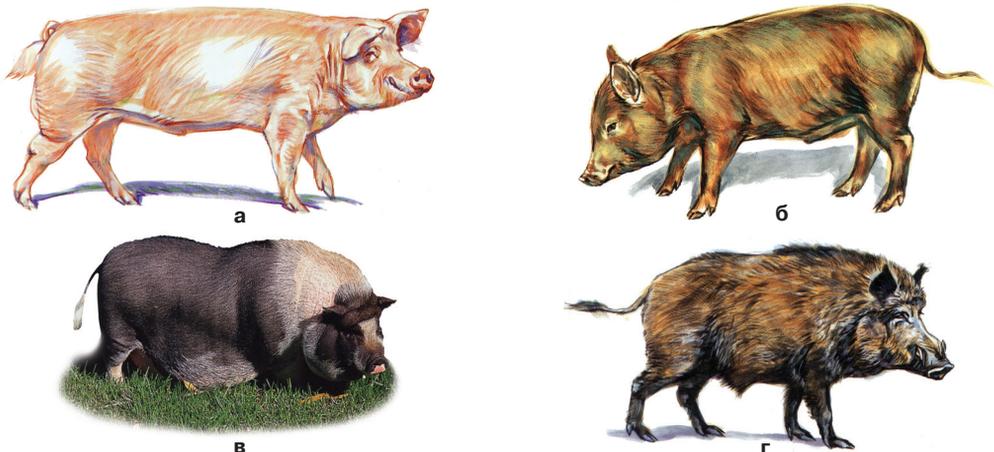


Рис. 1 Породы животных, использованных при выведении светлогорской популяций мини-свиней а) ландрас б) геттингенская свинья в) вьетнамская вислобрюхая свинья г) европейский кабан

Свиньи породы ландрас послужили донорами генов эпистатичной белой масти и высокого многоплодия, но для них характерны крупные размеры и интенсивный рост в постнатальный период. Вьетнамские свиньи явились донорами генов низкорослости, но они передали исходным поколениям гибридов нежелательные рецессивные гены черной масти и гены, детерминирующие слабую конституцию и патологический жировой обмен, а также провислую спину (нередко вьетнамских свиней именуют «вислобрюхими»). Использование диких кабанов при создании мини-свиней позволило генетически закрепить такие признаки, как крепкая конституция, низкая интенсивность роста, хромосомный полиморфизм и широкий диапазон поведенческих реакций.

Чаще всего СМС бывают белой масти, но встречаются особи и других окрасов: рыжие, пегие, черные, черно-пестрые. При рождении нечасто могут появляться особи в «ливрее» (поросята с характерными для диких сородичей рыже-черными полосами). Полосы на 2-3 месяце жизни



Рис. 2 Хряк светлогорской популяции мини-свиней



Рис. 3 Свиноматка светлогорской популяции мини-свиней с пометом

начинают постепенно исчезать и к 6 месяцам у них появляется устойчивая масть агути. Белая масть у этих свиней неполно доминирует над черной мастью и агути. При спаривании особей светлогорской популяции с полностью белыми свиньями получают преимущественно белых поросят (рис 2, 3).

Мини-свиньи полностью белой масти необходимы для проведения специальных радиобиологических и дерматологических экспериментов, во всех остальных случаях масть животных не имеет значения. Большинство зарубежных линий и популяций мини-свиней (минесотская, геттингенская, корсиканская, омини) имеют темную масть.

В результате сложного многоступенчатого скрещивания были получены свиньи с удовлетворительной, отчасти нежной конституцией. Мини-свиньи светлогорской популяции имеют хорошие материнские качества, мирный нрав. Многоплодие в среднем составляет 7 поросят на опорос (табл. 1). Свиньи хорошо приспособлены к безвыгульному содержанию на ограниченном рационе в условиях вивариев.

Таблица 1

**Показатели продуктивности у мини-свиней светлогорской популяций  
и некоторых зарубежных аналогов**

Светлогорская		Светлогорская	Геттингенская белая	Геттингенская пегаля
		М±m		
Плодовитость*		7,8 ± 0,66	7,1	5,8
Многоплодие**		6,9 ± 0,73	–	–
Крупноплодность***, кг		0,452 ± 0,015	0,514	0,503
Живая масса, кг	1 месяц	2,1 ± 0,15	–	–
	2 месяца	4,1 ± 0,30	5,8	5,0
	3 месяца	8,0 ± 0,55	–	–
	4 месяца	13,4 ± 0,80	13,0	11,5
	5 месяцев	18,2 ± 1,19	–	–
	6 месяцев	21,3 ± 0,82	–	–
	12 месяцев	34,8 ± 2,84	35,9	29,7
<i>Примечания:</i>				
* Плодовитость – число всех поросят в помёте при рождении, включая слабых, мертворожденных, мумифицированных и уродов.				
** Многоплодие – число жизнеспособных поросят в помёте при рождении.				
*** Крупноплодность – масса одного поросенка при рождении.				

Средняя продолжительность супоросности у свиней светлогорской популяций 113–116 дней. Подсос длится в среднем 55–60 дней. Технологии разведения, кормления и содержания мини-свиней с небольшими поправками соответствуют технологиям, принятым в племенных хозяйствах при содержании и разведении обычных свиней. Мини-свиньи чувствительны к колебаниям внешних условий. Существуют некоторые особенности их кормления. Сотрудниками НЦБМТ РАНН разработаны подробные зооигиенические и зоотехнические нормы по содержанию, кормлению и уходу за этими животными.

### **Морфофизиологический и генетический статус СМС**

В популяции сложился своеобразный генотип как в локусах групп крови (А, В, D, G, F, K, L, M, H, J), так и в впер-

вые исследованных иммуногенетических системах сывороточных белков (АМ, IgGY, Lpb, Lrg и др.). Выявлены маркерные аллели в гомозиготных и гетерозиготных генотипах, которые характерны только для исходных форм свиней. По большинству локусов групп крови ( D, E, F, K, L, H ) доминируют гены вьетнамских свиней и диких кабанов. Например, аллели  $L^{aegmnops}$  в генном концентрации 0,5,  $F^{ac} = 0,54$ ,  $L^{adhi} = 0,42$  (локусы E, F, L) вьетнамских свиней, аллели  $E^{edghgmt}$ ,  $L^{adhi} = 0,083$  дикого среднеазиатского кабана, а аллели  $E^{hdgkmps} = 0,25$ ,  $L^{bdfi} = 0,29$  – европейского кабана. На стадии элиминирования в популяции находится маркерный аллель свиней породы ландрас  $E^{cdfhkmnps}$ . Частота его составляет всего 0,042, а аллель  $L^{bcgi}$ , который также характерен для этой породы, не найден вовсе. Выявлен надежный генетический маркер геттингенских свиней –  $B^b$  (локус В) [1]. У других ис-

ходных животных этот маркер отсутствовал. Иммуногенетический мониторинг позволяет направленно регулировать селекционные процессы с целью сохранения ценных маркерных аллелей в популяции.

Изучалась фенотипическая экспрессия следующих генетических локусов (их полиморфизм описан в популяциях домашних свиней): глюкозофосфатизомераза (ГФИ), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6-ФГД), эстеразы Д (ЭСТ Д), аденозиндеаминаза (АДА), фосфоглюкомутаза (ФГМ 2), Выборочно тестировали мономорфные локусы изоцитратдегидрогеназы, малик энзима, лактатдегидрогеназы, глутаматоксалоацетаттрансаминазы, диафразы, по которым аллельных вариантов не выявлено. У исследованных животных описан полиморфизм по локусам 6-ФГД, АДА. В локусе ГФИ зафиксирован аллель ГФИВ, обладающий низкой электрофоретической подвижностью, в локусе ЭСТ Д – аллель ЭСТ ДА, с высокой электрофоретической подвижностью, в локусе ФГМ – аллель ФГМВ. По сравнению с исходной сибирской популяцией утрачен аллель ЭСТ ДВ, встречавшийся частотой 0,19 [6]. В целом по всем исследованным локусам популяция находится в генетическом равновесии, что является показателем ее консолидированности.

Для использования мини-свиней в биологических экспериментах необходимо знать уровень их генетической гетерогенности. СМС отличаются высокой генетической гетерогенностью из-за сложного воспроизводительного скрещивания, но по некоторым локусам крови уровень гетерогенности невысок, что указывает на интенсивное применение инбридинга при селекции. В целом СМС обладают характерным спектром генетической изменчивости, позволяющим дифференцировать их от других пород.

У мини-свиней светлогорской популяции исследовали генетический полиморфизм трансферина и церулоплазмينا. Генетический детерминированный полиморфизм трансферина проявляется в различной электрофоретической подвижности алломерных форм. У СМС каждый из аллелей трансферина обнаруживается в виде трех основных полос. Встречается четыре кодоминантных аллеля, контролирующих полипептидную цепь трансферина. Наиболее часто встречается генотип ВВ (0,97), остальные гомозиготные генотипы (АА, СС, DD) встречаются приблизительно с одинаковой частотой (около 0,005). Гетерозиготные формы трансферина у светлогорских мини-свиней имеют большую вариабельность полос, и определить гомозиготный генотип трансферина представляет большую сложность.

Исследование электрофоретических фенотипов церулоплазмينا у этих же мини-свиней показало, что переносимый медь гликопротеид плазмы – церулоплазмин существует в трех фенотипических вариантах. Эти варианты обладают различной электрофоретической подвижностью и хорошо различимы. Церулоплазмины у светлогорских мини-свиней детерминированы двумя кодоминантными аллелями. Частота встречаемости из 180 исследованных сывороток мини-свиней такова:  $Cp^1/Cp^1 - 0,01$ ;  $Cp^2/Cp^2 - 0,97$ ;  $Cp^1/Cp^2 - 0,02$  [9]. Это дает основание считать, что наличие двух генов, контролирующих формирование полипептидных цепей церулоплазмينا в некоторых случаях, может быть использовано при селекции светлогорских мини-свиней. В качестве генетического маркера наиболее пригоден довольно редко встречающийся ген  $Cp^1$ , так как наличие его в гомозиготном состоянии у производителей дает до-

полнительную возможность проследить генеалогию всего семейства и установить степень родства.

Изучение иммуногенетических показателей и некоторых ферментов метаболизма разновозрастных самцов (7 дней – 60 месяцев) показало, что в возрастном аспекте у животных отмечается параллелизм изменений количества клеток иммунной системы (лейкоциты, Т-лимфоциты) и уровня ферментов метаболизма ксенобиотиков (цитохром Р-450, глутамин-S-трансфераза).

Были изучены физиолого-биохимические показатели крови у светлогорских мини-свиней. Сывороточный белок содержится в концентрации  $75 \pm 5,20$  г/л, глюкоза  $68,10 \pm 4,89$  мг/%, общие липиды  $614,9 \pm 32,72$  мг/%, холестерин  $2,2 \pm 0,12$  ммол/л, эндогенный этанол  $1,9 \pm 0,20$  мг/%, лактат  $22,4 \pm 2,89$  мг/%. Определенный интерес для селекционной работы представляет установление связи между живой массой и некоторыми показателями крови. Были установлены небольшие положительные корреляции между живой массой и концентрацией белка ( $r = 0,2$ ), глюкозы ( $r = 0,1$ ), общих липидов ( $r = 0,3$ ). Аналогичные данные были получены в опыте на свиньях мини-леве [13].

Интересно отметить отрицательную корреляцию между содержанием общих липидов и холестерина в крови ( $r = -0,6 \pm 0,12$ ;  $P < 0,01$ ). Полученные данные могут иметь значение при продолжении работы по моделированию атеросклероза и алкоголизма на мини-свиньях светлогорской популяции [7].

Необходимым условием для проведения ряда экспериментов является изучение показателей жидкой среды организма, в частности крови. Гематологические показатели мини-свиней светлогорских популяций в норме не сильно отличаются от таковых у мини-свиней других пород и популяций (табл.2).

Среди свиней имеются как агрессивные, так и спокойные животные. Агрессия обычно выражается дракой между животными с нанесением ран на голове, груди и в области лопаток. Драки обычно заканчиваются установлением ранговой иерархии, но иногда дело доходит до серьезного увечья. Наиболее распространенные легкие увечья – откусывание кончика хвоста или уха. Агрессивность свињи проявляется также и по отношению к человеку. Естественно, что работа в лабораторных условиях с агрессивными или пугливыми животными представляет значительные трудности.

Отбор спокойных и стрессустойчивых животных сотрудниками лаборатории в результате привел к важным качественным изменениям в сторону улучшения поведения свиней. На сегодняшний день животных со спокойным типом поведения 63%, с допустимым типом поведения – 16%, а с нежелательным типом поведения – 21% (до начала отбора – 40, 22 и 38 % соответственно). Доля стрессчувствительных животных снизилась с 31% до 12%.

На данный момент в светлогорской популяции можно условно выделить животных двух категорий – обычных и мелких (таб. 3).

Стадо мини-свиней состоит из селекционной и пользовательской групп. Основное направление работы в селекционной группе – выведение стандартных лабораторных животных с небольшой живой массой. Пользовательская группа предназначена для проведения медико-биологических экспериментов в основном на базе вивария нашей лаборатории.

Основные промеры и индексы телосложения светлогорских мини-свиней в возрасте от 2 до 3 лет приведены в таблице 4.

В светлогорской популяции мини-свиней отбор направлен на уменьшение

Таблица 2  
Половозрастная динамика гематологических показателей у мини-свиной светлогорской популяций

№ п/п	Возраст	Пол	Гематокрит, %			Гемоглобин, г %			Лейкоциты, тыс.			Эритроциты, млн.			Цветной показатель		
			M±m	σ	P	M±m	σ	P	M±m	σ	P	M±m	σ	P	M±m	σ	P
1	2 недели	♂	39,2±1,34	2,68		9,75±0,59	1,18		9,3±1,15	2,3		6,86±0,70	1,4		0,85±0,08	0,16	
		♀	38,5±1,46	3,52	0,56	11,0±0,38	0,92	0,99	12,5±1,33	3,2	0,99	6,19±0,26	0,63	0,90	1,07±0,07	0,17	0,99
2	1 месяц	♂	40,1±0,74	1,63		10,6±0,60	1,32		22,6±1,40	3,08		7,02±0,53	1,17		0,90±0,11	0,25	
		♀	43,5±2,51	5,52	0,95	12,1±0,56	1,24	0,99	17,4±1,62	3,58	0,99	7,82±0,50	1,09	0,95	0,93±0,10	0,22	0,37
3	3 месяца	♂	40,9±0,85	1,90		10,3±0,51	1,14		21,6±2,02	4,53		6,47±0,46	1,05		0,96±0,04	0,10	
		♀	39,0±1,81	4,06	0,90	10,4±0,64	1,43	0,23	20,1±1,98	4,43	0,74	6,35±0,48	1,08	0,30	0,01±0,11	0,24	0,66
4	6 месяцев	♂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		♀	52,0±2,25	6,37	-	11,8±0,47	1,33	-	26,7±1,25	3,53	-	6,6±0,19	0,56	-	1,07±0,06	0,18	-
5	1 год	♂	57,0±2,6	3,64		14,4±2,02	2,8		23,4±3,23	4,53		8,08±0,04	0,06		1,07±0,16	0,22	
		♀	52,0±1,54	4,07	0,99	15,2±0,67	1,78	0,65	17,0±1,31	3,47	0,99	7,96±0,47	1,24	0,23	1,14±0,07	0,19	0,99
6	2 года и старше	♂	50,0±5,05	7,07		14,4±0,40	0,57		14,5±2,53	3,54		6,70±0,10	0,14		1,29±0,01	0,02	
		♀	46,0±1,55	4,10	0,90	13,8±0,69	1,95	0,74	17,4±1,61	4,56	0,90	6,50±0,52	1,48	0,37	1,29±0,12	0,34	-

Эти показатели соответствуют данным, приведенным для миниатюрных свиной линий Sinclair [13].

Таблица 3

**Живая масса мини свиней светлогорской популяций  
в зависимости от возраста (кг)**

Категория	Возраст				
	При рождении	2 мес.	6 мес.	12 мес.	36 мес.
Обычные	0,6 (0,5–0,7)	5,2 (4,8–6,0)	22,5 (20–25)	40 (35–45)	70 (60–80)
Мелкие	0,41 (0,3–0,59)	4,0 (3,5–4,6)	17,5 (15–19)	30 (25–34)	50 (40–59)

\* Периоды 2, 12 и 36 мес. отражают, соответственно, возраст окончания периода кормления материнским молоком, завершения полового созревания и период, когда интенсивный период массы тела прекращается.

Таблица 4

**Промеры и индексы телосложения светлогорских мини-свиней\***

Показатель	Селекционная группа		Пользовательная группа	
<b>Промеры (см)</b>				
	Мелкие	Обычные	Мелкие	Обычные
Дина туловища	75,80±6,29	81,90±2,48	82,50±2,00	89,50±1,15
Обхват груди за лопатками	67,50±4,00	75,90±1,71	75,40±2,27	85,20±1,01
Высота в холке	42,30±4,00	45,60±0,57	46,50±0,93	49,80±0,79
Обхват пясти	14,30±0,86	14,40±0,5	18,30±1,60	16,50±0,65
<b>Индексы (%)</b>				
	Мелкие	Обычные	Мелкие	Обычные
Формата	112,3	179,6	109,4	179,7
Компактности	89,1	92,7	91,4	95,2
Массивности	145,8	166,5	177,4	171,1
Костистости	30,9	31,6	43,1	33,1

\* Индекс телосложения – отношение промеров, выраженный в процентах

размеров и живой массы. Уже с четвертого поколения у селекционируемых животных самцы всегда были меньше самок.

### СМС в эксперименте

С момента создания СМС активно использовались в разных экспериментах, в основном биомедицинского направления. Их результаты с успехом применялись в практической медицине.

Оказалось, что мини-свиньи являются адекватной биомоделью для изучения патогенеза атеросклероза. Изучены возрастные особенности изменения биохимических показателей и липидного обмена сыворотки крови светлогорских мини-свиней. В результате выявлены оптимальные сроки для постановки эксперимента по моделированию атеросклероза. Было изучено содержание в сыворотке крови общего холестерина, триглицеридов, соотношение фракций липопротеидов у животных разного возраста

Самый высокий уровень холестерина наблюдался в возрасте 2 месяцев. С возрастом содержание общего холестерина в крови мини-свиней постепенно снижаются. Оптимальным сроком для постановки опытов по моделированию экспериментального атеросклероза можно считать 2-месячный возраст, и возраст 12-18 месяцев [11].

Светлогорские мини-свиньи использовались при изучении роли экзогенных химических соединений, в том числе и фторидов, в патогенезе атеросклероза и ускорении естественных процессов старения. Исследования продолжались более года. В результате было установлено, что миниатюрные свиньи являются одним из немногих видов, обладающих способностью развития спонтанного атеросклероза [2].

Молодняк мини-свиней светлогорской популяции был использован для изучения пневмоцистоза. У поросят болезнь протекала с явлениями пневмонии. После культивирования *Pn. Carinii* в культуре клеток была выявлена локализация возбудителя в цитоплазме [12].

На свиньях светлогорской популяции изучалась острая ишемия головного мозга. Полученные данные позволили охарактеризовать миниатюрных свиней как животных, которые легко переносят выключение обеих общих сонных артерий. При этом у них, как и у людей при острых нарушениях мозгового кровообращения, возникают проявления висцеральной патологии — нарушается функциональное состояние печени [3].

Большой интерес представляет новая категория гнотобиотов — безантигенные животные, контролируемые не только по микробному, но и по антигенному фактору.

Гнотобиотическое животное подвергается действию трех факторов — отсутствия микрофлоры, стерильной диеты и микроклимата изолятора. Суммарный эффект этих факторов формирует специфический морфофизиологический статус организма гнотобиота, для которого характерно недоразвитие дыхательной, лимфатической и пищеварительной систем, а так же наличие структурных изменений в остальных органах и системах. В настоящее время представляет практический интерес изучение дифференцированного влияния указанных факторов на организм. Это связано с тем, что гнотобиологические методы активно внедряются в клинику. Больные, помещенные в палату-изолятор для прохождения курса лечения, фактически испытывают действие двух факторов — стерильной диеты и микроклимата изолятора.

Сотрудниками НИЛ экспериментально-биологических моделей АМН СССР

(ныне НЦ БМТ РАМН) впервые в стране были получены безантигенные поросята и отработаны методические приемы их выращивания [10].

Для обеспечения безмикробных условий при получении и выращивании безантигенных поросят были использованы гнотобиологические изоляторы (рис 4). Для операции отбирались свиноматки на 113 день беременности. Операции делали методом гистеротомии в условиях внутривенного наркоза.

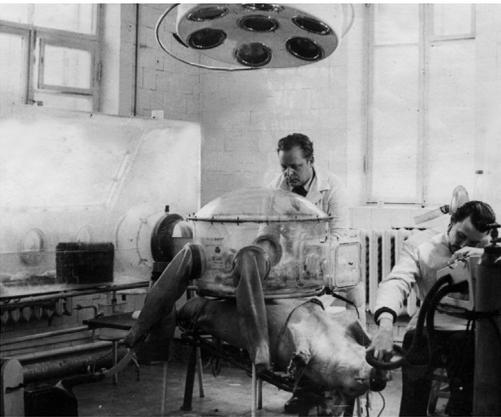


Рис. 4 Получение безантигенных поросят сотрудниками НИЛ экспериментально-биологических моделей АМН СССР, 1979г.

Сотрудниками лаборатории изучалась возможность моделирования алкоголизма на светлогорских мини-свиньях. Мини-свиньи сходны с человеком по физиологии пищеварения, уровню многих ферментов метаболизма, строению и функциям различных систем и органов и, как оказалось, по поведенческим признакам опьянения. На мини-свиньях моделируются главные черты этого заболевания, свойственные человеку — добровольное потребление алкоголя и четкое разделение отдельных стадий заболевания [8]. Изучались патологические изменения в тканях и органах при хроническом алкоголизме [5]. На мини-свиньях

светлогорской популяции отработаны способы измерения кровяного давления, различные методики хирургического вмешательства [4].

В настоящее время на мини-свиньях светлогорской популяции проводят изучение ранних функциональных нагрузок при внутрикостной имплантации. Разработана методика непосредственной имплантации, определения оптимальных сроков нагрузки и выбора конструкции имплантата. На свиньях СМС производится изучение патогенетических механизмов восстановления стромально-эпителиальных возрастных изменений кожи с помощью клеточной трансплантации. Методами гистологии и иммуногистохимии оценивается переживаемость трансплантируемых клеток, возможное воспаление и структурные изменения, происходящие в дерме в результате трансплантации. СМС задействованы в доклинических исследованиях биоэквивалентности лекарственных средств. Начато проведение полного генетического мониторинга с помощью метода ПЦР и определения аллелей групп крови. У основного поголовья определены генотипы групп крови, проводится полный биохимический анализ крови. Начата селекционная работа по созданию более мелких лабораторных свиней на основе генофонда существующей популяции.

## Литература

1. Горелов И.Г., Ермолаев В.И. Иммуногенетический мониторинг лабораторных мини-свиней светлогорской популяций. // Тезисы конференции. — М. С.10, 1990.
2. Гродецка Н.С. и др. Сравнительная оценка атеро- и геронтогенного действия фторида натрия на белых крысах и миниатюрных свиньях светлогорской

- популяции. // *Материалы Всесоюзной конференции.* — Москва. С48-49. 1980.
3. Западнюк Б.В., Познахирев П.Р. Проявление острой циркулярной гипоксии головного мозга у миниатюрных свиной и лабораторных грызунов. // *Материалы Всесоюзной конференции.* — Москва. С 81-82. 1980.
  4. Капанадзе Г.Д. Использование миниатюрных свиной в биомедицинских экспериментах. // *Биомедицина, № 2, с. 40-52, 2006.*
  5. Марданова Г.В., Шахламов В.А. Некоторые ультраструктурные особенности яичников миниатюрных поросят при хронической алкоголизации родительской пары. // *Сб. науч. трудов НИИ морфологии человека АМН СССР.* — М.; с. 101-102, 1990.
  6. Орлова Г.В. Биохимический полиморфизм светлогорской популяций миниатюрных свиной. // *Тезисы конференции.* — М. С. 113, 1990.
  7. Осипов В.В. Некоторые биологические характеристики светлогорских мини-свиной. Тезисы конференции. Лабораторные животные для медико-биологических и в биотехнологических исследований. // *Тезисы конференции.* — М. С.10, 1990.
  8. Осипов В.В. Опыт моделирования алкоголя на мини-свиных. // *Фармакология и токсикология, №3, 1988.*
  9. Осипов В.В. Полиморфизм трансферрина и церулоплазмينا у светлогорских мини-свиной. // *Тезисы всесоюзной конференции.* — М., с.109-110, 1988.
  10. Подопригра Г.И. и др. Гнотобиология на рубеже двух столетий. // *Бюлл. Экпер. Биол., № 14, с. 211-248, 1978.*
  11. Тихонов Н.Н. Возрастные особенности липидного обмена у мини-свиной. Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. // *Материалы Всесоюзной конференции.* — М. С.21-22. 1980.
  12. Ярашева Д.М. и др. Пневмоцистоз у миниатюрных свиной светлогорской популяции. Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. // *Материалы Всесоюзной конференции.* — М., с 72, 1980.
  13. Gregor G. // *Ztschr. Versuchstier, 21, 92-106, 1979.*

## SVETLOGORSKAYA MINIPIG POPULATION

G.J.Kapanadze, G.A. Ashuev

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow  
Central scientific Research Stomatology Institute of Roszdrav, Moscow*

**Key words:** Svetlogorskaya minipig, standartization, experiment.

Principal morfo-physiological and zootechnical description of Svetlogorskaya minipig species, history of raising the best strains of them, various of using them in the medical end biological researches.



## РЕЛЕВАНТНОЕ И АЛЬТЕРНАТИВНОЕ БИМОДЕЛИРОВАНИЕ

### Использование мини-свиней в экспериментальной дентальной имплантологии

Ж.А. Ашуев, А.А. Кулаков, Г.Д. Капанадзе

*Центральный НИИ стоматологии Росздрава, Москва*

*Научный центр биомедицинских технологий, РАМН, Москва*

На лабораторных мини-свиньях была проведена экспериментально-морфологическая работа для установления наиболее оптимальных сроков функциональных нагрузок при внутрикостной имплантации (1; 3; 6,5 месяцев). Морфологически в динамике от 1 до 6,5 месяцев наблюдали, как вокруг имплантата формируется соединительнотканная капсула, которая быстро созревает, уплотняется и истончается за счёт репаративного остеогенеза. Наблюдалось нарастание костной массы на поверхности имплантата. Преобладание соединительных или опорных структур в зоне «имплантат-костная ткань» зависело от анатомо-топографических условий в полости рта и от достижения первичной стабилизации.

**Ключевые слова:** непосредственная имплантация, биомодель, остеоинтеграция, фиброостеоинтеграция, непосредственные нагрузки.

Развитие стоматологии постепенно превращает имплантацию в обычное традиционное лечение. Мировоззрение людей меняется, и они хотят в кратчайшие сроки получить лечебный и эстетический эффект, необходимый для комфортной жизни.

По данным литературы, предпочтение отдают двухэтапной методике имплантации, при которой после удаления зубов необходимо выдержать период 4–6 месяцев, чтобы на следующем этапе провести операцию внутрикостной имплантации [9, 11, 10]. По ряду причин это не всегда удовлетворяет пациентов. Минимизировать сроки восстановления жевательной функции можно, только начав ортопедическое лечение в более ранние сроки. После удаления зуба кость, ранее имевшая нагрузку, постепенно атрофируется, не получая полноценной нагрузки и питания.

Для достижения оптимальных морфологических и функциональных условий в системе имплантат-кость, в первую очередь нужно добиться первичной стабилизации, далее — продолжительного сохранения этой стабилизации; важно ещё и состояние слизистой оболочки по пери-

ферии шейки имплантата, которая изучается клиническими методами [13].

В экспериментальных исследованиях [7] сравнивали воздействие на челюстную кость одномоментной и отсроченной имплантации и не обнаружили различия в строении костной ткани. По мнению авторов, немедленная умеренная функциональная нагрузка ускоряет костные регенерационные процессы. Кроме того, в лунке имплантат может быть позиционирован как удаленный зуб, что облегчает изготовление конечной ортопедической конструкции и позволяет избежать использования угловых супраструктур или телескопической фиксации. Использование техники одномоментной имплантации сокращает сроки всего лечения и периода, когда пациент пользуется или не пользуется временными протезами [8, 6, 12].

Раннее восстановление дефектов зубного ряда имеет не только теоретическое, но и практическое значение, и поэтому при использовании метода непосредственной имплантации одной из основных задач является определение безопасного уровня нагрузки [3, 13].

Для проведения экспериментальных исследований в большинстве лабораторий мира в настоящее время используют в основном мини-свиней в качестве биологических моделей, поскольку их зубочелюстная система наиболее близка к таковой у человека. Кроме того, реакции мини-свиней на действие химических веществ или физических факторов во многом подобны эффектам, наблюдающимся у человека [2], что связано с общностью характеристик метаболических процессов.

Однако в настоящее время недостаточно экспериментальных данных по изучению динамики процессов остеогенеза в различные сроки наблюдения при непосредственной имплантации, а также для анализа эффективности различных методик проведения непосредственной имплантации и влияния геометрии имплантата на процесс остеоинтеграции в более ранние сроки протезирования.

Основной целью нашей работы явилась разработка методики непосредственной имплантации, обоснование показаний и противопоказаний к операции, определение оптимальных сроков нагрузки при непосредственной имплантации и выбор конструкции имплантата, исследование процесса остеоинтеграции в разные сроки.

## Материалы и методы

Анатомическое строение альвеолярных отростков челюстей мини-свиньи позволяло установку внутрикостных имплантатов длиной 12 мм, и диаметром цилиндрической части 3,5 и 4,5 в зависимости от толщины гребня. В большинстве случаев при установке имплантатов добивались хорошей первичной стабилизации. После инсталляции имплантата непосредственно в полости рта, изготавливали временные коронки из отечественной пластмассы «Акродент».

После завершения операции, животным, содержащимся в специальных клетках по одному, корма предоставлялись в измельченном запаренном (вареном) виде. В послеоперационном периоде мини-свиньи получали терапию: внутримышечно линкомицин 10% — 4 мл 1 раз в день в течение 7 дней, чтобы исключить инфекционные осложнения.

В запланированный срок — через 1, 3 и 6,5 месяцев после операции мини-свиньи (7 животных) выводили из эксперимента 1 месяц (2 животных), 3 месяца (3 животных) и 6,5 месяцев (2 животных). Выпиливали зубочелюстные блоки вместе с имплантатом. Проводили макроскопическое изучение, после чего материал фиксировался в 10 % нейтральном формалине и подвергался декальцинации в 10 % растворе трилона Б в течение 4 месяцев. После этого из декальцинированной кости вывинчивали винтообразный имплантат, разделяли блоки на отдельные лунки с окружающей костной тканью альвеолярного отростка нижней и верхней челюсти мини-свиньи. Всего морфологически изучено 21 образца имплантационного костного ложа от 7 мини-свиней: 5 образцов в срок 1 месяц, 9 образцов в срок 3 месяца и 7 образцов в срок 6,5 месяцев.

Образцы тканей после проводки по восходящим спиртам заливали в парафин и готовили как поперечные, так и сагитальные (продольные) срезы толщиной 6–8 мк. для изучения архитектоники формирующейся вокруг имплантата капсулы. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, часть срезов окрашивались толуидиновым синим для выявления кислых гликозаминогликанов (ГАГ).

Перед операцией внутрикостной имплантации проводилась премедикация (за 30 мин. до наркоза внутримышечно диазепам 4 мл, внутримышечно пипольфен 8 мл, за 10 мин до наркоза атропин 2 мл).

Наркоз: 5% раствор тиопентал-натрия в физрастворе внутривенно 10 мл (0,5 г). Глубина наркоза корректируется внутривенным введением 5% раствора тиопентал-натрия в физрастворе. Общий расход тиопентал-натрия: 1,5 г/гол.

Выход из наркоза: кальция хлорид 10% – 4 мл внутривенно, сульфокамфокаин – 2 мл подкожно.

Под 5% тиопенталовым наркозом удалялись премоляры на верхней и нижней челюсти у мини-свиньи (благоприятная зона для установки имплантатов) и непосредственно с помощью специальных боров формировали ложе в ячейках

удаленных зубов для установки имплантатов. Всего было установлено 34 имплантатов, В эксперименте использовали отечественную имплантационную систему «Биомал».

## Результаты

В ходе экспериментов наблюдались случаи отторжения имплантатов, что, вероятно, связано с плохими анатомо-топографическими условиями в операционной зоне, из-за недостаточной первичной стабилизации (см. таб.).

Т а б л и ц а

### Доля отторгнутых и интегрированных имплантатов

№	Срок наблюдения	Количество установленных имплантатов	Размеры имплантатов		Количество интегрированных имплантатов	Доля интегрированных имплантатов, %
			3,5x12	4,5x12		
Свинья 1	1 мес	6	6	–	3	50
Свинья 2	1 мес	4	4	–	2	50
Свинья 3	3 мес	6	4	2	4	66,7
Свинья 4	3 мес	6	6		3	50
Свинья 5	3 мес	4	3	1	2	50
Свинья 6	6,5 мес	4	–	4	4	100
Свинья 7	6,5 мес	4	2	2	3	75
Итого	–	34	24	9	21	61,8

**Морфологическое исследование** показало, что через один месяц после операции вокруг имплантатов наблюдалось формирование зрелой соединительнотканной капсулы, рельеф которой повторял винтовую нарезку имплантата. Лимфо-макрофагальная инфильтрация капсулы была слабой и имела очаговый периваскулярный характер. Уже в этот ранний период соединительная ткань капсулы имела зрелый фиброзный характер, состоящей из плотных пучков коллагеновых волокон и фибробластов (рис. 1). Только в части наблюдений на небольших участках ещё сохранялась относительно незрелая соединительная ткань и более выраженная воспалительная инфильтрация, свидетельствующая о пролонгации воспалительного процесса.

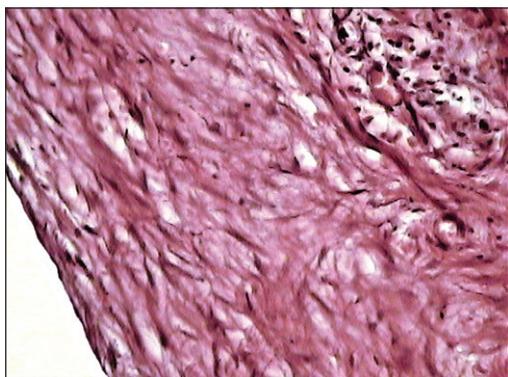


Рис 1. 1 месяц после операции.

Соединительная – тканная капсула, состоящая из зрелой фиброзной ткани. Коллагеновые волокна и веретеновидные фибробласты вблизи внутренней поверхности расположены циркулярно, а в глубине косо и продольно. Плотные пучки коллагена отсутствуют, отмечается периваскулярный лимфомакрофагальный и плазмноклеточные инфильтраты (только в глубоких слоях капсулы).

В области пришеечной части имплантата по ходу его стержня происходило врастание тонкого эпителиального пласта из эпителия десны, что вело к образованию неглубокого физиологического кармана (рис. 2). Большая часть поверхности имплантата бы-

ла интимно соединена с соединительной тканью капсулы, причем на границе местами были видны небольшие скопления макрофагов. Однако гигантские клетки инородных тел встречаются крайне редко. Такая тканевая реакция свидетельствует о биоинертности использованных нами титановых имплантатов с «сапфировым» покрытием. Слизистая оболочка десны незначительно изменена только в непосредственной близости от имплантата: там встречаются участки очаговой периваскулярной воспалительной инфильтрации в подэпителиальном слое, гиперплазия и акантоз эпителия, умеренная дистрофия слоя шиповидных клеток и небольшая десквамация поверхностных кератиноцитов. При небольшом отдалении от края альвеолярной лунки эти изменения исчезают.

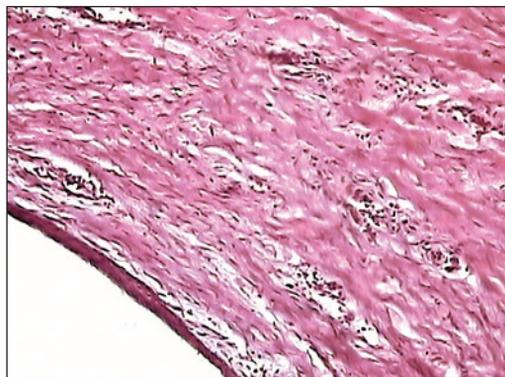


Рис 2. 1 месяц после операции.

Плотная фиброзная капсула в верхней части альвеолярной лунки вблизи шейки имплантата, выстланная тонким эпителиальным пластом. Ткань капсулы зрелая, но видны очаговые лимфо-макрофагальные инфильтраты с примесью плазматических клеток. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X 200.

Важнейшим процессом на этот срок является активный репаративный неоостеогенез в кости альвеолярного отростка, что является реакцией на внедрение имплантата в зубную лунку. Одновременно с пазушным остеокластическим рассасыванием и дистрофическими изменениями

остеоцитов края материнской кости идет активное новообразование костных балок разной степени зрелости: остеоидных, грубоволокнистых, сетчатых, минерализованных и компактизирующихся (рис.3).

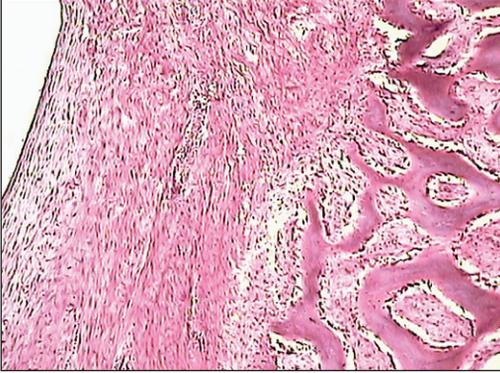


Рис 3. 1 месяц после операции.

Формирование фиброзной капсулы вокруг имплантата. Разнонаправленные пучки коллагена в капсуле с преобладанием циркулярной ориентации. В глубоких слоях формирование новообразованных костных балок с фиброзной тканью между ними. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X 100.

В глубоких отделах лунки новообразованная костная ткань замещает соединительную ткань капсулы, что приводит к сужению последней (рис.4).

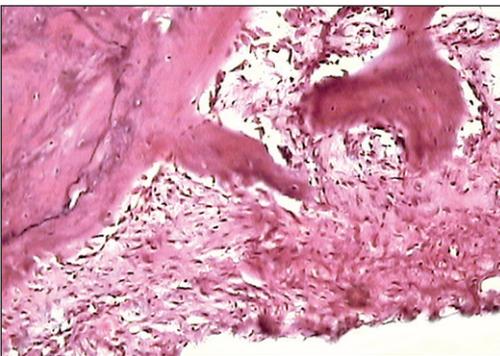


Рис 4. 1 месяц после операции.

Тонкая фиброзная капсула отделяет имплантат от новообразованной губчатой кости. Слева видны линии склеивания, справа новообразованная трабекула. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X 400.

Через 3 месяца после операции происходит дальнейшее созревание, уплотнение и истончение фиброзной капсулы вокруг имплантата. Она шире в выступах (зубцах), соответствующих углублениям винтового имплантата (рис.5).

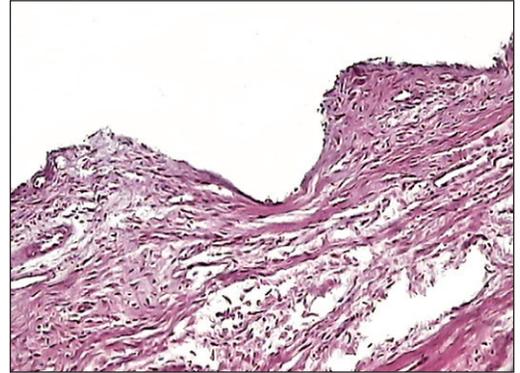


Рис 5. 3 месяца после операции.

Соединительно-тканная капсула вокруг имплантата. Отмечается неровная внутренняя линия с зубцами, соответствующими винтообразной нарезке имплантата. Внутренний слой капсулы состоит из плотной фиброзной ткани, коллагеновые пучки имеют продольную и циркулярную направленность, воспалительная инфильтрация минимальна. Клетки в основном – фибробласты. На внутренней поверхности немногочисленные макрофаги. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X 200.

Характерно, что пучки коллагеновых волокон фиброзной капсулы имеют разнонаправленную ориентацию в различных слоях: циркулярную, продольную и косонаправленную (рис.6).

По-видимому, у свиньи, которая, как и человек (в отличие от собаки) перетирает пищу зубами, такое строение капсулы не только фиксирует имплантат, но и способствует равномерному распределению механической нагрузки при жевании. Следует отметить, что в нижней челюсти мини-свиньи разнонаправленность коллагеновых пучков капсулы выражена более четко, чем в верхней челюсти.

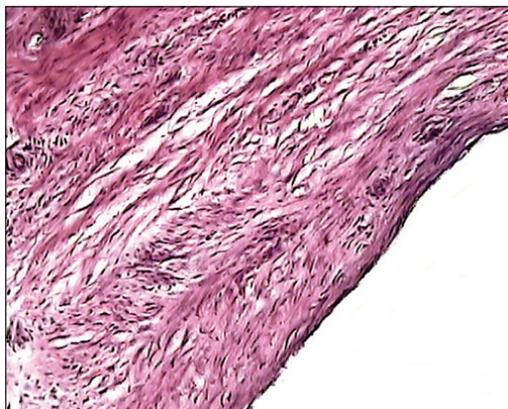


Рис 6. 3 месяца после операции. Плотная фиброзная капсула вокруг имплантата. Различная направленность коллагеновых пучков. Воспалительная инфильтрация отсутствует. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X 200.

Истончение капсулы связано с продолжением остеогенеза и наращиванием костной массы в стенке альвеолярной лунки. Незрелых костных балок становится значительно меньше. Капсула в основном граничит либо со зрелой губчатой костью (чаще в верхнем отделе лунки), либо с компактизированной костной тканью остеонной структуры (рис.7).

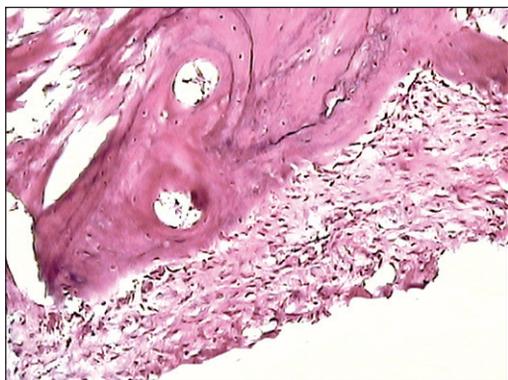


Рис 7. 3 месяца после операции. Тонкая фиброзная капсула между имплантатом и костной тканью альвеолярного отростка. Костная ткань – зрелая компактная, остеонная, но с четкими линиями склеивания. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X 200.

Многочисленные линии склеивания свидетельствуют о постепенном напластовании при новообразовании костной ткани. Местами продолжается перестройка костной ткани с остеокластической резорбцией костных балок, новообразованием других балок и переходом в губчатую или компактную кость.

Через 6,5 месяцев после операции значительных изменений по сравнению с трёхмесячным сроком уже не происходит, так как перестройка костной ткани альвеолярного отростка и формирование капсулы вокруг имплантата в основном заканчивается. Костная стенка лунки в большей степени компактизируется, хотя местами остается губчатая кость (рис.8). Костная ткань появляется также в зубцах, соответствующих углублениям в имплантате. Местами процесс расширения костной ткани за счет новообразования костных балок продолжается, но значительно меньше, чем в трёхмесячный срок. Фиброзная капсула еще больше истончается, но полностью не исчезает. Воспалительная инфильтрация в капсуле и слизистой оболочке десны уменьшается или исчезает.

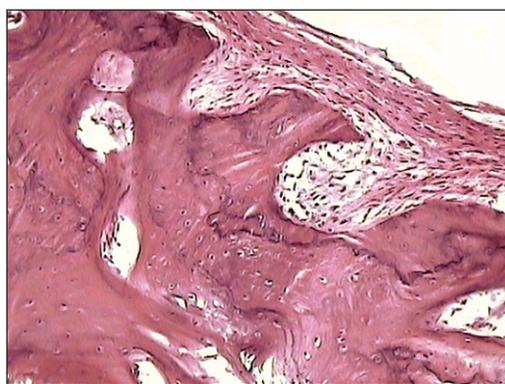


Рис 8. 6,5 месяцев после операции. Тонкая фиброзная капсула состоит из правильно организованных коллагеновых волокон. Капсула вплотную прилежит к компактизированной зрелой кости, в которой четко видны линии склеивания. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение X 200.

## Обсуждение результатов

Результаты, полученные при экспериментальном исследовании, показали, что мини-свиньи являются адекватной (физиологической) биомоделью при изучении процессов капсулообразования и реакции мягких и твердых тканей при установке имплантата. Морфологически в динамике от 1 до 6,5 мес. показано, что вокруг имплантата формируется соединительнотканная капсула, которая быстро созревает, уплотняется и истончается за счет репаративного остеогенеза в стенках альвеолярной лунки и нарастания там костной массы. Фиброзная капсула содержит разнонаправленные пучки коллагеновых волокон и по своей архитектонике близка к пародонтальной связке естественного зуба. Это усиливает фиксацию имплантата и способствует равномерному распределению нагрузки на костную ткань. Таким образом, благодаря ранней физиологической нагрузке быстро происходит остеофиброинтеграция и остеоинтеграция имплантата. Преобладание фиброзных или костных структур в зоне контакта зависит также от достижения первичной стабилизации, конструкции и геометрии имплантата, качества его поверхности и, особенно, оптимальной ранней нагрузки на имплантаты. Кроме того, быстрое снижение и исчезновение воспалительных и дистрофических изменений в слизистой оболочке десны и в капсуле имплантата свидетельствует о высокой биоинертности титанового имплантата, покрытого искусственным сапфиром.

Следует согласиться с Albrektson [4], что достичь истинной остеоинтеграции невозможно, особенно, когда на имплантат действуют сгибающие латеральные силы, противоречащие законам биомеханики. А создание устойчивой ортопедической конструкции в соответствии с законом биомеханики у человека, с его жевательными

особенностями, так чтобы на имплантат действовали жевательные силы только в одном вертикальном направлении, невозможно. Наличие тонкой соединительнотканной капсулы, по-видимому, является благоприятным фактором, способствующим смягчению механического стресса во время функциональной нагрузки. К тому же формирование разнонаправленных коллагеновых пучков в капсуле (как и в пародонтальной связке) способствует равномерному распределению нагрузки при жевании. Под влиянием ранней нагрузки происходит растяжения и сжатие коллагеновых волокон, имплантат быстрее адаптируется в лунке, физиологическое механическое давление ускоряет перестройку и утолщение костной ткани альвеолярного отростка, происходит процесс остеофиброинтеграции, который в связи с тонкостью фиброзной капсулы близок к остеоинтеграции.

Исходя из результатов нашего экспериментального исследования, а также данных зарубежной литературы, можно с большей уверенностью утверждать об эффективности непосредственной имплантации и более ранних нагрузках на них.

Резюмируя вышеизложенное, можно сказать, что непосредственная имплантация с ранней функциональной нагрузкой являются технически несложными операциями и при соблюдении определенных показаний и противопоказаний необходимо рекомендовать этот метод лечения для скорейшей реабилитации пациентов, что весьма актуально в настоящее мобильное время.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балуда И.В. Состояние тканей протезного ложа у больных с концевыми дефектами зубных рядов при лечении с использованием имплантатов. — Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 22 с. 1990.

2. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. — М.: Изд-во ВПК, 2004.
3. Параскевич В.Л. Дентальная имплантология. Основы теории и практики: Науч.-практ. пособие. — Минск, с. 240-275, 2002.
4. Albrektsson T, Jacobsson M. Bone-metal interface in osseointegration. // *J Prosthet Dent*; 57:597-607, 1987.
5. Babbush C.A. Guidelines for extraction immediate implant placement. // *Newsletter. February. 1998.*
6. Banat O, Daftary F. Surgical reconstruction. A prerequisite for longterm implant success. A philosophic approach. // *Prast. Periodontics Aesthet. Dent. Vol. 9. P. 21. 1995.*
7. Barzilay I., Graser G.N., Iranpour B. et al. Immediate implantation of pure titanium implants into extraction sockets of Macaca fascicularis. Part I : Clinical and radiographic assessment. // *Int-J-Oral-Maxillofacial-Implants. May-Jun;11(3): 299-310, 1996.*
8. Blosck M.S., Kent J.N. Endosseous implants for maxillofacial reconstruction. — *Philadelphia, 1995.*
9. Branemark P.L. Introduction to osseointegration. // In: Branemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-Integrated Protheses: Osseointegration in Clinical Dentistry. Chicago: Quintessence. 11-76, 1985.*
10. Hahn J. Лекции по оральной имплантологии. // *Инфодент, №1. С. 7-9. 1999.*
11. Linkov L.I., Wertman J. Keemtry implants and their procedures // *J. Oral implantol. Vol.12, No. 4. P. 590- 626. 1986.*
12. Saadoun A. P., Le Gall M. Implant positioning for periodontal functional and aesthetic results // *Prast. Periodontics Aesthet. Dent. Vol. 7. P. 43.*
13. Weiss Ch. Chort-and long-term bone maintenance surrounding fibro-osteal and osteal integrated dental implants // *J. Oral Implantol. Vol. 16, No.1. 1990.*

## USING OF MINIPIGS IN EXPERIMENTAL DENTAL IMPLANTOLOGY

G.A.Ashuev, A.A.Kulakov, G.J. Kapanadze

*Central scientific Research Stomatology Institute of Roszdrav, Moscow  
The Reseach Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key word:** direct implantation, model, osteointegration, fibreosteointegration, direct loads.

The experimental work have been done on big biomodels (laboratory minipigs) for establishing of optimal timing (1, 3 and 6,5 months) for functional loads in intraosseons implantation. It was shown in morphological dynamic studies in the period from 1 to 6,5 months connective tissue capsule was formed around implant which is maturing quickly, packing and thinning by reparation osteogenesis. The osseous mass growing is noted on implant surface and alveolar process thickening in the implantation zone under alveolar process the influence early functional loads.

## Культура дифференцированных нейронов взрослого моллюска – альтернативная модель изучения процессов регенерации нервной системы

Н.А. Ивличева<sup>1,2</sup>, Э.Н. Гахова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Моск. обл.,

<sup>2</sup> Пущинский государственный университет, Пущино, Моск. обл.

Культура дифференцированных нейронов *in vitro* рассматривается как модель для изучения процессов регенерации нервной системы в криомедицине. Кратко описана история развития метода культуры клеток *in vitro* и возможность его практического применения в нейробиологии. Дается описание модельного объекта – мозга пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* L. – для изучения процессов восстановления нейронов, прошедших криоконсервацию (замораживание при  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Метод культивирования *in vitro* нейронов беспозвоночных в настоящее время является перспективным для проблем биомедицины.

**Ключевые слова:** культура клеток *in vitro*, нейроны моллюска, криоконсервация, регенерация нервной системы

Одно из основных мест в науке о мозге занимают проблемы развития нервной системы и неразрывно связанные с ними проблемы регенерации нервных клеток, в решении которых значение тканевых и клеточных культур трудно переоценить. Клеточная культура *in vitro* как модель используется для решения целого ряда задач нейробиологии, поскольку позволяет в течение длительного времени исследовать нервные клетки, сохраняющие свою целостность и высокий уровень физиологической активности. Метод культуры нервных клеток применяется при исследовании синаптогенеза, пластичности и специфичности восстановленных межнейронных функциональных связей и синаптической передачи, и т.д.

В последнее время культура нервных клеток *in vitro* приобретает существенное значение в области нейромедицины, связанной с задачами трансплантологии и развитием биотехнологии длительного сохранения нервной ткани (и целого мозга) с помощью глубокого замораживания при температуре жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

История развития исследований на клеточном уровне в культуре *in vitro* насчитывает уже более 100 лет [11]. Можно считать, что клеточные и тканевые культуры берут свое начало с того времени, когда в 1885 году Ру (Roux) удалось в течение немногих дней поддерживать развитие медуллярной пластинки куриного эмбриона в теплом солевом растворе. В 1887 году Арнольд (Arnold) описал кратковременное переживание и миграцию лейкоцитов вне организма лягушки, в солевом растворе. В 1903 году Жолли (Jolly) впервые наблюдал деление клеток (лейкоцитов) саламандры в висячей капле. В 1906 году Биб и Эвинг (Beebe and Ewing) осуществили попытку получить истинное культивирование ткани на примере инфекционной лимфосаркомы собак. Однако подлинное начало применения метода культуры ткани, началось с того времени, когда Харрисон (Harrison) в 1907 году осуществил воспроизводимые эксперименты по переживанию *in vitro* медуллярной трубки эмбриона лягушки. Ученому удалось получить рост аксонов из клеток, взятых

из кусочков ткани медулярной трубки. С этого момента начинается развитие метода культуры нервной клетки и ткани.

Дальнейшее развитие культуры *in vitro* шло по пути изолирования клеток диссоциацией, или дезагрегацией живой ткани, и введения полученных клеток в искусственные среды. Так, Роуз и Джонсон (Rous and Jones) в 1916 году впервые применили раствор трипсина для переваривания плазматического сгустка и обнаружили, что ткань эксплантата распадается на отдельные клетки, которые могут быть использованы для дальнейшего культивирования *in vitro*. Но лишь спустя 40 лет это наблюдение нашло практическое применение благодаря исследованиям Москоны (Moscona) [27], который разработал методику диссоциации эмбриональных тканей с помощью протеолитических ферментов в среде, свободной от двухвалентных ионов кальция и магния. И по сей день эта методика выделения живых изолированных клеток широко применяется для получения монослойных культур диссоциированных клеток, в том числе и развивающейся нервной системы [12].

В настоящее время имеются реальные предпосылки к тому, что культура нейронов и нервной ткани *in vitro* найдет широкое применение в такой перспективной области как криобиотехнология нервной системы. Создание криобанков нервной ткани позволит в течение длительного времени (десятки лет) сохранять резерв трансплантатов при сверхнизких температурах, например в жидком азоте при  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Первые наблюдения за выживаемостью нейрональной ткани после замораживания относятся к 1953 году, когда Лайет и Гонзалес (Luyet and Gonzales) [26] показали, что ткань мозга цыпленка может переживать замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$ . Позднее, в 1980 году, были опубликованы данные по переживанию эмбриональной ткани мозга млекопитающих в течение 18 недель при  $-90^{\circ}\text{C}$ ,

замороженных с медленной скоростью с использованием 10% ДМСО. [21]. Эмбриональные ткани, в том числе и нервная, отличаются пониженной иммунологической компетентностью и относительно хорошо переносят цикл замораживания-отогрева при удачном подборе криопротекторов и криозащитных сред [18, 25]. Тем не менее, авторы отмечают, что клетки, культивированные после криоконсервации эмбриональной нервной ткани, были чувствительны к механическим и осмотическим воздействиям, а процент приживания трансплантатов после криоконсервирования был довольно низким. Клетки эмбриональной нервной ткани способны к митотическому делению и росту клеток, поэтому поврежденные клетки могут замещаться новыми, а критериями успешной криоконсервации может служить изучение биосинтеза белка и ДНК [1]. Дальнейшие работы показали возможность криоконсервации ткани мозга крыс и приматов, в том числе и человека [23, 30, 31]. Нейроны и глиальные клетки человека и лабораторных животных в различной степени сохраняли жизнеспособность при одних и тех же условиях замораживания-оттаивания [4, 25]. Показано также, что контакты, необходимые для функционирования тканевой системы, оказываются наиболее уязвимыми местами для осмотического стресса и фазовых переходов, сопровождающих процесс криоконсервации [14].

Интерес к криоконсервации нервной ткани возрастает параллельно с развитием методов трансплантации нервной ткани. [17, 19]. В связи с этим особое внимание уделяется изучению криоконсервации не изолированных нейронов, а зрелой нейрональной ткани (коры головного мозга, гиппокампа и др.), которую можно трансплантировать в мозг реципиентам сразу после оттаивания, или через промежуточный этап проведения изолированных клеток через культуру *in vitro*.

Криоконсервация и восстановление физиологических функций зрелой дифференцированной нервной ткани имеет ряд трудностей, отличных от замораживания эмбриональной ткани. Тем не менее, показана возможность криоконсервации и восстановления жизнеспособности постнатальной нервной ткани практически при тех же условиях замораживания-оттаивания, что и эмбриональной ткани [28]. В работе Брюне (Brunet) с соавт. опубликованы успешные результаты такого исследования. Авторы замораживали небольшие кусочки (1 мм<sup>3</sup>) коры головного мозга человека в среде DMEM (250 мкл) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 8% ДМСО. Замораживание осуществляли медленно со скоростью 1°С/мин до -196°С и хранили в жидком азоте в течение 2-х лет. После быстрого оттаивания и механической диссоциации размороженных кусочков, выделенные из них клетки были введены в культуру *in vitro*. Иммуноцитофлуоресцентный анализ показал, что и глиальные клетки, и нейроны криоконсервированной ткани в культуре не отличались от контрольных [17].

Применение метода культуры ткани расширяет возможности в сфере изучения жизнеспособности биоматериала, прошедшего криоконсервацию. Сюда входит тестирование морфо-функциональной сохранности, способности формирования отростков, анализ состояния рецепторов, синтеза медиаторов, восстановления электрической активности, для последующей успешной приживляемости трансплантатов в мозге животных.

Несмотря на определенные успехи, введение в практику нейромедицины методов криоконсервации пока не получило развития в основном из-за недостатка фундаментальных научных знаний о механизмах криоповреждений и путей криозащиты нейронов.

В этом плане простые нервные системы беспозвоночных, в частности модель

дифференцированных нейронов взрослого моллюска в культуре клеток *in vitro*, является наиболее удобной для изучения механизмов регенерации нервной системы и роста отростков [16, 32, 33] при (крио-)повреждениях в процессе криоконсервации нервной ткани.

Известно, что основные принципы функционирования и строения нервной системы всех изученных в этом отношении представителей животного мира идентичны. Возможно, что механизмы регенерации нейронов также не имеют существенных видовых отличий, и закономерности, обнаруженные на нейронах беспозвоночных, могут быть использованы для понимания аналогичных процессов в нейронах высших животных и человека. Более существенен вопрос, который до сих пор остается открытым, в какой мере закономерности, обнаруженные в модельных условиях *in vitro*, могут быть использованы для понимания механизмов, регулирующих тот же процесс *in vivo* [10, 24].

Несмотря на то, что беспозвоночные относятся к пойкилотермным животным и, вероятно, более устойчивы к низким температурам по сравнению с млекопитающими, их клетки, как и нейроны млекопитающих, могут быть заморожены до сверхнизких температур только с использованием определенных режимов охлаждения и криозащитных агентов.

В наших исследованиях по культивированию нейронов и криоконсервации нервной ткани модельным объектом являются дифференцированные нейроны изолированного мозга взрослого пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* L. (большой прудовик) [2, 3, 5, 6, 8, 9, 12, 13, 20, 24]. По систематическому положению *Lymnaea stagnalis* относится к подтипу *Conchifera* (раковинные), к классу *Gastropoda* (брюхоногие), подклассу *Pulmonata* (легочные), надотряду *Basommatophora* (сидячеглазых).

Мозг моллюска состоит из нескольких пар ганглиев, соединенных между собой комиссурами и коннективами. Все ганглии и отходящие от них нервы заключены в соединительнотканную оболочку. В ганглиях моллюсков нервные клетки лежат по наружной поверхности ганглия, а середина ганглия занята отростками нейронов, нейропилем. Каждый из ганглиев содержит до 2000 нейронов разного размера, от 10 до 250 мкм. Тела нейронов пигментированы и хорошо видны под микроскопом. Гигантских нейронов, как правило легко идентифицируемых, в мозге моллюска не более 20 [7, 9]. Нейроны моллюсков относятся к распространенной среди беспозвоночных категории униполярных клеток, у которых функции различных отростков мультиполярных нейронов (рецептивные и эфферентные) сочетаются в одном отростке. Нейроны посылают свои аксоны в нейропиле, где находятся синаптические контакты между отростками нейронов.

Изолированный мозг моллюска *Lymnaea stagnalis* L. был использован нами для изучения механизмов действия криопротекторов и замораживания (жидкий азот,  $-196^{\circ}\text{C}$ ) с применением методов фиксации мембранного потенциала и регистрации трансмембранных ионных токов на диализированных нейронах [3, 12, 13, 20]. Основные результаты показали, что независимо от используемого вида криопротектора (диметилсульфоксид, этиленгликоль, формамид, маннитол) происходило увеличение порога активации ионных каналов, уменьшение пика входящих и выходящих токов ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ), уменьшение проводимости мембраны для  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ . Эффекты криопротекторов на ионные каналы имели обратимый характер. После оттаивания ганглиев, замороженных в жидком азоте, нейроны восстанавливали характерные для них электрические параметры через 1,5-2 ча-

са. Несмотря на различия в деталях, нейроны беспозвоночных и позвоночных имеют ряд общих структурных особенностей, поэтому результаты по изучению влияния криопротекторов и ультразвуковых температур могут быть в значительной степени экстраполированы на нейроны позвоночных.

На сегодняшний день показано, что нейроны, выделенные из замороженного в жидком азоте мозга моллюска, оживают [2, 20] и формируют отростки в клеточной культуре *in vitro* после двухлетнего хранения при  $-196^{\circ}\text{C}$  (рис.) [8]. На рисунке изображен мозг моллюска, замораживание-оттаивание осуществляли со скоростью  $400-500^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$ , в качестве криопротектора использовали 2М ДМСО [5, 7]. Культивирование проводили при  $22^{\circ}\text{C}$ . Состав питательной среды с антибиотиком (гентамицин):  $\text{NaCl} - 90\text{mM}$ ,  $\text{KCl} - 5$ ,  $\text{CaCl}_2 - 2$ ,  $\text{MgCl}_2 - 1,5$ ,  $\text{tris HCl} - 0,25$ , без добавления сыворотки, но содержащий 10% RPMI, pH 7,9 (по Костенко, 1985). Для морфологической дифференцировки изолированных нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis* L. необходимо, чтобы после эксплантации в культуру нейроны прикрепились к стеклу и втянули аксоны, оставшиеся в процессе изоляции клеток из мозга. Затем у клеток образуются наплывы цитоплазмы – ламеллы, указывающие на начало роста новых отростков. Отростки опытных нейронов не отличались от отростков контрольных нейронов, мозг которых не подвергался криоконсервации [10].

Однако, как показали электрофизиологические и электронномикроскопические исследования [3, 8] для проявления функций формирования отростков в клеточной культуре *in vitro* после двухлетнего хранения при  $-196^{\circ}\text{C}$  требуется длительный восстановительный период (до 18 часов). Это свидетельствует о наличии криоповреждений, отдаленные последствия которых могут проявиться в дальнейшем

функционировании нейронов. В этой связи представляет большой интерес изучение механизма индукции и ингибирования роста нейритов путем воздействия различными биологическими, в том числе и фармакологическими, агентами.

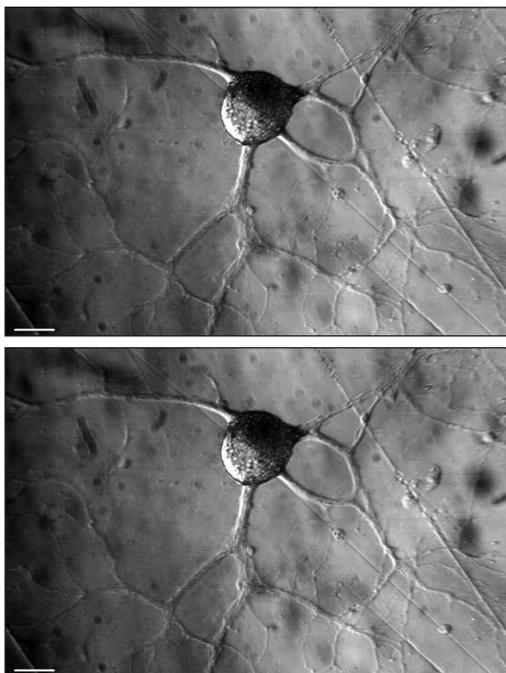


Рис. Культура дифференцированных нейронов *in vitro* мозга взрослого моллюска *Lymnaea stagnalis* L. (3-и сутки культивирования):

- а) контроль – нейроны из мозга моллюска, не подвергнутого замораживанию;
- б) нейроны из оттаянного мозга моллюска после его хранения в жидком азоте в течение 2-х лет.

По данным литературы в настоящее время на идентифицированных нейронах моллюска *Lymnaea stagnalis* L. широко изучаются механизмы взаимодействия между пресинаптическими кальциевыми каналами в процессе синаптической передачи информации, механизмы формирования конусов роста нейронов [32, 33, 35], роль хемотропизма и аутокринной регуляции в образовании межнейронных

связей [10, 24], влияние нейротрофических (серотонин, дофамин) и эпидермальных ростовых факторов на регенерацию и формирование нейрональных отростков [22, 34]; вопросы ассоциативного обучения и проблемы долговременной памяти на клеточном уровне [15]. Наиболее актуальной проблемой сейчас является проблема трансплантации криоконсервированных нейронов взрослого человека [23]. Поняв механизмы регенеративных процессов нейронов на примере таких простых нервных систем, как мозг моллюска, можно будет приблизиться к управлению процессами восстановления нервных клеток и развития нервной системы в целом.

Резюмируя вышесказанное, можно полагать, что изолированные и развивающиеся *in vitro* нервные и глиальные клетки являются почти идеальной экспериментальной моделью для решения многих задач нейробиологии, криомедицины, нейрофармакологии и нейротоксикологии.

Таким образом, метод культивирования *in vitro* нейронов беспозвоночных, давно ставший классическим для электрофизиологических, фармакологических и функционально-метаболических исследований, в настоящее время является перспективным для проблем биомедицины.

## Литература

1. Бабийчук Г.А. Ломако В.В., Шуляк Л.И., Шило А.В. Ломакин И.И. Функциональное состояние фрагментов эмбриональной нервной ткани после гипотермического хранения и трансплантации реципиенту. // *Проблемы криобиологии*. № 2, с.40-48. 2000.
2. Гахова Э.Н., Дмитриева Е.В. Криоконсервация нервной ткани // *Биофизика живой клетки*, Т.7, с.65-68 (<http://cam.iteb.psn.ru/>). 2003.

3. Гахова Э.Н., Чекурова Н.Р., Кислов А.Н., Вепринцев Б.Н. Гигантские нейроны сохраняют жизнеспособность после глубокого замораживания мозга пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* L. // *Криобиология*. № 1, с.19-21. 1989.
4. Гольцев А.Н., Гурина Т.М., Бабенко Н.Н., Останков М.В. Влияние различных режимов криоконсервирования на некоторые характеристики эмбриональных нервных клеток // *Проблемы криобиологии*, № 1, с.46-50. 2003.
5. Дмитриева Е.В. Структурно-функциональные изменения нейронов моллюска *Lymnaea stagnalis* L. после криоконсервации. — Автореф. дис ... канд. биол. наук. — Пушкино, 22с. 2004.
6. Дмитриева Е.В., Мошков Д.А., Гахова Е.Н. Ультраструктурные изменения нейрона МПЗ моллюска *Lymnaea stagnalis* L. после криоконсервации изолированного мозга // *Цитология*, Т. 48. № 6, с. 2006.
7. Дьяконова Т.Л., Вепринцев Б.Н. Особенности структурной и функциональной организации и метаболической активности нейронов прудовика // *ВИНИТИ*. № 816-69. 1969.
8. Ивличева Н.А., Дмитриева Е.В., Костенко М.А., Гахова Э.Н. Криоконсервированные нейроны моллюска способны к морфологической дифференцировке в культуре *in vitro* // *Биофизика*, Т.49, вып. 4, с.710-714. 2004.
9. Костенко М.А. Внутриклеточная регуляция дифференцировки и регенерации нейронов в культуре. — Автореф. дис ... докт. биол. наук. — Пушкино, 360с. 1985.
10. Мякишева С.Н., Костенко М.А. Роль хемотропизма и аутокринной регуляции в образовании межнейронных связей. // *Цитология*. Т.43, № 4, с.370. 2001.
11. Пол Д. Культура клеток и тканей. — Медгиз, 1963.
12. Сотников О.С., Богута К.К., Голубев А.И., Миничев Ю.С. Механизмы структурной пластичности нейронов и филогенез нервной системы. — С.-Пб.: Наука, 1994.
13. Чекурова Н.Р. Использование электрофизиологического метода для изучения механизмов криоповреждений и способов криозащиты. // *Биофизика живой клетки*, Т.6, с.121-126. 1994.
14. Armitage W.J., Juss B.K., Easty D.L. Differing effects of various cryoprotectants on intercellular junctions of epithelial cells // *Cryobiology*. V.32, p.52-59. 1995.
15. Benjamin P.R., Staras K., and Kemenes G. A Systems Approach to the Cellular Analysis of Associative Learning in the Pond Snail *Lymnaea*. // *J. Neurophysiol.*, May/June. V.7, № 3, p.124-131. 2000.
16. Bray D. Membrane biophysics: the dynamics of growing axons. // *Current biology*, V.6, № 3. p.241-243. 1996.
17. Brunet J-F., Pellerin L., Magostretti P., Villemure J-G. Cryopreservation of human brain tissue allowing timely production of viable human brain cells for autologous transplantation // *Cryobiology*. V.47, № 2, p.179-183. 2003.
18. Collier T.J., Gallagher M.J., Sladek C.D. Cryopreservation and storage of embryonic rat mesencephalic dopamine neurons for one year: comparison to fresh tissue in culture and neural grafts // *Brain Res.*; 623(2):249-56. 1993.
19. Frodl E., Duan W.M., Sauer H., Kupsch A., Brundin P. Human embryonic dopamine neurons xenografted to the rat: effects of cryopreservation and varying regional source of donor cells on transplant survival, morphology and function.// *Brain.Res.* V.647, p.286-298. 1994.
20. Gakhova E.N., Kislov A.N., Cheкурова N.R. Study of membrane properties of mollusc neuron after freeze-storage at liquid nitrogen temperature for 8 years.// *Cryopreservation of testis of frog Rana temporaria. Infusionsther.Trasfusiosmed.* V.24, № 5. p.378-379. 1997.

21. Houle J.D., Das G.D. Freezing of embryonic neural tissue and its transplantation in the rat brain // *Brain Res.* V. 192, p.570-574. 1980.
22. Koert C.E., Spencer G.E., Minnen J. et al. Functional Implications of Neurotransmitter Expression during Axonal Regeneration: Serotonin, But Not Peptides, Auto-Regulate Axon Growth of an Identified Central Neuron. // *J. Neurosc.*, August 1, 21(15): 5597-5606. 2001.
23. Kohama I., Lankford K.L., Preiningerova J. et al. Transplantation of Cryopreserved Adult Human Schwann Cells Enhances Axonal Conduction in Demyelinated Spinal Cord. // *J. Neurosc.*, February 1, 21(3):944-950. 2001.
24. Kostenko M.A., Myakisheva S.N. The Role of Chemotaxis in Morphological Differentiation of Mollusc Neurons. *Comp. // Biochem. Physiol.*, V.115A, № 3, p.265-268. 1996.
25. Koopmans J., Hogen E.I., Copray S. et al. Cryopreservation of porcine fetal ventral mesencephalic tissue for intrastriatal transplantation in Parkinson's disease // *Cell Transplant.*;10(7):573-81. 2001.
26. Luyet B., Gonzales F. Growth of nerve tissue after freezing in liquid nitrogen // *Biodynamica.* V. 7, p.171-173. 1953.
27. Moscona A.A., Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. // *J. Anat. Lond.*, V. 86, p.287. 1952.
28. Negishi T., Ishii Y., Kawamura S. et al. Cryopreservation of brain tissue for primary culture // *Exp.Anim.*, Jul;51(4):383-90. 2002.
29. Pasic M., De sa Faria L.J. Effects and freezing on abdominal ganglia of *Aplysia* // *Cryobiology.* V. 16, p.390-400. 1979.
30. Pichugin Yu., Fahy G.M., Morin R. Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification // *Cryobiology.* V.52, p.228-240. 2006.
31. Silani V., Pizzuti A., Strada O. et al. Human neuronal cell viability demonstrated in culture after cryopreservation // *Brain Res.* V. 473, № 1, p.169-174. 1988.
32. Spafford J.D., Munno D.W., Nierop P. et al. Calcium Channel Structural Determinants of Synaptic Transmission between Identified Invertebrate Neurons. // *J. Biol. Chem.*, Feb. 7, Vol. 278, Issue 6, 4258-4267. 2003.
33. Spencer G.E., Lukowiak K., Syed N. I. Transmitter-receptor interactions between growth cones of identified *Lymnaea* neurons determine target cell selection in vitro // *J. of Neurosc.*, Nov.1, 20(21):8077-8086. 2000.
34. Syed N., Richardson P., Bulloch A. Ciliary neurotrophic factor, unlike nerve growth factor, supports neurite outgrowth but synapse formation by adult *Lymnaea* neurons // *J.Neurobiol.*, V. 29, № 3, p.293-303. 1996.
35. Wildering W. C., Hermann P. M., Bulloch A.G.M. *Lymnaea* Epidermal Growth Factor Promotes Axonal Regeneration in CNS Organ Culture // *J. of Neurosc.*, Dec. 1, 21(23):9345-9354. 2001.

**THE IN VITRO CULTURE OF THE DIFFERENTIATED NEURONS FROM  
ADULT MOLLUSCS IS THE MODEL FOR STUDY OF REGENERATIVE  
PROCESSES OF NERVOUS SYSTEM IN CRYOMEDICINE**

**N.A. Ivlicheva<sup>1,2</sup>, E.N. Gakhova<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup> Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow region*

*<sup>2</sup> Pushchino State University, Pushchino, Moscow region*

**Key words:** in vitro culture of cells, mollusc's neurons, cryopreservation, regeneration of neurons.

The in vitro culture of differentiated neurons is considered as a model for study of regenerative processes of nervous system in cryomedicine. It has been shortly described a history of development of the method of the in vitro cellular culture and the possibility to its practical application in neurobiology. It has been given the description of the model object, – a brain of fresh-water mollusc *Lymnaea stagnalis* L., – for study of regenerative processes of neural cells after cryopreservation of isolated brain (freezing at  $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Currently the method for in vitro cultivation of the invertebrate's neurons is promise for biomedicine problems.

## Изменения электрической активности переживающего среза неокортекса морской свинки как прогностический показатель эффективности лазерной терапии у больных, страдающих рассеянным склерозом

М.Н. Жадин<sup>1</sup>, Н.М. Захарова<sup>1</sup>, А.Н. Карнев<sup>2</sup>, И.И. Марушак<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Московская обл.;

<sup>2</sup> Российский Медицинский государственный Университет, Москва

Описаны результаты клинического испытания новой разработанной нами диагностики рассеянного склероза на основе анализа влияния сыворотки крови на электрическую активность переживающих срезов неокортекса морской свинки на фоне лечения низкоинтенсивной внутривенной лазерной терапии. Для сравнения на тех же больных проводилась традиционная неврологическая диагностика по шкале Куртцке (EDSS). Обе диагностические методики дали сходные результаты, показывающие, что новая электрофизиологическая диагностика адекватно отражает стадию заболевания и функциональное состояние больного рассеянным склерозом. Данное исследование еще раз подтвердило успешность внутривенной низкоинтенсивной лазерной терапии.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, диагностика, переживающий срез, неокортекс, внутривенная лазерная терапия

### Введение

Рассеянный склероз (РС) – одно из распространенных неизлечимых заболеваний нервной системы, поражающее лиц молодого и трудоспособного возраста. Вследствие того, что этиология заболевания остается неясной, большое внимание уделяется исследованию механизмов патогенеза РС, методов патогенетической терапии заболевания и разработке новых методов диагностики РС. Важным условием развития демиелинизации ЦНС при РС становится патологическая проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). В норме ГЭБ непроницаем для многих элементов крови, включая иммунокомпетентные клетки [2]. Известно, что при РС повышается секреция противоспалительных цитокинов: интерлейкинов (IL) IL-1, IL-2, IL-6, TNF-альфа (фактора некроза опухолей) [1]. Они, в свою очередь, оказывают влияние на способность мозговых капилляров изменять про-

ницаемость ГЭБ. При этом нарушение проницаемости ГЭБ наблюдается не только в активной фазе процесса. Сохраняющаяся в стадии ремиссии повышенная ранимость ГЭБ создает условия для проникновения цитокинов в мозг при любой антигенной стимуляции клеточного иммунитета, поддержанию патологической активности астроцитов и микроглии мозга. В связи с повышением проницаемости ГЭБ, недавно была разработана [3] новая быстрая недорогая и сравнительно надежная методика диагностики РС, основанная на определении амплитуды электрической реакции вызванной активности переживающего среза неокортекса морской свинки на введение сыворотки крови больного РС [4]. В предлагаемой работе излагаются результаты испытания этой методики в клинических условиях на примере применения также новой внутривенной низкоинтенсивной лазерной терапии [6] и неврологической диагностики по шкале Куртцке.

### Диагностика по влиянию сыворотки крови на переживающий срез неокортекса

Вследствие вышеизложенного представлялось интересным исследовать воздействие низкоэнергетического лазерного облучения крови больных РС в комплексном лечении РС, выполняя контроль за состоянием больного с помощью недавно разработанной диагностической методики [3] на основе влияния сыворотки крови больного РС на электрическую активность переживающих срезов неокортекса морской свинки. Методика заключалась в нижеследующем.

Опыты выполнялись на инкубируемых *in vitro* срезах неокортекса морских свинок. Животных массой 250-400 г декапитировали с помощью гильотины. Механическим слайсером приготавливали фронтальные срезы сенсорной коры толщиной около 500 мкм и помещали в экспериментальный отсек термостатируемой камеры. С помощью перистальтических насосов через камеру осуществлялся проток насыщенного карбогеном раствора (35°C) следующего состава (в ммоль/л): NaCl – 131,5, KCl – 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,24,  $\text{CaCl}_2$  – 2,  $\text{MgSO}_4$  – 2,  $\text{NaHCO}_3$  – 13,5, глюкоза – 10. Раздражающий вольфрамный биполярный электрод помещался на границе белого и серого веществ, а отводящий стеклянный электрод с диаметром кончика около 10 мкм, наполненный 0,1 М раствором NaCl, в области IV-V слоев коры в одной проекции со стимулирующим. Регистрировали вызванные популяционные ответы нейронов среза с латентным периодом 2-4 мс, длительностью 19-15 мс и средней амплитудой 0,1-0,5 мВ. В инкубирующую среду вводилась сыворотка крови больного РС в объеме, составлявшем 20% от общего объема инкубирующей среды. После введения сыворотки больного РС в стадии обострения амплитуда популяционного

ответа сравнительно быстро (в течение 30 мин.) снижалась в несколько раз в зависимости от тяжести заболевания. Если же вводилась сыворотка больного РС в стадии ремиссии, то амплитуда ответа повышалась на 30-100%. Амплитуда ответа не менялась, если в инкубирующую среду вводилась сыворотка крови здоровых людей в том же объеме или пациентов, больных иными болезнями, но не РС. Таким образом, эта методика позволяла выявить заболевание РС у пациента, определить степень его тяжести, а также и стадию заболевания, и была специфичной к РС.

Введение сыворотки крови больного РС со всеми ее компонентами во внеклеточную среду среза через инкубирующую среду является экспериментальной моделью нарушения ГЭБ при РС. При этом вещества, содержащиеся в крови в результате развития аутоиммунной реакции на миелин и разрушения миелина, поступают прямо в ткань неокортекса, оказывая ингибирующее влияние на активность корковых нейронов.

### Шкала Куртцке

Состояние больных наряду с вышеописанной методикой оценивалось по шкале Куртцке (EDSS). По этой шкале у больных отмечались нижеследующие симптомы:

- 1) симптомы поражения пирамидного тракта;
- 2) симптомы поражения мозжечка;
- 3) симптомы поражения черепных нервов, вызванные поражениями белого вещества ствола мозга;
- 4) симптомы поражения проводниковой чувствительности;
- 5) нарушения функционирования тазовых органов;
- 6) зрительные нарушения, обусловленные поражениями зрительного нерва;
- 7) нейропсихологические симптомы.

## **Внутривенная лазерная терапия**

Клинические симптомы при РС развиваются в результате воспалительного поражения миелиновых оболочек аксонов, а на поздних стадиях и их самих. Локальный аутоиммунный процесс увеличивает активацию Т-хелперов против белковых фракций ЦНС [8]. Поэтому терапия на ранних стадиях заболевания обычно направляется на избирательное подавление аутоиммунного ответа. Для решения этой задачи необходима идентификация протеинов ЦНС, которые являются мишенью локального Т-лимфоцитарного ответа. Учитывая недостаточную эффективность и высокую стоимость комплексного лечения с добавлением иммуномодуляторов, ныне разрабатываются новые подходы к терапии РС. Большой проблемой остаются оценка эффективности той или иной проводимой терапии и обоснования ее патогенетической направленности. Лазерное излучение активирует многие процессы в организме, повышает энергетический и пластический обмен, усиливает микроциркуляцию, стимулирует окислительно-восстановительные процессы, обеспечивает увеличение синтеза нуклеиновых кислот, белков и ферментов [4].

Терапевтический эффект лазерного излучения связан с его фотоактивирующим и нормализующим действием на активность важнейших ферментов метаболизма, на биосинтез белков, ДНК, РНК, на пролиферацию клеток, регенерацию тканей и на активность иммунной системы и системы микроциркуляции [5]. Конечный фотобиологический эффект лазерного облучения проявляется ответной реакцией организма в целом, комплексным реагированием органов и систем. Это находит отражение в клинических эффектах лазерной терапии. Уменьшение длительности фаз воспаления и отека тканей оказывает противовоспалительный и противоотечный эффекты. По-

вышение скорости кровотока, увеличение количества новых сосудистых коллатералей улучшает регионарное кровообращение, что вместе с ускорением метаболических реакций и увеличением митотической активности клеток способствует процессу физиологической и репаративной регенерации. При лазерной терапии отмечается повышение активности общих и местных факторов иммунной защиты [4]. Ежедневное внутривенное лазерное облучение крови [6] проводилось у всех больных с помощью аппарата АЛОК-1 (мощность 1 мвт, время облучения в первом сеансе 15 мин. и в последующих — 10 мин., общее количество сеансов — 5).

## **Результаты**

С целью изучения эффективности лечебного действия низкоэнергетического лазерного внутрисосудистого облучения при РС было проведено комплексное лечение 12 больных (9 женщин и 3 мужчин, средний возраст составлял 42 года) на базе ГКБ № 55 и в Московском научно-клиническом Центре рассеянного склероза. Продолжительность заболевания была от 4 до 30 лет; у всех наблюдавшихся больных была выявлена ремитирующая форма заболевания.

Неврологический статус оценивался в динамике до и после проведения лазерной терапии. Состояние всех больных до и после лазерной терапии обследовалось с помощью диагностических методов по влиянию сыворотки крови на переживающий срез неокортекса и одновременно по шкале Куртцке. Эти два параллельных обследования дали взаимосогласующиеся результаты. До лечения шесть человек (больные 1, 4, 6, 8, 9, 12, табл.) были в стадии ремиссии и шесть больных обнаружили стадию обострения (больные 2, 3, 5, 7, 10, 11). После проведения лазерной тера-

пии, согласно результатам анализов у трех больных (больные 5, 7, 11) стадия обострения перешла в стойкую стадию ремиссии, у двух человек (больные 2 и 10) в стадии обострения отмечено лишь некоторое улучшение, в четырех случаях у больных (больные 1, 4, 8, 9) в стадии ремиссии отмечено явное улучшение состояния, у 1-го больного (больной 6) стадия ремиссии перешла в стадию обострения, и в 1 случае состояние больного (больной 12) не изменилось (см. табл.).

Результаты электрофизиологической диагностики приведены в таблице. В первом столбце приведен номер больного, во втором и третьем столбцах приведены изменения амплитуды популяционных ответов, вызванных введением сыворотки крови больного РС соответственно до и после лечения, в процентах к амплитуде популяционного ответа до введения сы-

воротки. Показания, меньшие 100%, сигнализируют о стадии обострения болезни, причем уменьшение этого показателя означает глубину подавления электрической активности среза и усиление степени тяжести заболевания. Показания, большие 100%, указывают на стадию ремиссии [3]. При отсутствии заболевания РС эти показания были бы равны 100%. Чем ближе показания, указанные в третьем столбце, как и во втором, к 100%, тем лучшим считалось состояние больного, что соответствовало результатам неврологических исследований в настоящей работе при сравнении двух методов диагностики. В четвертом столбце даны отношения между показаниями третьего столбца к показаниям, приведенным во втором столбце, что соответствует глубине и качеству изменения состояния больного. Особенно существенными были качественные из-

Т а б л и ц а

**Показатели электрофизиологического тестирования состояния больного**

№ больного	До лечения	После лечения	Отношение показателей	Результат лечения
1.	171%	1116%	1,47	+
2.	53%	73%	21,38	+
3.	18%	36%	2,00	+
4.	200%	129%	1,57	+
5.	83%	142%	1,71	+
6.	111%	52%	2,13	-
7.	22%	129%	5,86	+
8.	133%	124%	1,07	+
9.	158%	139%	1,14	+
10.	35%	70%	2,00	+
11.	88%	105%	1,19	+
12.	122%	122%	1,00	Не опр.

менения состояния в результате лечения от обострения к ремиссии, и наоборот. Однако, если такого качественного перехода не было, улучшением состояния мы считали случаи, когда величина показателя в результате лечения приближалась к 100%, т.е. к показателю отсутствия заболевания РС. В пятом столбце указаны результаты лечения: знаком плюс (+) отмечено улучшение состояния больного, а знаком минус (-) маркировано ухудшение состояния.

Выявлена идентичность между результатами неврологической и электрофизиологической диагностик в процессе лечения, что и являлось главной целью предлагаемой работы. Надо отметить также, что данное исследование еще раз подтвердило успешность внутривенной низкоинтенсивной лазерной терапии.

Статистический анализ данных, приведенных в Таблице, был выполнен по критерию знака [7]. В соответствии с правилами анализа по этому критерию, результаты, полученные от больного 12, были исключены из анализа, как не отметившие никакого сдвига анализируемого показателя. Из 11 обследованных больных у 10 было отмечено улучшение состояния в результате лечения. Лишь у одного больного (6) тестирование показало ухудшение состояния. Это означает высокую статистическую значимость по критерию знака (вероятность ошибки менее 1%) [7] преимущественной позитивности результатов предпринятого лечения.

### Заключение

Таким образом, нами было показано, что новая электрофизиологическая диагностика адекватно отражает стадию заболевания и функциональное состояние больного РС. Важными достоинствами ее являются объективная количественная

оценка состояния больного и возможность его оценки в процессе его лечения. Эти свойства описываемой методики открывают возможность первичной диагностики РС в больницах, где нет высококвалифицированных неврологов. Яркая выраженность изменений популяционного ответа в результате введения сыворотки позволяет надеяться на возможность быстрой оценки перспективности того или иного начатого курса лечения индивидуально для данного больного уже в начальной стадии лечения и оценки целесообразности его продолжения или смены формы лечения.

**Работа поддержана грантом РГНФ № 06-06-00179а.**

### Литература

1. Гусев Е.И., Демина Т.Л., Бойко А.Н. Рассеянный Склероз. — М., 1997.
2. Гусев Е.И., Чехонин В.П., Демина Т.Д., Беляева И.А., Буглак А.В., Бойко А.Н., Смирнова Н.Ф., Гурина О.И. Проницаемость гематоэнцефалического барьера и синтез противовоспалительных цитокинов клетками периферической крови больных рассеянным склерозом. // В кн. *Нейроиммунология. Нейроинфекции. Демиелинизация.* СПб., с.37-39, 1997.
3. Жадин М.Н., Захарова Н.М., Андреев А.А., Балакин В.Е., Пархоменко Р.И., Слабоспитская Е.В. Исследование влияния сыворотки крови больных рассеянным склерозом на электрическую активность переживающих срезов неокортекса морской свинки. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 7, с.52-55, 2000.
4. Илларионов В.Е. Основы лазерной терапии. — М. 1992.
5. Козлов В.И., Буллин В.А. Лазеротерапия. — М. 1992
6. Марушак И.И., Карнеев А.Н., Демина Т.Л., Соловьева Э.Ю. Комплексное лечение

больных рассеянным склерозом с применением внутривенной лазерной терапии. // В кн. *Новые Технологии в Неврологии и Нейрохирургии на Рубеже Тысячелетий. Мат Росс. Конгресса. Ступино; 128-129, 1999.*

7. *Урбах В.Ю.* Математическая статистика для биологов и медиков. — М.: Изд АН СССР; 1963.
8. *Van Noort J.M.* Multiple sclerosis: an altered immune response or an altered stress response? // *Mol Med*; 74: 285-96, 1996.

## CHANGE OF ELECTRICAL ACTIVITY OF NEOCORTICAL SURVIVING SLICES OF GUINEA-PIG AS A PROGNOSTICAL INDEX OF LASER THERAPY EFFICACY IN THE PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

**M.N. Zhadin<sup>1</sup>, N.M. Zakharova<sup>1</sup>, A.N. Karneev<sup>2</sup>, I.I. Marushak<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Cell Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow Region;*

<sup>2</sup> *Russian Medical State University, Moscow*

**Key words:** multiple sclerosis, diagnostics, surviving slice, neocortex, intravenous laser therapy.

The results of clinical trial of new elaborated by us diagnostics of multiple sclerosis on the basis of analysis of the influence of blood serum on electrical activity of neocortical surviving slices on the background of treatment with low intensive intravenous laser therapy. For comparison, the same patient was subjected to traditional neurological diagnostics on Kurtzke scale (EDSS). Both the diagnostic methods gave similar results showing that the new electrophysiological diagnostics adequately reflects the disease phase and functional state of a multiple sclerosis patient. The present investigation supported successfulness of the low intensive intravenous laser therapy again.



## Исследование пролонгированного действия короткоживущих анксиогенных олигопептидов на крысах

И.П. Ашмарин, Р.А. Данилова, О.И. Рудько

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва*

Анксиогенные олигопептиды (АО) характеризуются коротким периодом полураспада *in vivo* – менее 15 минут, что ведет к расщеплению более чем 99,99% АО уже к 10-15 часу после парентерального введения. Поэтому особенного внимания заслуживают факты пролонгированных до 1-14 суток эффектов таких АО, как холецистокинин-4 и -3, и 5НТ-модулин. Обсуждаются возможные механизмы этого явления: депонирование части АО, последовательная индукция (супрессия) выхода других регуляторных соединений, длительная сенситизация рецепции АО.

**Ключевые слова:** депрессия, анксиогенные пептиды, короткоживущие пептиды, длительное действие

В 1970-е годы развитие исследований пептидергической регуляции породило надежды на быстрое создание наиболее физиологичных лекарственных средств на основе регуляторных пептидов (РП). Главным препятствием на этом пути явилась неустойчивость большинства РП *in vivo*, особенно при введении *извне*. Сроки их полураспада редко превышают 15 минут. К 15-20 часам после парентерального введения пептид полностью распадается. Естественно, внимание исследователей было направлено на эффекты РП, проявляющиеся в течение первых часов после введения. Более позднее, часто менее выраженные эффекты ускользали нередко от основательного изучения. Между тем, постепенно накапливалось всё больше данных об эффектах, проявляющихся на 1-14 сутки и даже далее. При этом следует отметить два типа долговременных эффектов (ДЭ) лабильных РП. Первый тип характеризуется такими эффектами, которые существенно отличаются от начальных. К этому типу ДЭ относятся, в частности, эффекты ряда олигопептидных рилизинг-гормонов гипоталамуса. Они индуцируют выход долгоживущих гормонов и, таким об-

разом, механизм этого типа ДЭ имеет очевидное объяснение. Значительно труднее истолковать механизм второго типа ДЭ, когда возникает эффект идентичный начальному после полного расщепления введенного РП, – на 1-14-е сутки. Мы также столкнулись с рядом таких явлений [4]. Задача настоящей статьи состоит в обобщении данных о пролонгированных эффектах анксиогенных олигопептидов холецистокинина-4 и -3 и 5-НТ-модулина, а также в обсуждении основных гипотез о механизмах долговременных эффектов РП.

### Материалы и методы

Работа выполнена на 120 неинбредных крысах (самцах) Wistar из питомника Андреевка. Вес животных составлял 150-250 г, возраст – 8-10 недель. Во время проведения экспериментов животные находились в виварии с контролируемыми SPF-условиями: температура окружающего воздуха  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , относительная влажность  $50 \pm 5\%$ , автоматическая смена светового периода «день» с 8:00 по 20:00, «ночь» с 20:00 по 8:00. Крысы со-

держались в пластмассовых клетках (60x35x20), оборудованных стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением и разделителями, с древесными опилками в качестве подстилочного материала, по 7-8 крыс в клетке. Экструдированный и сбалансированный комбикорм ПК-120-1 для лабораторных крыс и мышей (ООО «ЛАБОРАТОРНАБ» ГОСТ Р 50258-92) дается *ad libitum*. Вода — в стандартных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками. Для исследований использованы три пептида: 1) фирменный препарат ССК-4 (**Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>** (ICN Biomedical Inc.) и 2) синтезированные НИИМГ РАН препараты ССК-3 (**Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>**) и 3) эндогенный тетрапептид 5-гидрокситриптамин-модулин (Leu-Ser-Ala-Leu) 5-HT-модулин. Указанные препараты вводили интраперитонеально в дозах от 40 мкг до 400 мкг на кг веса крысы (объем 0,2 мл). Контрольным группам вводили физиологический раствор в том же объеме. Тестирование отставленных эффектов проводили в интервале от 1 до 20 суток после введения пептидов. Для выявления компонентов тревожности и страха в поведении крыс был использован крестообразный лабиринт и “dark-light” тест. Склонность крыс к развитию депрессивно-подобного состояния оценивали по методике Порсолта в тесте неизбежного плавания. Для статистической обработки данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона-Манна-Уитни.

### Результаты исследований

Ранее нами показано, что однократное парентеральное введение ССК-4 в дозах от 100 до 400 мкг/кг за 40-60 минут до тестирования оказывает анксиогенный эффект, выражающийся в изменении показателей поведения в крестообразном приподнятом лабиринте, указывающих на наличие компонентов тревожности и страха, и об угнетении двигательной и ориентировочно-исследова-

тельской активности при наличии стрессорного звукового раздражителя. Кроме того, показано наличие депрессивных компонентов в поведении крыс — статистически значимое дозозависимое увеличение времени иммобилизации и снижение времени активного плавания в тесте неизбежного плавания Порсолта. Исследования с ССК-3 также указывают на выраженный анксиогенный эффект через 40-60 минут после парентерального введения во всех используемых тестах, аналогичный эффекту ССК-4, и даже в значительно меньших дозах — 40 мкг/кг.

Однако в дальнейших исследованиях [4, 2] было отмечено, что анксиогенные эффекты после однократного введения пептидов сохраняются на более длительное время (см. табл. 1 и табл. 2). Так, через 1 сутки после введения как ССК-4 (400 мкг/кг), так и ССК-3 (40 мкг/кг) по основным показателям в крестообразном лабиринте (число выходов на открытые лучи, время пребывания на них и поведение риска) отмечены изменения, свидетельствующие о повышенном уровне тревожности. На 5-е сутки после однократного введения ССК-4 анксиогенный эффект не только не уменьшился, но и стал более выраженным, как при первичном тестировании через 5 суток после введения пептида, так и в том случае, когда крысы через 5 суток тестировались повторно (первичное тестирование через 40-60 мин после введения). Данные тестирования в светло-темной камере также согласуются с крестообразным лабиринтом и указывают на проявления тревожности — уменьшается латентный период первого ухода из светлого отсека и статистически значимо снижается общее время пребывания в светлом отсеке. Тестирование через 10-12 суток после введения как ССК-4, так и ССК-3 показало, что, как в крестообразном лабиринте, так и в темно-светлой камере изменения в поведении, указывающие на проявление тревожности сохранились, но стали менее выраженными.

Таблица 1  
**Поведенческие эффекты однократного введения ССК-4 (400 мкг/кг)**

Тест		Время тестирования после введения (в % к контролю)		
		1 сутки	5 суток	10-12 суток
Крестообразный лабиринт	Число выходов в открытые лучи	69,9	29,2 p< 0,05	66,7
	Время пребывания в открытых лучах	77	2,9 p< 0,05	4,57 p< 0,05
	Соотношение числа выходов в открытые лучи к общему числу переходов	55,9	27 p< 0,05	72,8
	Поведение риска	9,8 p< 0.05	11,8 p< 0,05	33,3
Тест Порсолта	Время иммобилизации	112,9	103,9	
	Время активного плавания	73,5 p< 0.05	61,5 p< 0,05	
	Время пассивного плавания	110 p<0.05	120 p< 0,05	

Таблица 2  
**Эффекты однократного введения ССК-3 (40 мкг/кг)**

Тест		Время тестирования после введения (в % к контролю)		
		1 сутки	5 суток	10-12 суток
Крестообразный лабиринт	Число выходов в открытые лучи	74,8	45 p< 0,05	78,6
	Время пребывания в открытых лучах	78	2,7 p< 0,01	26,4 p< 0,05
	Соотношение числа выходов в открытые лучи к общему числу переходов	50,1	59,4 p<0,05	45,2 p< 0,05
	Поведение риска		0 p< 0,05	116,7
Тест Порсолта	Время иммобилизации	140,7 p< 0,05	138,4 p< 0,05	
	Время активного плавания	75,6 p< 0,05	80,6 p< 0,05	
	Время пассивного плавания	100	99,2	

Наряду с повышением тревожности отмечено и наличие депрессивных компонентов в поведении крыс после однократного введения пептидов – увеличение времени иммобилизации и снижение времени активного плавания в тесте Порсолта. Исследования с отставленными сроками тестирования показали, что через 1 сутки, также как и через 40-60 минут после введения пептидов, отмечено снижение времени активного плавания и увеличение времени иммобилизации. Через 5 суток эти изменения не только сохранились, но и стали более выраженными – в группе с ССК-3 достоверно уменьшение времени активного плавания и увеличение времени иммобилизации, а в группе с ССК-4 достоверно уменьшение времени активного плавания и увеличение времени пассивного плавания.

Отставленные эффекты однократного введения пептидов отмечены нами и на биохимическом уровне [4, 2]. Так, через 5 дней после однократного введения ССК-4 наблюдаемые изменения в уровне DA, его метаболитов и отношения их к DA (статистически значимое снижение) имели ту же направленность, что и через 40-60 минут после введения и были гораздо более выраженными. Уровень 5-НТ и его метаболита – НИАА при этом статистически значимо снижались.

Через 5 суток после введения ССК-3 отмечалось снижение уровня дофамина (74% от контроля, статистически не значимо) и статистически значимое снижение НВА и повышение соотношения DOPAK/DA, а также уменьшение соотношения НИАА/5-НТ.

Таким образом, однократное введение пептидов ССК-4 и ССК-3 вызывает пролонгированный эффект как на поведенческом, так и на биохимическом уровне.

Начатые нами исследования с пептидом, специфически взаимодействующим

с рецепторами IV-подтипа серотонина – 5НТ-модулином, также свидетельствуют о пролонгированных эффектах однократного введения 5НТ-модулина в дозе 400 мкг/кг веса. Анксиогенные эффекты при введении 400мкг/кг 5НТ-модулина наблюдались через 1 сутки, как при повторном, так и первичном тестировании крыс в крестообразном лабиринте – снижение числа выходов и времени пребывания на открытых лучах и снижение показателей «поведения риска». Признаки тревожного поведения через 1 сутки после введения отмечены и в «dark-light» тесте – снижение числа выходов в светлый отсек ( $p < 0,001$ ) и времени пребывания на свету ( $p < 0,05$ ).

Результаты теста неизбежного плавания указывают на выраженные компоненты депрессивно-подобного поведения у опытных крыс по сравнению с контрольными через 1 сутки после введения 5НТ-модулина – увеличение времени иммобилизации (192% к контролю,  $p < 0/01$ ). Через 2 суток после введения время иммобилизации остается в 1,5 раза больше по сравнению с контролем.

## Обсуждение результатов

Представленные данные свидетельствуют о способности анксиогенных олигопептидов ССК-4,-3 и 5-НТ-модулина индуцировать пролонгированные эффекты, идентичные по характеру ранним эффектам этих пептидов в течение 1-14 суток. Периоды полураспада ССК-4, -3 не превышают 13 минут и, следовательно, уже к 10-15 часу после парентерального введения можно полагать их отсутствие в организме [7, 10]. Очевидна трудность объяснения поздних эффектов. Ниже представлены три основных гипотезы, которые могут быть предложены для истолкования этого явления.

### **1. Резервирование, депонирование РП**

Исследования динамики распада олигопептидов после парентерального введения свидетельствуют о существовании нескольких фаз процесса. После быстрого распада большей части олигопептида (обычно свыше 99,99 %) следует фаза относительно медленного расщепления оставшейся части. Это связывают с наличием в плазме крови и тканях белков, способных нековалентно взаимодействовать с пептидом и защищать его от протеаз. Таковы давно выявленные нейрофизины – переносчики вазопрессина и окситоцина, а также целый ряд позже найденных белков, с большим или меньшим сродством связывающих энкефалины, эндорфины, кортиколиберин и др. [14, 11, 8, 5 и др.]. Однако, если пытаться объяснить таким образом поздние эффекты, идентичные начальным, то очевидно противоречие между долей оставшегося РП (менее 0,01%) и четкой выраженностью, достоверностью поздних эффектов.

### **2. Индукция или подавление выхода долгоживущих регуляторных соединений**

Известен ряд лабильных олигопептидных РП, способных индуцировать или подавлять выход долгоживущих регуляторов. Таковы многочисленные рилизинг-факторы гипоталамуса, которые вызывают непосредственно быстрые физиологические эффекты и одновременно регулируют выход значительно более устойчивых гормонов. Всесторонне изучены быстрые воздействия тиролиберина на эмоциональный статус, двигательную активность, кровообращение мозга и дыхание при одновременной индукции выхода тиротропина, который, в свою очередь, стимулирует выход гормонов щитовидной железы [1, 12]. Гонадолиберин оказывает быстрое стимулирующее действие на половое поведение, индуцируя при этом выход лютеинизирующего и фолликулстимулирующего гормонов, обеспечивающих овуляцию и сперматогенез [6, 9].

Процессы такого типа характеризуются существенными отличиями быстрых начальных и последующих длительных эффектов. Для лабильных РП – таких, как холецистокинины-3 и -4 и 5НТ-модулин, такой механизм ДЭ, идентичных начальным, представляется маловероятным. Поздние и начальные эффекты этих пептидов, представленные выше, весьма сходны. Опубликованы исследования, в которых показано возрастание в плазме крови концентраций адренкортикотропина, кортизола и С-белка после введения ССК-4 [16, 13]. Однако период, в течение которого это наблюдается, не превышает 1-2 часа. Кроме того, эти соединения в физиологических концентрациях не обладают анксиогенным действием, которое можно было бы сопоставить по интенсивности и ряду особенностей с ХЦК-4. Это не позволяет распространить вторую гипотезу на возможные механизмы пролонгированного действия ССК-4 и -3, хотя, в принципе, нельзя исключить индукцию каких-либо других долгоживущих регуляторных соединений и, наконец, «запуск» последовательной многоступенчатой индукции многих различных регуляторов [3].

### **3. Длительное изменение возбудимости рецепторов после начального введения РП**

Привлекательна гипотеза, предполагающая длительное изменение чувствительности рецепторов после кратковременного воздействия АО. Для восприятия этой гипотезы необходимо иметь в виду, что при тестировании тревожности или депрессивности экспериментальных животных в приподнятом крестообразном лабиринте или при неизбегаемом плавании происходит выброс эндогенных АО – ССК-4, ССК-3 и 5-НТ-модулина. Они действуют на рецепторы обычного уровня чувствительности. Если же до тестирования животное уже подвергалось воздействию вводимых извне этих же пептидов, то возможно повышение чувствительности, гиперсенситизация рецепто-

ров. Этот процесс сходен с реакциями проторения синапса, формирования кратковременной или оперативной памяти, длительность которой может измеряться сутками. Они рассмотрены в большом числе исследований последних трех десятилетий и включают, например, такие реакции, как аутофосфорилирование протеинкиназ, демаскирование резервных рецепторов [15] и т.п. В результате при тестировании на 1-14 сутки секретлируемый эндогенный АО воздействует на гиперсенситизированные рецепторы, что и объясняет явление пролонгированного эффекта АО. На рис. представлена схема, иллюстрирующая гипотезу. Разумеется, необходимо экспериментальное ее подтверждение с помощью анализа изменений в системе рецепции.

### Вывод

Таким образом, представленные выше экспериментальные данные о пролонгированных эффектах анксиогенных пеп-

тидов холецистокинина-4, холецистокинина-3 и серотонин-модулина в наибольшей мере согласуются с гипотезой о длительной гипосенситизации рецепторной системы при воздействии введенного извне пептида. В результате реакция на выброс тех же пептидов, происходящий при последующем тестировании (в кросс-лабиринте, при неизбежном плавании) на поздних сроках, оказывается значительно усиленной. Рецепторная система как бы запоминает мощное первичное воздействие на период до 14 суток, который существенно больше срока существования инъекционного пептида. Следует еще раз отметить, что это явление сходно с проторением синапса при формировании долговременной нейрологической памяти. Доказательством этой гипотезы может быть лишь биохимический анализ изменений рецепторной системы после однократного введения анксиогенных пептидов.

**Исследования поддержаны грантом РФФИ № 05-04-48736а**

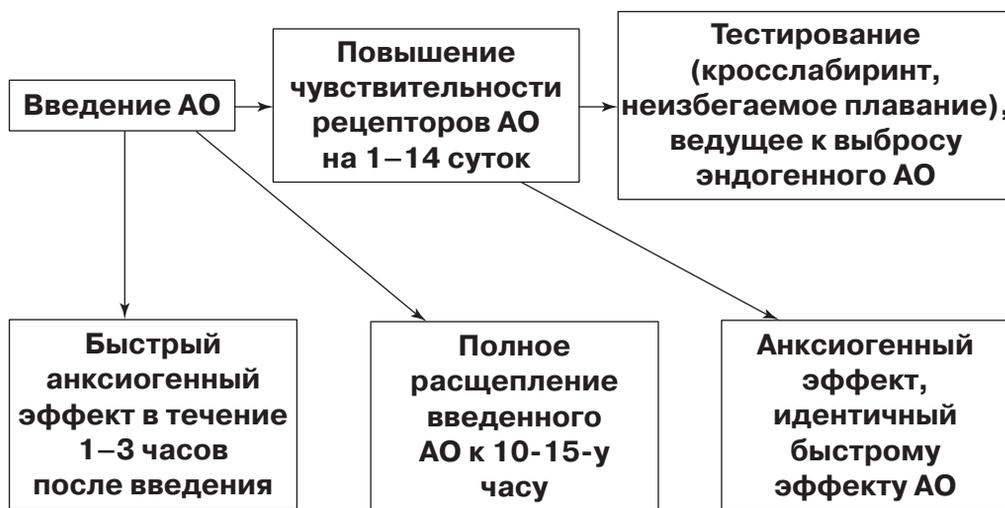


Рис. Схема, иллюстрирующая процессы, возникающие после введения короткоживущих анксиогенных олигопептидов (АО)

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Гурская И.Е., Гусева А.А. и др. Тиролиберин (ТРГ) – новые физиологические эффекты и перспективы клинического применения. // *Вестник РАМН*, в. 6, с. 40-44, 1992.
2. Ашмарин И.П., Данилова Р.А., Рудько О.И. и др. Долговременное действие пептидных регуляторов: отложенные и инверсные эффекты холецистокинина-4 и -3. // *Медицинский академический журнал*, т. 4, № 1, с. 4-13, 2004.
3. Ашмарин И.П., Обухова М.Ф. Регуляторные пептиды, функционально-непрерывная совокупность. // *Биохимия*, № 3, с. 263-271, 1986.
4. Ashmarin I.P., Rud'ko O.I., Danilova R.A., Andreeva L.A. Postponed effect of cholecystokinin fragments 30-33 (CCK-4) and 31-33 (CCK-3) on albino rats behavior. // *Neurosci. Res. Comm.*, v. 34, № 3, p. 165-173, 2004.
5. Behan D.P., Linton E.A., Lowry P.J. Isolation of the human plasma corticotrophin-releasing factor-binding protein. // *J. Endocrinol.*, v. 122, No. 1, p. 23-31, 1989.
6. Conn P.M., Crowley W.F. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. // *Annu. Rev. Med.*, v. 45, p.391-405, 1994.
7. Deschodt-Lanckman M., Bui N.D., Noyer M., Christophe J. Degradation of cholecystokinin-like peptides by a crude rat brain synaptosomal fraction: a study by high pressure liquid chromatography. // *Regul. Pept.*, v. 2, No. 1, p. 15-30, 1981.
8. Heldebrand A., Preissner K.T., Muller-Berghaus G., Teschemacher H. A novel -endorphin binding protein (= vitronectin) exhibits specific non-opioid binding sites for -endorphin upon interaction with heparin or surfaces. // *J. Biol. Chem.*, v.264, No. 26, p. 15429-15434, 1989.
9. Kadar T., Telegdy G., Schally A.V. Behavioral effects of centrally administration LH-RH agonist in cats. // *Physiol. Behav.*, v. 51, No. 3, p. 601-605, 1992.
10. Koulischer D., Moroder L., Deschodt-Lanckman M. Degradation of cholecystokinin octapeptide, related fragments and analogs by human and rat plasma in vitro. // *Regul. Pept.*, v.4, No. 3, p. 127-139, 1982.
11. Nakajima S., Komuro T., Shimamura M., Hazato T. Enkephalin-binding protein in human blood. // *Biochem. Int.*, v. 19, No. 3, p. 529-536, 1989.
12. O'Leary R., O'Connor B. Thyrotropin-releasing hormone. // *J. Neurochem.*, v. 65, No. 3, p. 953-963, 1995.
13. Radu D., Ahlin A., Svanborg P., Lindfors N. Anxiogenic effects of the CCK (B) agonist pentagastrin in humans and dose-dependent increase in plasma C-peptide levels. // *Psychopharmacol.*, v. 161, No. 4, p. 396-403, 2002.
14. Roscetti G., Venturelli F., Roda L.G. Enkephalin binding systems in human plasma III: comparative protection of different peptides. // *Neurochem. Res.*, v. 13, No. 3, p. 221-224, 1988.
15. Siegel G.J., Albers R.W., Brady S., Price D.L. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. – USA, Academic Press, 1016 p. 2005.
16. Strohle A., Holsboer F., Rupprecht R. Increased ACTH concentrations associated with cholecystokinin tetrapeptide-induced. Panic attacks in patients with panic disorder. // *Neuropsychopharmacology*, v. 22, No. 3, p.251-256, 2000.

## **PROLONGED ACTION OF SHORT-LIVED ANXIogenic OLYGOPEPTIDES**

**I.P.Ashmarin, R.A.Danilova, O.I.Rud'ko**

*Moscow State University, Moscow*

**Key words:** depression, anxiogenic peptides, prolonged action, short-lived peptides.

Anxiogenic oligopeptides (AO) have in vivo a very short lifetime, less than 15 min. It leads to the degradation of more than 99,99% of parenterally administrated AO during 10-15 hours. Therefore, it is important to pay attention to data of prolonged (till 1-14-th day) effects of cholecystinin-4, -3 and 5-HT-moduline. Some possible mechanisms of such effects are under consideration: partial reservation of AO, induction of other regulatory compounds, releasing and long lasting sensitization of receptors.

## Сравнительное изучение фармакокинетики бемитила и его влияния на циркуляторно-метаболическое обеспечение нейронного модуля соматосенсорной коры мозга

Ю.С. Макляков, В.В. Хоронько, А.А. Степанов, С.А. Сергеева, И.М. Мякота

*Ростовский государственный медицинский университет Росздрава,*

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Изучали фармакокинетику бемитила и его влияние на локальный мозговой кровоток, парциальное напряжение кислорода и импульсную активность нейронов в соматосенсорной коре головного мозга у крыс. Для изучения особенностей фармакокинетики использовался метод газовой хроматографии. Для исследования циркуляторно-метаболического обеспечения нейронного модуля синхронно регистрировали локальный мозговой кровоток, парциальное напряжение кислорода и импульсную активность нейронов в области проекции вибриссы С<sub>3</sub> соматосенсорной коры головного мозга крыс. Установлено, что бемитил обеспечивает насыщение тканей мозга более высокими концентрациями препарата, чем их величины в плазме крови; однократное введение бемитила вызывает достоверное увеличение локального мозгового кровотока, парциального напряжения кислорода в зоне проекции вибриссы С<sub>3</sub> соматосенсорной коры головного мозга. Одновременно с оценкой активности микроциркуляторного модуля коры головного мозга крыс анализ биоэлектрической активности нервных клеток показал увеличение частоты генерации спайков нервными клетками. Установлена высокая корреляция между уровнем бемитила в мозге и величинами локального мозгового кровотока, парциального напряжения кислорода и импульсной активности нейронов в соматосенсорной коре головного мозга крыс.

**Ключевые слова:** актопротектор, бемитил, ФК-распределение препарата.

Бемитил производное меркаптобензи-мидазола относится к классу лекарственных средств актопротекторов, способных повышать физическую и умственную работоспособность и не истощать его энергетические ресурсы [2]. В отличие от психостимуляторов бемитил модулирует процессы возбуждения и торможения в центральной нервной системе и, таким образом, оказывает психогармонизирующее действие. Что обусловлено его антигипоксическим действием [2], способностью истощения катехоламинов в органах при выполнении усиленных физических нагрузок [2, 4], психостимулирующим действием [4]. Это первый отечественный актопротектор метаболического действия, в

основе которого лежит активирующее влияние на процессы окисления и энергообразования, что обуславливает его противогипоксический эффект [1, 6].

Бемитил обладает очень низкой токсичностью, его широко применяют в клинической практике при лечении неврозов, астенических состояний и других патологических состояний, характеризующихся развитием гипоксии нервной ткани [5].

Целью настоящей работы явилось изучение экспериментальной фармакокинетики бемитила. Наряду с этим изучалось его влияние на локальный мозговой кровоток, парциальное напряжение кислорода и импульсную активность нейронов в соматосенсорной коре голов-

ного мозга у крыс. Необходимость в проведении подобного исследования связана с тем, что в научной литературе отсутствуют сведения о характере влияния бемитила на циркуляторно-метаболическое обеспечение нейронных модулей, широко представленных в структурно-функциональной организации коры головного мозга [7].

### Материалы и методы

Исследования проводились на половозрелых конвенциональных нелинейных крысах Wistar из питомника Андреевка. Животные содержались в условиях вивария при температуре 20°C и влажности 40 – 60% и находились на стандартной диете (гранулированный корм на основе овса, ржи и пшеницы, производитель ООО «Кубанькорм»). На момент проведения исследований животные были здоровыми, изменений поведения, аппетита, режима сна и бодрствования обнаружено не было. За двенадцать часов до проведения экспериментов животных лишали доступа к пище без ограничения потребления воды.

Фармакокинетические исследования были выполнены на 70 крысах – самцах массой 200 – 250г, возраста 6 – 9 месяцев [8]. Для изучения особенностей фармакокинетики бемитил вводили перорально (зондом) в виде раствора полиэтиленгликоля – 400 в дозе 100 мг/кг. При изучении распределения при однократном пероральном введении концентрацию бемитила определяли в плазме крови и мозге крыс через 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после однократного введения. Животным контрольной группы вводился раствор полиэтиленгликоля – 400 в аналогичном объеме. Для проведения фармакокинетических исследований ткань мозга измельчалась и гомогенизировав-

лась до превращения в 20% водный гомогенат. Для количественного определения соединения использовался метод газовой хроматографии.

Для исследования циркуляторно-метаболического обеспечения нейронного модуля использовали комплексный методический подход: синхронно регистрировали локальный мозговой кровоток, парциальное напряжение кислорода и импульсную активность нейронов в области проекции вибриссы С<sub>3</sub> соматосенсорной коры головного мозга крыс, где четко выражена модульная организация нейронов [7]. Эксперименты по данному разделу работы были выполнены на 60 крысах массой 170-200г. Локальный мозговой кровоток регистрировали методом водородного клиренса с электрохимической генерацией водорода в ткани мозга, парциальное напряжение кислорода в нервной ткани регистрировали полярографическим способом по В.А. Березовскому, а биоэлектрическую активность модуля коры головного мозга характеризовали по показателям импульсной активности нейронов. Регистрацию этих параметров осуществляли в течение 1 минуты. Затем приступали к изучению реакций микрососудов, динамики парциального напряжения кислорода, вызванной импульсной активности нейронов в проекционной зоне соматосенсорной коры головного мозга крыс при сенсорной стимуляции вибриссы С<sub>3</sub>. В качестве теста, оценки изменений функциональной активности нервных клеток модуля коры головного мозга, использовали стимуляцию вибриссы С<sub>3</sub> с частотой 1 Гц, длительностью каждого стимула 10 мс в течение 20 с. Бемитил в дозе 250 мг/кг, разведённый в растворе полиэтиленгликоля-400, вводился перорально. Регистрацию параметров проводили через 1, 1,5, 2, 2,5 часа после введения препарата. Контрольной группе крыс по аналогичной схеме вводили раствор полиэтиленгликоля – 400.

## Результаты

Полученные экспериментальные данные анализировались с помощью фармакокинетических моделей, представленных в работе Каркищенко Н.Н. и др. [3].

Оценка фармакокинетики препаратов проводилась на основе моделирования с помощью 2-камерной модели с учетом всасывания из места введения, что позволило установить не только оптимальные дозы и интервалы, но и выявить степень накопления препаратов в плазме крови мозга.

В результате фармакокинетического моделирования были получены следующие количественные величины (табл. 1), характеризующие каждую из фаз распределения препарата и его элиминации. Установлено, что альфа-фаза распределения определяется уровнем препарата в ткани ( $A_1$ ), равным 5852,8 нг/г, гибридной скоростью распределения препарата из плазмы крови мозга  $\alpha = 0,6699$  час<sup>-1</sup>. Соответствующий период полураспределения  $t_{1/2\alpha} = 1,03$  час. Следует отметить, что параметры, описывающие перенос препарата из плазмы крови в мозг характеризуют альфа-фазу распределения, так как данный

препарат находится в хорошем физико-химическом равновесии с плазмой крови. Время достижения максимальной концентрации ( $t_m$ ) в исследуемой ткани составило 1 час, а ее величина – 2700,1 нг/г.

Бета-фаза определяется уровнем препарата в ткани ( $A_2$ ) равным 888,54 нг/г, и скоростью удаления бемитила из организма  $\beta = 0,1$  час<sup>-1</sup>. Соответствующий период полувыведения  $t_{1/2\beta} = 6,93$  час. Фаза всасывания также зависит от скорости всасывания бемитила из желудочно-кишечного тракта в плазму крови  $k_a = 1,81$  час<sup>-1</sup>. Соответствующий период полувсасывания  $t_{1/2k_a} = 0,3821$  час. В то же время следует отметить, что относительная биодоступность бемитила из крови в мозг при пероральном приеме составляет  $F = 1,61$  или 160,67 %. Относительная биодоступность – это отношение средней концентрации в мозге к средней концентрации в плазме крови, которая рассчитывается как отношение соответственно AUC в мозге к AUC в плазме крови. При этом соответствующая площадь под кривой ( $AUC_1$ ) в исследуемой ткани составляет 13908,5 нг\*час/г. Среднее время удержания ( $MRT_1$ ) в исследуемой ткани составило 7,18 час.

Таблица 1

### Фармакокинетические параметры бемитила в мозге после перорального введения крысам

Показатель	Значение	Ед. изм.	Показатель	Значение	Ед. изм.
Доза	100	мг/кг	$t_{1/2k_a}$	0,3821	час
$A_1$	5852,8	нг/г	<b>C</b>	4530,6	нг/мл
$A_2$	888,54	нг/г	$k_e$	0,32574	1/час
$\alpha$	0,6699	1/час	$k_{21}$	0,20558	1/час
$\beta$	0,1	1/час	$k_{12}$	0,23851	1/час
$k_a$	1,8136	1/час	$A_3 = -(A_1 + A_2)$	-6741,3	нг/г
$t_{1/2\alpha}$	1,0345	час	<b>AUC<sub>1</sub></b>	13908,5	нг*час/мл
$t_{1/2\beta}$	6,9322	час	<b>MRT<sub>1</sub></b>	7,18304	час

Таким образом, в результате фармакокинетического моделирования установлено, что фармакокинетика бемитила в мозге после перорального введения имеет двухфазный характер, причем гибридная константа скорости распределения препарата в мозг ( $\alpha = 0,67$ ) час<sup>-1</sup> незначительно отличается от таковой в плазме крови (0,72 час<sup>-1</sup>). Однако следует отметить, что терминальная константа скорости элиминации  $\beta$  немного возросла с 6,02 в плазме крови до 6,93 часа в мозге. По нашему мнению, это связано с процессами замедления перераспределения препарата в мозг за счет наличия гистогематического барьера при переходе из плазмы крови в ткани мозга. Константа скорости переноса бемитила из центральной камеры модели  $k_{12} = 0,241$  час<sup>-1</sup>. Константа скорости переноса в обратном направлении несколько ниже ( $k_{21} = 0,206$  час<sup>-1</sup>), что, по видимому, и увеличивает период полувыведения препарата из мозга. В то же время следует отметить, что относительная биодоступность бемитила из крови в мозг при пероральном приеме составляет более

160%. На первый взгляд, это кажется парадоксальным, однако здесь следует учесть более высокое сродство препарата к тканям мозга, в связи с чем и получается более высокая концентрация препарата в тканях мозга, чем в плазме крови.

Среднее время удержания препарата, характеризующее среднюю длительность пребывания в мозге  $MRT_1 = 7,18$  часа, несколько больше, чем в плазме крови (6,49 часа).

Все сказанное позволяет утверждать, что процессы перераспределения бемитила из плазмы крови в мозг после перорального приема достаточно активны и обеспечивают насыщение тканей мозга более высокими концентрациями препарата, чем их величины в плазме крови.

Результаты исследования характера циркуляторно-метаболического обеспечения нейронного модуля показали, что исходная клеточная активность в зоне проекции вибриссы  $C_3$  соматосенсорной коры головного мозга у крыс, увеличивается, что показано, в табл. 2. В результате установлено, что однократное введение бемитила вызывало достоверное увеличение локального мозгово-

Таблица 2

**Характеристики локального мозгового кровотока, кислородного обеспечения и фоновой импульсной активности нейронов в зоне проекции вибриссы  $C_3$  соматосенсорной коры головного мозга крыс в контрольной и экспериментальной (однократное введение бемитила) группах. ( $M \pm m$ )**

Время (час)	Локальный мозговой кровоток (мл/100г/мин)		Парциальное напряжение кислорода (мм рт. ст.)		Общая средняя частота фоновой импульсной активности (имп/с)	
	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент	Контроль	Эксперимент
1	24±0,4	61,1±0,4**	15,2±0,3	47,2±4,3*	4,02±0,7	5,4±0,8**
1,5	24,4±0,5	61,8±1,07**	15,4±0,4	47,9±4,3*	4,4±0,4	6,3±0,6**
2	24,6±0,7	62,2±0,4**	16±0,3	48±4,3*	4,9±0,6	6,1±1,1**
2,5	24,6±0,7	62,5±0,4**	16,4±0,2	47,9±4,9*	5,3±0,7	6,2±0,9**

Достоверность различий между экспериментом и контролем:  
\* –  $P < 0,005$ , \*\* –  $P < 0,001$

го кровотока, парциального напряжения кислорода в зоне проекции вибриссы С<sub>3</sub> соматосенсорной коры головного мозга. Одновременно с оценкой функционирования микроциркуляторного модуля коры головного мозга крыс проведенный анализ биоэлектрической активности нервных клеток характеризовался увеличением частоты генерации спайков нервными клетками.

Следующим этапом исследования с целью оценки адекватности перестройки

циркуляторного и метаболического обеспечения нейронного модуля при изменении функциональной активности нервных клеток в условиях однократного введения бемитила проведено изучение направленности и величины изменений локального мозгового кровотока, напряжения кислорода и импульсной активности нейронов у контрольных и опытных крыс при механостимуляции вибриссы С<sub>3</sub>. Результаты исследования приведены в таблицах 3, 4.

Таблица 3

**Характеристики функциональной гиперемии в зоне проекции вибриссы С<sub>3</sub> соматосенсорной коры головного мозга крыс при сенсорной стимуляции. (M±m)**

Время (час)	Латентный период функциональной гиперемии (с)		Амплитуда функциональной гиперемии (в % к исходному уровню кровотока)	
	контроль	эксперимент	контроль	эксперимент
1	6,2±1,2	3,5±0,7*	26,6±0,6	27,6±0,5**
1,5	6,1±1,1	3,2±0,6*	27,5±0,85	27,5±0,6**
2	6,4±1,4	3,4±0,5*	27,6±0,3	27,8±0,8**
2,5	6,2±1,2	3,3±0,6*	27,6±0,3	27,6±0,7**

Достоверность различий между экспериментом и контролем:  
\* – P < 0,005, \*\* – P < 0,05

Таблица 4

**Характеристики реакции повышения парциального напряжения кислорода в зоне проекции вибриссы С<sub>3</sub> соматосенсорной коры головного мозга крыс при сенсорной стимуляции в контрольной и экспериментальной (однократное введение бемитила) группах (M±m)**

Время (час)	Латентный период реакции повышения напряжения кислорода (с)		Амплитуда реакции повышения напряжения кислорода (в % к исходному уровню кровотока)	
	контроль	эксперимент	контроль	эксперимент
1	5,41,2	8,42,2*	10,50,5	3,80,1**
1,5	5,21,1	8,52,5*	10,30,2	4,90,6**
2	5,21,1	8,42,2*	12,51,1	5,10,9**
2,5	5,31,3	8,72,8*	13,41,9	4,80,7**

Достоверность различий между экспериментом и контролем:  
\* – P < 0,005, \*\* – P < 0,05

На основании анализа локального мозгового кровотока, парциального напряжения кислорода и импульсной активности нейронов модуля коры головного мозга после однократного введения бемитила можно сделать заключение о том, что при сенсорной стимуляции увеличение кровотока связано с возрастанием функциональной активности нервных клеток, а увеличение локального мозгового кровотока в проекционной зоне коры головного мозга при афферентном раздражении повлекло за собой повышение парциального напряжения кислорода в нервной ткани.

Таким образом, бемитил в условиях его однократного введения повышает интенсивность локального мозгового кровотока и способствует увеличению потребления кислорода нервной тканью.

Данные, полученные при фармакокинетическом исследовании процессов распределения и элиминации бемитила, позволили оценить динамику развития эффекта и изменения локального мозгового кровотока области проекции вибриссы  $C_3$  соматосенсорной коры головного мозга крыс в зависимости от времени. Однако наличие информации об изменениях содержания бемитила в мозге экспериментальных животных позволило провести и сопоставление концентраций этого препарата с фармакодинамической реакцией организма животных и получить корреляционные оценки и регрессионный анализ.

На рисунке 1 изображена зависимость локального мозгового кровотока в области проекции вибриссы  $C_3$  соматосенсорной коры головного мозга крыс от величины концентраций бемитила в мозге. Проведенный корреляционный анализ показал высокую степень связи между величинами локального мозгового кровотока после однократного и многократного введения бемитила и кон-

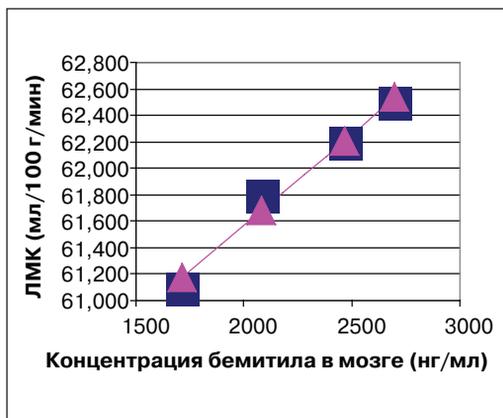


Рис. 1. Зависимость локального мозгового кровотока от величины концентраций бемитила в мозге.

центраций ( $R=-0,9951$ ), а линия регрессии, проведенная по экспериментальным данным, создает, возможность прогнозировать изменения локального мозгового кровотока в пределах изученного диапазона концентраций. Параметры регрессионного уравнения имели следующие значения:

$$a = 0,0014; b = 58,79$$

Таким образом, возникает возможность проведения расчетов с использованием следующей зависимости:

$$ЛМК = 0,0014 \times C + 58,79,$$

где  $C$  — это концентрация бемитила в мозге;

ЛМК — локальный мозговой кровоток области проекции вибриссы  $C_3$  соматосенсорной коры головного мозга крыс.

На рисунке 2 изображена зависимость парциального напряжения кислорода области проекции вибриссы  $C_3$  соматосенсорной коры головного мозга крыс от величины концентраций бемитила в мозге. Проведенный корреляци-

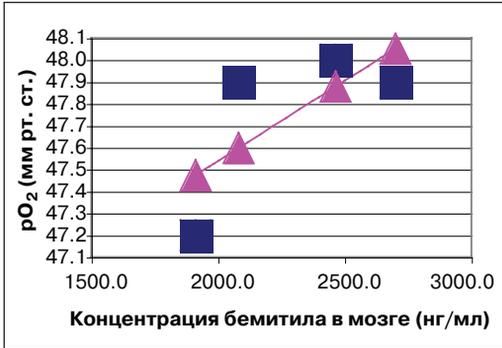


Рис. 2. Зависимость парциального напряжения кислорода от величины концентраций бемитила в мозге

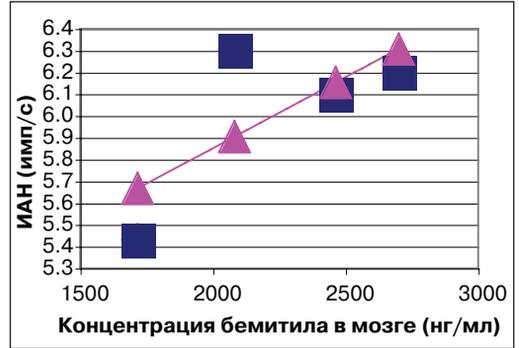


Рис. 3. Зависимость импульсной активности нейронов от величины концентраций бемитила в мозге.

онный анализ показал высокую степень связи между показателями парциального напряжения кислорода в соматосенсорной коре головного мозга и концентраций ( $R=0,990$ ), а линия регрессии, проведенная по экспериментальным данным, создает возможность прогнозировать изменения парциального напряжения кислорода в пределах изученного диапазона концентраций. Параметры регрессионного уравнения имели следующие значения:  $a=0,001$ ;  $b=49,098$

Таким образом, возникает возможность проведения расчетов парциального напряжения кислорода с использованием следующей зависимости:

$$pO_2 = -0,001 \times C + 49,098, \text{ где:}$$

$C$  — это концентрация бемитила в мозге,  $pO_2$  — парциальное напряжение кислорода области проекции вибриссы С3 соматосенсорной коры головного мозга крыс.

На рисунке 3 изображена зависимость импульсной активности нейронов от величины концентраций бемитила в мозге. Проведенный корреляционный анализ показал высокую степень связи между величинами импульсной актив-

ности нейронного модуля в области проекции вибриссы С3 соматосенсорной коры головного мозга крыс и концентраций ( $R=-0,995$ ), а линия регрессии, проведенная по экспериментальным данным, создает возможность прогнозировать изменения импульсной активности в пределах изученного диапазона концентраций. Параметры регрессионного уравнения имели следующие значения:  $a=-0,001$ ,  $b=4,55$

Таким образом, возникает возможность проведения расчетов с использованием следующей зависимости:

$$\text{ИАН} = -0,001 \times C + 4,55, \text{ где:}$$

$C$  — это концентрация бемитила в мозге, ИАН — импульсная активность нейронов области проекции вибриссы С3 соматосенсорной коры головного мозга крыс.

## Выводы

Все сказанное позволяет утверждать:

1. Процессы перераспределения бемитила из плазмы крови в мозг обеспечивают насыщение тканей мозга более высокими концентрациями препарата, чем их

величины в плазме крови, что объясняется высокой липофильностью препарата.

2. Однократное введение бемитила вызвало достоверное увеличение локального мозгового кровотока, парциального напряжения кислорода в зоне проекции вибриссы С<sub>3</sub> соматосенсорной коры головного мозга. Одновременно с оценкой активности микроциркуляторного модуля коры головного мозга крыс анализ биоэлектрической активности нервных клеток показал увеличение частоты генерации спайков нервными клетками.
3. Сенсорная стимуляция привела к увеличению кровотока, что связано с возрастанием функциональной активности нервных клеток, а увеличение локального мозгового кровотока в проекционной зоне коры головного мозга при афферентном раздражении повлекло за собой повышение парциального напряжения кислорода в нервной ткани.
4. Установлены высокие корреляции между уровнем бемитила в мозге и величинами локального мозгового кровотока, парциальным напряжением кислорода и импульсной активностью нейронов в соматосенсорной коре головного мозга крыс. Корреляции имеют положительную величину, что позволяет говорить о бемитиле, как об актопротекторе улучшающем циркуляторно-метаболическое обеспечение нейронного модуля соматосенсорной коры головного мозга.

## Литература

1. Бобков Ю.Г., Виноградов В.М., Катков В.Ф. и др. Фармакологическая коррекция утомления. — М.: Медицина. С.208, 1984.
2. Бугаева Л.И., Спасов А.А., Веровский И.Н. и др. Исследование острой токсичности бемитила и бромитила // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. Т.63. № 6. С.53-57. 2000.
3. Каркищенко Н.Н., Хороныко В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика. — Ростов-на-Дону: Феникс, 2001.
4. Крапивин С.В., Романова В.Е., Воронина Т.А., Лукьянова Л.Д. // *Физиологический журнал СССР*. — Т. 77, № 7. С. 1-6. 1991.
5. Морозов И.С., Барчуков В.Г., Быков Н.П. и др. Необходимость и возможности фармакологической коррекции профессиональной работоспособности в экстремальных условиях. // *Тезисы 1-го Съезда Российского научного общества фармакологов 9-13 октября 1995г. «Фундаментальные исследования как основа создания лекарственных средств»*. С.-291. 1995.
6. Морозов И.С., Александровский Ю.А., Серебрякова Т.В. и др. Применение бемитила в психиатрической практике: Метод. рекомендации — М., 1987.
7. Сухов А.Г. Нейронная организация тактильного анализатора крысы. — Ростов-на-Дону, 1992.
8. Фирсов А.А., Жердев В.П., Барманова Е.Ю. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению фармакокинетики лекарственных средств. — М., 2000.

**PHARMACOKINETICS COMPARATIVE STUDIES OF BEMITILE  
AND ITS INFLUENCE ON THE CIRCULATORIC-METABOLIC SUPPORT SO-  
MATOSENSORIC CORTEX NEURONAL MODULES**

**Yu.S. Makljakov, V.V. Khoronko, A.A. Stepanov, S.A. Sergeeva, I.M. Mjakota**

*Rostov State Medical University, Rostov-on-Don  
The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** actoprotector, bemitile, PK-drug distribution.

Bemitile pharmacokinetic and its influence on the local brain blood flow (LBB), partial oxygen pressure (pO<sub>2</sub>) and neuronal impulse activity (NIA) in the ratXs somatosensoric cortex has been studied. For studying of pharmacokinetics features the method of a gas chromatography was used. For research of circulatory-metabolic support of the neural module synchronously registered a LBB, pO<sub>2</sub> and NIA in the place of a projection vibrissae '3 ratXs somatosensoric cortex. It is established, that provides saturation of a brain tissues by higher concentration of a drug, than their level in blood plasma; simultaneous bemitile administration causes reliable increase of LBB, pO<sub>2</sub> and NIA in the place of a projection vibrissae '3 ratXs somatosensoric cortex. Simultaneously with an estimation of microcirculatory activity the rats somatosensoric cortex module the analysis of bioelectric activity of nervous cells has shown increase in frequency of spikes generation by nervous cells. High correlation between a level bemitile in a brain and sizes of LBB, pO<sub>2</sub> and NIA in ratXs somatosensoric cortex is established.

## Изучение воздействия фармакологических соединений на структуру гидратных оболочек

В.А. Злобин, В.А. Павлов, А.И. Шеньшин, Е.В. Назарова

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Исследовалась способность воздействия молекул опиатов на структуру водных систем. Выявлено значительное снижение величины пространственно-временного параметра воды, что свидетельствует о способности исследуемых соединений структурировать водное окружение и тем самым влиять на рецепторные системы.

**Ключевые слова:** опиаты, кластер, флуктуация.

Для детектирования низких концентраций (до  $10^{-13}$  М) лекарственных соединений предлагается использовать эффект их действия на структуру сетки водородных связей воды. Это действие обуславливает ряд биологических и физико-химических эффектов, которые могут быть положены в основу различных модификаций детектирования.

Так, к настоящему времени получено большое количество экспериментальных данных, указывающих на то, что опиаты способны вызывать как бифазный, так и мультифазный ответ при воздействии на биологические системы [1, 2, 6]. Мультифазность проявляется в ингибировании и активации некоторых биоэффектов под действием различных концентраций опиата. Наличие мультифазности, в частности для морфина, объясняется его взаимодействием с различными подтипами опиатных рецепторов. Однако, полученные результаты позволяют предположить, что мультифазность может быть связана с изменением свойств клеточных мембран, вызываемых изменением структуры приповерхностной воды. Так, было установлено, что опиаты в концентрациях  $10^{-2}$ – $10^{-8}$  М способны критически сказываться на целостности липидного бислоя [3] путем опосредованного действия на структуру сетки водородных связей приповерхностной воды. Более того, вызы-

ваемое опиатами изменение структуры воды компенсировались их антагонистом — налоксоном [4]. Данный факт служит косвенным подтверждением того, что примембранная водная фаза может являться одним из сигнальных элементов рецепции опиатов и играет важную роль в процессе лиганд-рецепторного взаимодействия.

Целью настоящего исследования было изучение воздействия фармакологических соединений на структуру их гидратных оболочек. Для этого нами проведена серия вычислительных экспериментов с использованием метода молекулярной динамики.

### Материалы и методы

В процессе вычислительного эксперимента использовались периодические граничные условия и молекулярно-механическое силовое поле ММ2+. Заряды и ван-дер-ваальсовы потенциалы воды в этом случае близки к таковым для TIP3P. Условия моделирования: NVT-ансамбль, потенциал взаимодействия молекул воды — TIP3P [6], заряды рассчитывались методом CNDO/2 в неограниченном базисе Хартри-Фока, температура 310 К, шаг по времени  $5 \times 10^{-4}$  пс, постоянная времени 1 пс, радиус обращения потенциала в 0 равен 9,5, радиус точного потенциала 5,5. [5].

Техника вычислительного эксперимента заключается в следующем. На 1 молекулу исследуемого вещества во всех случаях приходилось в среднем около 200 молекул воды, ребро кубической ячейки выбиралось из условия равенства плотности, приблизительно  $1 \text{ г/см}^3$ . Молекулярно-динамический расчет проводился с использованием программы *HyperChem* (версии 5.02) до выхода на динамическое равновесие  $\sim 50$  пс, при котором полная энергия системы не менялась с точностью до флуктуаций.

Среднее время жизни водородной связи и среднее число водородных связей на молекулу воды вычислялись с использованием специально разработанного программного обеспечения по результатам молекулярно-динамических расчетов.

Среднее время жизни водородной связи  $\langle \tau \rangle$  в программе оценивалось по формуле:

$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^n \tau_{i/n}$$

где  $\tau_i$  — время существования  $i$ -й водородной связи;  $n$  — число водородных связей, образовавшихся за время наблюдения за системой (обычно 0,2 пс). Такие оценки вполне приемлемы для времени жизни водородной связи (0,5 пс — эксперимент, 0,2 пс — расчет).

Интервал длин водородной связи определялся по экспериментальным функциям парной корреляции (то есть функциям радиального распределения)  $G_{O...H}$ . Для расстояния  $OH...O$  он составлял  $r \approx 1,4$ – $2,4$ .

Расчетное среднее число водородных связей на молекулу воды для чистой воды составило —  $2,94 \pm 0,02$ , что близко к экспериментальному —  $3,2$ .

Для оценки ошибок рассчитываемых величин нами были выполнены три независимых вычислительных эксперимента для чистой воды. На конечном участке траекторий движения молекул рассчиты-

вались параметры функции радиального распределения (среднее число водородных связей на молекулу воды и среднее время жизни водородных связей). Каждый из расчетов проводился по 17 состояниям с интервалом по времени 0,05 пс.

## Результаты

Получены следующие значения стандартных отклонений. Ошибка среднего времени жизни водородных связей составила  $S_\tau = 0,008$  пс. Ошибка среднего числа водородных связей на молекулу воды составила  $S_n = 0,020$ . Найденные величины позволяют судить о достоверности возмущений, вносимых в структуру сетки водородных связей воды различными соединениями.

Результаты вычислительного эксперимента представлены на рисунке.

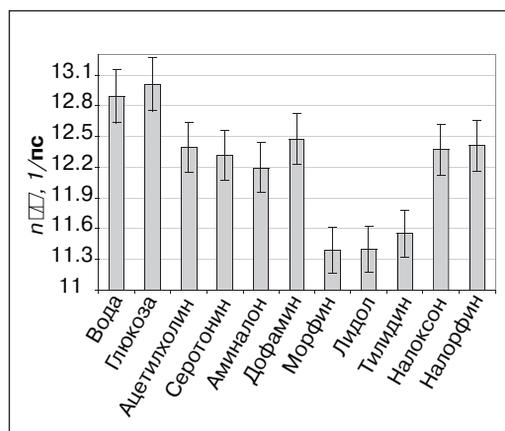


Рис. Гистограмма зависимости отношения числа водородных связей на молекулу воды  $n$  к времени жизни водородной связи  $\langle \tau \rangle$  от природы растворенной в воде молекулы.

Анализ результатов вычислительного эксперимента представленных на гистограмме показывает, что величина пространственно-временного параметра для системы 2, не содержащей биологически активных компонентов, близка к таковой

для чистой воды. Для систем 7...9, содержащих биологически активные вещества, существенно отличаются от воды, а для систем 3...6 и 10...11, содержащих биорегуляторы и антагонисты биологически активных веществ системы 7...9 находятся в промежутке между крайними значениями.

### Обсуждение результатов

Наиболее общую информацию о структуре жидкости дают методы дифракции рентгеновских лучей, нейтронов и электронов. Возможности этих методов дополняют друг друга. Целью является расчет функции радиального распределения по данным эксперимента.

Однако точное определение функции радиального распределения из дифракции рентгеновских лучей и нейтронов сейчас невозможно. Это связано с тем, что существуют значительные трудности в интерпретации экспериментальных данных. Рентгенография и нейтронография, как правило, наиболее эффективны только при изучении простых жидкостей.

Кроме того, рентгенограмму структуры можно сравнить с вершиной айсберга, поскольку она отображает лишь те молекулярные образования, которые «живут» достаточно долго. Она не дает представления об огромном числе структур с меньшим временем «жизни», которые, играют очень важную роль в молекулярных системах. Только новое поколение нейтронных спектрометров будет способно дать новую полезную информацию о структуре водных систем.

В связи с этим особую значимость приобретает получение информации о структуре жидкости с помощью вычислительного эксперимента, который используется как мощный метод предсказания

макроскопических свойств системы по её микроскопическим параметрам.

При проведении вычислительного эксперимента, как правило, используют метод Монте-Карло или метод молекулярной динамики, что позволяет рассчитать значительное число экспериментально измеряемых величин, а также экспериментально не определяемых, но фигурирующих в теории. В результате численного эксперимента можно получить функцию радиального распределения, число Н-связей на одну молекулу, время жизни этой связи, средний размер кластера в образце, координационное число и ряд других величин.

Функция радиального распределения малочувствительна даже к существенным изменениям не только дальнедействующей, но и ближнедействующей части потенциальной энергии межмолекулярных сил. При этом связь между функциями распределения и межмолекулярными взаимодействиями, а также строением ассоциатов и комплексов сложна и неоднозначна.

Кроме того, имеет значение, для какой части системы следует проводить вычислительный эксперимент, сводящийся в конечном итоге к выходу системы на динамическое равновесие, поскольку неравновесная термодинамика, применительно к слабо неравновесным системам, опирается на представление о локальном равновесии. Согласно этому представлению любая малая часть массы неравновесной системы находится в состоянии термодинамического равновесия. Она подчиняется всем соотношениям равновесной термодинамики. Поэтому их состояния могут быть охарактеризованы с помощью температуры, энтропии и других макроскопических переменных в зависимости от природы системы.

Для сохранения принципа локального равновесия под малой частью системы на-

ходящейся в состоянии термодинамического равновесия следует понимать такую, к которой соотношения термодинамики еще применимы с точностью, по крайней мере, десятых долей процента. Такие части системы содержат примерно  $10^3$ - $10^4$  молекул, поэтому проведение численного эксперимента с таким числом молекул при современном уровне развития вычислительной техники становится невыполнимой задачей.

Однако вычислительный эксперимент может эффективно использоваться для исследования элементарных событий реакций. От механизмов элементарных реакций зависят механизмы более сложных процессов, происходящих в исследуемых системах. Например, для процессов, протекающих при тепловом движении в жидкостях, в качестве элементарных могут быть приняты реакции разрыва и образования связей (приводящие к перестройке ассоциатов) или реакции перераспределения (результатом которых может быть изменение числа связей).

Структурные особенности жидкости во многом определяются тепловым движением молекул. В воде происходят различные флуктуации, характеризующиеся пространственно — временными параметрами. Причиной возникновения таких флуктуаций в воде могут быть колебательные движения молекулы растворенного вещества. Для сложных молекул такие колебания, как правило, специфичны.

Под флуктуацией, как известно, подразумевается отклонение физических величин от их среднего значения, то есть неоднородность. Эти неоднородности в жидких системах являются результатом скопления значительного числа молекул. Из сказанного следует, что в чистой воде флуктуацией может быть кластер, состоящий из множества молекул воды, связанных водородными связями, для которого

сохраняется принцип локального равновесия. Такой подход согласуется с современными теоретическими представлениями о структуре воды.

Возможность образования кластеров небольшого размера можно считать экспериментально доказанной. Теоретические работы допускают возможность образования кластеров, содержащих сотни молекул воды. В последние годы появились указания на то, что в определенных условиях в воде могут образовываться кластеры микронного размера. Вместе с тем, в настоящее время с применением инструментальных методов анализа получены результаты, свидетельствующие о существовании в тонких (3, 5, 10 и 20 мкм) слоях кластеров большого (миллиметрового) размера, которые обнаруживали регулярность в пространственном расположении.

Кластерная модель строения жидкости определяет кластер как индивидуальную сущность. Из этого следует, что характерные для кластера пространственно — временные параметры должны определяться характеристиками элементарных событий реакций.

Так, например, для воды в качестве временного параметра будет величина среднего времени жизни водородной связи, а в качестве пространственного — среднее число водородных связей на молекулу воды, так как эта величина характеризует структурированность системы (чем больше число водородных связей на молекулу воды, тем больше развита структура).

Вода, является упругой средой, поэтому возникшая флуктуация будет изменяться во времени. Так, например, адиабатические флуктуации плотности, которые можно рассматривать как локальное изменение давления, разумеется, не могут «застыть» на месте в упругой среде, а «побегут» по ее объему со скоростью распро-

странения упругого возмущения. То есть в определенном объеме должна наблюдаться картина структурных волн.

На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что для характеристики процессов, определяющих структурные особенности исследуемых систем, наиболее целесообразным является применение пространственно-временного параметра, в качестве которого, предлагается использовать отношение числа водородных связей на молекулу воды к времени жизни водородной связи. Данный параметр можно отнести к метрическим (протяженность и длительность) свойствам системы. Исходя из того, что в таких системах возможно существование волновых процессов, этот параметр также можно использовать для частотной характеристики этих процессов.

Необходимо отметить, что такие оценки, по-видимому, являются несколько грубыми, но для проведения качественных исследований структурных особенностей исследуемых систем могут быть вполне приемлемыми.

Таким образом, для изучения влияния фармакологических соединений на процессы, использование вычислительного эксперимента с применением метода молекулярной динамики, который позволяет определить время жизни и среднее число водородных связей на одну молекулу воды, происходящие в объеме жидкости, представляется целесообразным.

### Выводы

1. Молекулы опиатов значительно снижают величину пространственно-временного параметра воды. Это может указы-

вать на снижение частоты волновых процессов, происходящих в исследуемых системах. Причиной этому может быть, например, увеличение размеров флуктуаций, что свидетельствует о способности исследуемых соединений структурировать воду.

2. Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии молекул опиатов на структуру водных систем.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности. // *Российский химический журнал*, т. XLIII, № 5, С. 3-11, 1999.
2. Воронина Т.А., Бурлакова Е.Б., Чернявская Л.И. и др. Некоторые аспекты фармакологического действия транквилизаторов бензодиазепинового ряда, вводимого в сверхмалых дозах. / *В сб. Механизмы действия сверхмалых доз*. М., с.92-93, 1995.
3. Кунцевич А.Д., Кузнецов П.Е., Назаров Г.В. и др. Влияние некоторых опиатов на стабильность искусственных бислойных липидных мембран. // *Докл. АН*, Т.358, №1, С. 125-126, 1998.
4. Кузнецов П.Е., Злобин В.А., Назаров Г.В. и др. Неспецифическое действие морфина на мембраны эритроцитов. // *Биофизика*, Т.49, вып. 4, с.680-684, 2004.
5. Kalinichev A.G., Buss J.D. Hydrogen Bonding in Supercritical Water. 2. Computer simulation. // *J. Phys. Chem*, V. 101, P..9720-9727, 1997.
6. Zlobin V.A., Kuznetsov P.E., Nazarov G.V. et al. Optical properties of aqueous morphine solutions. // *Proc. SPIE*, Vol. 5068, P.396-404, 2003.

## **STUDYING OF PHARMACOLOGICAL COMPOUNDS INFLUENCE ON THE STRUCTURE OF HYDRATE COATS**

**V.A. Zlobin, V.A. Pavlov, A.I. Shanshin, E.V. Nazarova**

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** fluctuation, cluster, opiates.

The ability of opiates molecules influence on the structure of water system was analyzed. The considerable reduction of quantity of water spatial-time parameter was revealed. It evidences about the ability of analyzing compounds to make the structure of water surrounding and by this to influence on receptor's system.



## Влияние аллелей $Kit^{w-v}$ и $Kit^{w-y}$ мутации *dominant spotting* на продолжительность стадий дробления и жизнеспособность ранних эмбрионов мышей

Н.Ю.Сахарова,<sup>1</sup> А.М.Малашенко<sup>2</sup>, Е.Ф.Вихлянцева<sup>1</sup>, Ю.А.Ковалицкая<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Моск. обл.,

<sup>2</sup> Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

<sup>3</sup> Филиал Института биоорганической химии РАН, Пущино, Моск. обл.

Исследовано влияние аллелей мутаций *dominant spotting*  $Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}$  на раннее развитие мышей. Эмбрионов получали от спаривания гетерозиготных животных между собой ( $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ) и ( $Kit^{w-y}/+ \times Kit^{w-y}/+$ ) и в результате реципрокного спаривания с мышами дикого типа C57BL/6 (+/+). На второй день после оплодотворения собирали эмбриональный материал из яйцеводов и анализировали соотношение эмбрионов и неразвивающихся яйцеклеток. У мышей  $Kit^{w-v}$  значительное количество неразвивающихся яйцеклеток было найдено только при спаривании  $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}$ . У мышей  $Kit^{w-y}$  высокую частоту неразвивающихся яйцеклеток наблюдали при любом типе спаривания. Кроме того, мы установили, что эмбрионы полученные от гетерозиготных животных были не только на стадии двух бластомеров (как в контроле +/+), но также на более поздних стадиях 4–8 бластомеров. Мы показали, что развитие 2-х клеточных эмбрионов *in vitro*, полученных от спаривания  $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$  с мышами +/+ не отличается от развития +/+ эмбрионов, но эмбрионы от спариваний  $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}/+ \times Kit^{w-y}/+$  большей частью погибают на стадии бластоцисты.

**Ключевые слова:** мыши, эмбриогенез, мутации гена *Kit dominant spotting*.

Оптимальный выбор адекватной биомодели является краеугольным камнем современной биомедицины [4]. В этом отношении мыши, несущие определенные мутации, являются незаменимой биомоделью для выяснения механизмов патологии, вызванной аналогичными мутациями у человека. Одна из таких мутаций широко известна как феномен «пегости». У человека она характеризуется врожденным светлым локоном или белым пятном на лбу и депигментацией кожи на животе, руках и ногах. Изучение молекулярных основ этого явления выявило мутацию в КИТ-гене, расположенном в хромосоме 4 [27]. Она нарушает строение и функцию тирозинкиназного рецептора, встроенного в клеточную мембрану [6]. У мышей существует мутация сходной фенотипической картиной —

*Dominant Spotting (W)*. Её определяет изменение в *c-kit*-гене, расположенного в хромосоме 5 [8, 27]. Эта мутация является уникальной моделью для изучения механизмов тирозинкиназной сигнализации, так как известны лиганд этой системы — фактор дифференцировки стволовых клеток (SCF) и мутации гена, кодирующего этот лиганд [13, 26]. Локус *W*, в котором расположен единственный структурный ген — *c-kit* протонкоген [7], характеризуется тем, что в нем с необычайно высокой частотой происходят доминантные мутации [3]. Первая мутация в этом локусе была обнаружена в 1908г. [23], а в настоящее время известно более 70 мутантных аллелей. Большинство мутаций серии *W* летальны в гомозиготном состоянии и жизнеспособны в гетерозиготном. У гетерозиготных животных на шерсти появ-

ляются белые пятна и ослабляется пигментация окрашенных участков. Эти аллели интенсивно изучаются, так как помимо влияния на окраску шерсти вызывают нарушения эритропоэза и гаметогенеза [23]. Они оказывают сходное влияние на окраску шерсти, но при этом могут не влиять на эритропоэз или на гаметогенез. Нарушения дифференцировок в различных клеточных линиях, подверженных действию этих аллелей, не зависят друг от друга и не являются результатом единичного физиологического повреждения во время развития [23].

Важное внимание обращено на роль мутаций *c-kit*-гена в функционировании репродуктивной системы [11]. В настоящее время на мышах наиболее интенсивно изучается роль *c-kit* рецепторной тирозинкиназы в сперматогенезе [12,18]. Известно, что *c-kit* рецепторы находятся в постакросомальной области сперматозоидов [19]. В отношении оогенеза было показано, что в ооцитах, начиная со стадии малого роста и до стадии зрелого фолликула, идет накопление *c-kit* транскриптов. Можно предположить, что они играют важную роль в созревании [9,15]. Рецепторные тирозинкиназы активны при оплодотворении и запускают многоступенчатый механизм реакции активации, начало которой соответствует моменту взаимодействия яйцеклетки и сперматозоида [10]. Показано, что в активации яйцеклетки играет роль усеченная форма *c-kit* киназы, которая экспрессируется во время спермиогенеза [20].

Представляет большой интерес выяснение проявления этого гена в раннем эмбриогенезе, так как в этот период на жизнеспособность ранних доимплантационных зародышей большое влияние оказывают ростовые факторы, действующие через рецепторы тирозинкиназного типа [21, 10], к которым и относятся *c-kit* мембранные рецепторы. В отношении раннего эмбриогенеза известно, что экспрессия *c-kit*-

гена у зародышей мышей выявляется на стадии 8 бластомеров [9]. Хотя специфический фактор роста SCF не был обнаружен на ранних стадиях развития, возможно, что *c-kit* рецепторы клеток ранних зародышей связываются с другим фактором роста — PAF (Plated activating factor), который синтезируется в этот период [25]. Информация о роли *c-kit* лигандной системы может быть получена при наблюдении за развитием мутантных зародышей. В связи с этим мы исследовали развитие ранних зародышей, полученных от гетерозиготных мышей линий C57BL/6- $Kit^{w-v}/+$  и C57BL/6- $Kit^{w-y}/+$ , несущих аллель  $Kit^{w-v}$  или  $Kit^{w-y}$  и сравнивали его с развитием зародышей мышей C57BL/6, несущими нормальный (дикий) *c-kit* ген.

## Материалы и методы

Для получения эмбрионального материала были использованы гетерозиготные мыши  $Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}$ , и мыши C57BL/6 (+/+) в возрасте 8 — 10 недель. Аллель  $Kit^{w-v}$  — *dominant spotting viable* — одна из самых известных мутаций этой серии. Некоторые гомозиготы  $Kit^{w-v}$  выживают и вырастают черноглазыми белыми мышами. Молодые мыши плодовиты, но с возрастом становятся бесплодными. [23]. Аллель  $Kit^{w-y}$  — *dominant spotting Yurlovo* [3, 14] была получена в 1962 г. в питомнике «Столбовая» и сохраняется в НЦБМТ РАМН. Гомозиготы  $Kit^{w-y}$  всегда погибают сразу после рождения. Обе мутации поддерживаются в гетерозиготном состоянии на генотипе C57BL/6 [2].

Самцов и самок в отношении 1:3 ссаживали в вечерние часы (18-20 часов) и на следующий день утром с 9 до 10 часов проверяли наличие копулятивной пробки, что служило указанием на произошедшее спаривание. День обнаружения копулятивной пробки принимался за 1-й день беременности. На 2-й день (13-14 часов)

самок забивали путем цервикальной дислокации. Эмбриональный материал получали при промывании яйцеводов. Всего было получено 999 яйцеклеток от мутантных мышей и 425 яйцеклеток от мышей +/+(контроль).

Было проведено 2 серии опытов. В 1-й серии сравнивали состояние *in vivo* яйцеклеток и зародышей, полученных от мышей Kit<sup>w-v</sup>/+, Kit<sup>w-y</sup>/+ и +/+ на 2-й день после оплодотворения; во 2 серии – влияние этих аллелей на развитие 2-клеточных эмбрионов в течение 72 часов *in vitro* в модифицированной среде Виттена [1]. В 1-й серии подсчитывали соотношение неразвивающихся и развивающихся яйцеклеток, полученных при промывании яйцеводов, при скрещивании гетерозиготных мышей между собой, реципрокном скрещивании гетерозиготных мышей с мышами +/+ и мышей +/+ между собой. К неразвивающимся относили неоплодотворенные, разрушенные, фрагментирован-

ные яйцеклетки, а также зиготы. Во 2-й серии были использованы 2-клеточные зародыши, полученные от скрещивания мутантных мышей между собой и от скрещивания самок +/+ с гетерозиготными самцами. Контролем служило развитие зародышей, полученных от мышей +/+.

Достоверность результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

## Результаты

### 1 серия

Результаты, полученные на 2 день после оплодотворения и представленные в табл. 1, показывают, что при реципрокном скрещивании мышей Kit<sup>w-v</sup>/+ с мышами +/+, т.е. в группах (Kit<sup>w-v</sup>/+ x +/+) и (+/+ x Kit<sup>w-v</sup>/+), количество неразвивающихся яйцеклеток сопоставимо с соответствующим показателем в контрольной группе (21,5%; 28,0% и 26,8%, соответственно).

Таблица 1

**Состав эмбрионального материала, полученного при промывании яйцеводов самок на 2-й день беременности при различных вариантах скрещивания мышей, несущих аллель Kit<sup>w-v</sup> или Kit<sup>w-y</sup>**

Вариант скрещивания	Общее количество яйцеклеток и эмбрионов	Неразвивающиеся яйцеклетки	
		число	%
Kit <sup>w-v</sup> /+ x Kit <sup>w-v</sup> /+	332	143*	43,1
Kit <sup>w-v</sup> /+ x +/+	135	29	21,5
+/+ x Kit <sup>w-v</sup> /+	100	28	28,0
Kit <sup>w-y</sup> /+ x Kit <sup>w-y</sup> /+	212	109*	51,4
Kit <sup>w-y</sup> /+ x +/+	54	28*	51,9
+/+ x Kit <sup>w-y</sup> /+	166	99*	59,6
+/+ x +/+	425	114	26,8

\* – достоверное различие по отношению к контролю, p<0,001

Однако, при скрещивании гетерозиготных мышей между собой ( $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ) доля неразвивающихся яйцеклеток (43,1%) достоверно выше контрольных показателей ( $p < 0,001$ ). В контрольной группе ( $+/+ \times +/+$ ) число неразвивающихся яйцеклеток не превышает показателей доимплантационной гибели эмбрионов мышей C57Bl/6, приведенных в литературе [3].

У мышей, несущих аллель  $Kit^{w-y}/+$ , значительное количество неразвивающихся яйцеклеток было обнаружено при всех вариантах скрещивания. Независимо от того, кто был носителем мутации, доля неразвивающихся яйцеклеток была одинакова во всех группах: ( $Kit^{w-y}/+ \times Kit^{w-y}/+$ ), ( $Kit^{w-y}/+ \times +/+$ ), ( $+/+ \times Kit^{w-y}/+$ ) – и составляла 51,4%, 51,8% и 59,6%, соответственно. Эти показатели достоверно выше количества неразвивающихся яйцеклеток в контрольной группе ( $p < 0,001$ ).

Анализ эмбрионов, полученных из яйцеводов (рис.1), показал, что на 2-й день беременности на время получения эмбрионального материала (13-14 ч) все эмбрионы в контрольной группе ( $+/+ \times +/+$ ) находились на стадии 2 бластомеров.

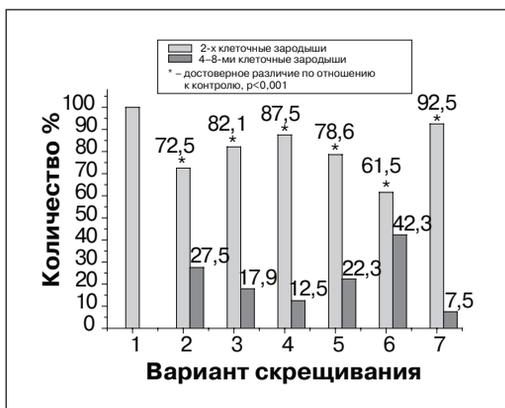


Рис. 1. Стадии развития эмбрионов, полученных из яйцеводов самок на 2-й день беременности. Варианты скрещивания: 1 –  $+/+$ , 2 – ( $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ), 3 – ( $Kit^{w-v}/+ \times +/+$ ), 4 – ( $+/+ \times Kit^{w-v}/+$ ), 5 – ( $Kit^{w-y}/+ \times Kit^{w-y}/+$ ), 6 – ( $Kit^{w-y}/+ \times +/+$ ), 7 – ( $+/+ \times Kit^{w-y}/+$ )

Это полностью соответствует временным параметрам развития мышей, согласно которым первое деление зиготы происходит через 36 часов после оплодотворения, а следующее деление бластомеров – через 12 часов [5]. При всех вариантах скрещивания мутантных мышей  $Kit^{w-v}/+$  и  $Kit^{w-y}/+$  помимо 2-клеточных были обнаружены эмбрионы, находящиеся на стадиях 4-8 бластомеров. Режим подсадки самок к самцам и проверки результатов спаривания строго соблюдался. Даже учитывая неизбежную временную гетерогенность зародышей вследствие того, что самки могли быть оплодотворены в разное время после подсадки к самцам, разброс по времени не мог превышать 12 часов. Это позволяет думать, что наличие у мутантных мышей на 2-й день после спаривания зародышей на более поздних стадиях дробления скорее всего связано с более быстрым прохождением этого периода развития. Как видно на рис. 1, доля зародышей на стадиях 4-8 бластомеров могла составлять от 7,5% до 42,3% от общего количества зародышей.

## 2 серия

а) влияние аллеля  $Kit^{w-v}$  на развитие эмбрионов мыши *in vitro* (табл. 2)

Было использовано 73 эмбриона, полученных от скрещивания между собой мышей  $Kit^{w-v}/+$  (группа  $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ). Через 24 часа культивирования стадии 4 бластомеров достигло 91,8% эмбрионов. Через 48 часов развитие продолжили 72,3% от начального количества зародышей, большая часть которых находились на стадии начала компактизации, т.е. ранней морулы, и некоторые – на стадии 8 бластомеров. Через 72 часа на стадии многоклеточной морулы были 30,1% эмбрионов, а на конечной стадии доимплантационного развития – стадии бластоцисты – 28,9% зародышей. Некоторые зародыши на стадии морулы и особенно бластоцисты имели

Таблица 2

**Развитие *in vitro* 2-х клеточных эмбрионов,  
полученных при различных вариантах скрещивания гетерозиготных мышей,  
несущих аллель *Kit<sup>w-v</sup>* или *Kit<sup>w-y</sup>***

Вариант скрещивания	кол-во эмбрионов	количество развивающихся эмбрионов на разных сроках культивирования							
		24 ч			48 ч			72 ч	
		стадия	кол-во	%	стадия	кол-во	%	кол-во бл-ст	%
<b>1 серия</b>									
<i>Kit<sup>w-v</sup>/+</i> × <i>Kit<sup>w-v</sup>/+</i>	73	4 бл.	67	91,8	8 бл., ранние морулы	55	75,3	21	28,8*
<i>+/+</i> × <i>Kit<sup>w-v</sup>/+</i>	31	4 бл.	30	96,8	8 бл., ранние морулы	26	83,9	15	48,4
<i>+/+</i> × <i>+/+</i>	<b>70</b>	<b>4 бл.</b>	<b>67</b>	<b>95,7</b>	<b>ранние морулы,</b>	<b>48</b>	<b>68,6</b>	<b>30</b>	<b>42,9</b>
<b>2 серия</b>									
<i>Kit<sup>w-y</sup>/+</i> × <i>Kit<sup>w-y</sup>/+</i>	90	4-8 бл.	78	86,7	8 бл, ранние морулы, бластоцисты	58	64,4	35	38,9 <sup>∇</sup>
<i>+/+</i> × <i>Kit<sup>w-y</sup>/+</i>	62	4-8 бл.	55	88,7	8 бл, ранние морулы, бластоцисты	42	67,7	38	61,3
<i>+/+</i> × <i>+/+</i>	<b>67</b>	<b>4-8 бл.</b>	<b>64</b>	<b>95,5</b>	<b>ранние морулы</b>	<b>50</b>	<b>74,6</b>	<b>45</b>	<b>67,2</b>
<sup>∇</sup> результаты достоверны по отношению к контролю, p<0,001 * результаты достоверны по отношению к контролю, p<0,05 (контроль выделен жирным шрифтом) Обозначения: бл. – бластомер, бл-ст – бластоциста									

уродливый вид – морулы состояли из клеток разной величины и были неполностью компактизованы, а у бластоцист трофобласт состоял из крупных клеток, не было четкой дифференцировки внутренней клеточной массы, и нарушалось формирование единой полости бластоцисты (рис. 2а).

От скрещивания самок  $+/+$  с самцами  $Kit^{w-v}/+$  (группа  $+/+ \times Kit^{w-v}/+$ ) был получен 31 зародыш. Через 24 часа культивирования 96,7% зародышей были на стадии 4 или 8 бластомеров, через 48 ч 88,6% от исходного количества зародышей достигли стадии 8 бластомеров или ранней морулы. Через 72 часа стадии бластоцисты достигли 48,3% зародышей. В этом случае морфологических аномалий в развитии практически не было (рис. 2б).

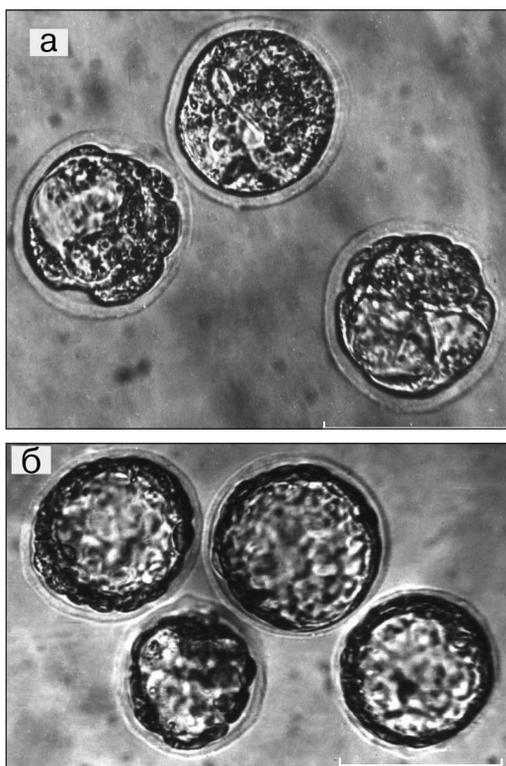


Рис. 2. Влияние аллеля  $Kit^{w-v}$  на развитие эмбрионов мыши *in vitro*: а)  $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ; б)  $+/+ \times Kit^{w-v}/+$ . Масштаб 100 мкм.

В контрольной группе, состоящей из 70 зародышей, полученных от мышей  $+/+$  (группа  $+/+ \times +/+$ ), через 24 ч. 95,7% эмбрионов были на стадии 4 бластомеров, через 48 часов развивающиеся зародыши (68,6%) имели вид компактных ранних морул, а через 72 часа стадии бластоцисты достигли 42,8% от начального количества зародышей.

При сравнении результатов, полученных в разных группах зародышей (табл. 2), видно, что наличие мутантного гена  $Kit^{w-v}$  у родителей не влияет на переход эмбрионов со стадии 2 бластомеров на стадию 4 бластомеров. Во всех группах большинство зародышей прошли одно деление. Стадии 8 бластомеров и ранней компактной морулы также достигает почти одинаковое число зародышей в подопытных и в контрольной группах. Однако в группе ( $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ) формируется значительно меньше бластоцист (28,9% по сравнению с 42,85% в контроле,  $p < 0,001$ ), в то время как в группе ( $+/+ \times Kit^{w-v}/+$ ) до стадии бластоцисты развилось 48,3% зародышей.

б) влияние аллеля  $Kit^{w-y}$  на развитие зародышей мышей *in vitro*.

Результаты исследования влияния этой мутации на развитие ранних зародышей *in vitro* представлены в табл. 2. Было обнаружено, что через 24 ч. культивирования 2-клеточные зародыши полученные от скрещивания между собой мышью  $Kit^{w-y}/+$  (группа  $Kit^{w-y}/+ \times Kit^{w-y}/+$ ) или от одного гетерозиготного родителя (группа  $+/+ \times Kit^{w-y}/+$ ), в основном, находились на стадии 4-8 бластомеров (86,5% и 88,7%), что близко к соответствующему показателю в контрольной группе (93,5%). Через 48 ч. в группе ( $Kit^{w-y}/+ \times Kit^{w-y}/+$ ) свое развитие продолжили 64,9%, в группе ( $+/+ \times Kit^{w-y}/+$ ) – 67,3%, а в контрольной ( $+/+ \times +/+$ ) – 84,0% от исходного количества зародышей.

В обеих подопытных группах через 48 часов помимо зародышей на стадии

8 бластомеров и ранней морулы были обнаружены ранние бластоцисты, составившие 2,8% – 4,8% от общего числа зародышей. В это время контрольные зародыши находились на стадии ранней морулы. Через 72 часа в группе ( $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+ \times \text{Kit}^{\text{w-y}}/+$ ) стадии бластоцисты достигли 38,9% зародышей, а в группе ( $+/+ \times \text{Kit}^{\text{w-y}}/+$ ) – 66,1%. В контрольной группе до стадии бластоцисты к этому времени развилось 67,2% зародышей. Различие между результатами в группе ( $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+ \times \text{Kit}^{\text{w-y}}/+$ ) и в контроле достоверно ( $p < 0,001$ ). Эти результаты указывают на то, что способность развиваться до стадии бластоцисты значительно снижена только у зародышей, полученных от скрещивания мышей  $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+$  между собой.

Анализ результатов этой серии показывает, что в условиях *in vitro*, у зародышей, которые получены от одного или обоих мутантных родителей, несущих аллель  $\text{Kit}^{\text{w-v}}$  или аллель  $\text{Kit}^{\text{w-y}}$ , второе деление дробления происходит так же, как и у контрольных зародышей. Однако, в последний период доимплантационного развития у зародышей как группы ( $\text{Kit}^{\text{w-v}}/+ \times \text{Kit}^{\text{w-v}}/+$ ), так и группы ( $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+ \times \text{Kit}^{\text{w-y}}/+$ ) выявлено резкое снижение способности формировать бластоцисты.

### Обсуждение результатов

Проведенные нами исследования обнаружили отрицательное влияние аллелей  $\text{Kit}^{\text{w-v}}$  и  $\text{Kit}^{\text{w-y}}$  на доимплантационное развитие мышей. Наличие большого количества неразвивающихся яйцеклеток, обнаруженных на вторые сутки после оплодотворения (первая серия опытов), позволяет предположить, что гибель яйцеклеток может быть связана как с нарушениями в гаметогенезе у мутантных животных, так и с нарушениями в самом процессе оплодотворения. По-видимому, изменения,

вызванные аллелем  $\text{Kit}^{\text{w-v}}$  в гаметогенезе, могут быть скомпенсированы при оплодотворении гаметами дикого типа, так как в этих случаях количество неразвивающихся яйцеклеток не превышает такового при скрещивании мышей, несущих дикий *c-kit* ген. Высокая доля неразвивающихся яйцеклеток, полученных при скрещивании гетерозиготных животных  $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+$  между собой, вероятно определяется нарушениями в самом процессе оплодотворения. Можно думать, что у гамет с измененными *c-kit* рецепторными тирозинкиназами, ослабляется способность взаимодействовать между собой.

В случае аллеля  $\text{Kit}^{\text{w-y}}$  большое количество неразвивающихся яйцеклеток, наблюдаемое при любых вариантах скрещивания гетерозиготных мышей, говорит о том, что этот аллель вызывает более сильные нарушения и в оогенезе, и в сперматогенезе, чем аллель  $\text{Kit}^{\text{w-v}}$ , и эти нарушения гораздо реже могут быть скомпенсированы при взаимодействии с гаметами дикого типа. То, что аллель  $\text{Kit}^{\text{w-y}}$  вызывает более сильные нарушения в оогенезе и сперматогенезе, проявляется и в том, что относительное количество неразвивающихся яйцеклеток при реципрокных скрещиваниях мышей  $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+$  с мышами  $+/+$  было значительно выше, чем при аналогичных скрещиваниях мышей  $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+$  ( $p < 0,001$ ).

Оба изученных аллеля, по-видимому, оказывают более сильное влияние на оогенез, чем на сперматогенез, так как по нашим наблюдениям самки  $\text{Kit}^{\text{w-v}}/+$  и  $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+$  при скрещивании их с самцами  $+/+$  дают гораздо меньше потомства, чем самки  $+/+$  при скрещивании их с самцами  $\text{Kit}^{\text{w-v}}/+$  или  $\text{Kit}^{\text{w-y}}/+$ .

Таким образом, наши результаты согласуются с данными о том, что продукты *c-kit* гена важны для нормального протекания оогенеза, сперматогенеза и оплодотворения (Horie et al., 1991, Arcesi et al.,

1992, Kissel et al., 2000), и изменения в строении рецепторных белков, вызванные мутациями  $Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}$  ведут к значительным нарушениям вышеуказанных процессов. Известно, что у гетерозиготных животных, несущих мутации в *c-kit* гене, происходит взаимодействие между мутантными белками и белками дикого типа [13]. Высокий показатель гибели яйцеклеток гетерозиготных животных по-видимому отражает особенности взаимодействия мутантных белков  $Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}$  с *c-kit* белком дикого типа. Можно думать что, как и в случае аллеля *c-kit*  $W^{d2}$  (24), мутантные белки  $Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}$  значительно уменьшают количество функциональных *c-kit* рецепторов на клеточной поверхности гамет.

Анализ эмбрионального материала, извлеченного из яйцедов на 2-й день после оплодотворения, показал опережение развития эмбрионов, полученных от мутантных животных, по сравнению с контрольными эмбрионами. Можно предположить, что обнаруженная «возрастная» неоднородность эмбрионов, полученных от мутантных животных, связана с тем, что эти мутации как-то влияют на пролиферацию клеток.

Результаты наблюдения за развитием в условиях *in vitro* 2-клеточных эмбрионов (2-я серия опытов) показывают, что на ранних стадиях дробления жизнеспособность зародышей, полученных от гетерозиготных мышей  $Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}$ , независимо от того, один или оба родителя несут мутантный ген, такая же, как и у зародышей  $+/+$ . Вероятно, присутствие мутантных рецепторов в клеточной мембране в это время не влияет на внутриклеточные процессы, определяющие возможность развития на начальных стадиях дробления, и не снижают их жизнеспособность. Однако, на поздних стадиях доимплантационного периода мы наблюдали резкое уменьшение количества бластоцист в

группах зародышей, полученных от обоих гетерозиготных родителей. По видимому, в условиях *in vitro* на этой стадии гибнет часть зародышей, гомозиготных по мутантным аллелям. Известно, что на стадии морулы и образования бластоцисты уже экспрессируются собственные *c-kit* гены [9]. Образующиеся у гомозиготных зародышей аномальные *c-kit* рецепторы полностью нарушают функционирование *c-kit* киназной системы. Выживание гетерозиготных зародышей, по-видимому, связано с тем, что экспрессирующееся у них какое-то количество нормальных *c-kit* рецепторов достаточно для обеспечения их развития в условиях *in vitro*. Показано, что у гетерозиготных мышей  $Kit^{w-v}$  функциональные *c-kit* рецепторы сохраняются на клеточной поверхности, хотя и в уменьшенном количестве [16].

Результаты, полученные в опытах *in vitro*, подтверждают наше предположение о том, что мутантные аллели  $Kit^{w-v}$  и  $Kit^{w-y}$  оказывают влияние на протекание первых стадий дробления, возможно ускоряя деление зародышей.

Это позволяет предположить, что механизм отсчета времени в дробящемся зародыше может быть как-то связан с активностью *c-kit* гена. Одной из загадок раннего развития млекопитающих являются очень медленные асинхронные деления бластомеров, что не имеет аналогии с делениями дробления ни одного из типов многоклеточных. Такое необычное поведение клеток раннего зародыша послужило основанием для предположения, что замедленные деления, которые следуют сразу после оплодотворения, вовсе не являются эмбриональными, и скорее относятся к гаметогенезу [17]. Авторы этой гипотезы полагают, что замедленные события раннего эмбриогенеза млекопитающих вызваны эволюционным сдвигом времени оплодотворения. На основании наших данных можно предположить, что

механизм отсчета времени в дробящемся зародыше связан с функциональной активностью c-kit гена.

Таким образом полученные нами сведения показали, что экспрессия c-kit гена важна не только для оо- и сперматогенеза, но и для раннего эмбриогенеза. Можно думать, что c-kit рецепторы, встроенные в поверхностную мембрану зиготы и передаваемые при дроблении образующимся blastomeres, принимают участие в регуляции дробления. Нарушенная собственная экспрессия c-kit гена у гомозиготных зародышей Kit<sup>wv</sup> и Kit<sup>wy</sup> приводит к снижению жизнеспособности и гибели значительной части зародышей на стадии blastocysts.

### Литература

1. Березовская О.П., Межевикина Л.М., Верпринцев Б.Н. Метод культивирования ранних эмбрионов линейных мышей. // *Онтогенез*. Т.17. С.553-555. 1986.
2. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М. и др. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. — М.: Наука. 190 с. 1983.
3. Бландова З.К., Вахрушева М.П., Малашенко А.М. и др. Пятнистые стерильные самцы — новая мутация Dominant Spotting в 5 хромосоме мыши. // *Генетика*. Т. 22. С.1025-32. 1986.
4. Каркищенко Н.Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины. // *Биомедицина*. № 1, с.5-16, 2005.
5. Прайт Х. Эксперименты с предimplantационными эмбрионами мышей. Биология развития млекопитающих. Методы. — М.: Мир. С. 27-64, 1990.
6. Fleischman R.A. Human piebald trait resulting from a dominant negative mutant allele of the c-kit membrane receptor gene. // *J.Clin.Invest*. V. 89. P. 1713-1717. 1992.
7. Geissler E.N., McFarland E.C., Russel E.S. Analysis of pleiotropism at the dominant white-spotting (W) locus of the house mouse: a description of ten new W alleles. // *Genetics*. V.97. P.337-361. 1981.
8. Geissler E.N., Ryan H.A., Housman D.E. The dominant White-spotting (W) locus of the mouse encoded the c-kit protooncogene. // *Cell*. V.55. P.185-192. 1988.
9. Horie K., Takahura K., Taii Sh., et al. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. // *Biology of reprod*. V. 45. P. 547-552. 1991.
10. Kinsey W.H., Schlesinger J. Tyrosine kinase signalling of fertilization. // *J. BBRC*. V.240. P.519-522. 1997.
11. Kissel H., Timochina I., Hardy M.P. et al. Point mutation in Kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signalling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other Kit responses. // *EMBO J*. V. 12. P.1312-1326. 2000.
12. Koshimizu U., Watanabe D., Tajima Y. et al. Effects of W (c-kit) gene mutation on gametogenesis in male mice: agametic tubular segments in Wf/Wf testes. // *Development*. V. 114. P. 861-7. 1992.
13. Lev S., Bechman J.M., Gival D., Yarden Y. Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lesions in signal transduction. // *Crit.Rev. Oncog*. V. 5. P.141-168. 1994.
14. Malashenko A. Yurlovo W suggested symbol WY . // *Mouse News Letters*. V. 37. P.61. 1967.
15. Nishina Y., Kobara Y., Sumi T. et al. Expression of c-kit protooncogene is stimulated by cAMP in differentiated F9 mouse teratocarcinoma cells. // *Exp.Cell Res*. V. 198. P. 352-356. 1992.
16. Nocka K., Buck J., Levi E, et al. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. // *EMBO J*. V. 9. P. 3287-94. 1990.
17. O'Farrell P.H., Stumpff J., Su T.T. Embryonic cleavage cycles: how is a mouse like a fly? // *Curr Biol*. V. 14. P. 35-45. 2004.

18. Rossi P., Sette C., Dolci S. et al. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. // *Endocrinol. Invest.* V. 23. P.609-615. 2000.
19. Sandlow J.I., Feng H.L., Sandra A. Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. // *Urology.* V. 49. P. 494-500. 1997.
20. Sette C., Bevilacqua A., Mangia F. et al. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatogonia. // *Development.* V. 124. P.2267-2273. 1997.
21. Sette C., Dolci S., Geremia R. et al. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. // *Int. J. Dev.Biol.* V. 44. P.599-608. 2000.
22. Shrivastava C., Rad-Ziejewski C., Campbel E. et al. An orphan receptor tyrosine kinase family whole members serve as nonintegrin collagen receptors. // *Mol. Cell.* V. 1. P. 25-34. 1997.
23. Silvers W.K. // In "The coat color of mice. A model for mammalian gene action and interaction". – *Spring-Verlag. N-Y. Heidelberg. Berlin.* P.206-223. 1979.
24. Tan J.C., Nocka K., Ray P. et al. The dominant  $W^{42}$  spotting phenotype results from missense mutation in the c-kit receptor kinase. // *Science.* V. 247. P. 209-212. 1990.
25. Wells X.E., O'Neill C. Biosynthesis of platelet-activating factor by two-cell mouse embryos. // *J. Reprod. Fertil.* V. 96. P. 61-71. 1992.
26. Williams D.E., Lyman S.D. Characterization of the gene product of the Steel locus. // *Prog. Growth Factor Res.* V. 3. P. 235-342. 1991.
27. Yang-Feng T.L., Ullrich A., Francke U. The oncogene c-kit (KIT) is located on human chromosome 4 and mouse chromosome 5. // *Cytogenet. And cell genet.* V.46. P.723. 1987.

## INFLUENCE OF MUTANT ALLELS DOMINANT SPOTTING $KIT^{w-v}$ AND $KIT^{w-y}$ ON CLEAVAGE STAGES AND VIABILITY OF EARLY MOUSE EMBRYOS

N.Yu. Sakharova<sup>1</sup>, A.M.Malashenko<sup>2</sup>, E.F.Vikhlyantseva<sup>2</sup>, Yu.A.Kovalitskaya<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Pushchino, Moscow region

<sup>2</sup>The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

<sup>3</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch) of RAN, Moscow region

**Key words:** mice, embryogenesis, mutation of Kit-gene – dominant spotting.

Influence of alleles  $Kit^{w-v}$  and  $Kit^{w-y}$  of mutation Dominant spotting on mouse early development has been studied. Embryos were obtained as a result of mating heterozygous animals between themselves ( $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ) and ( $Kit^{w-y}/+ \times Kit^{w-y}/+$ ) and as a result of reciprocal mating with the wild type C57BL/6 (+/+). On the second day post fertilization embryonic material from oviducts was obtained and embryo-undeveloped eggs ratio was analysed. As for mice  $Kit^{w-v}/+$  considerable amount of undeveloped eggs was found only in case of ( $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ) mating. As for mice  $Kit^{w-y}/+$  high contents of undeveloped egg cells was observed in case of any type of mating. Besides we found that embryos obtained from heterozygous animals were not only on the stage of two blastomeres (as in control +/+) but also on the more later stages (4-8 blastomeres). We showed that in vitro development of 2-cell embryos obtained from mating of  $Kit^{w-v}/+$  and  $Kit^{w-y}/+$  with +/+ animals don't differ from that of +/+ embryos; but embryos from ( $Kit^{w-v}/+ \times Kit^{w-v}/+$ ) and ( $Kit^{w-y}/+ \times Kit^{w-y}/+$ ) mating mostly died on the blastocyst stage.

## Влияние мутантных аллелей на поведение мышей в тесте открытого поля

Ф.З. Магкоева<sup>1</sup>, Т.Б. Бескова<sup>1</sup>, И.Г. Лильп<sup>2</sup>, А.М. Малашенко<sup>1</sup>, И.И. Полетаева<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Научный центр биомедицинских технологий РАМН,

<sup>2</sup>Медико-генетический научный центр РАМН,

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Изучены особенности поведения мышей нескольких линий и генотипов: C3H/SnY, TPS/Y, WR/Y, WR-aa+/Kit<sup>w-y</sup>, WR-A<sup>w</sup>/a, C57BL/10SnY и B10.CW. Обнаружены межлинейные различия в уровнях исследовательской активности (число вертикальных стоек и норковых реакций) и эмоциональной реактивности (число дефекаций и уринаций). Наиболее высокое число вертикальных стоек было у мышей линий TPS/Y и WR/Y по сравнению с мышами других линий и мутациями. Число норковых реакций оказалось наиболее высоким у мышей линий C3H/SnY и TPS/Y, самым низким – у мышей линии C57BL/10SnY. Мутантные гены Kit<sup>w-y</sup> (кодирующий экспрессивность рецепторов трансмембранной тирозинкиназы) и Turg<sup>c</sup> (ген альбинизма) не повлияли на показатели исследовательского поведения. У мышей, несущих аллель A<sup>w</sup>, детерминирующий синтез феомеланина и контролирующей распределение фео- и зумеланина по волосу, обнаружилась пониженная исследовательская активность. Поскольку наиболее низкие уровни испуга были у мутантных форм мышей B10.CW и WR-A<sup>w</sup>a, то предполагается, что ген Turg<sup>c</sup> снижает эмоциональную реактивность мышей линии C57BL/10Sn, а ген и A<sup>w</sup> влияет и на эмоциональное, и на исследовательское поведение мышей WR. Не исключается, что эти гены вызывают какие-то изменения в мозговом «субстрате», фенотипически проявляющиеся у мышей изученных генотипов в виде изменений видоспецифических поведенческих актов. Обсуждаются возможные причины наблюдаемых межлинейных и генотипических различий поведенческих реакций у мышей.

**Ключевые слова:** мыши, генотип, мутации, исследовательское поведение, эмоциональное поведение, межлинейные различия.

Широкие возможности для изучения нейрогенетических, нейрохимических и молекулярных механизмов патологических расстройств, затрагивающих функции центральной нервной системы, дают исследования на экспериментально-биологических моделях с охарактеризованным поведенческим фенотипом [2, 13]. Это могут быть мыши разных генетических линий, мутантные, трансгенные или нокаутные животные. Бурный рост исследований с применением трансгенных животных не исключает проведения работ на линейных и мутантных животных, являющихся ценным объектом для исследования поведенческих реакций.

Более того, в области генетики поведения такие животные имеют даже некоторые преимущества, т.к. конечный эффект поведения у трансгенных и нокаутных животных нередко зависит от генетического бэкграунда [8, 9]. Животные с детально охарактеризованным поведенческим фенотипом дают также возможность «прицельного» и правильного выбора объекта для изучения механизмов поведения, моделирования наследственных неврологических и психических расстройств человека и разработки методов их коррекции [11]. «Good Genetics Need Good Phenotypes» – вряд ли можно выразиться точнее [12].

Ранее нами подробно было изучено поведение и морфология мозга у мышей линий CBA/LacSto, C3H/Sn и 101/HY (далее CBA, C3H, 101/H). У мышей 101/H, характеризующихся генетической нестабильностью предположительно обусловленной мутацией *mut-1*, был найден ряд особенностей в поведении: обнаружена аудиогенная эпилепсия, нарушения памяти и анатомической структуры гиппокампа [4]. Плейотропное действие этой и других мутаций на функции ЦНС и поведение пока изучено недостаточно.

В настоящей работе в унифицированных условиях теста изучено поведение мышей нескольких генотипов и их мутантных форм для оценки влияния некоторых мутаций на поведение животных и использования этих животных в последующих исследованиях для изучения основ функционирования ЦНС.

## Материалы и методики

Экспериментальные животные. Анализировали поведение самцов мышей следующих линий и генотипов: C3H/SnY (далее C3H), TPS/Y (далее TPS), WR/Y, мутации // WR-aa+/Kit<sup>w-y</sup> и WR-A<sup>w</sup>a, C57BL/10SnY (далее B10) и мутации B10.CW (генотип aa cc).

Мутация *dominant spotting*, известная сейчас как Kit<sup>w-y</sup> (ранее обозначалась как W<sup>y</sup>), была обнаружена у мышей линии C57BL/6JY (B6) в 1962 г. в питомнике «Столбовая» и затем введена в линию WR [5]. Ген Kit<sup>w-y</sup> кодирует экспрессивность рецепторов трансмембранной тирозинкиназы. Описан его эффект в сперматогенезе и эмбриогенезе [3]. Реверсия гена *a* к дикому типу A<sup>w</sup> произошла спонтанно в линии WR. Ген A<sup>w</sup> детерминирует синтез феомеланина и распределяет фео- и эумеланины по волосу.

Ген альбинизма *c* (Tug<sup>c</sup> – современный символ) введен серией возвратных скрещиваний от мышей CC57W в линию C57BL/10Sn.

Линия TPS выведена в НИЛ биомоделей РАМН при селекции на повышенную чувствительность к кластогенному эффекту тио-ТЭФ среди потомков от скрещивания мышей 8 линий, включая мышей 101/H. Возможно, мыши TPS унаследовали от мышей линии 101/H дефект эксцизионной репарации, обусловленный уже упомянутой мутацией *mut-1* [6].

Все животные были получены из Научного центра биомедицинских технологий РАМН, после чего их содержали и разводили инбредно в виварии ГУ МГНЦ РАМН [1].

Эксперименты проводили на мышах 2-3-месячного возраста в осенний период 2004 г. Животных содержали в пластиковых клетках размером 26 × 20 × 15 см по 5-7 особей при 12-часовом световом режиме (освещение с 8 до 20 часов). Мыши получали натуральный и гранулированный комбинированный корма ПК-120-1 фирмы «Информкорм» и воду *ad libitum*. В каждой группе было исследовано не менее 7 животных.

Тестирование поведения. Поведение мышей оценивали в небольшой по размеру цилиндрической камере «открытое поле» (Ø 36 см, высота стенок 20 см) с 25 отверстиями в полу (Ø 1 см). В течение 3 мин теста визуально регистрировали число заглядываний в отверстия (норковые реакции), число вставаний на задние лапки (вертикальные стойки), число актов дефекации (по количеству болюсов) и урикации. Два первых показателя отражают исследовательское поведение животных, два последних – испуг животного, его эмоциональную реактивность. В процессе тестирования регистрировали также число эпизодов чистки шерсти – груминга. Этот показатель, формально относящийся к репертуару гигиенического поведения, нередко рассматривают и как индикатор уровня конфликта в поведении между мотивациями страха и исследования среды.

## Результаты

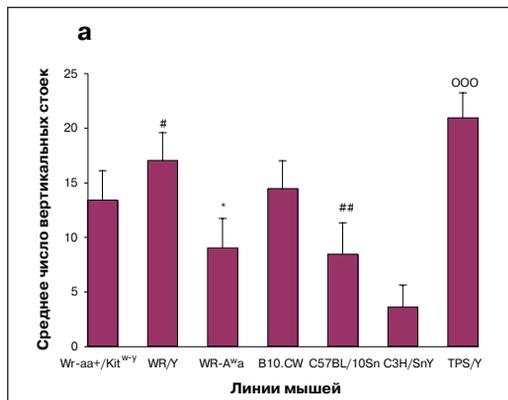


Рис. 1а:

- \* – достоверно отлично от показателя у мышей линии WR при  $p < 0,05$ ;
- ooo – достоверно отлично от показателя у мышей линии C3H при  $p < 0,001$ ;
- # – достоверно отлично от показателя у мышей линии C3H при  $p < 0,001$ ;
- ## – достоверно отлично от показателя у мышей линии C3H при  $p < 0,001$ .

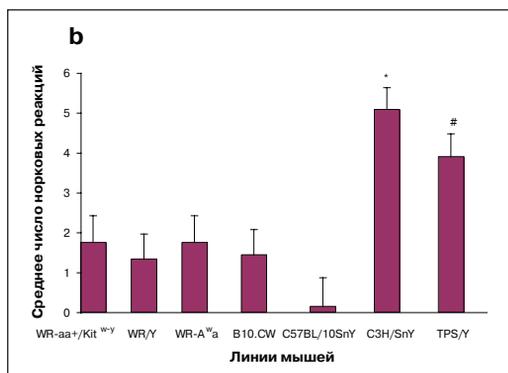


Рис. 1б:

- \* – достоверно отлично от показателя у мышей линий WR и B10 при  $p < 0,001$ ;
- # – достоверно отлично от показателя у мышей линий C3H и B10 при  $p < 0,01$ .

Статистическую обработку проводили с помощью многофакторного дисперсионного анализа ANOVA (стандартный пакет программ Statistica). Сравнивали показатели у мышей исходных линий с их мутантными формами (WR с WR aa +/Kit<sup>w/y</sup> и WR-A<sup>\*a</sup>; B10 с B10.CW) и C3H с TPS), а также показатели поведения у мышей WR, B10, C3H и TPS.

**Исследовательское поведение.** Как видно из рис. 1а среднее число вертикальных стоек за 3 мин тестирования животных было достоверно выше у мышей WR по сравнению с мышами WR-A<sup>\*a</sup>, несущими аллель дикого типа A<sup>\*a</sup> ( $p < 0,01$ ). Различий между самцами линии WR и мышами ее другой мутантной формы WR-aa+/Kit<sup>w/y</sup> не выявлено.

Более высокое число вертикальных стоек было также зарегистрировано у мышей линии TPS и WR в сравнении с мышами C3H ( $p < 0,001$ ).

Число «норковых реакций» – другого показателя исследовательского поведения мышей – наиболее низким оказалось у мышей линии B.10 (рис. 1б). Ни один из мутантных аллелей не повлиял на этот показатель. Достоверные межлинейные различия по числу норковых реакций выявлены между мышами B10 и C3H ( $p < 0,001$ ), а также между мышами WR и C3H ( $p < 0,001$ ) и WR и TPS ( $p < 0,01$ ).

**Эмоциональная реактивность.** Число актов дефекации, являющихся одним из основных показателей испуга животного, оказалось достоверно более высоким у мышей WR по сравнению с возвратной мутацией WR-A<sup>\*a</sup>, ( $p < 0,05$ ) и более низким у мутации B10.CW в сравнении с мышами B.10 ( $p < 0,05$ ) (рис. 2а). Самый низкий уровень дефекации обнаружился у мышей линии TPS (у 91% животных они вообще отсутствовали) по сравнению с мышами всех других изученных генотипов. Напомним, что у мышей этой линии был наиболее высокий уровень исследовательской активности. Самый высокий уровень испуга наблюдали у мышей линии WR, хотя у них же был и высокий уровень исследовательской активности.

Межлинейные различия по этому показателю были выявлены также между мышами линий C3H и WR ( $p < 0,001$ ), B10 и WR ( $p < 0,05$ ) и C3H и TPS ( $p < 0,001$ ) (Рис. 2а).

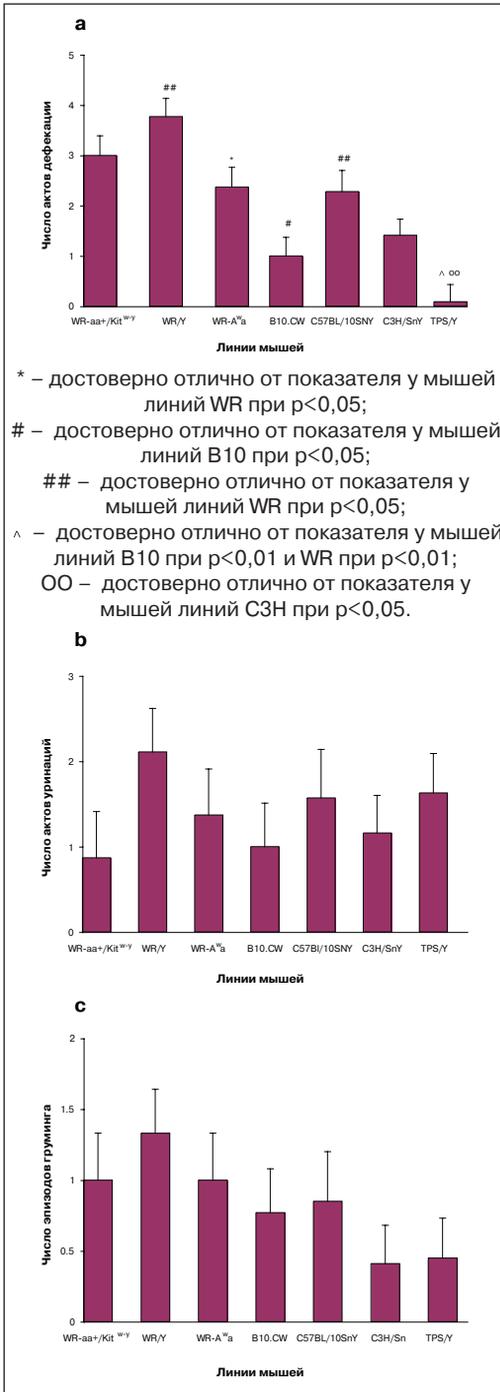


Рис. 2 Эмоциональная реактивность мышей разных генотипов в установке «открытое поле»

На рис. 2б и 2с представлены данные по числу уринений и эпизодов груминга – другим показателям эмоциональной реактивности. Различий между мышами изученных линий и мутаций по числу актов уринения не выявлено. По числу эпизодов груминга достоверные межлинейные различия обнаружались только между мышами WR и TPS ( $p < 0,05$ ) и WR и C3H ( $p < 0,05$ ).

## Обсуждение результатов

При обсуждении полученных данных стоит обратить внимание на два взаимосвязанных вопроса. Первый – это возможный биологический смысл обнаруженных различий, второй – характер изменения анализируемых показателей внутри групп «исходная линия и мутантный генотип».

И норковые реакции, и вертикальные стойки относятся к репертуару исследовательского поведения домашней мыши. Можно было бы предположить, что между количеством этих «единиц поведения» должна была бы существовать положительная корреляция – чем выше уровень исследовательской мотивации, тем больше этих актов поведения должно обнаруживать животное. Однако у исследованных нами групп мышей этого обнаружено не было, за исключением мышей линии TPS, у которых и число стоек, и число норок было относительно высоким (рис. 1а и 1б). Если по уровням вертикальных стоек были найдены различия между мышами линии WR/Y и их мутантной формой – WR-A<sup>a</sup> ( $p < 0,01$ ), а также между мышами C3H и TPS ( $p < 0,001$ ), то по другому показателю – норковым реакциям – таких различий не обнаружено. У мышей линий C3H было наиболее низкое среднее число вертикальных стоек, но наиболее высокое число норковых реакций (рис. 1а и 1б). Такому, казалось бы, несоответствию по показателям, отражающим один и тот же

вид поведения животных, т.е. исследовательское поведение, можно дать два взаимно не исключających объяснения. Во-первых, число вертикальных стоек в условиях небольшой тестовой камеры может быть проявлением высокого уровня локомоторной активности (которая также может служить показателем исследовательской мотивации, но в данном эксперименте специально не изучалась). Во-вторых, в силу генотипических особенностей у мышей одних линий (B10, WR/Y) исследовательская мотивация может обнаруживаться преимущественно в виде вертикальных стоек, а у других (C3H) – в виде норковых реакций. Как уже говорилось, у мышей TPS исследовательская активность была высокой по обоим показателям. Преобладание норковых реакций (а не вертикальных стоек), характерное для мышей линии C3H в нашем исследовании, свойственно и мышам линии CBA, что было обнаружено в сравнительном исследовании [7].

**Хотя большинство поведенческих актов у мышей носят полигенный характер наследования [9], полученные результаты позволяют предположить, что сниженная исследовательская активность мышей WR-A<sup>a</sup> (по уровню вертикальных стоек) в сравнении с мышами WR/Y может быть частично обусловлена влиянием аллельного гена A<sup>a</sup>, поскольку мыши WR/Y и WR-A<sup>a</sup> различаются только по этому гену, а эксперименты были проведены в идентичных условиях и исключали различия во влиянии средовых факторов.**

У мышей TPS выявлен относительно высокий уровень исследовательской активности по обоим показателям. Напомним, что мыши линии TPS были получены от скрещивания 8 линий мышей, в числе которых были и мыши 101/H, характеризующиеся, напротив, крайне низкой исследовательской активностью [4]. Поэтому здесь можно предположить, что исследовательская активность у мышей TPS

контролируется генами иными, чем этот же показатель поведения у мышей 101/H.

Число актов дефекации в условиях тестов, вызывающих у животных испуг, служат мерой «эмоциональной реактивности» животных. При этом уровень актов дефекации и показатели исследовательского поведения находятся, как правило, в обратных соотношениях, т.е. чем выше реакция испуга, тем ниже исследовательская активность и наоборот.

В нашем эксперименте такие «классические» обратные соотношения обнаружались у мышей B10 – низкое число норок и высокое число дефекаций, у мышей B10.CW и TPS – высокое число вставаний и норок (только у TPS) и низкое дефекаций, и у C3H – высокое число норок и низкое дефекаций. У мышей остальных генотипов таких обратных соотношений выявлено не было.

У мышей линии TPS уровень дефекаций был достоверно ниже, чем у C3H, однако по вышесказанным причинам можно лишь с большой долей осторожности предположить, что ген *mut-1*, контролирующей генетическую нестабильность у мышей TPS, влияет на эмоциональную реактивность этих животных. Стоит, правда, отметить, что у самцов 101/H число дефекаций также было невысоким [4].

Поскольку уровни испуга животных были ниже у мутантных форм B10.CW и WR-A<sup>a</sup>, то логично предположить, что ген альбинизма *Tyr<sup>c</sup>*, оказывает определенное влияние на эмоциональное поведение мышей. А различия в поведении между мышами WR/Y и WR/A<sup>a</sup> свидетельствуют о том, что меланиоты отличаются по поведению от мышей дикого типа. Напомним, что ген A<sup>w</sup> детерминирует синтез феомеланина и распределяет фео- и эумеланины по волосу. Вероятно, эти гены могут влиять на какие-то изменения в мозговом «субстрате», на процессы развития и/или функ-

ционирования ЦНС мыши. Это, в свою очередь, выражается в виде зарегистрированных нами фиксированных комплексов действий (fixed action patterns) и, возможно, в нарушениях соотношения показателей страха и исследовательского поведения.

По нашему мнению помещение мыши в установку «открытого поля» небольшого размера, как это было в нашем эксперименте, не должно вызывать сильного испуга животного, поэтому данные по уровням дефекации и уринации, можно частично трактовать также и как показатели, отражающие интенсивность обменных процессов. Однако этот вопрос требует дополнительных исследований.

**Таким образом, в результате исследования были выявлены межлинейные и генотипические различия в исследовательском и эмоциональном поведении мышей, биологический смысл которых пока можно лишь предполагать.** Однако полученные данные служат основанием для изучения механизмов и более глубокого анализа особенностей поведения у мышей, в т.ч. у носителей мутаций. В частности, перспективным направлением в этой области представляются исследования связанные с изучением влияния аллеля  $A^w$ , детерминирующего синтез феомеланина, и гена альбинизма  $Tug^c$ , которые, вероятно, влияют на уровни исследовательской и/или эмоциональной активности. Интересной экспериментальной моделью для будущих исследований являются и мыши линии WR, поведение которых не вписывается в рамки классических представлений — «высокий уровень исследовательской мотивации — низкий уровень испуга». У этих животных в условиях данного тестирования соотношение этих показателей не носило обратного характера и высокая исследовательская активность сопровождалась высоким же уровнем эмо-

циональной реактивности, несмотря на то, что помещение животных в небольшую по размерам камеру вызывает, как правило, умеренный уровень страха.

**Следует также заметить, что во избежание получения ложноотрицательных результатов, исследования эффектов различных фармакологических препаратов на поведение было бы целесообразнее проводить не только на неинбредных мышах из различных стокков, но и на животных, имеющих определенные особенности поведения, выявляемые в различных ситуациях тестирования.**

## Литература

1. Бландова З.К., Душкина В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. — М.: Наука, 189 с., 1983.
2. Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И. Основы этологии и генетики поведения. — М.: Изд-во МГУ, 383 с., 1999.
3. Коломиец О.Л., Курило Л.Ф., Малащенко А.М., Сахарова Н.Ю., Чеботарева Т.А. Изучение эффектов мутантного гена dominant spotting-Yflove ( $Kit^{w/y}$ ) на сперматогенез, раннее эмбриональное развитие и плодовитость мышей линии C57BL/6JY. // *Генетика*, т. 41, № 10, с. 377-1386, 2005.
4. Лильп И.Г., Бизкоева Ф.З., Ревещин А.В. и др. Генетическая модель некоторых наследственных заболеваний человека: особенности поведения, нейрохимии и морфологии мозга у мышей линии 101/HY. // *Генетика*, т. 36, №12, с. 1598-1613, 2000.
5. Малащенко А.М., Суркова Н.И. Новая линия мышей WR — высокочувствительна к цитогенетическому эффекту тиоТЭФ. // *Цитология и генетика*, т. 8, № 5, стр. 387-389, 1979.
6. Малащенко А.М., Крышкина В.П., Суркова Н.И. Влияние отбора на чувстви-

- тельность лабораторных мышей к цитогенетическому эффекту тиюТЭФ. // *Генетика*, т. 18, № 2, с. 241-247, 1982.
7. Салимов Р.М., Полетаева И.И. Факторный анализ организации поведения мышей // *Журн. высш. нервн. деят.*, т. 42, № 2, с. 314-324, 1992.
  8. Clapcote St. et al. Effects of the rd1 Mutation and Host Strain on Hippocampal Learning in Mice // *Behavior Genetics*, v. 35, No. 5, p. 591-601(11). 2005.
  9. Crawley J.N. What's Wrong with My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. — NY: Wiley-Liss. 350 p. 2000.
  10. Genetically Defined Animal Models of Neurobehavioral Dysfunction. / Ed. P. Driscoll. — Boston Basel Berlin: BizkhKuser, 304 p., 1992.
  11. Pfaff D. Precision in mouse behavior genetics. // *PNAS* 98: 5957-5960. 2001.
  12. Tarantino L., Bucan M. Dissection of behavior and psychiatric disorders using the mouse as a model. // *Human Molecular Genetics*. V. 9, No. 6, 953-965. 2000.
  13. Vandenbergh J.G. Use of House Mice in Biomedical Research // *ILAR Journal (Online)* V. 41, No. 3 [http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarjournal/41\\_3/41\\_3Introduction.shtml](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/41_3/41_3Introduction.shtml), 2000.

## THE MUTANT ALLELS INFLUENCE ON THE BEHAVIOR MICE IN OPEN-FIELD TEST

F.Z.Magkoeva<sup>1</sup>, T.B.Beskova<sup>1</sup>, A.M.Malashenko<sup>1</sup>, I.I.Poletaeva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow  
Medical Genetic Scientific Center of RAMS, Moscow  
Moscow State University, Moscow

**Key words:** mice, genotype, investigatory activity, emotional reactivity, mutations.

Male mice of several genotypes (C3H/SnY, TPS/Y, WR/Y, WR-aa+/Kit<sup>w-y</sup>, WR- A<sup>w</sup>a, C57BL/10SnY и B10.CW) were tested in the open-field test (the small arena version). TPS/Y and WR/Y mice revealed the highest scores of rearings. The highest number of hole pokes was characteristic for C3H/SnY and TPS, while C57BL/10SnY mice showed the lowest results. No influence of mutant alleles (Kit<sup>w-y</sup> — the expression of transmembrane tyrosine kinase receptors, and Tyr<sup>c</sup>-albinism) on exploration scores was revealed. Animals with A<sup>w</sup> allele (pheomelanine synthesis and distribution along the hair) showed the decreased exploration level. The fear-induced behavior in B10.CW и WR- A<sup>w</sup>a genotypes had lower scores in comparison to wild type. It was suggested that Tyr<sup>c</sup>-allele decreased the emotional reactivity in C57BL/10Sn, while A<sup>w</sup> allele affected both — emotional reactivity as well as exploration level in WR. The differences in behavior are discussed as the evidence of genotype influences on the brain mechanisms of the species-specific behavioral action patterns.

## Влияние интерферона на мутагенное и цитотоксическое действие вируса гриппа у лабораторных мышей

А.Г. Пирцхелани, Н.А. Пирцхелани, Н.В. Мамаладзе,  
Г.А. Пирцхелани, Н.Г. Джаджанидзе, Г.Д. Капанадзе  
*Тбилисский Государственный Университет,  
Тбилисский Государственный медицинский Университет,  
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

На лабораторных мышах и их эмбрионах изучено антииммуногенное и антицитотоксическое действие эндогенного интерферона при индукции мутации вирусом гриппа A<sub>0</sub>/PR<sub>8</sub>. В работе применены цитогенетические и вирусологические методы исследования. Вирус гриппа A<sub>0</sub> характеризуется мутагенным и цитотоксическим действием. Однократное интраназальное введение животным в разные сроки беременности вируса гриппа A<sub>0</sub> (по 0,2 мл) вызывает достоверное ( $p < 0,001$ ) повышение количества структурных нарушений хромосом (единичные и парные фрагменты, лизис), мутаций (триплоидия, тетраплоидия, анеуплоидия) патологических митозов (полая метафаза, деспирализация, набухание и слипание хромосом), центромерных ассоциаций хромосом и нарушение интерфазных ядер (полное ядро), как у беременных мышей, так и у их эмбрионов. Хромосомы эмбрионов более чувствительны к воздействию вируса гриппа A<sub>0</sub>, чем хромосомы взрослых животных, как до имплантации (бластоцисты), так и на стадии активного органогенеза. Эндогенный интерферон характеризуется выраженным антимутагенным и антицитотоксическим действием. Он в три раза уменьшает частоту мутагенных и цитотоксических эффектов вируса гриппа A<sub>0</sub>.

**Ключевые слова:** Вирус гриппа, интерферон, митозы, хромосомы, мыши, эмбрионы.

Среди причин перинатальной заболеваемости и смертности исключительно важное место принадлежит инфекциям беременных, в частности вирусным болезням. Особенно тяжело эти инфекции протекают у эмбрионов и плодов, так как интенсивное клеточное деление создает благоприятную среду для размножения вирусов, которые оказывают выраженное цитопатогенное воздействие на клетки эмбриона, нарушают их генетический аппарат и часто приводят к гибели.

Если проблема перинатальной вирусной инфекции в настоящее время привлекает к себе все большее внимание, то вопрос о влиянии противовирусных препаратов, в том числе и интерферона на хромосомы эмбрионов при гриппозной инфекции изучен крайне недостаточно.

Имеются единичные сведения о влиянии экзогенного интерферона на хромосомы клеток людей, инфицированных вирусом гриппа [15]. Авторы показали, что экзогенный интерферон снижает число структурных нарушений хромосом.

В наших предыдущих работах было показано, что вирус гриппа A<sub>0</sub> обладает выраженным эмбриотоксическим и мутагенным действием, как в клетках беременных мышей, так и в клетках плодов [13]. Мутагенное действие вируса гриппа установлено также в культурах лимфоцитов человека [11].

Исходя из этого, изыскание препаратов, уменьшающих указанный эффект вирусов, представляется исключительно важным.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния эндогенного

интерферона на хромосомы беременных мышей и их эмбрионов при гриппозной инфекции.

## Материал и методы

Опыты проводились на нелинейных мышах разводки Тбилисского государственного медицинского университета. Первым днем беременности считали день обнаружения влагалищных пробок у самок после подсаживания к ним самцов. В работе использованы патогенный для мышей вирус  $A_0/PR_8$  (в тексте обозначается  $A_0$ ), который вводили интраназально однократно в дозе  $10^4$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл и индуктор интерферона вирус болезни Ньюкасла (в тексте обозначается ВБН) в дозе  $10^7$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл — вводили внутривенно.

Всего исследовано 22-е беременные мыши, 40 эмбрионов на стадии органогенеза и 121 4-х дневный эмбрион, которые распределены в 4 группы: 1) через 6 часов индукции интерферона у беременных мышей их заражали вирусом гриппа  $A_0$ ; 2) мышей заражали только вирусом гриппа  $A_0$ ; 3) вирусом болезни Ньюкасла; 4) контрольная группа.

Для приготовления хромосомных препаратов из клеток беременных мышей использовали метод Форда-Уоллама [16]. Хромосомные препараты из зародышей периода органогенеза (9-12 дневные) готовили по методу Врублевской-Дыбана [18]. Зародышей периода дробления и на стадии бластоцисты исследовали под бинокулярной лупой МБС-2. Подсчет числа blastomeres и хромосомный анализ проводился на препаратах, приготовленных по методу Тарковского [19]. Учет структурных нарушений хромосом проводился по классификации Н.П. Бочкова [5], геномных мутаций Н.П. Дубинина [7], патологи-

ческих митозов — И.А. Алова [2]. Изучение нарушения интерфазных ядер проводилось по модифицированному методу А. Пирцхелани, Н. Мамаладзе [12]. Все полученные данные обработаны статистическими методами.

## Результаты исследования и их обсуждение

Анализ полученных данных показал (таблица), что вирус гриппа  $A_0$  в клетках взрослых мышей вызывает резкое возрастание частоты хромосомных аномалий (структурные нарушения хромосом, геномные мутации). Со дня инфицирования частота этих нарушений постепенно возрастает и на седьмой день достигает 40, 47% (в контроле 2,0%). Аналогичные данные получены клиническими наблюдениями некоторых авторов [9,10].

Следует отметить, что из структурных нарушений в три раза чаще наблюдается лизис хромосом, чем единичные и множественные фрагменты (табл.). Кроме хромосомных аномалий вирус гриппа  $A_0$  характеризуется высоким цитотоксическим действием. Он часто вызывает образование патологических митозов и на 7-й день инфицирования достигает 27,9%. Из патологических митозов при влиянии вируса гриппа  $A_0$  наиболее часто наблюдается полая метафаза, деспирализация и склеивание хромосом, значительно реже трехгрупповая метафаза и набухание хромосом. Из патологических митозов в контроле наблюдается только полая метафаза и склеивание хромосом.

Анализ полученного нами материала показал также, что вирус гриппа  $A_0$  вызывает нарастание нарушения интерфазных ядер: плотноконденсированный хроматин располагается в виде кольца по периферии клетки, а середина остается пустой. Микроскопический анализ

Таблица 1

**Антимутагенное и антицитотоксическое действие  
эндогенного интерферона в клетках взрослых мышей  
и эмбрионов в условиях индукции мутации вирусом гриппа А<sub>0</sub>.**

Варианты	Группа животных	Количество животных	Дни исследования	Число метафаз	Общее число структурных нарушений хромосом (%± ст. от)	Число геномных мутации (%±ст. от.)	Число патологических митозов (%)	Р
А <sub>0</sub>	Взрослые мыши	5	53	500	11,29±1,3	5,13±0,6	19,15±1,8	
		6	7	340	40,2±2,6	5,2±0,7	27,9±1,9	
		5	15	500	4,0±0,9	1,6±0,4	7,3±1,3	
Инт+ А <sub>0</sub> *		6	7	400	13,5±1,4	10,5±0,4	11,3±1,5	<0,001
А <sub>0</sub>	9-12 дн. эмбрионы	20	3	350	33,3±2,6	8,9±2,8	29,8±2,3	
		10	5	300	48,0±4,0	5,5±1,7	45,0±4,0	
Инт+ А <sub>0</sub> *		10	5	350	13,0±2,1	2,0±0,7	19,0±2,0	<0,001
А <sub>0</sub>	4 дн. эмбрионы	45	2	75	30,0±4,6	9,0±2,9	28,3±5,2	
		46	3	100	37,0±4,0	13,7±2,0	35,0±4,7	
Инт+ А <sub>0</sub> *		30	3	50	7,8±4,2	2,2±0,8	12,0±3,8	<0,001

\* – Вирусом гриппа А<sub>0</sub> мышей заражали через 6 часов индукции интерферона.

таких ядер проводился в тех же препаратах, где проводился учет хромосомных аномалий. При влиянии вируса гриппа А<sub>0</sub> в клетках взрослых мышей на седьмой день инфицирования частота нарушений интерфазных ядер достигала 3,4% (в контроле 1,1%). Цитогенетический анализ показал, что под влиянием вируса гриппа резко возрастает частота центромерных ассоциаций хромосом и на 7-е сутки после инфицирования в клетках взрослых мышей они достигали 30,0 % (в контроле 0,8 %).

Мутагенная и цитотоксическая активность вируса гриппа А<sub>0</sub> еще более выражена в эмбриональных клетках (9-12 дневные). Цитогенетический анализ показал, что под влиянием вируса гриппа А<sub>0</sub> на 5-е сутки после инфицирования в клетках эмбрионов число структурных

изменений хромосом составляло 48%, а число патологических митозов – 45% (см. табл.).

Из цитогенетического анализа явствует, что вирус гриппа А<sub>0</sub> в клетках 4-дневных эмбрионов вызывает высокую частоту как структурных нарушений хромосом, так и геномных мутаций и патологических митозов. Например, число структурных нарушений хромосом на 3-и сутки после инфицирования было 17,0%; Геномные мутации 4,0%, а число патологических митозов достигает 35,3%.

Таким образом, эмбриональные клетки оказались более чувствительными к действию вируса гриппа, чем клетки взрослых мышей. Этот факт согласуется с данными других авторов, показавших, что при действии разных факторов внешней среды в большей степени поврежда-

ются клетки плода и эмбриона, чем клетки взрослого организма [3, 6], что, по их мнению, связано с несовершенством защитно-приспособительных механизмов эмбриона.

На возможную связь между цитогенетическим нарушением и эмбриотоксическим эффектом вируса гриппа, с одной стороны, указывает совпадение пиков их действия, и, с другой стороны, известно [11], что клетки с грубыми нарушениями хромосом (лизис, деспирализация, полая метафаза, фрагментация) в дальнейшем элиминируются, так как в изученных нами случаях около 50% делящихся эмбриональных клеток были повреждены указанными изменениями. С большой долей вероятности можно допустить, что эмбрионы с подобными повреждениями хромосом оказывались нежизнеспособными и погибали, т.е. эмбриотоксическое действие вируса было обусловлено его мутагенным и цитотоксическим эффектом.

Таким образом, гриппозная инфекция характеризуется высоким летальным, эмбриотоксическим, мутагенным и цитотоксическим действием. Исходя из этого, большое внимание было уделено выявлению и использованию протекторных веществ, которые уменьшали бы до минимума как нарушения хромосомного аппарата, так и гибель животных и их эмбрионов.

Раньше нами было установлено, что вирус гриппа A<sub>2</sub>/Aichi характеризуется высоким мутагенным действием. Эндogenous интерферон, индуцированный вирусом болезни Ньюкасла, обладает способностью снижать смертность мышей от гриппозной инфекции, а также существенно угнетает мутагенный эффект вируса гриппа [15].

Отмечено, что влияние противовирусных препаратов, в том числе интерферона на генетический аппарат эмбрионов (стадия бластоциста и стадия активного орга-

ногенеза) при гриппозной инфекции изучен крайне недостаточно.

Беременным мышам до моделирования гриппозной инфекции вводили вирус болезни Ньюкасла (ВБН), который вызывает индукцию эндогенного интерферона. Результаты опытов показали, что число аномальных метафаз на фоне эндогенного интерферона уменьшалось с 40,4% (7-ые сутки вируса гриппа A<sub>0</sub>) до 13,5% (p<0,001) (таблица). На фоне интерферона в клетках беременных мышей аналогично уменьшилось число патологических митозов.

Следующая серия опытов проведена на 9-12-и дневных и на 4 дневных эмбрионах. Было показано, что эндогенный интерферон как в клетках 9-12-и дневных эмбрионов, так и в клетках 4-х дневных эмбрионов, в среднем, в три раза уменьшает частоту хромосомных аномалий и патологических митозов. Под влиянием интерферона в три раза снижалась также гибель животных и их эмбрионов. Достоверность наших полученных данных об антимутагенном действии, как экзогенных так и эндогенных интерферонов подтверждена нами и другими авторами [4, 8, 17].

При изучении механизмов действия антимутагенов основную сложность представляет то, что они относятся к соединениям разных классов. Антимутагены обладают свойством включаться в разные биологические процессы. Один из способов реализации протекторных свойств — это дисмутагенизация, т.е. инактивация вредного агента антимутагенном. Второй путь — это участие антимутагенов в активации репарационных процессов. Указанные механизмы изучены и доказаны экспериментально [1, 8]. Исходя из вышесказанного, представляется перспективным использование антимутагенов с лечебно-профилактической целью людьми, имеющими контакт с вирусными инфекциями и другими вредными веществами.

## Выводы

1. Вирус гриппа  $A_0$  обладает мутагенной и цитотоксической активностью, которые зависят от стадии онтогенеза и сроки заражения. Хромосомы эмбрионов более чувствительны к воздействию вируса, чем хромосомы взрослых животных.
2. Вирус гриппа  $A_0$  вызывает в генетическом аппарате 5 типов повреждений: 1. хромосомные аберрации (одиночные и множественные фрагменты. лизис хромосом); 2. геномные мутации (анеуплоидия, триплоидия, тетраплоидия); 3. патологические митозы (полая метафаза, деспирализация, трехгрупповая метафаза, набухание и слипание хромосом); 4. нарушение интерфазных ядер (полное ядро); 5. вирус гриппа вызывает резкое возрастание частоты центромерных ассоциаций хромосом.
3. Эндогенный интерферон обладает выраженным антимутагенным и антицитотоксическим действием. Он в три раза уменьшает мутагенный и цитотоксический эффект вируса гриппа  $A_0$ .

## Литература

1. Алакперов У.К. Антимутагенез. — М.: Наука, с. 13-17, 1984.
2. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. — М., 263 с., 1972.
3. Бариян И.Р. Особенности эмбриотоксического действия вируса гриппа. // *Арх. анат. гист. и эмбриол.*, № 2, с. 53-58. 1985.
4. Бичикашвили Н. — Автореф. канд. дисс., 2003г.
5. Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник И.В. Классификация и методы учета хромосомных аберрации в соматических клетках. // *Генетика*, 8, 5, с. 138-142, 1972.
6. Дыбан А.П., Удалова Л.Д. Изучение хромосомных нарушений на начальных стадиях эмбриогенеза млекопитающих. // *Генетика*, 4, с. 52-65, 1967.
7. Дубинин Н.П. // *В кн. Общая генетика.* — М. Наука, с. 145-160, 1976.
8. Засухина Г.Д. Репаративные механизмы клеток и проблемы окружающей среды. — М.: Наука, 183 с., 1979.
9. Канторович Р.А., Соколова Н.М., Гаврилова Е.М. и др. Действие вируса гриппа на хромосомы человека. // *Биол. эксперим. бол.*, 77, 2, с. 99-102, 1974.
10. Кучерова Н.Г. Влияние гриппозной инфекции на хромосомы клеток человека и животных. // *XIV Международный генетический конгресс. Тезисы докладов.* — М., 343 с., 1983.
11. Михайлова Г.Р., Горшунова Л.П. Цитологическое и кариологическое изучение культур клеток человека. Хроническая инфекция вируса гриппа. // *Цитол. и генетика*. 10, 6, с. 582-534, 1980.
12. Пирицхелани А.Г., Мамаладзе И.В. Нарушение интерфазных ядер митозов и хромосом как показатель общетоксического и мутагенного действия факторов среды на организм. Методические рекомендации. — Тбилиси, 1991.
13. Пирицхелани А.Г. Дисс. ... соиск. степ. докт. мед. н.. 1994.
14. Фролов А.Ф., Дядюн С.Т., Дзяблик И.В. // *Цитол. Генет.*, №1, с. 18-20, 1982.
15. Шелия Г.П., Кинтрая П.Я., Корсантия Б.М., Пирицхелани А.Г. Влияние эндогенного интерферона на эмбриональное и мутагенное действие вируса гриппа у белых мышей. // *Вопросы вирусологии*, № 2, с. 179-183, 1984.
16. Ford E., Wollam D. A study of the mitotic chromosomes of mice of the strong a line. // *Exp. Gell. Res.*, v. 32, p. 320, 1963.
17. Pirtskhelani A., Pirtskhelani G. Investigation of antimutagenous and antitoxic action of interferon and a-tocopherol on the background of metapyrin. //

- Proc. Georgian Acad. Sci. Biol. Ser., vol. 24. v. 1-6, p. 299-301, 1998.*
18. Tarkowski A. An air-drying method for chromosome preparation from mouse ages cytogenetics. 1966, v.5, p.394.
19. Wroblewska L. Dyban A Chromosome preparations from mouse embryos during early organogenesis dissociation after fixation followed by air – drying Stain Technol. 1969, v.44, p. 147.

**THE INFLUENCE OF INTERFERON ON THE MUTAGENIC AND CYTOTOXIC EFFECT OF INFLUENZA VIRUS IN WHITE MICE AND EMBRYONIC**

**A.Pirtskhelani, N.Pirtskhelani, N.Mamaladze, G.Pirtskhelani, N.Jajanidze, G.J.Kapanadze**

*Tbilisi State University,  
Tbilisi Medical State University,  
The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** influenza virus, interferon, mitosis, chromosomes, mice, embryones.

In the laboratory mice and embryo antimutagenic and anticytotoxic effects of the endogenous interferon has been studied during mutation influenza virus A0 (Strain PR8). The ten-day administration of influenza virus A0 (0,2 ml dose) induced high incidence of structural aberrations of the chromosomes (deletions, multiple fragments, lyses) genomic mutations (triploid, tetraploidy) the chromosomal centromere associations and pathologic mitosis (hollow metaphase, K mitosis, chromosomal adhesion) and deterioration of the interphase nuclei (hollow nucleus) as mice and their embryo. Endogenous interferon exerted highly effective antimutagenic and anticytotoxic action. It's decreased incidence and mutagenic and cytotoxic effects of the influenza virus A0 about 3 times.



## Использование ДНК-маркеров для генотипирования инбредных линий лабораторных мышей

В.В. Мартынов, А.М. Малащенко, В.Н. Каркищенко, Т.Б. Бескова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Применение ISSR-ПЦР и RAPD-ПЦР ДНК маркеров для изучения генетического полиморфизма мышей пяти инбредных линий позволило выявить уникальный генетический профиль каждой исследованной линии. Полученные данные могут быть использованы в дальнейшем для создания «ДНК-паспортов» инбредных линий лабораторных мышей, а также для контроля генетической однородности этих линий.

**Ключевые слова:** Мыши, полиморфизм, генетический профиль, ДНК-маркеры.

### Введение

Лабораторные мыши *Mus musculus* являются наиболее востребованным видом лабораторных животных. Их используют для проведения исследований в области онкологии, токсикологии, вирусологии, иммунологии, трансплантологии, физиологии, сравнительной генетики и многих других областях биологии и экспериментальной медицины [1]. Очевидно, что для решения таких разнохарактерных по сути своей задач, необходимо иметь животных с определенными биологическими особенностями — для каждой задачи своими. Выведение инбредных линий позволило получить таких животных. Основным достоинством инбредной линии является то, что все животные внутри этой линии гомозиготны и однородны по генотипу. Использование инбредных животных в эксперименте позволяет получать воспроизводимые результаты и повышает эффективность и надежность биологических исследований.

Генетическая однородность животных в пределах одной инбредной линии поддерживается путем применения специальной методики разведения таких линий [1]. Но даже при тщательном соблюдении всех правил, при разведении инбредных

животных существует опасность нарушения гомозиготности. Причиной этого могут быть спонтанные мутации или случайные скрещивания (генетическая контаминация) [1, 3]. И если мутации приводят к образованию новых линий или сублинейной дивергенции, то случайное скрещивание ведет к необратимой потере гомозиготности, то есть к потере инбредного статуса и соответствующих фенотипических качеств каждого отдельно взятого животного. Опасность генетической контаминации особенно велика, когда в одном помещении содержатся несколько линий с одинаковой окраской шерсти.

Эффективным инструментом контроля генетической однородности мышей инбредных линий являются ДНК-маркеры, основанные на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2, 4–8]. Основными преимуществами таких маркеров является их высокая степень диспергированности по геному, независимость от возраста и физиологического состояния животного, а также простота, надежность и воспроизводимость лабораторных манипуляций, необходимых для выявления таких маркеров. В своем исследовании, направленном на создание генетических стандартов инбредных линий, мы использовали ДНК-маркеры двух типов: Inter-simple sequence repeat (ISSR) —

ПЦР и Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) – ПЦР. Основной принцип, положенный в основу маркеров данного типа, заключается в том, что при амплификации геномной ДНК мышей разных линий с определенными праймерами образуется уникальный для каждой линии спектр продуктов амплификации, характеризующий ее геномную конституцию (рис, табл. 2)

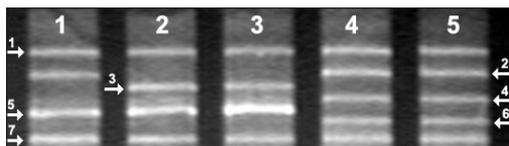


Рис. Электрофоретический спектр продуктов амплификации геномной ДНК мышей пяти инбредных линий с праймером 3. 1 – BALB/c; 2 – DBA/2; 3 – CBA; 4 – C57BL/6; 5 – C57BL/10-GFP. Стрелками 1, 7 обозначены мономорфные зоны, стрелками 2-6 – полиморфные зоны.

### Материалы и методы

Выделение ДНК. Геномную ДНК выделяли из печени трехнедельных самок мышей линий BALB/cLacY (BALB/c), DBA/2 JY (DBA/2), CBA/LacY (CBA), C57BL/6 JY (C57BL/6) и C57BL/10-GFP (C57BL/10) из коллекционного фонда лабораторных мышей НЦБМТ РАМН при помощи набора *Diatom DNA Prep 100* (ООО «Компания Биокон», Россия) по инструкции фирмы-производителя.

Амплификация ДНК. Для амплификации геномной ДНК использовали следующие праймеры: (1)-CACACACACACA-CACA(G/A)G, (2)-CACACACACACACA(G/A)(C/T), (3)-AGCAGCAGCAGC(C/T) и (4)-GACTCGGTATCG. Полимеразную цепную реакцию проводили в термоциклере Терцик («ДНК-технология», Россия). Реакционная смесь объемом 25мкл содержала: 50 нг геномной ДНК, 0.2 мкл *Taq* ДНК-полимеразы (5 ед/мкл) («Fermentas», Литва), 2.5 мкл 10х буфера («Fermentas»), 2 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 мкл 2.5 mM раствора каждого из четырех дезоксирибонуклеотидфосфатов и 20 пМ каждого праймера. Протокол амплификации включал: 1 цикл продолжительностью 7 мин денатурации при 95°C; 35 циклов по 45 сек при 94°C для денатурации цепей ДНК, 45 сек при 64°C для отжига праймеров (1) и (2) и при 62°C для отжига праймера (3) и 1 мин при 36°C для отжига праймера (4), 1 мин 20 сек при 72°C для синтеза комплементарных цепей ДНК для праймеров (1)-(3) и 1 мин 30 сек для праймера (4); и завершающего синтеза в течение 7 мин при 72°C.

Для разделения продуктов амплификации использовали электрофорез в 1,5%-ном агарозном геле («Amresco», США). Для визуализации ДНК использовали краситель EtBr («Amresco») в соответствии с инструкцией фирмы-производителя, гели сканировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 312 нм, при помощи трансиллюминатора Vilber Lourmat ECX-

Таблица 1

### Количество локусов, выявляемых в геноме мыши при помощи праймеров 1-4

Название праймера	Число выявленных локусов	Из них полиморфных
Праймер 1	22	15
Праймер 2	13	2
Праймер 3	20	9
Праймер 4	12	4
Итого:	67	30

15М (Франция), оборудованного видто-системой «Gel Imager-2» для регистрации гелей (Россия). В качестве маркера молекулярной массы при определении длины фрагментов ДНК использовали Gene Ruler 100bp Plus («Fermentas»).

### Результаты

Применение вышеуказанных ДНК-маркеров позволило получить четыре электрофоретических спектра продуктов амплификации, характерных для каждого из четырех использованных праймеров, и тем самым выявить в геноме мышей ряд локусов. Под термином «локусы» здесь мы понимаем фрагменты геномной ДНК, амплифицированные в ходе ПЦР и различающиеся по своей электрофоретической подвижности. Среди выявленных локусов были как мономорфные, так и полиморфные (диморфные) локусы.

В качестве примера того, какие локусы можно считать полиморфными, а какие мономорфными, приводится фрагмент электрофоретического спектра продуктов амплификации геномной ДНК мышей с праймером (3), как наиболее наглядный

(рис.). Ампликоны (зоны) с одинаковой электрофоретической подвижностью, которые присутствуют у всех исследованных линий, являются мономорфными локусами, в то время как ампликоны, которые есть у одних линий, но отсутствуют у других можно считать полиморфными локусами. Так, например, на рисунке зоны, обозначенные стрелками 1 и 7, присутствуют у всех пяти линий, и поэтому представляют собой мономорфный локус. Зона 2 есть только у линий BALB/c, C57BL/6 и C57BL/10, но отсутствует у линий DBA/2 и CBA, то есть этот локус находится в полиморфном состоянии – у одних линий в этом локусе один аллель (видимая зона), а у других линий другой аллель (отсутствие видимой зоны). Точно также полиморфными являются локусы, обозначенные стрелками 3-6.

В соответствии с этим принципом нами были проанализированы все полученные спектры. В результате у мышей исследуемых линий всего было выявлено 67 геномных локусов, из которых 30 оказались полиморфными (см. табл.1). Для всех полиморфных локусов мы составили сводную таблицу распределения аллелей в этих локусах для того, чтобы получить генетиче-

Таблица 2

### Распределение аллелей в 30 полиморфных локусах, выявленных при помощи ДНК маркирования

Линия	Порядковые номера локусов (сквозная нумерация)																														
	Праймер 1															Праймер 2		Праймер 3										Праймер 4			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
BALB/c	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
DBA/2	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	
CBA	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	
C57BL/6	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	
C57BL/10	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	

ский профиль каждой исследованной линии (см. табл. 2), при этом наличие видимой зоны в локусе обозначали знаком «+», а отсутствия видимой зоны знаком «-». Как видно из таблицы 2, каждая линия обладает уникальным генетическим профилем, что позволяет использовать полученные данные для генотипирования и, в перспективе, мониторинга генетической стандартности инбредных линий.

Мыши трансгенной линии C57BL/10-GFP получены из Jackson Laboratory с любезного разрешения А.В.Червонского.

### Литература

1. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. — М.: Наука, 191, 1983.
2. Cheah Y.C., Nadeau J.H., Pugh S., Paigen B. New murine polymorphisms detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR and mapped by use of recombinant inbred strains. // *Mamm. Genome.*, v. 5, No 12, 762-767, 1994.
3. Fitch W.M., Atchley W.R. Evolution in Inbred Strains of Mice Appears Rapid. // *Science*, v. 228, No. 7, 1169-1175, 1985.
4. Iakoubova, O.A., Olsson C. L., Dains K.M., et al. Microsatellite marker panels for use in high-throughput genotyping of mouse crosses. // *Physiol Genomics*, v. 3, 145-148, 2000.
5. Ideraabdullah F.Y., de la Casa-Espéron E., Bell T.A., Detwiler D.A. et al. Genetic and Haplotype Diversity Among Wild-Derived Mouse Inbred Strains. // *Genome Res.*, v.14, 1880-1887, 2004.
6. Mishra M., Dubey N., Totey S.M. et al. Phylogenetic relationships and genetic polymorphisms in wild Indian mice. // *Biomol. Eng.*, v. 18, 281-288, 2002.
7. Venugopal G., Trivedi H.N., Mohapatra S.S. Arbitrary single short primers identify polymorphic DNA markers that distinguish inbred strains of mice. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 203, 659-665, 1994.
8. Wiltshire T., Pletcher M.T., Batalov S. et al. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis defines haplotype patterns in mouse. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, No 6, 3380-3385, 2003.

### USING OF DNA MARKERS IN THE GENOTYPING OF INBRED STRAINS OF LABORATORY MICE

V.V.Martynov, A.M.Malashenko, V.N.Karkischenko, T.B.Beskova

*The Research Center for Biomedical Technology of RAMS, Moscow*

**Key words:** Mice, polymorphism, genetic standardization, DNA markers.

The ISSR-PCR and RAPD-PCR markers have been applied for study of the genetic diversity among five inbred strains of mice. Overall thirty polymorphic loci have been found. The distribution of alleles at these loci is specific for each strain. These results indicate that DNA markers may be successfully used for genotyping inbred strains of mice and monitoring of their genetic purity.

## Криоконсервация культивируемых клеток нейробластомы мышцы N1E-115

С.Н.Мякишева<sup>1</sup>, Н.Ю. Сахарова<sup>2,4</sup>, Н.А.Ивличева<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Моск. обл.,

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Моск. обл.,

<sup>3</sup>Пушкинский государственный университет, Пущино, Моск. обл.

<sup>4</sup>Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Для изучения морфологической дифференцировки нервных клеток в культуре предложена перспективная модель – нейробластома N1E-115 клона C-1300. Были подобраны оптимальные условия для замораживания-оттаивания данной культуры. Показаны способы культивирования нейробластомы и воздействие на культуру различных препаратов, что важно для исследований в области нейробиологии, нейрофармакологии и биомедицины.

**Ключевые слова:** культура нервных клеток, нейробластома, пролиферация, дифференцировка, криоконсервация.

Одной из актуальных медико-биологических проблем нейробиологии является изучение механизмов, обеспечивающих сложные межнейронные взаимодействия в мозге как при экспериментальных воздействиях, так и при патологических состояниях, а также при регенерации. Значительный вклад был внесен в понимание механизмов нейрональной дифференцировки методами, использующими культуру различных нервных клеток [8], изолированных как из нормальных, так и малигнизированных тканей нейрогенного происхождения. Большое преимущество клеточных культур заключается в возможности прижизненного анализа динамики морфологических и функциональных изменений этих клеток в процессе развития [7] или под влиянием биологически активных веществ, вводимых в питательную среду [2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16]. Существенно и то, что для исследования культур может быть использовано большинство известных сегодня нейрогистологических, гистохимических, ультраструктурных и иммуноцитохимиче-

ских методов [3, 6]. Дифференцировка опухолевых нейробластов обратима: клетки могут втягивать образовавшиеся отростки и повторно делиться [18, 19] Связь процесса деления с дифференцировкой, по-видимому, не однозначна [6, 9, 10].

Основное достоинство клеток нейробластомы как модели для изучения процессов дифференцировки нейронов заключается в возможности получения большого количества нервных клеток одного типа и их способности к пролиферации и дифференцировке (морфологической, электрофизиологической и биохимической) [6]. Известно, что при определенных условиях культивирования клетки нейробластомы мышцы обнаруживают свойства, характерные для нормальных нервных клеток. При дифференцировке нейробластомы во многих случаях экспрессируется полная ее программа, т.е. морфологическая дифференцировка как правило сопровождается биохимической и электрофизиологической.

На клетках нейробластомы при изучении механизма действия индукторов кле-

точной дифференцировки основное внимание уделяется взаимодействию их с клеточной мембраной, а также свойствам клеточной мембраны при экспрессии дифференцировки. Основными маркерными признаками нервных клеток является: морфология клетки (наличие у нее специфических нервных отростков), высокая активность ферментов, участвующих в метаболизме нейромедиаторов, электрическая возбудимость клеточной мембраны. Эти особенности характерны и для культивируемых клеток нейробластомы. Уровень спонтанной дифференцировки в культивируемых клетках довольно низкий. Известно много агентов, повышающих уровень дифференцировки клеток нейробластомы, в результате чего они становятся фенотипически сходными с другими нервными клетками [6].

Важно отметить, что в процессе длительного культивирования те или иные свойства клеток меняются, культура претерпевает процесс так называемого старения, поэтому для поддержания постоянства характеристик данной линии прибегают к замораживанию (хранению в жидком азоте) значительного количества клеток одного пассажа и последующему возобновлению культуры из замороженного состояния [1].

В связи с этим целью нашей работы было проведение исследований по изучению пролиферации и дифференцировки нервных клеток нейробластомы мыши N1E-115 клона C-1300 под влиянием изменений окружающей среды и подбор оптимальных условий замораживания — оттаивания данной культуры.

## Материалы и методы

Все исследования были проведены на культуре клеток нейробластомы мыши N1E-115 клона C-1300, которая хранится в

криобанке Института биофизики клетки РАН. Клетки нейробластомы N1E-115 мыши культивировали в среде DMEM (*Sigma*, США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (*Flow Laboratories*, Великобритания) при 37°C. Пересев клеток проводили 2 раза в неделю. В экспериментах использовали клетки на 3-й день после посева. Посевная доза —  $1 \times 10^4$  кл/см<sup>2</sup> поверхности пластиковых флаконов для культивирования. Через 1 сутки первичную среду меняли на среду, индуцирующую дифференцировку. Дифференцировку индуцировали: добавлением в окружающую среду форсколина и аверсектина. Количество дифференцированных клеток оценивали методом прижизненного наблюдения и подсчета в поле зрения под микроскопом. Степень морфологической дифференцировки клеток определяли как долю клеток, образующих отростки (нейриты) длиной не менее 50 мкм, по отношению к общему количеству клеток в каждом из полей зрения микроскопа (не менее 5). Учитывая коэффициент пересчета на кв. см, определяли количество дифференцированных клеток во флаконе. Для статистической обработки материала был использован критерий Стьюдента.

Режимом замораживания было постепенное охлаждение со средней скоростью 0,6-0,7°C / мин до температуры -40°C. Предварительно готовили концентрированную суспензию клеток в среде DMEM и в сыворотке. В качестве криопротектора добавляли 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Затем флаконы быстро переносили в жидкий азот (-196°C).

Оттаивание культуры клеток проводили по следующей схеме. Флаконы из жидкого азота помещали на 2-3 мин в теплую воду (37°C), затем суспензию клеток переносили в центрифужные пробирки и проводили 2-3 отмывания в сыворотке центрифугированием при 500-1000 об/мин. Далее клетки суспендировали в среде

DMEM, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и помещали в культуральные флаконы. После размораживания проводили 2-3 пассажа и затем использовали в экспериментах.

### Результаты исследования и их обсуждение

Как показали наши исследования, выживаемость клеток при замораживании-оттаивании значительно зависит от состава суспензии, в которой проводят заморозку клеток (рис.1).

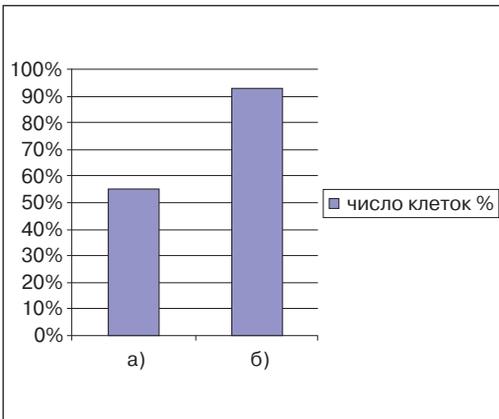


Рис.1. Выживаемость клеток нейробластомы мыши после криоконсервации в зависимости от состава криоконсервирующего раствора:

- а) 10% ДМСО + 90% (среда DMEM с 10% сыворотки)  
 б) 10% ДМСО + 90% сыворотки

Так, при использовании среды DMEM с 10% сывороткой сохраняют жизнеспособность максимум 56% клеток. В то же время при замораживании в 100% сыворотке число жизнеспособных клеток достигает максимум 92 %. Мы предполагаем, что данные результаты можно объяснить тем, что при криоконсервации клеток в культуральной среде DMEM возникает большая вероятность повреждения клеток образующимися кристаллами льда

при замораживании в отличие от замораживания в сыворотке. В то же время, возможно, что и сама сыворотка обладает естественными криозащитными свойствами. Сравнительный анализ показал, что наиболее оптимальными условиями замораживания с сохранением наибольшего числа жизнеспособных клеток нейробластомы является использование 10% ДМСО и 90% сыворотки. При этом концентрация клеток в суспензии составляет не менее 2 млн. в 1 мл.

При изучении пролиферации и дифференцировки было показано, что под действием всех использованных индукторов пролиферирующие клетки нейробластомы претерпевают морфологическую дифференцировку в полном соответствии с картиной, описанной в литературе [6, 9, 17]. При культивировании в среде с 10% сывороткой в присутствии индукторов число морфологически дифференцированных клеток составляет максимум 25-30%, в то время как число дифференцированных клеток в бессывороточной среде и среде с 1%-ой сывороткой достигает 50-60% от общего числа клеток. При культивировании без смены питательной среды (более 3-4 сут) дифференцированные клетки гибнут по типу апоптоза. В большинстве случаев скорость дифференцировки клеток нейробластомы прямо пропорциональна их последующей гибели. Необратимая морфологическая дифференцировка клеток нейробластомы под действием всех индукторов достигается практически одновременно на 3-4-сутки. Для получения больших количеств необратимо дифференцированных нейронов лучше использовать бессывороточную среду DMEM или среду DMEM с 1%-ой сывороткой в комбинации с агентами, вызывающими дифференцировку. Наилучшие результаты были при добавлении в среду в качестве индуктора формосколина (рис.2).

## Литература

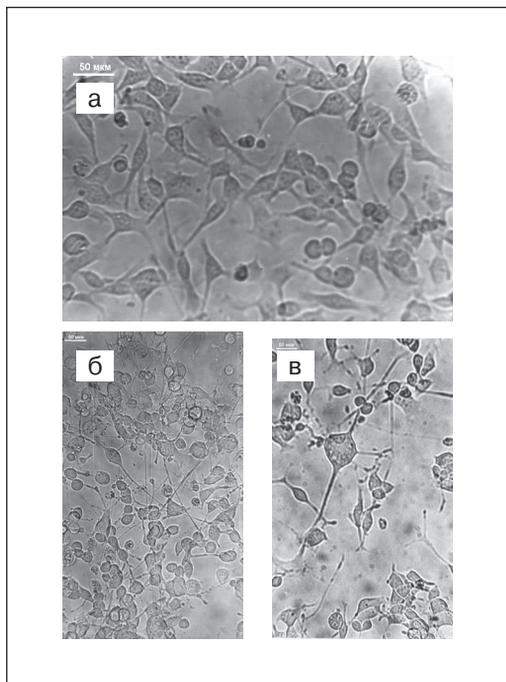


Рис. 2. Культура клеток нейробластомы мыши (6-7 сут. культивирования), 50 мкм  
а) контроль (среда ДМЕМ + 10% сыворотки)  
б) дифференцированная культура нейробластомы (ДМЕМ +1%сыворотки + аверсектин)  
в) дифференцированная культура нейробластомы (ДМЕМ +1%сыворотки + форсколин)

Таким образом, для изучения морфологической дифференцировки нервных клеток в культуре предложена перспективная модель нейробластомы мыши N1E-115 клона С-1300. Были подобраны оптимальные условия для замораживания – оттаивания данной культуры. Показаны способы культивирования нейробластомы и возможности использования ее с целью изучения процессов пролиферации – дифференцировки нервных клеток под воздействием различных препаратов, что важно для исследований в области нейробиологии, нейрофармакологии и биомедицины.

1. Тахова Э.Н., Дмитриева Е.В. Кривоконсервация нервной ткани // *Биофизика живой клетки*, Т. 7, с.65-68 (<http://sam.iteb.rspn.ru/>).2003.
2. Костенко М.А. Ионная регуляция дифференцировки и регенерации нейронов в культуре // *Успехи совр. биол.*, Т. 5, с.221-234. 1980.
3. Костенко М.А., Лермонтова Н.Н. Культивирование нервной ткани и клеток беспозвоночных // В кн.: Руководство по культивированию нервной ткани. – М.: Наука, с.233-242. 1988.
4. Костенко М.А., Мякишева С.Н., Попов В.И. Морфологическая дифференцировка клеток мышинной нейробластомы N1E-115. // *Морфология*, Т. 110, № 4, с.64-70. 1996.
5. Мякишева С.Н., Костенко М.А., Дригнаев В.А., Мосин В.А. Проллиферация и морфологическая дифференцировка клеток нейробластомы в культуре под влиянием авермектинов. // *Морфология*, Т. 120, № 6, с.24-26. 2001.
6. Никольский Н.Н., Вахтин Ю.Б., Игнатова Т.Н. и др. Биология клетки в культуре. – Л.: Наука, 280 с. 1984.
7. Пол Д. Культура клеток и тканей. – М.: Медгиз, 348 с., 1963.
8. Сотников О.С., Костенко М.А. Механическое напряжение и подвижность межклеточных контактов в культуре нервных клеток. // *ДАН СССР*, Т. 281, № 3, с.690-693. 1985.
9. Bodowei R., Hering S., Schubert B. et al. Sodium and Calcium Currents in Neuroblastoma x Glioma Hybrid Cells Before and After Morphological Differentiation by Dibutyryl Cyclic AMP. // *Gen. Physiol. Biophys.*, T4, p.113-127. 1985.
10. Eckert R., Hescheler J., Krautwwurst D. et al. Calcium currents in neuroblastoma x glioma hybrid cells after cultivation with dibutyryl cyclic AMP and nicel. //

- European Journal of Physiology, Pflugers Arch*, V. 417, p.329-335. 1990.
11. Foulds L. Neoplastic development. // *L.: Acad.Press*, V. 1. 1969.
  12. Foulds L. Neoplastic development. // *L.: Acad.Press*, V. 2. 1975.
  13. Kostenko M. A., Myakisheva S.N. The Role of Chemotaxis in Morphological Differentiation of Mollusc Neurons. // *Comp. Biochem. Physiol.*, V.115A, № 3, p.265-268. 1996.
  14. Kostenko M.A., Myakisheva S.N., Popov V.I. Morphological differentiation of N1E-115 mouse neuroblastoma cells. // *Neurosci. Behav. Physiol.*, 27 (5), p.516-523. 1997.
  15. Kruman I.I., Kostenko M.A., Gordon R.Ya. et al. Differentiation and apoptosis of murine neuroblastoma cells. // *Biochem.Biophys. Res. Commun.* V. 191(3), p.1309-1318. 1993.
  16. Perez-Juste G., Aranda A. Differentiation of mouse neuroblastoma cells by phorbol esters and insulin-like growth factor 1 is associated with induction of *retinoic acid receptor  $\beta$  gene expression*. // *ONCOGENE*, V. 18, № 39, p.5393-5402. 1999.
  17. Prasad K.N. Differentiation of neuroblastoma cells in culture. // *Biol. Rev.*, V. 50, p.129-265. 1975.
  18. Schubert D., Humphreys S., Baroni C., Cohn M. In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, V. 66, p.5611-5615. 1979.
  19. Seeds N.W., Gilman A.G., Amano T., Nirenberg M.W. Regulation of axon formation by clonal lines of a neural tumor. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, V. 66, p.160-167. 1970.

## CRYOPRESERVATION OF CULTIVATED CELLS OF THE MOUSE N1E-115 NEUROBLASTOMA

S.N. Myakisheva<sup>1</sup>, N.Yu. Sakharova<sup>2,4</sup>, N.A Ivlicheva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow Region,*

<sup>2</sup>*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow Region,*

<sup>3</sup>*Pushchino State University, Pushchino, Moscow region,*

<sup>4</sup>*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** in vitro culture of neuron cells, neuroblastoma, proliferation, differentiation, cryopreservation.

The mouse neuroblastoma N1E-115, Clone C-1300, was proposed as a perspective model for the studying of nerve cell morphological differentiation in culture. We have selected the optimal conditions for the freezing-thawing of this cell culture. The method of neuroblastoma cultivating, that allow to investigate the influence of different preparations on the nerve cell proliferation-differentiation processes were worked out. These data may play an important role in neurobiology, neuropharmacology and biomedicine investigations.

## Морфологическая характеристика болезни Тиззера у лабораторных грызунов

Э.Х.Абдрашитова

Научный Центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Описана морфологическая характеристика болезни Тиззера, широко распространенной среди лабораторных мышей конвенционального разведения. Возбудителем заболевания является *Bacillus piliformis*, паразитирующая в высококодифференцированных клетках: мышечные энтероциты, гепатоциты, нейроны. Патологические изменения имеют место, как правило, в печени, миокарде и кишечнике. В печени и миокарде – это некротические очаговые изменения, в кишечнике – воспалительные изменения в области илеоцекального угла. Возможно острое, хроническое течение, а также бациллоносительство. При остром течении отмечается высокая летальность.

**Ключевые слова:** мышь, болезнь Тиззера, некроз, печень, миокард, кишечник.

Болезнь Тиззера чрезвычайно распространена среди лабораторных животных конвенционального разведения. Она протекает как в острой форме, вызывая массовый падеж животных, так и в хронической. В последнем случае, неучтенная исследователями, может внести значительные разночтения в результатах эксперимента.

Возбудителем болезни считается *Bacillus piliformis*, однако до настоящего времени этот вопрос остается спорным: бактерия постоянно выделяется при данном заболевании, но степень ее ответственности за начало последнего остается не выясненной [1].

*B. piliformis* – весьма полиморфная палочка, размерами 0,5×8–10 мкм, подвижная, спорообразующая. Окрашивается в мазках и гистологических срезах по Гимза, PAS-положительная, импрегнируется серебром. Вегетативные формы весьма неустойчивы во внешней среде в отличие от споровых форм.

Особенностью этого микроба является то, что он не растет на искусственных питательных средах, однако он хорошо культивируется на куриных эмбрионах, подобно вирусным агентам. Является обли-

гатным внутриклеточным паразитом, проявляя, как и вирус, тропизм к высококодифференцированным клеткам, не относящимся к мезенхимальным тканям, в отличие от других цитофильных инфекций (сальмонеллез, бруцеллез и др.), паразитирующих в фагосомах защитной мезенхимальной системы, т.е. как правило он паразитирует в гепатоцитах, энтероцитах, мышечных клетках, нейронах.

Заболевание распространено на всех континентах, наиболее широко – среди мышей, но спонтанное заболевание описано у крыс, хомяков, монгольских песчанок, кроликов, Rh-обезьян, кошек, собак, лошадей. Резистентными считаются цыплята. Распространено бациллоносительство, что является источником распространения инфекции алиментарным путем.

Клинически заболевание проявляется не всегда. Протекает в латентной форме, проявляется внезапной потерей нескольких животных. При остром течении отмечается водянистая или геморрагическая диарея, длящаяся несколько дней и заканчивающаяся гибелью животного. Чаще гибнет отъем, смертность может быть чрезвычайно высокой.

Патологическим изменениям подвергаются, главным образом, печень (рис. 1, 2), миокард (рис.3) и кишечник (рис.4). Наиболее выражены патологические изменения в печени. Здесь развиваются множественные очаги некроза, диаметром 0,5-3 мм, четко ограниченные, расположенные, как правило, перипортально. Вокруг очага некроза в зависимости от стадии его развития отмечается мононуклеарная или же нейтрофильная инфильтрация, однако реакция окружающей ткани на некроз слабо выражена.

Диагностическим признаком считается наличие в живых гепатоцитах по границе с некротическими множества палочек, упакованных в пачки, обнару-

живаемых на гистологических препаратах, окрашенных по Гимза, PAS-реакции, импрегнированных серебром. Однако выявление микроба гистологическими методами представляет определенные трудности [2].

Поражение миокарда заключается также в развитии некротических изменений макроскопически на передней стенке левого желудочка диагонально расположенные полосы некротизированной ткани белого или сероватого цвета чередуются с розового цвета полосами нормальной ткани, что создает картину так называемого «тигрового сердца», характерного для данного заболевания.

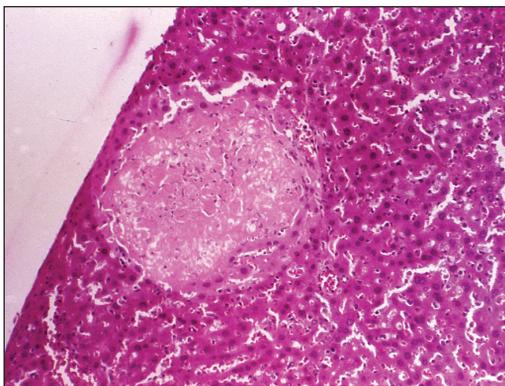


Рис. 1 Болезнь Тиззера. Некротический очаг в печени. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. 10×10

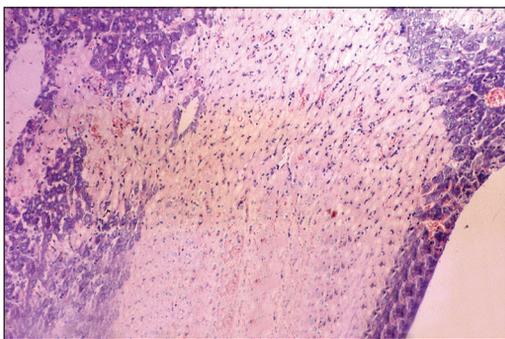


Рис. 2 Болезнь Тиззера. Обширный некроз в печени. Окраска: по Гимза-Романовскому. Ув. 10×10



Рис. 3 Болезнь Тиззера. Некроз миокарда. Окраска: PAS-реакция. Ув. 10×10

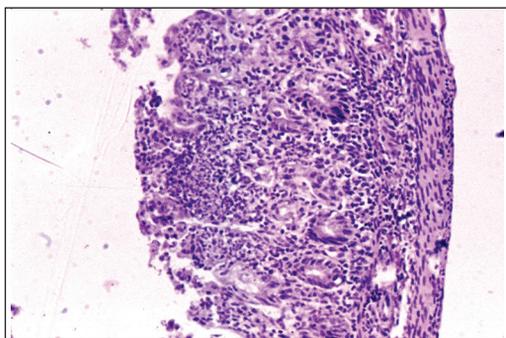


Рис. 4 Болезнь Тиззера. Воспалительная инфильтрация собственного слоя стенки кишки с деструкцией ворсин и крипт. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. 10×10

Поражение кишечника сосредотачивается чаще всего в области илеоцикального угла. Отмечается отёк лейкоцитарная и лимфоцитарная инфильтрация слизистой оболочки дистального участка тонкой кишки, слепой и восходящего участка толстой. В ряде случаев имеют место геморрагии в слизистую оболочку. Однако поражения кишечника не всегда ярко выражены, иногда макроскопически даже не видны.

Диагностика заболевания основывается на:

1. Данных патологоаналитического исследования (что описано выше). Особенно диагностическим является интрацеллюлярное обнаружение палочек в средах и отпечатках.
2. Применим метод провокации. Для этого используют обработку мышей кортизоном в дозе 100-200 мг/кг подкожно или внутримышечно. Через 7-10 суток исследуют печень.
3. Наиболее употребимы серологические методы: реакция связывания комплекта (фиксация) антител специфиче-

ским антигеном. Существуют стандартные диагностические тест-системы.

4. Профилактика заболевания [3] состоит в строгом соблюдении зооигиенических мер. Перенаселенность в помещениях разведения, транспортировка, неполная диета, экспериментальные нагрузки в виде облучения, обработки стероидными гормонами и т.д. могут сделать латентное течение заболевания явным, острым и привести к гибели животного.

### Литература

1. *Ganaway J.R., Allen A.V., Moore F.D. Tyzzer's Disease. // In: "Symposium" Diseases of Laboratory Animals complicating biomedical research. Chicago, Illinois, 13 april, 717-732, 1971.*
2. *Kosaku F. Tyzzer's Disease. // Japan J. Exp. Med. Vol 48, No. 6, p. 467-480, 1978.*
3. *Manual of Basic Techniques for a Health Laboratory. // 2-nd. WHO Geneva, 2003.*

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF TYZZER'S DISEASE OF LABORATORY ANIMALS

E.Kh. Abdrashitova

*The Research Center for Biomedical Technology of RAMS, Moscow*

**Key words:** mouse, Tizzer's disease, necrose, liver, miocardia, intestinum.

Described pathological changes due to Tizzer's disease in liver, myocardium and intestinum.



## Модификация метода реципрокной трансплантации кожи у лабораторных мышей

Т.Б.Бескова

*Научный Центр Биомедицинских Технологий РАМН, Москва*

Изменена форма трансплантата. В результате этого сокращено время операции и уменьшена смертность оперируемых мышей.

**Ключевые слова:** трансплантация кожи, инбредные мыши, гомозиготность.

Метод реципрокной изотрансплантации кожи широко применяется при разведении линейных мышей и крыс для контроля генетической однородности [1, 2] и для идентификации гаплотипов инбредных линий [3, 7]. Существует целый ряд методов, используемых в тех же целях: изучение генов окраски, применение иммуногенетических и биохимических маркеров (электрофорез белков крови, методы, основанные на полимеразной цепной реакции), мандибулярный анализ, анализ кариотипа (для линий с хромосомными перестройками), определение доли прицентромерного гетерохроматина [5-8]. Поскольку совместимость тканей является полигенным признаком, достоинством метода трансплантации кожи заключаются в контроле гомозиготности по большому числу генов, позволяющем своевременно обнаружить генетическое засорение и слабые генетические различия, обусловленные остаточной гетерозиготностью или мутациями. Кроме того, этот метод даёт возможность повторно использовать животных для подтверждения результата и относительная прост в техническом смысле.

Руководства по применению метода издавались многократно, очень подробно методика описана З. К. Бландовой [1]. Поэтому здесь я остановлюсь только на некоторых изменениях, к которым пришла в результате собственного практиче-

ского опыта. Вероятно эти советы будут полезны не только начинающим, но и тем, кто, практикует этот метод уже давно, но не в таком объеме, чтобы «набить руку» до автоматизма.

Как правило, наибольшее затруднение вызывает определение времени наркоза, так чтобы животное не погибло и не проснулось раньше времени. Переносимость применяемого обычно эфирного наркоза не только различна у разных линий, но зависит еще от многих факторов: пола, возраста, состояния животного, даже от атмосферных процессов во время операции. В любом случае желательно сократить пребывание животного под наркозом до минимума. Как ускорить проведение операции? Во-первых, сэкономить время можно, изменив форму трансплантата и главное — соответствующего «окошка» — ложа. Как известно, по классической методике пересадки кожи с хвоста на бок рекомендуется у наркотизированной мыши на подготовленном поле в области спины выстричь 2-3 квадратных окошка размером 10-12 кв. мм. Эту (основную!) часть работы можно ускорить в четыре раза, если окошки делать не прямоугольными, а овальными, для чего следует, оттянув кожу пинцетом, сделать ножницами одноединственное режущее движение непосредственно под кончиками пинцета. Ножницы должны быть развернуты вдоль

тела животного. Разумеется, с овальным окошком плохо совместим трансплантат прямоугольной формы. Но почти идеально, учитывая растяжимость кожи, в овал ложится ромб. Сделать трансплантат ромбовидной формы не составит большой сложности. Для этого кожу, снятую с ампутированного кончика хвоста и разрезанную на продольные полосы, нужно далее нарезать на кусочки, развернув ножницы к продольной оси этих полос не под прямым, а под острым углом — трансплантаты получатся ромбическими (рис.).

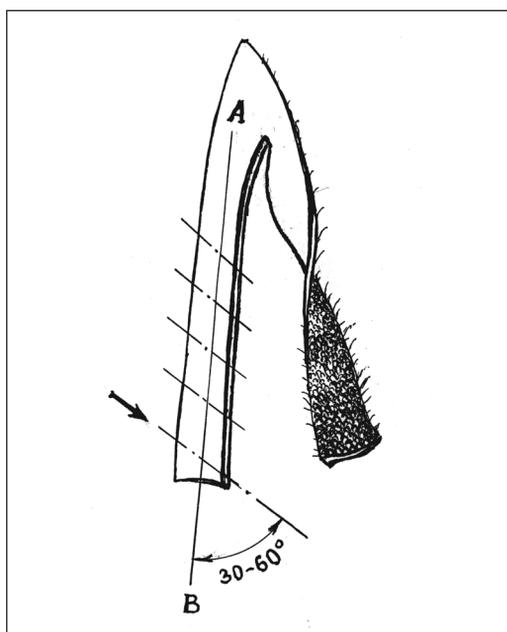


Рис. Выкраивание трансплантатов ромбовидной формы

*Стрелкой указано направление ножниц при нарезании трансплантатов из полоски кожи, снятой с хвоста, по отношению к продольной оси (линия А.В.) этой полоски.*

Во-вторых, ускорить ход операции помогает предварительное приготовление повязок. Согласно методике, после пересадки трансплантатов, прежде чем перебинтовать животное лейкопластырем, на операционное поле накладывают четырехслойную

стерильную марлевую салфетку и закрепляют ее коллодием. Но, поскольку коллодий в настоящее время практически вышел из употребления, приходится прикреплять марлю к лейкопластырю, которым перебинтовывается животное. Чтобы не тратить время, в течение которого животное находится под наркозом, на отматывание, отрезание лейкопластыря и прикрепление к нему салфетки, следует подготовить повязки до того, как дать животному наркоз. Накануне операции автоклавируют обычные стеклянные банки объемом 0,8 или 1 литр, предварительно накрыв их металлическими крышками и плотно обернув бумагой. После подготовки трансплантатов отрезают кусок лейкопластыря и, прикрепив к нему марлю, опускают в стерильную банку так, чтобы конец с салфеткой не касался дна. Противоположный конец закрепляют у горловины банки и прикрывают ее крышкой. Можно подготовить сразу 3-4 таких повязки в одной банке и вести операции «конвейером». Кстати можно для повязок использовать и готовый бактерицидный пластырь, но в этом случае поверх он также закрепляется обычным 3-сантиметровым лейкопластырем, а стерильные салфетки все равно должны быть под рукой на случай кровоточивости ложа.

И последнее. Иногда для того, чтобы после операции помочь мыши скорее выйти из наркоза, некоторые экспериментаторы дуют в мордочку животному, производя нечто вроде искусственного дыхания «изо рта в рот». Следует помнить, однако, о разнице в частоте дыхания человека и мыши. В подобном случае лучше подносить животное мордочкой к струе воздуха от вентилятора.

Всего за период с апреля 1997 г. по март 2005 г. в ходе плановых проверок племенных ядер мышей инбредных линий коллекционного фонда по классической методике было прооперировано 91 животное, а по модифицированной — 57. При

этом гибель животных, находившихся под наркозом сократилась с  $9,9\% \pm 3,1$  до  $3,5\% \pm 2,5$ . Различие достоверно по второму порогу вероятности  $P > 0,01$ , расчёты производили по методу Фишера [4]. Уровень отторжения трансплантатов по техническим причинам сократился с  $8,7\%$  до  $4,8\%$ , но разность не достоверна из-за малого количества мышей, прооперированных по видоизменённой методике. Предполагается накопление данных в ходе дальнейших проверок животных на генетическую однородность.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бландова З.К., Душкин В.А., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. М.: «Наука», 1983, с. 143-156.
2. Бландова З.К., Шмидт Е.Ф., Раткин А.Э. Исследование гомозиготности мышей инбредных линий коллекционного фонда НИЛ Биомоделей АМН СССР. Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований, часть I. М., 1988, с. 63-68.
3. Раткин А.Э., Бландова З.К. Идентификация гаплотипа H-2 некоторых линий мышей из коллекционного фонда НИЛЭБМ АМН СССР. Проблемы сохранения и поддержания генетических коллекций лабораторных животных. Пуцино, 1991, с. 52-58.
4. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во Московского университета, 1970, с. 130-132.
5. Cheah Y.C., Nadeau J.H., Pugh S., Paigen B. New murine polymorphisms detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR and mapped by use of recombinant inbred strains. *Mamm. Genome.*, 1994, v.5, No 12, 762-767.
6. Iakouboba O.A., Olsson C.L., Dains K.M., Choi J., Kalcheva I., Bentley L.G., Gunanan M., Hillman D., Louie J., Machrus M., West D.B. Microsatellite marker panels for use in high-throughput genotyping of mouse crosses. *Physiol. Genomics.*, 2000, v. 3, p. 145-148.
7. Klein J. H-2 Mutations: Their Genetics and Effect on Immune Functions, *Advances in immunology. N.-Y.*: 1978, v. 26, p. 64-67.
8. Namura T., Esaki K., Tomita T. Manual for genetic monitoring of inbred mice. *ICLAS. Univ. Tokyo Press.*, 1984, p. 181-182.

## MODIFICATION OF SKIN GRAFTING METHOD IN LABORATORY MICE

T.B. Beskova

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** skin grafting, inbred mice, homozygosis.

The form of graft was changed. In consequence that, the duration of operations were diminished and the mice death-rate time during of operation was reduced.

## Способы стерилизации гранулированного корма для гнотобиотических животных

Л.А.Болотских

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Выбраны оптимальные режимы стерилизации гранулированного корма для гнотобиотических животных в автоклаве и гамма-лучами. Установлено, что данные способы стерилизации обеспечивают нормальный рост и развитие гнотобиотических животных.

**Ключевые слова:** гнотобиотические животные, гнотобиологические изоляторы, стерилизация.

Развитие гнотобиотехнологии в настоящее время позволяет получать гнотобиологические модели на различных видах животных: крысах, мышах, кроликах, морских свинках, мини-поросятах и т.д. Технологические приёмы получения и выращивания гнотобиотов отдельных видов животных описаны в различных трудах [2-5]. Однако следует отметить, что вопросы кормления и стерилизации диет для гнотобиотов требуют дальнейшего изучения и стандартизации. Диеты для гнотобиотических животных разрабатываются, прежде всего, с учётом их дальнейшей стерилизации. Стерилизуют диеты различными путями: автоклавированием или облучением, обработкой газом [1]. Однако, даже радиационная стерилизация с использованием электрофизических источников ионизирующего излучения, также как и другие электрофизические методы (например, СВЧ) подобно тепловому способу, снижает питательную ценность кормов, в частности уменьшает содержание некоторых витаминов [6,7].

При стерилизации паром значительному разрушению подвергаются витамины: витамины группы В разрушаются почти полностью (90%), остальные (пиридоксин, фолиевая кислота, витамины А, С, Е) разрушаются примерно на 50%.

В НИЛбиомоделей (ныне НЦБМТ РАМН) были подобраны наиболее оптимальные способы обработки кормов, обеспечивающие надёжную стерилизацию последних и, в то же время, достаточно щадящие в отношении сохранения их питательной ценности. Для стерилизации мы используем отечественные автоклавы ГК-100-3М, кобальтовый облучатель, аппарат для сварки полиэтиленовых плёнок М-АП-2-С.

Схема стерилизации гранулированного корма в автоклаве представлена на рис. 1,2.

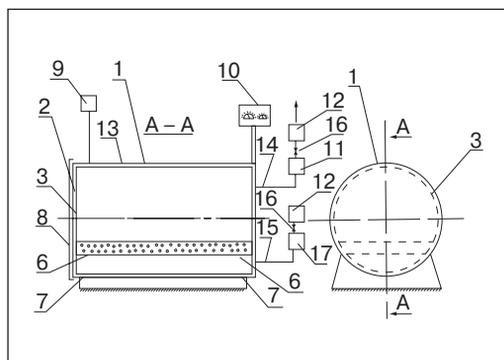


Рис. 1 Схема стерилизации гранулированного корма в автоклаве

На рис. 1 изображен общий вид автоклава с размещенным в нем изолированным цилиндром с подносом; на рис. 2 по-

казан в продольном сечении цилиндр с подносом; на рис. 3 — размещение подноса в цилиндре (вид сбоку).

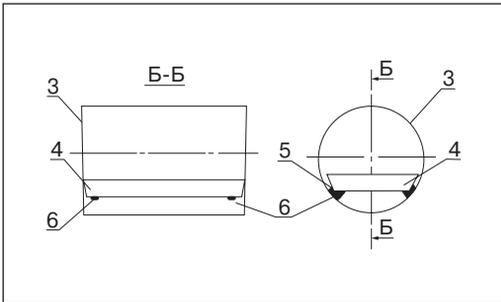


Рис. 2. 1 – изолированный корпус; 2 – камера; 3 – герметичный цилиндр; 4 – поднос; 5 – отбортовки подноса; 6, 7 – опоры; 8 – крышка в автоклаве; 9 – источник энергопитания; 10 – контрольный измерительный блок; 11 – вакуумметр; 12 – компрессор; 13 – нагреватели; 14, 15, 16 – коммуникации систем вакуумирования, подача воздуха и запорная арматура; 17 – манометр.

### Технологическая схема

Способ стерилизации гранулированного корма для гнотобиологических моделей состоит в следующем. Стерилизация проводится в камере 2 в автоклаве. Для этого в нее помещают герметичный цилиндр 3 с подносом 4, имеющий отбортовки 5, выполненные из нержавеющей стали.

На подносе 4 гранулы корма укладывают ровным слоем, равным 4-5 толщинам гранулы. Перед автоклавированием в автоклаве создают давление 0,115-0,120 Мпа с нагревом камеры 2 до 121-124°C, выдерживают при этой температуре в течение 5 мин., вновь создают вакуум 0,085-0,090 Мпа и температуру 121-124°C и в этом режиме проводят стерилизацию в течении 15 мин., выпускают из камеры 2 пар и создают вакуум 0,085-0,090 Мпа в течении 10 мин для окончательной сушки корма.

После стерилизации корма регистрируют температуру по термометру, укрепленному в контейнере под пленкой. Не допускается проведение корма в изолятор, если температура в контейнере была ниже 121°C. После автоклавирования цилиндр присоединяется к наружному отверстию аэрошлюза при снятой наружной крышке. Соединение герметизируется переходником и несколькими слоями клейкой ленты типа ПТФ. Затем производится распыление 2% раствором перуксусной кислоты. По истечении 30 минут экспозиции внутренняя крышка аэрошлюза изолятора открывается. Длинным острым инструментом пробивают пленку, закрывающую отверстие присоединенного контейнера и корм переводят в камеру изолятора. Расстыковку гнотобиологического изолятора и контейнера производят в обратном порядке.

Апробирован и другой способ стерилизации гранулированного корма- стерилизация гамма-лучами. Этот вид стерилизации считается наиболее щадящим. Гранулированный корм расфасовывают в полиэтиленовые мешочки, устойчивые к химическим дезинфектантам и обладающие определенной механической прочностью. Запаявают мешочки на машине для сварки полиэтиленовых пленок М6-АП-2С. Герметично запаянные мешочки с кормом помещают в такие же мешочки несколько большего размера. Упакованный в двойные мешочки корм подвергают облучению различными дозами на кобальтовом облучателе.

Стерилизации гранулированного корма в автоклаве, применяемая в НЦБМТ РАМН, эффективна и обеспечивает высокую сохранность питательности корма. Обработка гранулированного корма гамма-лучами в дозе 2,5 Мрад. также, даёт надёжные результаты, однако она требует больших материальных затрат.

### Литература

1. *Базалеев Н.И., Клепиков В.Ф., Литвиненко В.В.* Электрофизические радиационные технологии. — Харьков: Акта, 206 с. 1998.
2. *Болотских Л.А., Лушикова З.С.* Усовершенствованный способ получения гнотобиотических животных. // *Биомедицина*, № 1, с. 114-117, 2005.
3. *Болотских Л.А., Подопригора Г.И.* Безантисгенные мини-поросята — новая категория гнотобиотов для медико-биологических исследований. // *В сб.: Биолог. характ. лаб. жив. и экстраполяция на человека экспер. данных*, с.93-94, 1980.
4. *Подопригора Г.И., Душкин В.А., Болотских Л.А. и др.* Оперативные методы получения безмикробных мышей, крыс и морских свинок. // *Вестник АМН*, № 12, с. 54-58, 1981.
5. *Подопригора Г.И.* Гнотобиология на рубеже двух столетий. // *Вестник АМН*, № 14, с. 239-251, 1996.
6. *Diehl J.H.* Nutritional effect of combining irradiation with other treatments // *Food Control*. P.20-25, 1991.
7. *Kilkast D.* Effect of irradiation on vitamins // *Food Chemistry*, vol. 49. p. 157-164, 1994.

## STERILIZATION METHODS OF GRANULATED FEEDS FOR GNOTOBIOTIC ANIMALS

L.A.Bolotskih

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key words:** gnotobiotic animals, gnotobiological isolation ward, sterilization.

The optimal regime for food's sterilization with using autoclave and  $\gamma$ -rays was choosing. These methods provide the normal growth and development of gnotobiotic animals.

## Рентгенологический контроль за процессами костеобразования при непосредственной установке имплантата в лунку удаленного зуба в эксперименте

Ж.А. Ашуев, А.А. Кулаков, Г.Д. Капанадзе

*Центральный НИИ Стоматологии Росздрава, Москва*

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Необходимость тщательного рентгенологического анализа структуры костной ткани челюстей мини-свиней обусловлена анатомическими особенностями строения костной ткани. Было показано, что немедленная умеренная функциональная нагрузка ускоряет костные регенерационные процессы. Рентгенологические экспериментальные исследования доказали целесообразность использования непосредственной установки имплантатов в костную лунку.

**Ключевые слова:** рентгенологический анализ, непосредственная имплантация, био-модель, непосредственные нагрузки.

В современных условиях дентальная имплантация становится одним из наиболее востребованных методов лечения частичной и полной утраты зубов. В исследованиях на животных и в сериях клинических испытаний было показано, что при определенных обстоятельствах имплантаты можно нагружать сразу после их установки.

Преимущества этого вида дентальной имплантации очевидны: создаются условия для ранней нагрузки, что способствует заживлению костной раны и укреплению имплантата, его быстрому функциональному включению в единый блок с сохранившимися зубами; нет необходимости использовать имediat-протез. Общие сроки окончательного лечения сокращаются, а техника оперативного вмешательства не усложняется.

При зубной имплантации очень важны анатомические особенности строения челюстей и высота альвеолярного отростка челюсти [2]. Следовательно, необходим тщательный рентгенологический анализ структуры костной ткани челюстей. Для планирования инсталляции имплантатов без риска повре-

ждения определенных анатомических структур нужна полная информация о морфологии и топографии кости [3, 5]. Срок службы имплантата зависит от первичной стабилизации, от ее длительного сохранения, а также от состояния слизистой оболочки по периферии шейки имплантата, которое изучается клиническими методами [4].

Поскольку основными показателями достоянств непосредственной или отсроченной имплантации является биодинамическое равновесие имплантата в челюстной кости, мы проводили рентгенологический контроль за ходом остеоинтеграции в сроки от 1 до 6,5 мес. при непосредственной имплантации в эксперименте на мини-свиньях. Использовали мини-свиней светлогорской популяции в возрасте 3 лет массой тела 40–60 кг. Выбор биомодели был обусловлен тем, что среди крупных лабораторных животных (собаки, мини-свиньи, овцы) именно мини-свинья имела наиболее подходящее анатомо-морфологическое строение зубочелюстной системы [1], а также их всеядность и особенности пережевывания пищи.

## Материал и методы

По стандартной методике вводили 5% раствор тиопентала натрия в физиологическом растворе. Общий расход тиопентала натрия — 1,5 г/гол. Для проведения непосредственной имплантации была выбрана область премоляров верхней и нижней челюстей, как наиболее удобная для установки имплантатов. При удалении зубов использовали в основном прямой элеватор, и с помощью специальных фрез формировали ложе в ячейках удаленных зубов для установки имплантатов. Всего было установлено 36 имплантатов. В эксперименте использовали отечественную имплантационную систему «Биомал». Анатомическое строение альвеолярных отростков челюстей мини-свиньи обеспечивало установку внутрикостных имплантатов длиной 12 мм с диаметром цилиндрической части 3,5 и 4,5 мм в зависимости от толщины альвеолярного гребня. После инсталляции имплантата изготавливали временные коронки из отечественной самоотвердеваемой пластмассы «Акродент».

После завершения операции подопытные животные получали обычный пищевой рацион в измельченном и вареном виде. Мини-свиньи содержались в отдельных клетках, чтобы исключить повреждение имплантатов при столкновении. Профилактика инфекционных осложнений заключалась во внутримышечном введении 10% линкомицина (4 мл/день в течение 7 дней).

В запланированный срок — через 1, 3 и 6,5 мес. после операции — мини-свиней выводили из эксперимента: через 1 мес. — 2 животных, через 3 мес. — 3 и через 6,5 мес. — 2. Зубочелюстные блоки выпиливали вместе с имплантатом.

Рентгенологическое исследование препаратов производилось с использованием цифровых рентгенограмм на аппарате «Иконос» (фирма «Симменс») при условиях 50-70 мВ, 50 мА. Съемки осуществля-

лись на кассете с усиливающими экранами Z1 и Z4. Всего исследован 21 препарат от 7 мини-свиней: 5 образцов — через 1 мес., 9 — через 3 мес. и 7 — через 6,5 мес.

## Результаты

При рентгенологическом исследовании макропрепаратов отмечается, что через 1 месяц наблюдается рост новообразованной молодой кости, по контуру витков имплантата без признаков воспаления. Через 3 месяца прослеживается четкая картина перекрывания новообразованной костной тканью резбовой части имплантата. Через 6,5 месяцев вокруг имплантатов изменений в костной ткани не обнаружено, костная ткань в плотную подходит к имплантату.

Анализируя состояние кости по данным рентгенографии, следует заметить, что во всех сроках от 1 до 6,5 месяцев качественная характеристика костной ткани вокруг имплантатов улучшается при непосредственной имплантации с использованием немедленных функциональных нагрузок.

## Выводы

Таким образом, наши рентгено-экспериментальные исследования убедительно демонстрирует целесообразность использования непосредственной установки имплантатов в костную рану, что позволяет ускорить и оптимизировать хирургический этап дентальной имплантации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. — М.: Изд-во ВПК, 2004.
2. Hadeed G. J. et al.// J. Oral Maxillofac. Surg. Vol. 44, No 3, pp. 188-192. 1986.

3. Luras D. et al. // *Dtsch. Zahnarztl. Z. Bd. 38. S.88, 1983.*
4. Weiss Ch. Short-and long-term bone maintenance surrounding fibro-osteal and
- osteal integrated dental implants // *J. Oral Implantol. Vol. 16, No 1, pp. 12-19. 1990.*
5. Wirz J. // *Schweis. Mschr. Zahnmed. Bd 95. S. 853-863. 1985.*

## **X-RAY CONTROL OF BONEFORMING PROCESS UNDER DIRECT INTRAOSSEONS IN EXPERIMENT**

**G.A.Ashuev, A.A.Kulakov, G.J.Kapanadze**

*Central scientific Research Stomatology Institute of Roszdrav  
The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

**Key word:** X-ray control, direct implantation, bio-model, direct loads.

Anatomic specification of mini-pig bone structure needs in careful X-ray control. Immediately moderate functional loading promotes bone regenerating process. X-ray experiments proved while direct implantation is preferable.

В 60-х гг. XX века повысились требования к испытанию новых фармакологических средств. Появилась необходимость разработки принципов и методов всестороннего изучения действия фармакологических препаратов в клинических условиях. Это положило начало развитию клинической фармакологии. Во многих странах клиническая фармакология выделилась в отдельную науку, стали создаваться специальные подразделения, институты, кафедры для обучения студентов. В нашей стране первая кафедра клинической фармакологии была открыта в 1976 году в Ростовском Государственном медицинском институте. Первым заведующим был профессор Н.Н.Каркищенко. С тех пор преподаватели и сотрудники кафедры, которую в 1986 году возглавил профессор Ю.С.Макляков, проводят большую научную и практическую работу. Приоритетными направлениями кафедры являются: доклиническое изучение фармакологических препаратов психотропного и радиопротекторного действия, изучение фармакокинетики лекарственных препаратов, клиническое изучение средств антигипертензивного действия, а также фармакоэкономика и фармакоэпидемиология.

В честь 30-летия создания кафедры в сентябре 2006 года была проведена научно-практическая конференция «Проблемы клинической фармакологии и моделирования в фармакологии и биомедицине».

**Резолюция  
научно-практической конференции  
«Проблемы клинической фармакологии  
и моделирования в фармакологии  
и биомедицине» Ростов-на-Дону,  
19-20 сентября 2006 года**

В соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Российской академии медицинских наук и Российской академии наук «О планах научно-практических мероприятий» № 795/80/460 от 19 декабря 2005 года и Постановления Президиума РАМН № 199, протокол № 19, параграф 11 от 9 ноября 2005 года, ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАМН и ГОУ ВПО Ростовский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ 19-20 сентября 2006 года провели научно-практическую конференцию «Проблемы клинической фармакологии и моделирования в фармакологии и биомедицине» в г. Ростове-на-Дону.

В рамках конференции состоялись 2 пленарных заседания, 8 симпозиумов, 1 круглый стол.

Всего было заслушано 110 докладов.

На заседаниях были рассмотрены и обсуждены следующие вопросы:

- Актуальные проблемы клинической фармакологии
- Клиническая фармакология в терапии сердечно-сосудистых заболеваний
- Клинико-фармакологические основы оптимизации фармакотерапии
- Моделирование в биомедицине и этнофармакология
- Фармакогенетика и безопасность лекарственных средств
- Клиническая фармакология urgentных и критических состояний
- Биотерапия и химиотерапия в онкологии
- Фармакологическая коррекция в психоневрологии
- Государственное регулирование лекарственного обеспечения населения, фар-

макоэкономика и фармакоэпидемиология основа оптимизации лекарственной терапии

### **Констатирующая часть**

1. В решении многих проблем биологической и клинической медицины решающую роль играют экспериментальные исследования на животных, позволяющие моделировать необходимые состояния, изучать динамику патологического процесса, фармакогеномику, метаболические сдвиги, динамику и кинетику лекарств и ксенобиотиков.
2. Этническая принадлежность человека, установленная на основании традиционных представлений о расах, далеко не всегда отражает его генетическую конституцию. Однако на эффективность и безопасность лекарственной терапии влияют как фенотипические, так и генотипические особенности человека.
3. Конференция отмечает, что генетически предопределённые болезни цивилизации, такие как ожирение, диабет, сердечно-сосудистые нарушения и др., являются в определенной степени ответом на игнорирование или неумышленное пренебрежение собственными этническими особенностями, т.е. платой за выживание в чужой среде обитания.

Официальные инстанции ВОЗ и Евросоюза недавно впервые признали, что лечение представителей различных этнических групп требует применения инновационных лекарств.

4. Проблема безопасности фармакотерапии становится всё более актуальной во всём мире. Фармакоэпидемиологические исследования последних лет показали, что у миллионов людей развиваются тяжёлые, подчас необратимые осложнения лекарственной терапии. Смертность в результате неблагоприятных побочных реакций

(НПР) на лекарственные препараты вышла на четвёртое место после смертности от сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и травм.

НПР стали не только серьёзной медицинской и социальной, но также и экономической проблемой. Затраты, связанные с лекарственными осложнениями, в некоторых странах исчисляются многомиллиардными затратами.

### **Постановляющая часть**

1. Конференция обращает внимание на необходимость активизации дальнейших научных исследований по поиску и созданию новых биомоделей для выяснения молекулярных, клеточных и системных механизмов поддержания здоровья и формирования нездоровья, как биологических категорий; разработки фундаментальных основ биобезопасности на основе достижений фармакопротеомики, фармакогеномики и нанотехнологий.
2. Конференция считает крайне важным продолжение исследований по разработке новых технологий в биомедицине и этнофармакологии, развитию фармакокинетического мониторинга и клинической фармакогенетики, как наиболее актуальных для современной медицины, особенно в нашей многонациональной стране
3. Учитывая важность и масштаб проблемы лекарственных осложнений, Конференция просит Министерство здравоохранения и социального развития РФ и Росздравнадзор принять необходимые меры по воссозданию в стране эффективной независимой системы мониторинга и контроля безопасности лекарственных средств, обеспечения её необходимой материально-технической базой и достаточным финансированием в рамках национальной программы «Здоровье».

---

Изготовлено в «Универсум Пабблишинг»  
Тираж 3 000 экз.

Адрес: ул. 3-я Мытищинская, д. 16  
тел. (495) 980-9230, факс (495) 980-9231  
e-mail: [prepress@clinpharma.com](mailto:prepress@clinpharma.com)