

БИОМЕДИЦИНА

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

№ 1 2005

Главный редактор

Н.Н. Каркищенко,
академик РАН, член-корреспондент РАМН

Редакционный совет:

Dr. Hans-W. Ackermann, профессор (Канада)
И.П. Ашмарин, академик РАМН (Россия)
Dr. Iorgjen Baskmen, профессор (Германия)
В.А. Быков, академик РАМН и РАСХН (Россия)
Dr. Ralf Edwards, профессор (Швеция)
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)
М.А. Пальцев, академик РАН и РАМН (Россия)
К.В. Судаков, академик РАМН (Россия)
Dr. Solemene Umberto, профессор (Италия)

Редакционно-издательская группа:

Е.В. Брайцева (научный редактор),
Б.М. Бороденков (технический редактор),
Е.В. Иванова, Г.Д. Капанадзе, Р.Г. Костокрызова,
Ю.С. Макляков, А.М. Малашенко, О.И. Степанова,
В.В. Хоронько, Е.Ф. Шмидт (ответственный секретарь)

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 действу-
ющим законодательством.

Адрес редакции:

105064, Москва,
Малый Казенный пер.. 5, стр. 1
E-mail: bmt@mail.ru

Изготовлено в «Универсум Паблишинг»
Тираж 3 000 экз.

© 2005, Научный центр биомедицинских технологий РАМН



От редакции

Уважаемые коллеги!

Государственное учреждение Научный центр биомедицинских технологий Российской академии медицинских наук представляет новый научный журнал «Биомедицина».

Прогресс в развитии биологических основ медицины определяется необходимостью решения ряда фундаментальных проблем, стоящих не только перед биологией и медициной, но и перед химией, физикой, прикладной математикой. Успехи в фармакологии, трансплантологии, клеточных технологиях, генетической инженерии, биотехнологиях уже имеют широкие социальные последствия и, вне всякого сомнения, будут привлекать возрастающее общественное внимание и интерес.

Проблемы биобезопасности и противодействия биотерроризму вышли за пределы узкоспециальных исследований и требуют для своего решения мультидисциплинарных и системных подходов и биомоделирования. Безопасность лекарств, пищевых продуктов, биодобавок и других средств жизнеобеспечения человека предусматривает осуществление фундаментальных исследований, прикладных разработок и внедрения на их основе новых медицинских технологий и принципов контроля.

В этих и многих других случаях необходима разработка системных подходов к получению адекватных и высокоэффективных методов биомоделирования не только на различных видах животных, но и на альтернативных моделях. Важнейшей составляющей этого процесса является математическое моделирование.

Национальные и общеевропейские законодательства, регулирующие проведение экспериментов на животных, требуют ограничения и отказа от использования животных. Популяризуется концепция трех R (Replacement, Reduction, Refinement) в виде программы по *сокращению усовершенствованию и замене* экспериментов на животных. Однако не все исследования можно адекватно выполнить на дафниях или гуппи. В то же время, не только в России и на постсоветском пространстве исчезли журналы, а в других странах мира резко сократилось их число и возник дефицит в периодике, посвященной лабораторным животным и методам биомоделирования.

Возникла необходимость в выпуске журнала, отражающего современное состояние вопросов и проблем биомоделирования, а также в консолидации усилий биологов, медиков, физиков, химиков, математиков в этой непростой области человеческого познания.

Приглашая к участию и публикациям в журнале «Биомедицина», мы надеемся, что он будет востребован, интересен и полезен всем ищущим новые пути в биомедицинских науках и технологиях.

Главный редактор
академик РАН, член-корр. РАМН
Н. Н. Каркищенко

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н.Н. Каркищенко.</i> Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины	5
ОБЗОРЫ	
<i>Ю.Н. Кротова, В.Н. Каркищенко, Д.П. Хлопонин.</i> Роль апоптоза в патологии миокарда	17
<i>Д.А.Сычёв, Е.В.Ших, В.М. Булаев, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес, С.В. Колхир.</i> Механизмы фармакокинетического взаимодействия лекарственных средств и фитопрепаратов: взгляд клинического фармаколога	25
<i>О.И. Степанова, Н.Н. Каркищенко, Н.А. Онищенко, Е.А. Степанова.</i> Коррекция патогенетических нарушений при сахарном диабете второго типа методами клеточной трансплантации	35
<i>Е.Ф. Шмидт, А.В. Суров.</i> Тайны семейства <i>Cricetidae</i>	52
БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ	
<i>В.Н. Каркищенко, Е.В. Брайцева.</i> Новые биомодели для оценки высоко-вирулентных штаммов чумы <i>Y. pestis</i>	67
<i>В.В. Хоронько, Ю.С. Макляков, С.А. Сергеева, А.В. Сафроненко.</i> Особенности фармакокинетики распределения актопротекторов бромантана и хлодантана у крыс	76
<i>Е.Ф. Шмидт.</i> Изменчивость предпочтения алкоголя у лабораторных мышей в зависимости от генотипа и среды	81
<i>А.Г. Погорелов, Е.И. Маевский, В.Н. Погорелова, М.Л. Учитель.</i> Экспериментальная модель алкогольного опьянения и её описание в параметрах условно-рефлекторной активности	88
БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ	
<i>Е.В. Иванова, С.А. Овчар, А.А. Батурин.</i> Психотропная активность новых синтетических производных пиримидина	92
<i>Х.Х. Семёнов, Е.Л. Игнатьева, Т.Б. Бескова.</i> Крриоконсервация эмбрионов мышей инбредных линий – гарантия сохранения их генофонда	96
<i>М.М. Шмаров, Д.Ю. Логунов, Л.В. Черенова, Е.Г. Пикер.</i> Разработка технологии получения рекомбинантных аденовирусов <i>CELO</i> в куриных эмбрионах в препаративных количествах	103
КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ	
<i>Т.Б. Бескова, А.М. Малашенко, Л.А. Болотских.</i> Сравнение кластогенного эффекта канцерогена бенз(а)пирена у мышей, выращенных в гнотобиологическом изоляторе и в открытой среде	108
ПРАКТИКУМ	
<i>М.М. Шмаров, Д.Ю. Логунов, Л.В. Черенова, Е.Г. Пикер.</i> Технология получения рекомбинантных аденовирусов <i>CELO</i> в куриных эмбрионах в препаративных количествах	112
<i>Л.А. Болотских, З.С. Лушикова.</i> Усовершенствованный способ получения гнотобиотических животных	114
<i>Э.Х. Абдрашитова, Л.А. Кононленко.</i> Эктромелия лабораторных мышей и методы её диагностики	118



НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

E.B. Брайцева. Введение в GLP 122

НАШ БЕСТИАРИЙ

Биологи и медики шутят 125

CONTENTS

N.N. Karkischenko. Conceptual space and topological structures of biomedicine 5

REVIEWS

J.N. Krotova, V.N. Karkischenko, D.P. Khloponin. The role of apoptosis in myocardial pathology 17

D.A. Sychev, E.V. Schich, V.M. Bulaev, G.V. Ramenskaya, V.G. Kukes, S.V. Kolhir. Pharmacokinetical interaction of drugs and herbal preparates 25

O.I. Stepanova, N.N. Karkischenko, N.A. Onischenko, E.A. Stepanova. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and perspective methods of treatment 35

E.F. Schmidt, A.V. Surov. The misteries of *Cricetidae* 52

BIOMODELLING

V.N. Karkischenko, E.V. Braitseva. New models for evaluation of high virulent strain of *Yersinia pestis* plague 67

V.V. Khoronko, Yu.S. Makljakov, S.A. Sergeeva, A.V. Safronenko. Pharmacokinetics of bromantane and chlodantane 76

E.F. Schmidt. The variability of alcohol preference in laboratory mice according to their genotype and environment 81

A.G. Pogorelov, E.I. Maevsky, V.N. Pogorelova, M.L. Utchitel. Experimental model of alcohol intoxication and its description in terms of behavioral reactions 88

BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

E.V. Ivanova, S.A. Ovchar, A.A. Baturin. Psychotropic activity of new synthetic derivatives of pyrimidine 92

H.H. Semenov, E.L. Ignatieva, T.B. Beskova. Cryopreservation of mammalian embryos 96

M.M. Shmarov, D.Yu. Logunov, L.V. Cherenova, E.G. Piker. Development of process for producing the preparation amount of adenovirus CELO recombinants in chicken embryos 103

BRIEF REPORTS

T.B. Beskova, A.M. Malashenko, L.A. Bolotskih. Benzo(a)pyrene carcinogen clastogenic effect in mice reared in gnotobiotic isolator vs those in conventional environment 108

PRACTICE

M.M. Shmarov, D.Yu. Logunov, L.V. Cherenova, E.G. Piker. A process for producing the adenovirus CELO recombinants in chicken embryos 112

L.A. Bolotskih, Z.S. Lushnikova. Improved method for gnotobiotic models development 114

E.Kh. Abdrashitova, L.A. Konoplenko. Ectromelia vims of laboratory mice and methods of diagnosis 118

NORMATIVE DOCUMENTS

E.V. Braitseva. Introduction to GLP 122

OUR BESTIARY

Humor 125

Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины

Н.Н.Каркищенко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Биологическая медицина или биомедицина является концептуальным научным направлением с задачами направленного поиска и конструирования генетически-обусловленных и экспериментальных биомоделей здоровья и нездоровья и целями сохранения и поддержания должного качества жизни. Предметом биомедицины является человек, выступающий в качестве прототипа для биомоделирования и построения моделей любого порядка. Основным методом биомедицины является биологическое и математическое моделирование от субатомных до мультисистемных уровней. Биологические, медицинские, физико-химические и иные науки и направления, которые четко очерчены в математических окрестностях, пределах, непрерывности и динамичности своих процессов и удовлетворяют аксиомам их топологических структур, составляют концептуальное пространство биомедицины.

Ключевые слова: аксиоматика, биомоделирование, иерархии биосистем, топология, экстраполяция.

Стремительный рост объема знаний в области фундаментальных биологических наук, расшифровка генома человека и других организмов, открытие функций стволовых клеток, нокаута генов, томография на основе ядерного, электронного и протонного резонанса и т.д. вносят принципиально новые подходы к диагностике и лечению заболеваний.

Аксиоматика в биомедицине

Строгой систематизации медицинских знаний пока не существует, а медицину, как область научных знаний, ученые договорились подразделять на медико-биологические, клинические, медико-социальные дисциплины.

Медико-биологические дисциплины исходят из соответствующих фундаментальных биологических наук. К ним относятся морфологические науки, изучающие строение тела человека и животных от молекулярного до организменного уровня, физиологические науки, исследующие функции здорового организма, общая патология,

изучающая закономерности болезненных процессов, биохимия и биофизика, изучающие химические и физические стороны физиологических и патологических процессов живых систем, фармакология и токсикология, изучающие влияние на организм лекарственных средств и ксенобиотиков, генетика, исследующая наследственность и изменчивость в связи с патологией человека. Математизация и информатизация этих наук обеспечивает абстрактно-логическое, алгоритмическое мышление, формирует единый абстрактный язык, вносит в исследование и моделирование специфическую междисциплинарную компоненту, которая может быть реализована не в одной из них, а лишь во всей совокупности остальных наук [10, 21, 28, 30]. Этим устанавливается общность биологических объектов, морфофизиологических свойств, физико-химических процессов и функциональных отношений, которые определяют и создают аксиоматическое и топологическое пространство биомедицины.

Формируя понятия абстрактных структур, Н.Бурбаки определяют аксиоматичес-

кие формы математики как скопление абстрактных форм в виде *топологических, алгебраических структур* и *структур порядка*. При этом «некоторые аспекты экспериментальной действительности как будто в результате предопределения укладываются в некоторые из этих форм» [4]. Установление общности биологических объектов, морфофизиологических свойств, физико-химических процессов и функциональных отношений определяют аксиоматическое и топологическое пространство биомедицины.

На этой основе определение топологической структуры *биомедицины* исходит из определения *множества* как первичного понятия математики, которое не определяется через другие понятия, а только поясняется. Обозначим исследуемое пространство в виде множества *биомедицины* как B , а множества смежных наук как A , C , D и т.д. Тогда их элементы обозначаются соответственно b и a , c , d и т.д. В этом случае:

множество B (биомедицина) обладает топологической структурой, если каждому его элементу тем или иным способом отнесено семейство подмножеств $A \subset B$, $C \subset B$, $D \subset B$ (соответственно $b \in B$, $a \in A$, $c \in C$, $d \in D$, называемых *окрестностями* этого элемента. Окрестности должны удовлетворять аксиомам топологических структур. В свою очередь, с помощью топологических структур точно определяются такие понятия, как «окрестность», «предел», «непрерывность» смежных дисциплин.

Суть аксиоматического метода в биомедицине предопределяется в случае, если объекты исследования представлены так полно, что могут быть оформлены в виде теории и могут быть подвергнуты аксиоматическому, а через него и математическому анализу. Последовательность метода аксиоматического анализа в биомедицине, как и в иных экспликациях прикладной математики следующая:

✓ формулируется абстрактная теория, которая является дуальной по своей сути, ибо содержит *элементы* одного или разных

множеств (например, параметры крови или объекты в виде лабораторных животных), а также *отношения между элементами* (например, «капилляры находятся между артериями и венами» или «гемоглобин содержит железо»);

✓ терминология на этапе формулирования используется в общем виде и обязательно должна носить содержательный смысл;

✓ устанавливаются аксиомы в полном терминологическом соответствии с целевой задачей;

✓ в общем виде в качестве логического следствия аксиом строятся теоремы или формулируются логические выводы;

✓ при необходимости вводятся новые термины, как правило, с более обобщенным смыслом, даются необходимые определения;

✓ следующий этап является очень важным, поскольку теперь мы переходим к «привязке» содержательного смысла к каждому термину абстрактной теории. Известно, как сложно установить единый язык общения между медиками, физиками и математиками. Например, физик скажет, что синусоидальная звуковая волна называется простым *тоном*, высота которого зависит от частоты. Чем выше частота, тем выше тон. Частоты, кратные ν_0 основного тона, называются обертонами. Если же простые синусоидальные волны образуют непрерывный ряд значений, то это *шумы*. Для врача шумы сердца – это важный информативный признак патологии, для физика – шумовой фон создает предел чувствительности аппаратуры и его следует любым способом устранить. Языковые «ловушки» подстерегают любого исследователя. Поэтому все понятия или термины должны быть хорошо подобраны и точно определены. Они должны обозначать какую-то физическую реальность, которая может быть раскрыта и описана математически. В результате этой процедуры термины, до сего момента носившие

абсолютно отрешенный, абстрактный смысл, приобретают осязаемое и наглядное содержание;

✓ в дальнейшем целесообразна экспериментальная или логическая проверка (экспертиза) того, насколько соблюдаются аксиомы абстрактной теории для этих понятий и терминов. Приведем еще один пример. Врач однозначно понимает термин *кома* как тяжелую финальную стадию заболевания, травмы, интоксикации с потерей сознания и нарушениями жизненно важных функций организма. Для физика и математика *кома* — это геометрическая абберация широких пучков света при прохождении через оптическую системы. Следствием *комы для врача* является развитие *полиорганной патологии*, тогда как *для физика* коме соответствует *каустика*, имеющая только одну плоскость симметрии, проходящей через оптическую ось системы. Устранение *комы для врача* — это самый сложный и часто непредсказуемый по последствиям комплекс реанимационных мероприятий, а *для физика* устранение сферической абберации, *комы* и *каустики* сводится к математической процедуре соблюдения условий Аббе:

$$y_1 n_1 \sin \psi_1 = y_2 n_2 \sin \psi_2,$$

где n_1 и n_2 — абсолютные показатели преломления сред; y_1 и y_2 — расстояния до оси системы, ψ_1 и ψ_2 — максимальные углы. Поэтому прикладные аспекты аксиоматики в информативном поле биомедицины являются важнейшими;

✓ завершающим этапом в последовательном использовании метода аксиоматического анализа является интерпретация абстрактной теории в терминах реальных разделов биомедицины и *оформление биомодели*, поскольку на этом уровне мы уже имеем описанную в содержательном смысле биосистему на том или ином уровне её иерархии.

Представлениями о формально-логических системах как абстрактных аксио-

матических теориях и разрешением задач *непротиворечивости, полноты и независимости* системы аксиом мы обязаны Д. Гильберту (1862–1943) и А. Н. Колмогорову (1903–1987). Работы А. Н. Колмогорова обосновали и разрешили вопросы сопоставления статистических данных с вероятностной теорией явлений. Согласно критерию А. Н. Колмогорова, сходимость

ряда $\sum \sigma \frac{2}{k} k^2$ является достаточным условием для того, чтобы усиленный закон больших чисел был применим к последовательности взаимно независимых случайных величин X ?. Говоря о работах академика А. Н. Колмогорова [6], обосновавшего теорию вероятностей как раздел теории меры на основе аксиом, получивший название «аксиоматика Колмогорова», можно согласиться с тем, что хижину теории вероятностей он перестроил в небоскреб [3], на одном из этажей которого должна полноправно поселиться биомедицина.

Если исходить из образного определения математики как «скопления абстрактных, бессодержательных, математических структур» [4] и из реалий состояния биологии и медицины в виде «фактов — воздуха ученого» [7], то развитие новых взглядов на аксиоматический метод в биомедицине может в корне изменить наши представления об отношении исследуемых структур и функций к реалиям действительного мира живой природы.

Иерархии биосистем

Развитие наших представлений о биологических системах можно отнести к зарождению учения об *организме-машине* Дени Дидро (1713-1784) и Жюльена Ламерти (1709-1756), которые полагали, что живое имеет чрезмерно большую сложность строения. Они считали, что, разложив и сведя биопроцессы к более простым, можно объяснить их в рамках физико-химических законов.

Понятийный и математический аппарат описания биосистем относится к разделу частной теории динамических систем, однако стремительное нарастание знаний в области биологии и медицины делает такой подход узкоспециализированным, поскольку методология и логика описания биологических процессов явно тяготеют к принципам общей теории динамических систем, а иначе — к *общей теории систем*. Оценка базовых принципов жизнедеятельности должна, вне всякого сомнения, строиться на системных подходах. Взаимодействия биосистем со средой Э.С. Бауэр [2] определил в форме: «Все и только живые системы никогда не бывают в равновесии и исключают за счет своей свободной энергии постоянно работу против равновесия, требуемого законами физики и химии при соответствующих внешних условиях».

Биосистемы — это иерархии структурно и функционально организованных систем, включающих элементы ниже лежащих уровней подсистем, интегрирующих всю сложность форм развития материи, в том числе и предбиологических.

Важнейшим свойством сложных систем, к которым, вне всякого сомнения, относятся биосистемы, является их *структурная и функциональная неоднородность* и многообразие. Они, в свою очередь, связаны многомерностью, проявляющейся в большом количестве разнородных параметров, в многообразии связей между однородными и разнородными параметрами, характеризующими работу данной биосистемы. Следующей особенностью биосистем является *динамичность* их взаимодействия со средой. Можно условно выделить *оперативную динамичность*, которая проявляется в сложноорганизованных реакциях на изменения и воздействия окружающей среды, например, поведение. Существуют также онтогенетическая и филогенетическая динамичность, когда мы сталкиваемся с *динамикой медленных и сверхмедленных процес-*

сов в структурно-функциональных изменениях биосистем, например, в случае получения инбредных линий лабораторных животных со случайными или заданными свойствами [5]. Достижение высокого уровня, качества и соответствия экстраполяции в отношении человека должно строиться на моделях различных порядков и использовании направленного инбридинга животных-биомоделей.

Говоря об адекватности построения биосистем, Н. Рашевски [25] делает вывод о том, что «конструкция должна быть адекватной заданной функции при заданных изменяющихся условиях среды». Использование подходов общей теории систем является наиважнейшей предпосылкой любых исследований, построений и заключений в биомедицине. Общая теория систем зародилась и отразилась в трудах отцов современной медицины — Гиппократ, Парацельса, Ибн-Сины — в форме индуктивной логики. Было бы нечестно сказать, что эти приоритеты присущи лишь Великим медикам. Индуктивная логика и системный подход, начиная с Аристотеля, присущи многим физикам, химикам, биологам и, естественно, философам, сформулировавшим интегральные понятия взглядов на мир и законы Природы. Однако, поскольку мы говорим о биомедицине, то именно в этом ключе и будем рассматривать как общие, так и частные аспекты теорий живых, а значит динамических, систем. Любые сложные системы состоят из конечных структур и структур, их порождающих. Вне зависимости от уровня сложности конечных или порождающих биологических объектов, отвечающих свойствам рефлексивности, симметричности и транзитивности, они могут быть представлены в виде структуры порядка биосистем в концептуальном поле биомедицины.

Сложные биологические системы могут быть разложены на более простые иерархические уровни. При этом тот или иной уровень иерархии должен отвечать

единому принципу соответствия структурной организации, функциональному предназначению или деятельности.

Можно выделить следующие уровни иерархической организации биосистем:

- ✓ субклеточные иерархии, например органеллы клеток;
- ✓ одноклеточные организмы или отдельные клетки;
- ✓ иерархии клеточных пулов;
- ✓ многоклеточные иерархии на уровне органов;
- ✓ иерархии мультиорганных систем;
- ✓ целостный организм человека или животных;
- ✓ популяционные иерархии;
- ✓ иерархии на уровне биогеоценоза;
- ✓ иерархии в системе биосферы и ноосферы.

Дадим краткое пояснение указанных иерархий. Так, *субклеточные иерархии* включают в себя сложные межатомные и межмолекулярные отношения ДНК, РНК, хромосом, органелл клеток, обеспечивающие рекомбинаторные и мутационные механизмы эволюционных процессов. На этом уровне моделируются донорно-акцепторные отношения электронов, протонов, иных атомных частиц, а также процессы ионообразования, химических механизмов кислотно-щелочного равновесия. На этом уровне рассматриваются ферментативные и каталитические процессы, энергоперенос, синтез и катализ белков, пептидов и аминокислот.

Иерархии одноклеточных организмов или отдельных клеток обеспечивают митозы, генерацию потенциалов, продукцию гормонов, транспорт кислорода и многочисленные иные аспекты жизнедеятельности, осуществляемые в митохондриях, хромосомах, рибосомах, лизосомах и других органеллах клетки. Функции микроорганизмов заключаются в обмене энергией и материей с окружающей средой, росте, делении, реакции на внешние раздражители, появлении разных форм движения.

Иерархии клеточных пулов — это не только образование колоний микроорганизмов, но и организация отдельных клеток в структурно-функциональные образования типа ядер головного мозга с приобретением новых «коллективных» функций. Эти образования обеспечивают, по принципу обратной связи, например, продукцию и эффекты нейротрансмиттеров (дофамина, серотонина и др.), или α - и β -клеток островков Лангерганса, не только выработки, но и регуляцию-обмен глюкогена и инсулина в поджелудочной железе.

Внутриорганные, органные и межорганные многоклеточные иерархии, построенные на основе субсистем клеток и межклеточных субстанций, обеспечивают стабилизацию параметров внутренней среды и жизнедеятельность организма во всех её проявлениях с внешней средой.

Иерархии мультиорганных систем строятся уже на подиерархиях клеток, их пулов, органов и анализаторных образований и обеспечивают управление взаимодействием со средой, как внутренней, так и внешней, а также анализ и синтез частных и обобщенных признаков в моделях образов, рефlekсах и инстинктах.

На уровне *целостного организма* человека и животных осуществляется управление механизмами адаптации к природным, экологическим системам, эволюции вида в изменяющейся среде. И.П. Павлов, на основании своих исследований, пришел к глубокому убеждению об «уравновешивании биологической системы со средой» [8].

Особи одного биологического вида, объединенного периодом и местом проживания составляют *популяционную иерархию*, а система популяций, объединенная материальными, энергетическими, организационными и информационными связями составляет *иерархию биогеоценоза*.

Если в качестве подсистем мы рассмотрим биогеоценозы, органами которых станут популяции, а структурами — биологические виды, то они составят гиперсистем-

ную *иерархию биосферы*. Иными словами биосфера — это совокупность всего живого на земле. Управление этими процессами в доступной человеку форме относится к понятию ноосферы, предложенному академиком В.И. Вернадским. Частным случаем этого уровня иерархии являются разум, мышление и сознание человека, обеспечивающие обитание в природных (в том числе и экстремальных) и созданных экосистемах, а также проживание и управление в социальной сфере.

Любые живые организмы имеют характерную особенность *приспособления и адаптации* к окружающей среде. Приспособление обеспечивает выработку строго определенных типов контакта со средой. Все ненужные контакты планомерно исключаются. Эволюция биосистем обеспечивает своеобразный *изоляциялизм*, то есть обеспечение регулируемыми потоками энергии, информации, питания, связи, направленными на сохранение и поддержание внутреннего баланса энергии и энтропии организма.

Многочисленные попытки обобщенно-го описания принципов управления или регулирования в живых системах до настоящего времени не увенчались успехом. Они сводились к абстрактно-логическому описанию этих процессов или заканчивались попытками использования частных теорий, систем, основ теории автоматического регулирования линейных систем. Системы регулирования представляют собой в большинстве случаев весьма сложные математические, технические или биологические конструкции, состоящие из, казалось бы, простых элементов: *объекта регулирования и регулятора*. Назначение регулятора сводится к тому, чтобы непрерывно поддерживать в объекте регулирования некоторое установившееся состояние или же состояние, изменяющееся по заданному закону. Следовательно, процесс регулирования в биосистемах заключается в том, что биорегулятор препятствует вся-

ким отклонениям от этого состояния, возникающим в объекте регулирования в результате каких-либо нарушений его работы. Со середины XX века интенсивно развиваются исследования по развитию классических математических методов в системах регулирования в *нелинейных системах* на основе учения А.М.Ляпунова [7], что может существенно обогатить наше понимание механизмов функционирования живой материи в различных иерархиях биосистем. Стоит отметить, что и в человеческом мышлении постоянно присутствуют, на первый взгляд, странные явления дуальности и нелинейности — люди часто любят и ненавидят один и тот же объект. Пример для разрядки: многие не переносят эвтаназию кур, но с обожанием употребляют цыпят табака. Вот вам дуальность и нелинейность!

Биомоделирование и экстраполяции

Модели в качестве средства познания стали употребляться уже на заре развития науки. Вместе с тем *общая теория моделирования* начала создаваться лишь с 60-х годов XX века. Употребление научных умозаключений в виде силлогизмов зачастую достаточно для определения их роли и места в системе строго определенных рамок. Оно дает возможность псевдологического использования термина «модель» в различных смыслах и, наоборот, часто имеет место применение различных слов для обозначения по сути дела одного и того же содержания.

Существуют различные классификации моделей. Но наиболее распространенными моделями, отражающими внутреннюю природу прототипа (в биомедицине им предстает человек), являются *материальные*, воспроизводящие структуру и функциональную интеграцию частей объекта; *информационные* или абстрактно-логические и математические; *вещественно-энергетические* или физико-химические, к ко-

торым относят и технические модельные устройства, а также предметные модели патологических процессов и методов лечения. Если предметные модели воспроизводятся на *животных-биомоделях*, то они могут совмещать в себе не только материальную, но также информационную и энергетическую составляющие биомоделирования.

По методу изучения биосистем моделирование можно разделить на аппроксимационное, структурно-функциональное и математическое.

Аппроксимационные (часто их называют простыми функциональными) модели используются при изучении как детерминированных, так и стохастических биосистем и оценке их качественных и количественных параметров. Таковой является модель ионных процессов проведения возбуждения аксонами нервных клеток, предложенная нобелевскими лауреатами А. Ходжкиным и Д. Хаксли.

Структурно-функциональные модели являются феноменологическими отображениями системы по отношению к структурно выделяемым блокам, взаимодействующим между собой и имеющим относительные количественные сопоставления, хотя в ряде случаев допустимы и качественные.

Математические модели детерминированных и вероятностных биосистем строятся на основе фундаментальных биологических и физико-химических законов. Корректная математическая трактовка биомодели, построенная на основе закона, рождает теорию работы биосистемы. Во всех случаях алгоритм построения корректных математических моделей включает в себя анализ объекта исследования, эксперимент, статистическую обработку результатов, оценку сложности системы, измерение входных и выходных переменных, выбор класса и вида модели, синтез параметров модели и, наконец, оптимизацию модели, и ее представление в виде,

пригодном для экстраполяции в отношении прототипа.

Под *моделью* (лат. *modelus* – мера, норма, образец) подразумевается материальный или виртуальный объект, замещающий в процессе изучения объект-оригинал или прототип, сохраняя типичные для конкретного исследования черты. Построение такой модели является процессом моделирования.

Разнообразие значений термина «модель» в современных биомедицинских науках бросается в глаза. Возникает сомнение, а можно ли говорить о моделях и моделировании вообще или только о моделях и моделировании в определенных разделах биологии и медицины. Исторически сложилось, что в решении многих проблем биологии и медицины решающую роль играют экспериментальные исследования на животных, позволяющие моделировать необходимые состояния, изучать динамику патологического процесса, метаболические сдвиги, динамику и кинетику процессов [5, 12, 13, 14, 15, 24, 25, 31]. Термин «животные-модели» прочно утвердился в арсенале исследователей в 30-х годах прошлого столетия. Boldessarins и Fisher [13] дали образное определение модели как «экспериментального компромисса, где простая экспериментальная система используется для понимания гораздо более сложной».

Животное-биомодель — лабораторное животное, используемое в эксперименте с целью построения демонстративных или любых других адекватных моделей функционирования человека и животных для последующего описания и анализа изучаемых процессов.

Лабораторные животные — это классические биологические модели, реакции которых на действие веществ или факторов во многом подобны их эффектам у человека [5, 15, 20, 32]. Критериями подобия, обуславливающими адекватность моделирования и надежность экстраполяции, являются: сходство у человека и эксперимен-

тальной модели биологических параметров систем, реагирующих на вещество; общность характеристик метаболических процессов; близость чувствительности, т.е. значений количественных показателей, установленных для человека и модели. В настоящее время в исследованиях оценки веществ все чаще применяются *альтернативные модели второго порядка* (различные гидробионты, бактерии, ферменты, культуры клеток и др.). При этом результаты непосредственно переносятся с тест-объектов на человека, что, как правило, не всегда сопровождается детальным анализом и доказательством правомерности такого подхода [27, 22, 30].

Ранее нами были представлены основные уровни иерархии биомоделирования, их детерминанты или структурные элементы, а также задачи, цели и функции объектов биомоделирования [5]. Помимо *биомodelей первого порядка*, включающих в себя лабораторных животных-млекопитающих, и *биомodelей второго порядка*, существуют биомodelи *третьего порядка* — математические модели, теоремы, аксиомы, описание процессов и функций в дифференциальных уравнениях, в понятиях теории вероятности и т. д. Все чаще встречаются предложения об использовании *моделей четвертого* и *более высоких порядков* для описания взаимодействия неспаренных электронов, квантово-химических, микроволновых процессов, синглетных и триплетных отношений и т.д.

Отметим, что ни один из этих подходов не претендует на всеобъемлемость, не охватывает все стороны прототипа, в нашем случае, человека. Биомodelи *первого порядка* наиболее полно охватывают собственно биологическую сферу человека, не претендуя на социальную составляющую, т.е. разум, подсознание, сознание, а также производные этого вида деятельности homo sapiens.

Биологические модели *второго порядка* могут с большей или меньшей полно-

той представить отображение от молекулярного до клеточного уровня максимально. Модели *третьего порядка* предусматривают построение математических конструкций на основе биомodelей первого, второго порядка или аксиоматическое или теоретическое представление концептуальных систем, требующих в дальнейшем подкрепления и четкого экспериментального обоснования тех или иных медико-биологических процессов.

Касаясь субмолекулярных, межатомных и атомарных уровней иерархии, следует, по-видимому, выделить самостоятельный *четвертый уровень* моделирования. Этот вид моделирования не входит напрямую ни в первый, ни во второй уровень. Теоретически его можно описать в терминах третьего, математического уровня, но интерпретация результатов требует новой системы координат и понятий и подтверждения в эксперименте.

Информативность биотестирования в биомodelях второго порядка можно было бы повысить, определяя, например, токсичность одновременно на нескольких тест-организмах [16, 18, 23]. Однако, принимая во внимание весьма низкую (по сравнению с человеком) чувствительность почти всех биотест-объектов к подавляющему большинству веществ в экспресс-экспериментах [19, 22, 29, 30], можно с уверенностью предположить, что использование «батарей» биотестов не решит проблем надежности альтернативного моделирования эффективности, биоэквивалентности или токсичности веществ для человека, а значит такая биомodelь весьма отдаленно соответствует прототипу.

Различия в уровнях реагирования моделей первого порядка (лабораторных животных) и альтернативных им моделей (биотест-объектов) на индивидуальные вещества не позволяют получить адекватные результаты по оценке комбинированного действия суммы разных факторов и веществ методами биотестирования. Для

абсолютного большинства ксенобиотиков прямая экстраполяция данных с биотестов на человека невозможна [5, 11, 17]. При экстраполяции очень важно учитывать тот факт, что между результатами наблюдения на людях и исследованиями животных имеются не только количественные, но и некоторые качественные различия. В опытах на некоторых видах животных невозможно воспроизвести отдельные биохимические и обменные реакции, происходящие в организме человека. В зависимости от характера и задач исследования, в каждом конкретном случае необходимо выбирать такую модель, которая наиболее адекватно позволит воссоздать соответствующий процесс у человека. Поэтому при биомоделировании и экстраполяции необходимо исходить из следующих постулатов, предпосылок и условий:

- ✓ несмотря на имеющиеся видовые особенности, разработка подходов к экстраполяции возможна и необходима, так как все-таки существует близость анатомо-физиологических свойств и биохимических процессов организма человека и животных;
- ✓ наличие одинаковых органов, однотипность их функционирования, сходство основных функций;
- ✓ сходство химического состава и структуры большинства тканей организма;
- ✓ качественная однородность основных биологических процессов;
- ✓ основные реакции обмена веществ и энергии, окислительно-восстановительные процессы, качественно сходны у животных и человека;
- ✓ сходство в изотопном составе органических и неорганических питательных веществ, поступающих в организм из окружающей среды, воды и воздуха;
- ✓ динамика обмена попавших в организм веществ обусловлена и количественно связана с основными метаболическими процессами, происходящими в организме;

- ✓ изменения, развивающиеся в организме животных и человека после воздействия разных факторов окружающей среды, в основном, качественно однотипны.

Оптимизация выбора адекватной биомодели является краеугольным камнем методологии биомедицины и экстраполяционных возможностей биомедицинских технологий. Моделирование является одним из мощных инструментов анализа и базовым методом биомедицины. Создание новой модели – это близкий к искусству, творческий процесс. При моделировании должно исключаться любое самоотнесение, ибо ничто не может быть моделью самого себя.

В известной шутке о том, что наилучшей моделью кошки является другая кошка, а ещё лучше – та же самая кошка, заключен философский смысл. «Идеальных» моделей не существует, любая модель не может быть конгруэнтной прототипу, а исследователь должен учитывать лишь те факторы, которые важны для достижения целей биомоделирования.

Пространство биомедицины

Биологическая медицина, или биомедицина, может быть представлена в разных ипостасях. *С одной стороны*, ее можно рассматривать как некую статическую опись отдельных направлений конечных или порождающих абстрактно-логических структур, аксиом, теорий и законов или генеральной совокупности медико-биологических наук в приложении в целом к клинической медицине, например, интимных процессов биомеханики развития и преобразования стволовых клеток. *С другой стороны*, биологическая медицина может быть представлена как научное направление интеграции, интерполяции и экстраполяции новейших достижений в познании структуры и функции живой материи в отношении конкретной клинической дисциплины или рассматриваемых ею

нозологий, например, в целом к эндокринологии или конкретно — к диабету.

Биологическая медицина, или *биомедицина*, является концептуальным научным направлением с задачами направленного поиска и конструирования генетически-обусловленных и экспериментальных биомоделей здоровья и нездоровья человека и целями сохранения и поддержания должного качества жизни.

Есть *третья* важная сторона *биомедицины*, выступающая как научное направление *биологических основ медицины*, дающее вероятностно-детерминантное описание сложных и динамических живых систем в приложении к человеку. Существенно то, что любые сложные системы могут быть проанализированы через множество взаимосвязанных и взаимодействующих элементарных систем на уровне животных-биомоделей первого порядка, альтернативных моделей второго порядка, математических моделей и моделей более высоких порядков, которые мы рассматриваем выше. По своей внутренней сути они составляют предмет биомедицины.

Предметом биомедицины является человек, выступающий в качестве прототипа для биомоделирования и построения моделей любого порядка.

Однако любые переносы из одной области науки в другую имеют два полюса: либо детерминистический, либо казуальный. Но поскольку Природа не знает о нашем делении на науки, то между этими полюсами и оказался вероятностно-стохастический принцип. Это и есть проблема из проблем, заключающаяся в соотношении необходимости и случайности, детерминизма и вероятности, содержащая сложнейшие вопросы современного естествознания. Парадокс заключается в том, что любая случайность подчиняется строгим законам необходимости, т.е. определенной детерминантности, без чего не было бы и теории вероятностей. Необходимо отдавать себе отчет в том, что стохастическая

модель не предназначена для воспроизведения всех деталей биологических процессов и функционирования биосистем. Она воплощает лишь основные черты явления, создавая в ряде случаев иллюзию некоей идеализации описываемого эксперимента. Тем не менее, обратившись к словам М.В. Ломоносова: «Математику уже затем учить следует, что она ум в порядок приводит», можно утверждать, что биомоделирование и, в особенности, моделирование математическое является тем универсальным методом биомедицины, который из плоскости «нужно ли применять» переносит нас в пространство «где и как лучше его использовать».

Основным *методом биомедицины* является биологическое и математическое моделирование от субатомных и молекулярных до органических и мультисистемных уровней.

В последние годы в научных коллективах разных стран сложился раздел науки, получивший название *медицинской биологии*, занимающийся, по определению академика РАМН В.Н. Ярыгина, изучением генетических (природных) и экспериментальных процессов для выяснения молекулярных, клеточных и системных механизмов здоровья и нездоровья. Это прогрессивное биомедицинское направление, имеющее серьезное научное развитие в концептуальном поле биомедицины [9].

Экстраполяция на человека данных, полученных в экспериментальных исследованиях на животных, является одной из важных задач современной биологии и медицины. Проблема переноса экспериментальных данных на человека, как правило, решается с целью определения, *во-первых*, характеристик воздействующего фактора, который может вызывать и не вызывать у человека определенные изменения сходные с реакциями у животных; *во-вторых*, динамики этих изменений во времени (время начала и продолжительность); *в-третьих*, для установления и учета ка-

чественных отличий в реакциях человека по сравнению с другими видами млекопитающих.

Наставником и учителем бога медицины Асклепия был кентавр Хирон. Казалось бы, пусть мифологический, но теоретически идеальный объект для осуществления экстраполяции. С одной стороны, это единое существо, человек–зверь, но с другой — существо, не принадлежащее ни к людям, ни к животным. Достижения протеомики и геномики позволяют конструировать практически любые новые биологические объекты [1], выращивать своеобразных «кентавров». Но все не так-то просто. Нам все равно придется найти и оценить пространства раздела сред, чтобы «лучи света могли отразиться, преломиться, возбудить окончания зрительных нервов глаза, сформировать зрительный образ и дать нам возможность увидеть окружающий мир» [8]. Необходимо также обозначить объект как физическую реальность, расшифровать его внутренние механизмы, дать формально-логическое или математическое описание, а затем выстроить оптимальную модель, которая в свою очередь, поможет сформулировать ту или иную концепцию.

Учитывая вышеизложенное, можно сказать, что биологические, медицинские, физико-химические и иные науки и направления, которые четко очерчены в математических окрестностях, пределах, непрерывности и динамичности своих процессов и удовлетворяют соответствующим аксиомам, составляют интегральное биомедицинское пространство. Думается, что концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины, с её предметом, объектом, методами исследования, целями и задачами являются достаточно комфортабельным местом для новых изысканий и открытий, расшифровки физико-химических процессов, математических построений и дальнейшего проникновения в глубины биологических основ медицины.

Литература

1. *Арчаков А.И.* Геномика, протеомика и биоинформатика — науки XXI столетия. *Медицинская кафедра*, 3, 6-13, 2002.
2. *Бауэр Э.С.* Теоретическая биология. М.-Л., ВИЭМ, 1935.
3. *Босс В.* Интуиция и математика. М.: Айрис-пресс, 2003.
4. *Бурбаки Н.* Очерки по истории математики. М.: Иностранная литература, 1963.
5. *Каркищенко Н.Н.* Основы биомоделирования. М., Изд-во ВПК, 2004.
6. *Колмогоров А.Н.* Основные понятия теории вероятностей. М.-Л., ОНТИ, 1936.
7. *Ляпунов А.М.* Общая задача об устойчивости движения. М., Гостехиздат, 1950.
8. *Павлов И.П.* Полное собрание трудов. Т. 3. М., Изд-во АН СССР, 1949.
9. *Хоффман Р.* Такой одинаковый и разный мир. М., Мир, 2001.
10. *Ярыгин В.Н.* Геномика в концептуальном поле биомедицины. В кн.: *Тр. VII Росс. нац. конгр. «Человек и лекарство»*. — М., 2000, с. 87-95.
11. *Antti H., Ebbels T.M.D., Keun H.C. et al.* Statistical experimental design and partial least squares regression analysis of biofluid metabonomic NMR and clinical chemistry data for screening of adverse drug effects. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 73, 139-149, 2004.
12. *Bailey S.A., Zidell R.H., Perry R.W.* Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: what is the best analytical endpoint? *Toxicologic Pathology*, 32, 448-466, 2004.
13. *Boldessarins R.J., Fischer J.E.* Model systems in Biological Psychiatry. Cambridge 5 MFT Press, 251, 1975.
14. *Claxton J., Sacher E., Matthiessen-Guyader L.* Ethical, legal and social aspects of farm animal cloning in the 6th Framework Programme for Research. *Cloning and Stem Cells*, 6, 178-181, 2004.
15. *Dawkins M.S.* Using behaviour to assess animal welfare. *Animal Welfare*, 13, 3-7, 2004.
16. *De Longueville F., Bertholet V., Remacle J.* DNA microarrays as a tool in toxicogenomics. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 7, 207-211, 2004.

17. *Jakshi D.K., Sharma P.* Genotoxicity of Ames test and res-assay. *J. of Envir. Pathol. Toxicol. and Oncol.*, 22, 101-109, 2003.
18. *Linares A.F., Loikkanen J., Jorge M.F. et al.* Antioxidant and neuroprotective activity of the extract from the seaweed, *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux, against in vitro and vivo toxicity induced by methylmercury. *Veter. and Human Toxicol.*, 46, 1-5, 2004.
19. *Jones P.A., King A.V.* High throughput screening (HTS) for phototoxicity hazard using the *in vitro* 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicol. In Vitro*, 17, 703-708, 2003.
20. *Johnson S.R., Patterson-Kane E.G., Niel L.* Foraging enrichment for laboratory rats. *Animal Welfare*, 13, 305-312, 2004.
21. *Julien E., Willhite C.C., Richard A.M. et al.* Challenges in constructing statistically based structure-activity relationship models for developmental toxicity. *Birth Defects Research Part A-Clinical and Molecular Teratology* 70, 902-911, 2004.
22. *Kazius J., McGuire R., Bursi R.* Derivation and validation of toxicophores for mutagenicity prediction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 312-320, 2005.
23. *Klopman G., Chakravarti S.K., Zhu H. et al.* ESP: a method to predict toxicity and pharmacological properties of chemicals using multiple MCASE databases. *J. of Chemical Information and Computer Sciences*, 44, 704-715, 2004.
24. *Koeneman B.A., Lee K.K., Singh A. et al.* An *in vivo* method for evaluating the biocompatibility of neural electrodes in rat brain slice cultures. *J. of Neuroscience Methods*, 137, 257-263, 2004.
25. *Lawrence A.B., Conington J., Simm G.* Breeding and animal welfare: practical and theoretical advantages of multi-trait selection. *Animal Welfare*, 13, 191-196, 2004.
26. *Rachevsky N.* *Mathematical Biophysics*, 1960.
27. *Raza M., Blair R.E., Sombati S. et al.* Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogenesis cause acquired epilepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 17, 522-17, 527, 2004.
28. *Sasseville V.G., Lane J.H., Kadambi V.J. et al.* Testing paradigm for prediction of development-limiting barriers and human drug toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 150, 9-25, 2004.
29. *Sanderson H., Johnson D.J., Wilson C.J. et al.* Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicol. Letters*, 144, 383-395, 2003.
30. *Sekkat N., Kalia Y.N., Guy R. H.* Development of an *in vitro* model for premature neonatal skin: biophysical characterization using transepidermal water loss. *J. of Pharmaceutical Sciences*, 93, 2396-2940, 2004.
31. *Topor Z.L., Pawlicki M., Remmers J.E. et al.* A computational model of the human respiratory control system: responses to hypoxia and hypercapnia. *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 1530-1545, 2004.
32. *Votano J.R., Parham M., Haii L.H. et al.* Three new consensus QSAR models for the prediction of Ames genotoxicity. *Mutagenesis*, 19, 365-377, 2004.

CONCEPTUAL SPACE AND TOPOLOGICAL STRUCTURES OF BIOLOGICAL MEDICINE

N.N. Karkischenko

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Biological medicine, a conceptual scientific complex, focuses its efforts on directional search for and construction of experimental and genetically caused biomodels of health and illness with purposes of retaining and maintaining the proper quality of life. A subject of biomedicine is a man as the prototype for biomodeling and construction of models of arbitrary orders. The basic method of biomedicine is biological and mathematical modeling spanning from subatomic to multisystem level. Biological, medical, physical, chemical and other disciplines, which are precisely outlined within their mathematical vicinities, limits, continuity and dynamism of processes and satisfies to axiomatics of their topological structures, constitute a conceptual space of biomedicine.

Key words: axiomatics, biomodeling, hierarchies of biosystems, topology, extrapolation.



Роль апоптоза в патологии миокарда

Ю.Н. Кротова, В.Н. Каркищенко, Д.П. Хлопонин

*Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону
Институт новых технологий РАН, Москва*

В качестве одного из главных патогенетических факторов сердечно-сосудистой патологии выступает потеря кардиомиоцитов. Их гибель может происходить в том числе посредством апоптоза — сложнорегулируемого, программируемого суицидального механизма. Выделяют два основных пути апоптоза — рецептор-опосредованный и митохондриальный. Доказано существование этих путей и их регуляторов во многих органах и тканях, в том числе в сердце. К этим регуляторам относят прежде всего белки семейства Bcl-2, каспазы, факторы роста, белки теплового шока, кальций и антиоксидантные системы. Глубокое понимание механизмов реализации апоптоза и их регуляции может способствовать разработке новых фармакологических методов профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: апоптоз, клеточная гибель, сердечно-сосудистые заболевания.

В настоящее время в структуре смертности населения первое место занимает патология сердечно-сосудистой системы (ССС). Изучением этиопатогенеза и разработкой эффективных методов лечения заболеваний этой системы занимаются исследователи во всем мире. В посвященных данной проблеме работах все чаще стали упоминать и ассоциировать с сердечно-сосудистой патологией нарушения со стороны одного из видов клеточной гибели — апоптоза. Свидетельства этому обнаружены как в сердце, так и в стенке кровеносных, в том числе коронарных, сосудов. В качестве основных триггеров этого вида клеточной гибели в ССС выступают гипоксия, ишемия/реперфузия, перерастяжение миокарда, ацидоз, окислительный стресс, высокие уровни/депривация цитокинов, гормонов и других биологически активных веществ [2, 12, 13, 22]. Имеется большое число фактов, свидетельствующих о значительной роли апоптоза в патогенезе атеросклероза, формировании постинфарктных изменений в

сердце, развитии и прогрессировании хронической сердечной недостаточности (ХСН), кардиомиопатий, различных форм аритмий, аритмогенной дисплазии правого желудочка, генезе внезапной коронарной смерти, реакции отторжения трансплантата при аортокоронарном шунтировании и т. д. [3, 5, 7, 10].

Согласно современным представлениям, апоптоз представляет собой активную, программированную форму гибели клетки, являющуюся результатом реализации ее генетической программы в ответ на воздействие большого числа разнообразных факторов. Морфологически он проявляется уменьшением размера и «сморщиванием» клетки, кариопикнозом и кариорексисом, конденсацией и фрагментацией хроматина, а завершается в большинстве случаев деградацией клетки до образования апоптотических телец, фагоцитируемых соседними клетками и макрофагами. Для апоптотических клеток характерно снижение внутриклеточного pH, падение митохондриального трансмемб-

ранного потенциала, транслокация остатков фосфатидилсерина с внутренней на наружную поверхность цитоплазматической мембраны, деструкция элементов цитоскелета и межнуклеосомальная деградация ДНК. Поскольку при апоптозе клеток в отличие от некроза не происходит выхода их внутриклеточного содержимого в интерстиций, для него не свойственна воспалительная реакция [3, 5].

Морфофункциональные процессы, происходящие в ходе апоптоза, обычно подразделяют на три стадии [1, 6]:

1) индукторную — получение, распознавание и передача апоптогенного сигнала на систему эффекторных белков;

2) эффекторную — активация основных исполнителей («эффекторов») апоптоза (каспаз, эндонуклеаз и др.), осуществляющих расщепление и деградацию структурных компонентов клетки, в первую очередь, ядра, цитоскелета и мембран;

3) терминальную — нарушение структуры, распознавание и фагоцитоз клетки или образовавшихся из нее апоптотических телец.

В качестве индукторов апоптоза в сердце могут выступать как вне-, так и внутриклеточные факторы. В соответствии с этим выделяют два основных сигнальных пути апоптоза (см. рисунок) [1, 7, 13, 15]:

а) «внешний» (рецептор-опосредованный), характеризующийся передачей апоптогенного сигнала через так называемые рецепторы смерти (FasR, TNFR1, DR3 – DR6) и приводящий к активации каспазы 8/10;

б) «внутренний» (митохондриальный), обусловленный, в частности, повреждением ДНК, воздействием токсических агентов и ультрафиолетового облучения и приводящий к активации каспазы-9.

В качестве основных исполнителей апоптоза выступают каспазы (*cysteinylaspartate-specific-proteases*) — семейство цистеиновых протеаз, расщепляющих клеточные субстраты по остаткам аспараги-

новой кислоты. К настоящему времени у млекопитающих идентифицировано 14 каспаз [1, 6, 13]. В зависимости от исполняемых функций их подразделяют на:

✓ **эффекторные** — исполнители апоптоза (каспазы 3, 6, 7);

✓ **инициаторные** — активаторы эффекторных каспаз (каспазы 2, 8, 9, 10);

✓ **модуляторы действия цитокинов** — участвующие в реализации воспалительных реакций (каспазы 1, 4, 5, 11, 13, 14);

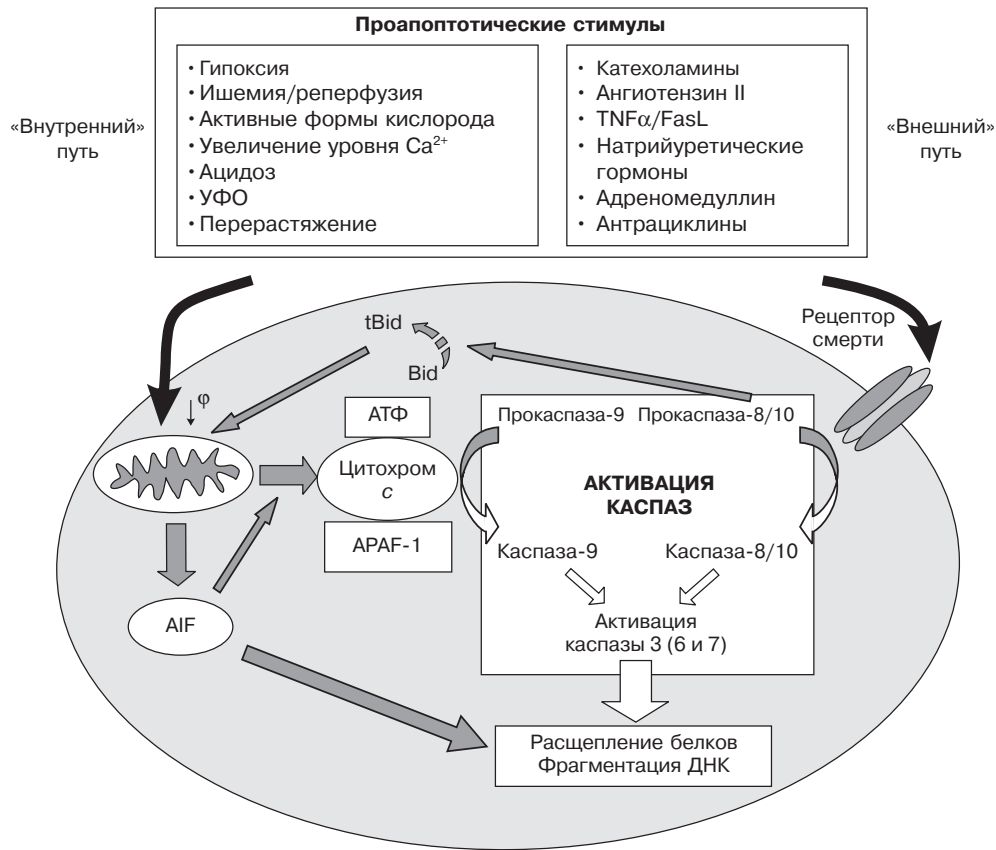
✓ каспаза-12 стоит особняком в ряду каспаз и принимает участие в реакции ЭПР-стресса.

В клетках каспазы находятся в неактивном состоянии в форме проферментов (прокаспаз). Их активация происходит путем протеолиза с последующей димеризацией образованных таким образом активных субъединиц. Этот процесс может происходить либо аутокаталитически, либо в результате протеолитического действия других протеаз (в том числе других каспаз) [1, 3, 6, 10].

Действие эффекторных каспаз направлено на расщепление структурных белков клетки, в частности компонентов цитоскелета и молекул адгезии, инактивацию ингибиторов апоптоза, фрагментацию ДНК, а также стимуляцию ряда других исполнителей апоптоза.

Помимо каспаз в качестве эффекторов апоптоза могут выступать Ca²⁺-зависимые протеазы (например, кальпаин), эндонуклеаза G, AIF (*apoptosis-inducing factor*), лизосомальные протеазы и т.д. [13, 25, 26].

Конечным итогом реализации программы апоптоза является потеря клеткой контактов с соседними клетками, дезорганизация ее цитоскелета, нарушение сплайсинга мРНК, репликации и репарации ДНК, олигонуклеосомальная фрагментация хроматина с формированием в большинстве случаев апоптотических телец. Перестройка клеточной мембраны клетки, в частности, увеличение количества остатков фосфатидилсерина на ее



Основные сигнальные пути апоптоза в сердце: tBid — BH3-Interacting Domain death agonist; AIF — apoptosis-inducing factor, APAF-1 — apoptotic protease-activating factor (остальные пояснения см. в тексте)

внешней стороне, а также утрата клеточных контактов маркируют ее для фагоцитоза макрофагами.

«Внешний» путь

Наиболее изученным из механизмов рецепторопосредованного апоптоза является взаимодействие так называемых «лигандов смерти» из семейства фактора некроза опухоли TNF (*tumour necrosis factor*), в частности $TNF-\alpha$ и FasL (Fas-лиганд), с «рецепторами смерти» TNFR1 и FasR, соответственно. Передача апоптогенного сигнала при связывании FasL с FasR про-

исходит при участии адаптерного белка FADD (MORT1) (*Fas-associated death domain protein*), чей N-терминальный домен DED (death effector domain), в свою очередь, связывается с аналогичным доменом прокаспазы 8, вызывая ее аутокаталитическую активацию. При активации рецептора TNFR1 в качестве адаптерного белка, аналогичного FADD, выступает TRADD (*TNFR-associated death domain protein*) [1, 23, 26].

Рецепторопосредованный, или «внешний», путь клеточной смерти представляется более коротким, нежели «внутренний»: посредством адаптерных молекул

происходит активация каспазы 8, которая, в свою очередь, способна напрямую активировать эффекторные каспазы, и в первую очередь каспазу 3. Однако это только основная схема, в действительности рассматриваемый сигнальный путь значительно более сложен и переплетается с другими путями апоптоза. Так, например, установлено, что каспаза 8 способна активировать не только каспазу 3, но и при посредничестве tBid (*BH3-Interacting Domain death agonist*) стимулировать выброс из митохондрий цитохрома *c* — одного из основных участников «внутреннего» пути апоптоза. И хотя в целом «внешний» путь не требует обязательного участия «внутреннего» пути апоптоза, тем не менее, подключение последнего к процессу программированной клеточной гибели способствует потенцированию рецептор-индуцированного механизма [1, 7, 13, 14].

Сегодня достоверно известно об интенсивной экспрессии в сердце FasR и FasL. При экспериментальном моделировании инфаркта миокарда, гипоксии, а также перегрузки сердца объемом зарегистрированы признаки апоптотической гибели кардиомиоцитов (КМЦ) и коррелирующие со степенью ее выраженности уровни FasR.

Ишемия/реперфузия в культуре КМЦ повышала их чувствительность к эффектам FasL. Кроме того, рецепторопосредованная инициация апоптоза встречается также при развитии ХСН, когда высокий уровень TNF- α и других провоспалительных цитокинов оказывает токсическое влияние на ССС в целом, и на миокард в частности [2, 3, 4, 12, 13, 15, 20].

Этот же сигнальный путь, но с привлечением других адаптерных белков, участвует в реализации ряда других клеточных программ. Так, сигнал, передаваемый через TNFR1, может активировать транскрипционные факторы NF- κ B (*nuclear factor κ B*) и AP-1 (*activator protein-1*). Эти сигнальные молекулы, в свою очередь, вызывают активацию генов, необходимых

для синтеза ряда цитокинов и развития иммуномодулирующего эффекта. Кроме того, доказана роль системы FasL/FasR не только в осуществлении апоптоза клеток, но и их пролиферации [6].

«Внутренний» путь

Одной из ключевых фигур апоптоза являются митохондрии. Они занимают около 30% объема КМЦ и выступают в качестве основных энергопродуцирующих органелл клетки. Кроме того, митохондрии — важное звено для проведения и усиления многих апоптотических сигналов, возникающих, например, при повреждении ДНК и нарушении клеточного цикла, гипоксии и ацидозе, окислительном стрессе, перерастяжении клетки и т.д. Они служат источником большого числа апоптогенных факторов, в частности цитохрома *c*, Ca²⁺, AIF, активных форм кислорода. Поэтому неудивительно, что любые, даже незначительные, нарушения их функции или трансмембранного потенциала могут серьезно повлиять как на синтез АТФ, так и на судьбу клетки в целом.

Выход из митохондрий апоптотических факторов осуществляется при взаимодействии активированных белков семейства Bcl-2. Эти белки своими COOH-гидрофобными основаниями способны прикрепляться к наружной мембране митохондрий в области РТР (*permeability transition pore*) — каналов с диаметром не более 2 нм. В норме РТР проницаемы главным образом для ионов Ca²⁺, активных форм кислорода, но не проходимы для некоторых анионов и более крупных молекул цитохрома *c*, АТФ и AIF. Белки семейства Bcl-2 (Bax, Bad, Bak и др.), укрепившись в наружной митохондриальной мембране, могут вступать во взаимодействие с ANT (*Adenine Nucleotide Transporter*) и образовывать более крупные каналы с диаметром до 3 нм, через которые в цитоплазму и происходит выход крупных молекул цитохрома *c*, АТФ



и AIF. Помимо этого белки Bcl-xL, Bcl-2, Bax и Bid, по всей видимости, способны образовывать в мембранах ионные каналы с различными свойствами. Все вышеизложенное дает основание утверждать о причастности указанных белков к формированию в митохондриальных мембранах каналоподобных структур, через которые апоптотические факторы покидают пределы митохондрий. Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL и др.), напротив, блокируют уже существующие каналы, а также препятствуют взаимодействию каспазы-9 и АРАФ-1 (*apoptotic protease-activating factor*), прерывая таким образом передачу проапоптотического сигнала и защищая клетку от апоптоза [1, 6, 7, 16, 27].

После высвобождения из митохондрий цитохром *c* в присутствии АТФ взаимодействует с находящимися в цитоплазме в неактивных формах каспазой-9 и АРАФ-1, образуя апоптосому. Именно в апоптосоме и происходит процессинг и активация каспазы-9, которая, в свою очередь, стимулирует основной эффектор «внутреннего» пути апоптоза — каспазу 3 [1, 10].

Наряду с цитохромом *c* из митохондрий в цитоплазму клетки выходят также АИФ и эндонуклеаза G, которые транслоцируются в ядро и вызывают фрагментацию ДНК. Они не требуют активации в цитозоле, выделяются из митохондрий до цитохрома *c* и, возможно, способствуют его выходу. Таким образом, АИФ и эндонуклеаза G являются самостоятельными эффекторными факторами, дублирующими действие цитохрома *c* и каспаз при блокаде последних.

Митохондриальный путь апоптоза, как и рецепторопосредованный, играет большую роль в развитии сердечно-сосудистой патологии и очень важен для КМЦ. Ишемия и, в том числе, провоцируемая ею гипогликемия, вызывают высвобождение цитохрома *c* из митохондрий даже на фоне действия ингибиторов каспаз. Активные формы кислорода также способны приво-

дить к выходу в цитоплазму цитохрома *c*, активации каспазы-3, вызывая H₂O₂-индуцированный апоптоз КМЦ [15, 17, 24].

В последнее время общепризнанным стал тезис о возможности инициации апоптоза и в других клеточных органеллах помимо митохондрий, например в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и комплексе Гольджи. Так, при повышении уровня внутриклеточного Ca²⁺ к поверхности ЭПР могут перемещаться кальпаин или каспаза-7, которые способны активировать предшественник каспазы 12. Последняя после выхода из ЭПР в цитоплазму может вызывать активацию каспаз 9 и 3 и приводить к индукции апоптоза [6, 13].

Таким образом, в организме млекопитающих, в том числе и в сердце, существуют различные, зачастую тесно переплетающиеся схемы и механизмы реализации программы апоптоза, зависящие от множества разнообразных факторов, в первую очередь от типа клетки/ткани и характера апоптогенного сигнала.

Регуляция апоптоза как возможная терапевтическая мишень

Апоптоз — многоэтапный сложнорегулируемый вид клеточной гибели. Именно на возможность регуляции этого процесса в настоящее время и возлагаются большие надежды в борьбе с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Каждый уровень и элемент данной системы может служить потенциальной мишенью для действия лекарственных средств.

Одним из важнейших звеньев регуляции апоптоза в ССС являются белки — продукты экспрессии генов семейства Bcl-2. Их объединяет сходный морфологический состав — каждый из них имеет, по крайней мере, одну из четырех возможных консервативных аминокислотных последовательностей, свойственных для Bcl-2. Среди них встречаются как про-, так и антиапоптотические формы. В соответствии с функ-

цией и гомологией представители этого семейства в настоящее время принято подразделять на три группы [6, 16, 27]:

1. Антиапоптотические белки Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, Bcl-2L1, Bcl-2L2 с гомологией в областях ВН1, 2, 3 и 4.
2. Проапоптотические белки Вах, Вак, Вок/Mtd, Bcl-x_S с гомологией в областях ВН1, 2 и 3.
3. Проапоптотические белки Bid, Bad, Bik/Nbk, Blk, Hrk, Vim/Bod, Nip3 и Nix/Vn1p3 с гомологией только в ВН3-области.

В клетке про- и антиапоптотические белки семейства Bcl-2 находятся в состоянии постоянного динамического равновесия и соотношение их активных форм в значительной мере определяет резистентность/предрасположенность клетки к апоптозу. Регуляция активности этих молекул осуществляется посредством их димеризации, три- и тетрамеризации, транслокации, фосфорилирования, распада, посттрансляционной и/или конформационной модификации [1, 6, 16, 27].

Необходимо отметить, что КМЦ экспрессируют белки семейства Bcl-2, однако степень влияния последних на апоптоз в сердце еще не до конца изучена. Ранее считалось, что в КМЦ содержание этих белков относительно количества митохондрий крайне низко и поэтому теоретически они не могут играть серьезной роли в регуляции апоптоза. Однако ряд последних публикаций свидетельствует об обратном. В частности, при адаптации левого желудочка к хронической перегрузке давлением зафиксировано значительное повышение экспрессии белка Вах и снижение Bcl-2. H₂O₂-индуцированный апоптоз КМЦ сопровождался увеличением экспрессии проапоптотического белка Bad, транслокацией Вах и Bad к наружной митохондриальной мембране, высвобождением цитохрома *c* и активацией каспазы 3. В терминальной стадии ХСН у людей сте-

пень выраженности апоптоза коррелирует с уровнями проапоптотических белков Вак и Вах. Таким образом, при ХСН происходит нарушение динамического равновесия между сигналами выживания и смерти, что и приводит к запуску и реализации программы апоптоза [3, 5, 13, 17, 19].

Кроме белков семейства Bcl-2, в каждой клетке организма, в том числе в сердце, существует группа эндогенных веществ, подавляющих активность каспаз. В этом ряду прежде всего следует отметить сFLIP (*cellular FADD-like inhibitory protein*), препятствующий взаимодействию каспазы-8 с адаптерным белком FADD, и семейство ингибиторов апоптоза IAP (*inhibitor of apoptosis protein*), тормозящих активность каспаз 3, 7 и 9. Инактивация каспаз также возможна путем их S-нитрозилирования под влиянием NO [6, 9, 15].

Помимо этого, не так давно Koseki T. et al. [18] идентифицировал и описал ингибитор апоптоза, характерный в основном для поперечно-полосатой мускулатуры, в том числе и сердца, — ARC (*apoptosis repressor with caspase recruitment domain*). Ранее считалось, что он взаимодействует с каспазами 2 и 8 и тормозит рецептор-опосредованный апоптоз. Однако совсем недавно было установлено, что ARC может также подавлять выход цитохрома *c* из митохондрий и предохранять клетки от гибели, индуцированной гипоксией. Возможно, ARC способен проявлять свой эффект на различных уровнях реализации программы апоптоза и таким образом может претендовать на роль ключевого регулятора этого процесса в сердце [10, 13].

Вместе с тем существуют белки-антагонисты ингибиторов каспаз, в частности Smac/DIABLO (*Second Mitochondrial Activator of Caspases*), который при высвобождении из митохондрий связывает и нейтрализует IAP, поддерживая за счет этого активность каспаз [6].

Кроме того, важными регуляторами апоптоза в ССС признаны белки теплового шока hsp (*heat shock proteins*). В сердце экспрессированы hsp различных семейств, главным образом hsp-10, -27, -60, -70 и -90. Двумя наиболее изученными из них являются индуцибельные hsp-27 и -70. Их активация под действием кардиотрофина-1, гербамидина А и этанола предохраняет КМЦ от ишемии. При сверхэкспрессии эти hsp могут предохранять КМЦ от действия таких индукторов апоптоза, как церамид и гипоксия, что обусловлено подавлением выхода цитохрома с из митохондрий. Кроме того, сверхэкспрессия hsp-10 и hsp-60, в комбинации или по отдельности, защищает КМЦ от апоптоза, вызванного ишемией/реперфузией миокарда [2, 10, 15, 19].

Хорошо известна взаимосвязь уровней Ca^{2+} внутри клетки и апоптоза. Считается, что Ca^{2+} регулирует проницаемость митохондриальной мембраны и выход цитохрома с в цитоплазму, а также активацию Ca^{2+} -зависимых эндонуклеаз, участвующих в фрагментации ДНК. В сердце идентифицированы многочисленные Ca^{2+} -зависимые эффекторы апоптоза, в частности кальпаин — Ca^{2+} -зависимая цистеиновая протеаза, расщепляющая Вах и таким образом поддерживающая его проапоптотическую активность. Неоднозначна роль в апоптозе кальциневрина — Ca^{2+} /кальмодулин-регулируемой фосфатазы. Одним из его эффектов является дефосфорилирование белка Ваd, в результате чего последний перемещается к митохондриальной мембране и модулирует выход цитохрома с из митохондрий в цитоплазму. Однако, поскольку кальциневрин считается одним из основных факторов гипертрофии миокарда и может выступать в качестве защитника КМЦ от апоптоза, ряд исследователей настаивает на его антиапоптотической роли [11, 19, 21].

Одним из наиболее мощных механизмов защиты от повреждения и смерти клетки являются клеточные антиоксидант-

ные системы. Они нейтрализуют свободные радикалы и таким образом минимизируют выраженность окислительного стресса, возникающего в результате ряда повреждений, включая ишемию/реперфузию миокарда [15].

Необходимо также подчеркнуть значительную роль, которую играют в регуляции апоптоза факторы роста. В частности, доказано, что важными факторами роста и выживания КМЦ являются IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) и HGF (*hepatocyte growth factor*) [4, 13, 19].

Таким образом, апоптоз представляет собой комплексный многоэтапным сложнорегулируемый процесс, нарушения которого на любом из этапов регуляции приводят к развитию разнообразной патологии ССС. Поэтому изучение апоптоза является одним из наиболее актуальных и перспективных направлений современной биологии и медицины. За последние 30 с лишним лет, прошедших с момента открытия этого явления, проведена масса исследований, однако до сих пор остается множество так и неразрешенных вопросов, касающихся молекулярных механизмов его реализации, регуляции в различных типах клеток и тканей (в том числе, в КМЦ и в миокарде), роли в развитии заболеваний ССС, а также современных и потенциальных возможностей его фармакотерапевтической коррекции.

Литература

1. *Владимирская Е.Б.* Механизмы апоптотической смерти клеток. *Гематология и трансфузиология*, 2002, № 2, с. 35-40.
2. *Драпкина О.М., Клименков А.В., Ивашкин В.Т.* Апоптоз кардиомиоцитов и роль ингибиторов АПФ. *Российский кардиологический журнал*, 2003, № 1, с. 81-86.
3. *Залесский В.Н., Гавриленко Т.И., Фильченков А.А.* Апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда. *Врачебное дело*, 2002, № 1, с. 8-15.
4. *Кремнева Л.В., Абатурова О.В.* Молекулярно-клеточные механизмы ремоделирова-

- ния миокарда при сердечной недостаточности. *Клиническая медицина*, 2003, № 2, с. 4-7.
5. Макарьков А.И., Салмаси Ж.М., Санина Н.П. Апоптоз и сердечная недостаточность. *Сердечная недостаточность*, 2003, № 6, с. 312-315.
 6. Фильченков А.А. Современные технологии количественной оценки апоптоза и их применение в экспериментальной и клинической онкологии. *Киев: ДИА*, 2003, 76 с.
 7. Bennett M.R. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart*, 2002, v. 87, 480-487.
 8. Chen M., Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis*, 2002, v. 7, 313-319.
 9. Deveraux Q.L., Reed J.C. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes & Development*, 1999, v. 13, No. 3, 239-252.
 10. Dispersyn G.D., Borgers M. Apoptosis in the heart: About programmed cell death and survival. *News Physiol. Sci.*, 2001, No. 1, 41-47.
 11. Duchon M.R. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The J. Physiol*, 2000, vol. 529, No. 1, 57-68.
 12. Fortuno M.A., Ravassa S., Fortuno A. et al. Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension mechanisms and potential management. *Hypertension*, 2001, v. 38, 1406-1412.
 13. Foo R.S., Mani K., Kitsis R. Death begets failure in the heart. *J. Clin. Invest.*, 2005, v. 115, 565-571.
 14. Fumarola C., Guidotti G.G. Stress-induced apoptosis: Toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*, 2004, v. 9, 77-82.
 15. Gill C., Mestril R., Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease – a novel therapeutic target? *The FASEB J.*, 2002, v. 16, 135-146.
 16. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 1999, v. 13, No. 15, 1899-1911.
 17. Hare J.M. Oxidative stress and apoptosis in heart failure progression. *Circ. Res.*, 2001, v. 89, 198-200.
 18. Koseki T., Inohara N., Chen S. et al. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *PNAS*, 1998, v. 95, No. 9, 5156-5160.
 19. Krijnen P., Nijmeijer R., Meijer M. et al. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J. Clin. Pathol.*, 2002, v. 55, 801-811.
 20. Lee P., Sata M., Lefer D.J. et al. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2003, v. 284, No. 2, 456-463.
 21. Molkenkin J.D. Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis. *Circ. Res.*, 2001, v. 88, 1220-1222.
 22. Nadal-Ginard B., Kajstura J., Leri A. et al. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res.*, 2003, v. 92, 139-150.
 23. Newell M.K., Desbarats J. Fas ligand: receptor or ligand? *Apoptosis*, 1999, v. 4, 311-315.
 24. Simon H.-U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000, v. 5, 415-418.
 25. Thornberry N.A., Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science*, 1998, v. 281, No. 5381, 1312-1316.
 26. Vaughan A.T.M., Betti C.J., Villalobos M.J. Surviving apoptosis. *Apoptosis*, 2002, v. 7, 173-177.
 27. Willis S., Day C., Hinds M.G. et al. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J. Cell Sci.*, 2003, v. 116, 4053-4056.

THE ROLE OF APOPTOSIS IN MYOCARDIAL PATHOLOGY

J.N. Krotova, V.N. Karkischenko, D.P. Khloponin
Institute of New Technologies

Cardiomyocytes loss is one of the main pathogenetic factors of cardiovascular pathology. Their death can occur by a highly regulated programmed cell suicide mechanism termed apoptosis. There are two main apoptotic pathways – receptor-mediated and mitochondrial. Increasing evidence supports the existence of these pathways and their regulators in many tissues and organs, including the heart. A better understanding of the apoptosis realization and regulation mechanisms may yield the development of new pharmacological methods of prophylactics and treatment of cardiovascular diseases.

Key words: apoptosis, cell death, cardiovascular diseases.

Механизмы фармакокинетического взаимодействия лекарственных средств и фитопрепаратов: взгляд клинического фармаколога

Д.А. Сычёв, Е.В. Ших, В.М. Булаев, Г.В. Раменская, В.Г. Кулес, С.В. Колхир

*Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва
Институт клинической фармакологии ФГУ НЦЭСМП, Москва*

В настоящее время все чаще наряду с лекарственными средствами пациентами применяются различного рода фитопрепараты. Накопилось большое количество данных о возможности фармакокинетического взаимодействия между ЛС (лекарственными средствами) и фитопрепаратами. Наибольшее клиническое значение имеет способность компонентов, входящих в состав фитопрепаратов, индуцировать или ингибировать изоферменты цитохрома Р-450 и (или) гликопротеин-Р. При этом фитопрепараты способны как снизить эффективность совместно применяемых с ними ЛС, так и спровоцировать возникновение нежелательных лекарственных реакций (НЛР). Для того чтобы избежать подобных ситуаций, необходимо повысить уровень информированности врачей и пациентов о возможных взаимодействиях ЛС и фитопрепаратов, а также наладить систему экспертизы фитопрепаратов «прицельно» на предмет их взаимодействия с ЛС.

Ключевые слова: фармакокинетическое взаимодействие, фитопрепарат, изоферменты цитохрома Р-450, гликопротеин-Р

На сегодняшний день фитопрепараты* применяют около 14% населения США [25]. Так, только в США в 1997 году рынок фитопрепаратов составил 5 млрд. долларов [13].

Фитопрепараты чаще всего применяются врачами у детей [34], пожилых людей [13], а также у беременных и лактирующих женщин [28]. При этом наиболее частыми показаниями для назначения фитопрепаратов являются тревожность, депрессия, деменция, болевой синдром, мигрень, доброкачественная гиперплазия простаты [22]. И хотя имеются данные о фармакологических эффектах многих фитопрепаратов, пока проведено небольшое число рандомизированных контролируемых исследований, подтверждающих их эффективность при данных заболеваниях [22].

Однако не всегда фитопрепараты назначаются лечащим врачом, часто больной

начинает применять их самостоятельно [3]. По данным разных авторов, от 20 до 30% больных, длительно получающих те или иные ЛС, дополнительно принимают различные фитопрепараты [25], и только 20–25% из них сообщают об этом своему лечащему врачу [27]. Скорее всего, пациенты либо боятся неодобрения со стороны врача факта приема фитопрепарата, либо вообще не считают важным подобное информирование. Однако большинство пациентов не подозревают о возможности взаимодействия между ЛС и фитопрепаратами, а лечащие врачи его просто недооценивают. С одной стороны, это можно объяснить недостатком информации о клинически значимых взаимодействиях ЛС и фитопрепаратов, а с другой — неверным представлением пациентов и даже врачей (!) о том, что «природное» происхождение компонентов фитопрепаратов автоматически означает их абсолютную безопасность как в отношении развития нежелательных реакций, так и в плане взаимодействия с другими ЛС. На самом деле взаимодействия

* Под фитопрепаратами будем подразумевать препараты или биологически активные добавки к пище, содержащие растительное сырье.

ЛС с фитопрепаратами могут приводить к клинически значимым изменениям фармакологического ответа — снижению эффективности и (или) безопасности фармакотерапии. Так, по некоторым данным, НЛР при совместном применении ЛС и фитопрепаратов встречаются в 16% случаев [14]. Наиболее часто в состав фитопрепаратов входят [24]:

гинко билоба (*ginko biloba*),
зверобой продырявленный (*hypericum perforatum*),
женьшень (*panax spp*),
чеснок (*allium sativum*),
эхинацея (*echinacea spp*),
serenoa palmetto,
кава-кава (*piper methysticum*).

Взаимодействие между ЛС и фитопрепаратами активно изучается. Имеется ряд сообщений о клинически значимых взаимодействиях подобного рода, а также клинические исследования, посвященные изучению влияния фитопрепаратов на фармакокинетику и фармакодинамику различных ЛС. В настоящее время наиболее изученным является фармакокинетическое взаимодействие между ЛС и фитопрепаратами. Как известно, результатом фармакокинетического взаимодействия является изменение концентрации ЛС в плазме крови. Следует отметить, что механизмы фармакокинетического взаимодействия ЛС и фитопрепаратов аналогичны механизмам межлекарственного взаимодействия и могут происходить при всасывании, распределении, метаболизме (биотрансформации) и выведении. При этом различные компоненты, содержащиеся в фитопрепаратах, могут влиять на ферменты биотрансформации (изоферменты цитохрома Р-450) и транспортеры ЛС (гликопротеин-Р и др.), выступая в роли их индукторов (повышают активность) или ингибиторов (снижают активность) [2].

Поэтому для предупреждения развития НЛР и предотвращения снижения эффективности ЛС, которые могут явиться след-

ствием подобных взаимодействий, врач должен учитывать эту информацию при проведении фармакотерапии и активным образом интересоваться у больного о применении препаратов и БАД, содержащих лекарственные растения [2].

Влияние фитопрепаратов на активность изоферментов цитохрома Р-450

Изоферменты цитохрома Р-450 катализируют реакции I фазы биотрансформации (окисление). Наибольшую роль в биотрансформации ЛС играют изоферменты СYP3A4 (блокаторы медленных кальциевых каналов, блокаторы H1-гистаминовых рецепторов, циклоспорин, оральные контрацептивы, глюкокортикостероиды), СYP2D6 (бета-адреноблокаторы, антипсихотические ЛС, антидепрессанты), СYP2C9 (непрямые антикоагулянты, НПВС, антагонисты ангиотензиновых рецепторов), СYP2C19 (блокаторы протонового насоса, противосудорожные ЛС), СYP2E1 (парацетамол) [1].

Как указывалось выше, компоненты, входящие в состав фитопрепаратов, могут быть как индукторами, так и ингибиторами изоферментов цитохрома Р-450. Как известно, индукторы изоферментов цитохрома Р-450 ускоряют биотрансформацию ЛС, что приводит к снижению их концентрации и ослаблению фармакологических эффектов [1]. Ингибиторы изоферментов цитохрома Р-450, наоборот, замедляют биотрансформацию ЛС, что приводит к повышению их концентрации и повышению риска развития НЛР [1].

Среди фитопрепаратов, индуцирующих изоферменты цитохрома Р-450, наиболее хорошо изучены фитопрепараты, содержащие экстракт зверобоя продырявленного. В исследовании Wang и др. [42] продемонстрировано, что экстракт зверобоя является сильным индуктором СYP3A4 и СYP1A2 (только у женщин), при этом он не оказывал влияние на активность СYP2C9 и СYP2D6. Кроме того, авторами

было выявлено, что экстракт зверобоя в большей степени снижает концентрацию мидазолама («маркерный» субстрат CYP3A4) при его пероральном введении, чем при внутривенном. Этот феномен, скорее всего, связан с тем, что экстракт зверобоя индуцирует не только печеночный CYP3A4, но и CYP3A4 стенки кишечника. Gurley и др. [13] сравнили влияние экстрактов зверобоя, чеснока, гинко билобы и женьшеня на активность различных изоферментов цитохрома P-450. Так, было показано, что зверобой индуцирует не только CYP3A4, но и CYP2E1 [19]. Raucy и др. [36] высказывают предположение, что способность зверобоя индуцировать CYP2E1 — изофермент, участвующий в биоактивации канцерогенов, — может способствовать повышению риска

злокачественных заболеваний у лиц, длительно принимающих зверобой и одновременно контактирующих с проканцерогенами (нитрозамины и др.).

По некоторым данным, индуцирующая способность экстракта зверобоя по отношению к CYP3A4 сопоставима с «универсальным» индуктором микросомального окисления рифампицином [16]. Следует отметить, что экстракт зверобоя более интенсивно индуцирует CYP3A4 у женщин, чем у мужчин [15]. Это объясняется хорошо известным фактом — более интенсивной экспрессией гена CYP3A4 у женщин. Так, Gorski и др. [15] показали значимое снижение концентрации и эффективности оральных контрацептивов (субстраты CYP3A4) на фоне приема экстракта зверобоя.

Таблица 1

Растения, входящие в состав фитопрепаратов, компоненты которых являются индукторами изоферментов цитохрома P-450

Растения	Индуклируемые изоферменты цитохрома P-450	Источник
Зверобой продырявленный <i>Hypericum perforatum</i> (гиперфорин)	CYP3A4, CYP2E1, CYP1A2 (у женщин)	Wang Z. и др. (2001) [42]
Эхинацея пурпурная <i>Echinacea purpurea</i>	CYP3A4 (в печени)	Gorski C. и др. (2004) [16]
Зеленый чай <i>Camellia sinensis</i>	CYP3A4 (в печени)	Nishikawa M. и др. (2004) [11]
Пуэрерия лопастая <i>Pueraria lobata</i> (пуэрерарин)	CYP1A1, CYP1A2	Guerra M.C. и др. (2000) [31]
Розмарин лекарственный <i>Rosmarinus officinalis</i>	CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, CYP2B2, CYP2E1, CYP3A4	Yoon Y. и др. (2001) [44]
Чистец <i>Stachytarpheta cayennensis</i> (бета-микрен)	CYP2B1, CYP2B6	
Хмель обыкновенный <i>Humulus lupulus</i> (бета-микрен)	CYP2B1, CYP2B6	
Цимбопгон лимонный (лимонное сорго) <i>Symbopogon citratus</i> (бета-микрен)	CYP2B1, CYP2B6	
Лавр благородный <i>Laur nobilis</i> (бета-микрен)	CYP2B1, CYP2B6	

Sugimoto и соавт. [40] показали, что на фоне двухнедельного приема экстракта зверобоя концентрация симвастина значительно понижается. Этот эффект также, по-видимому, связан с индукцией СYP3A4 под действием экстракта зверобоя. Концентрация правастатина при этом не изменялась, так как этот препарат не является субстратом СYP3A4 [40].

В работе Ruschitzka и др. [37] продемонстрировано, что на фоне применения экстракта зверобоя концентрация циклосприна снижается более чем на 50%, что сопровождается повышением риска возникновения реакции отторжения трансплантата у больных после пересадки почки.

Интерес представляет работа Burstein и др. [8], в которой авторы показали, что экстракт зверобоя не повышает концентрацию карбамазепина (субстрат СYP3A4)

у больных эпилепсией, длительно принимающих это ЛС. Авторы объясняют это тем, что карбамазепин сам является индуктором СYP3A4, поэтому экстракт зверобоя и не может вызвать индукцию уже индурированной системы.

Предполагают, что способность экстракта зверобоя индуцировать СYP3A4 связана с содержащимися в нем гиперфоринном, и в меньшей степени с адгиперфоринном [29]. Эти соединения являются лигандами внутриклеточного прегнан-Х-рецептора, при этом образовавшийся комплекс проникает в ядро клетки и, влияя на регуляторную область гена СYP3A4, стимулирует экспрессию гена этого изофермента [30].

Компоненты, входящие в состав фитопрепаратов, могут также ингибировать изоферменты цитохрома Р-450 (табл. 2).

Таблица 2

Растения и фрукты, входящие в состав фитопрепаратов, компоненты которых являются ингибиторами изоферментов цитохрома Р-450

Растения	Ингибируемые изоферменты цитохрома Р-450	Источник
Фрукты		
Грейпфрут (сок и плоды) <i>Citrus paradisi</i> (6, 7-дигидроксибергамоттин)	СYP3A4 (в кишечнике)	Lown K.S. и др. (1997) [29]
Лайм (сок и плоды) <i>Citrus aurantifolia</i> (бергамоттин)	СYP3A4 (в кишечнике)	Bailey D.B. и др. (2003) [15]
Помелла (плоды) <i>Citrus grandis</i>	СYP3A4 (в кишечнике)	Egashira K. и др. (2003) [12]
Апельсин (кожура) <i>Citrus aurantium</i>	СYP3A4	Guo L.Q. и др. (2001) [18]
Растения		
Расторопша пятнистая <i>Silybum marianum</i> (силибин)	СYP2C9, СYP3A4	Sridar C. и др. (2004) [39]
Эхинацея пурпурная <i>Echinacea purpurea</i>	СYP1A2, СYP3A4 (в кишечнике)	Gorski C. и др. (2004) [16]
Зеленый чай <i>Camellia sinensis</i>	СYP3A4 (в кишечнике)	Nishikawa M. и др. (2004) [13]
Чеснок <i>Allium savitum</i> (аллицин)	СYP2E1	Yang C.S. и др. (2001) [43]

Растения	Ингибируемые изоферменты цитохрома Р-450	Источник
Растения		
Пуерерия лопастая <i>Pueraria lobata</i> (пурерарин)	CYP2B1, CYP2E1, CYP3A4	Guerra M.C. и др. (2000) [17]
Лимонник <i>Schisandra fruit</i> (гомисин С)	CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4	Iwata H. и др. (2004) [23]
Дудник даурский <i>Angelica dahurica</i>	CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4	Yoon Y. и др. (2001) [44]
Большдо <i>Peumus boldus</i>	CYP1A2, CYP3A4	
Элеутерококк колючий <i>Eleutherococcus senicosus</i>	CYP3A4	Smith M. и др. 2001 [38]
Кошачий коготь <i>Uncaria tomentosa</i>	CYP3A4	Budzinski J. и др. (2000) [7]
Ромашка аптечная <i>Matricaria chamomilla</i>	CYP3A4	
Бузина черная <i>Sambucus canadensis</i>	CYP3A4	
Желтокорень канадский <i>Hydrastis canadensis</i>	CYP3A4, CYP2D6	
Солодка голая <i>Glycyrrhiza glabra</i>	CYP3A4	
Черемуха поздняя <i>Prunus serotina</i>	CYP3A4	
Нотоптеригамус надрезанный <i>Notopterygium incisum</i>	CYP3A4	Guo L.Q. и др. (2001) [18]
Дудник китайский <i>Angelica sinensis</i>	CYP3A4	
Сапожниковия растопырчатая <i>Saposhnikovia divaricata</i>	CYP3A4	

Экстракт чеснока, за счет диаллилсульфида, является ингибитором CYP2E1 и снижает его активность более чем на 30% [43]. Клиническое значение этого феномена требует уточнения. Gorski и др. [16] продемонстрировали способность экстракта эхинацеи пурпурной ингибировать CYP1A2 и CYP2C9 в печени, CYP3A4 кишечника, при этом экстракт эхинацеи оказался индуктором CYP3A4 печени. Авторы делают вывод о том, что эти свойства экстракта эхинацеи могут иметь клиническое значения при ее совместном применении с ЛС-субстратами данных

изоферментов (теофиллином, фенитоином, циклоспорином).

Экстракт сока грейпфрута входит в состав ряда фитопрепаратов. Широко известна способность сока грейпфрута ингибировать CYP3A4. Продемонстрировано, что совместное применение сока грейпфрута с ЛС-субстратами CYP3A4 увеличивает их биодоступность [29], что сопровождается увеличением риска НЛР (табл. 3). Так, сок грейпфрута увеличивает биодоступность нифедипина, мидазолама, триазолама, цизаприда, циклоспоринона более чем на 50% [29]. Доказано, что сок грейп-

фрукта в большей степени ингибирует активность CYP3A4 в стенке кишечника, чем в печени [29]. При этом ингибирование CYP3A4 сохраняется в течение 24 часов после приема 200 мл сока грейпфрута. Причем ингибирующая способность сока грейпфрута зависит от сорта, например сок белых грейпфрутов является более сильным ингибитором CYP3A4 и гликопротеина-P, чем красных. Предполагают, что активным компонентом сока грейпфрута, ингибирующим CYP3A4 и гликопротеин-P, является фумарокумарины 6, 7- дигидроксибергамотин, и, в меньшей степени, ниренгинин [22].

Экстракт красного вина также входит в состав многих фитопрепаратов. В исследованиях *in vitro* было показано, что ингибитором CYP3A4 является также флавоноид красного вина ресвератрол, причем его ингибирующая активность сопоставима с макролидами (эритромицином и тролеандомицином) [9]. Однако авторам не удалось найти связь между содержанием ресвератрола в красном вине и его ингибирующей активностью по отношению к CYP3A4. Это скорее всего связано с тем, что и другие флавоноиды красного вина ингибируют CYP3A4. [9]. Так, Piver и др. [35] показали, что еще один флавоноид красного вина — эпселон-винеферин (димер ресвератрола) — является более сильным ингибитором CYP3A4, кроме того он ингибирует CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6.

Способность флавоноидов красного вина ингибировать изоферменты цитохрома P-450 может иметь клиническое значение при его взаимодействии с ЛС. В настоящее время имеется небольшое количество клинических исследований в которых изучалось влияние красного вина на фармакокинетику ЛС. Так, у здоровых добровольцев красное вино (Cabernet Sauvignon 1999; Ernest & Julio Gallo, Modesto, Calif.) достоверно удлиняет время наступления максимальной концентрации фелодипина (субстрат CYP3A4) и его метаболита дигидрофелодипина [5].

В другом исследовании на фоне приема красного вина имелась тенденция к повышению максимальной концентрации цизаприда (субстрат CYP3A4) в плазме крови, кроме того, достоверно удлинялось время ее наступления [32]. Следует отметить, что изменение фармакокинетики ЛС под влиянием красного вина не приводило к изменению фармакодинамики, что скорее всего связано с тем, что эти исследования проводились при однократном, а не курсовом применении ЛС. Однако в работе Tsunoda и др. [41] показано, что красное вино (Blackstone Merlot, 1996; Blackstone Winery, Graton, Calif.), напротив, снижает биодоступность и максимальную концентрацию циклоспорина в плазме крови.

Можно предположить, что противоречивые результаты упомянутых исследова-

Таблица 3

Нежелательные реакции, возникающие при совместном применении лекарственных средств и сока грейпфрута [4]

Лекарственные средства	Нежелательные реакции
Гиполипидемические ЛС: ловастатин, симвастатин, аторвастатин	Разрушение поперечно-полосатой мускулатуры (рабдомиолиз)
Антигипертензивные ЛС: фелодипин, никардипин, нифедипин, нисодипин, нитрендипин	Гипотония, тахикардия
Гипогликемические ЛС: репаглинид	Гипогликемия
ЛС для лечения эректильной дисфункции: силденафил, тадалафил, варденафил	Гипотония

ний связаны с различным содержанием флавоноидов, обладающих ингибирующим действием.

Влияние фитопрепаратов на активность гликопротеина-Р

Гликопротеин-Р представляет собой АТФ-зависимый белок переносчик, локализованный на апикальной мембране клеток слизистой кишечника (энтероцитах), гепатоцитов, эпителиоцитов почечных канальцев. Субстратами гликопротеина-Р являются сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, макролиды, фторхинолоны, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, статины, многие противоопухолевые средства. В кишечнике гликопротеин-Р препятствует всасыванию ЛС, а в почках и в печени, способствует активной секреции соответственно в мочу и в желчь [1].

Индукторы гликопротеина-Р способствуют угнетению всасывания ЛС и ускорению их выведения, приводя к снижению их концентрации и ослаблению фармакологических эффектов. Напротив, ингибиторы гликопротеина-Р повышают всасывание ЛС и угнетают их выведение, что приводит к повышению их концентрации и повышению риска развития НЛР [1].

Имеются данные о том, что экстракт зверобоя является также индуктором гликопротеина-Р [11]. Совместное применение препаратов зверобоя с ЛС-субстратами гликопротеина-Р приводит к снижению концентрации последних в плазме крови, что чревато снижением эффективности фармакотерапии [10, 11]. Так, показано, что согласно описанному механизму экстракт зверобоя снижает концентрацию ингибиторов ВИЧ-протеиназ индинавира и саквинавира [33], а следовательно и эффективность этих ЛС у больных ВИЧ-инфекцией.

Dresser и др. (2003) изучили фармакокинетику дигоксина у больных, одновременно принимающих экстракт зверобоя.

Оказалось, что экстракт зверобоя почти в два раза снижал концентрацию дигоксина [10]. На основании экспериментальных работ высказывается предположение, что из всех компонентов экстракта зверобоя ответственным за индукцию гликопротеина-Р является также гиперфорин [42].

В исследовании *in vitro* показано, что экстракт клевера лугового (*Trifolium pratense*) также способен индуцировать гликопротеин-Р, предположительно за счет биоханина А [45]. Следствием этого является повышение всасывания и угнетение выведения дигоксина и винбластина под действием экстракта клевера лугового [46].

Заключение

Поток данных о неблагоприятных взаимодействиях ЛС с фитопрепаратами неуклонно растёт. Эта проблема ставит вопрос: каким образом можно обеспечить высокую эффективность совместного применения ЛС и фитопрепаратов?

На наш взгляд, этот вопрос должен решаться комплексно. С одной стороны, необходимо повысить уровень информированности врачей и пациентов о неблагоприятных взаимодействиях ЛС с фитопрепаратами, а с другой — наладить систему экспертизы фитопрепаратов «прицельно» на предмет их взаимодействия с ЛС. Очевидно, что для проведения подобной экспертизы необходимо проводить исследования по изучению влияния фитопрепаратов и их компонентов на активность изоферментов цитохрома Р-450 и гликопротеина-Р.

Данные, полученные в подобных исследованиях, должны найти свое отражение в инструкциях по применению фитопрепаратов. Так, Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами (США) в своей директиве, выпущенной в феврале 2000 года, указывает на то, что «не рекомендуется совместное применение экстракта зверобоя с оральными контрацеп-

тивами, селективными ингибиторами обратного захвата серотонина и ингибиторами ВИЧ-протеиназы» [20].

Литература

1. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. М., Реафарм. 2004.
2. Кукес В.Г., Ших Е.В., Сычев Д.А., Булаев В.М., Раменская Г.В. О взаимодействии биологически активных добавок, содержащих лекарственные растения, с лечебными средствами. *Вопросы питания*, 2003, 72 (№ 5), 39-43.
3. Пилат Т.П., Иванов А.А. Биологически активные добавки к пище (теория, производство, применение). М. 2002.
4. Bailey D.G., Dresser G.K. Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2004; 4(5): 281-97.
5. Bailey D., Dresser G., Bend J. et al. Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: Comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther*. 2003; 73: 23-27.
6. Barone G.W., Gurley B.J., Ketel B.L., Abul-Ezz S.R. Herbal dietary supplements: a source for drug interactions in transplant recipients. *Transplantation*. 2001; 71: 239-41.
7. Budzinski J., Foster B., Vandenhoeck S. An *in vitro* evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine*. 2000; 7(4): 273-82.
8. Burstein A. et al. Lack of effect of St John's wort on carbamazepine pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2000; v. 68; No. 6.
9. Chan W.K., Delucchi A.B. Resveratrol, a red wine constituent, is a mechanism-based inactivator of cytochrome P450 3A4. *Life Sci*. 2000, Nov 10; 67(25): 3103-12.
10. Dresser K. et al. Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 32-43.
11. Durr D., Stieger B., Kullak-Ublick G.A., et al. St John's wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68: 598-604.
12. Egashira K., Fukuda E., Onga T., Yogi Y., Matsuya F., Koyabu N., Ohtani H., Sawada Y. Pomelo-induced increase in the blood level of tacrolimus in a renal transplant patient. *Transplantation*. 2003, Apr 15; 75(7): 1057.
13. Foster D., Phillips R., Hamel M., Eisenberg D.M. Alternative medicine use in older Americans. *J Am Geriatr Soc*, 2000; 48: 1560-1565.
14. Fugh-Berman A., Ernst E. Herb-drug interactions: review and assessment of report reliability. *Br J Clin Pharmacol*, 2001; 52: 587-595.
15. Gorski J.C., Hamman M.A., Wang Z., Vasavada N., Huang S., Hall S.D. The effect of St John's wort on the efficacy of oral contraception. *Clin Pharmacol Ther*, 2002; 71: P25.
16. Gorski C., Huang H.M., Pinto A. et al. The effect of echinacea (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity *in vivo*. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 75: 36-48.
17. Guerra M.C., Speroni E., Broccoli M., et al. Comparison between Chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalysed drug metabolism. *Life Sci.*, 2000 Nov 3; 67(24): 2997-3006.
18. Guo L.Q., Taniguchi M., Chen Q.Y., Baba K., Yamazoe Y. Inhibitory potential of herbal medicines on human cytochrome P450-mediated oxidation: properties of umbelliferous or citrus crude drugs and their relative prescriptions. *Jpn J Pharmacol*. 2001, Apr; 85(4): 399-408.
19. Gurley J. et al. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 2002; v. 72; No. 3.
20. Henney J. Risk of drug Interactions with St John's wort. *Journal of the American Medical Association*, 2000; v. 283; 13.
21. Hensrud D.D., Engle D.D., Scheitel S.M. Underreporting the use of dietary supplements and nonprescription medications among patients undergoing a periodic health examination. *Mayo Clin Proc*, 1999; 74: 443-7.
22. Huang S.M., Hall S., Watkins P. et al. Drug interactions with herbal products and grapefruit juice: A conference report. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; v. 75; No1: 2-14.
23. Iwata H., Tezuka Y., Kadota S., Hiratsuka A.,

- Watabe T. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in Schisandra fruit extract. *DMD* 32: 2004, 1351-1358.
24. Izzo A.A., Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Drugs*, 2001; 61: 2163-75.
 25. Kaufman D.W., Kelly J.P., Rosenberg L., Anderson T.E., Mitchell A.A. Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States. *JAMA* 2002; 287: 337-44.
 26. Kessler R.C., Davis R.B., Foster D.F. et al. Long-term trends in the use of complementary and alternative medical therapies in the United States. *Ann Intern Med*, 2001; 135: 262-268.
 27. Klepser T.B., Doucette W.R., Horton M.R., et al. Assessment of patient's perceptions and beliefs regarding herbal therapies. *Pharmacotherapy*, 2000; 20: 83-7.
 28. Kristoffersen S.S., Atkin P.A., Shenfield G.M. Uptake of alternative medicine. *Lancet*, 1996; 347: 972.
 29. Lown K.S., Bailey D.G., Fontana R.J., Janardan S.K., Adair C.H., Fortlage L.A., Brown M.B., Guo W., Watkins P.B. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J. Clin. Invest.* 1997, 99: 2545-2553.
 30. Moore L.B., Goodwin B., Jones S.A., Wisely G.B., Serabjit-Singh C.J., Willson T.M., et al. St John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X-receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97: 7500-2.
 31. Nishikawa M., Ariyoshi N., Kotani A. et al. Effects of continuous ingestion of green tea or grape seed extracts on the pharmacokinetics of midazolam. *Drug Metab Pharmacokin*, 2004; 19 (4): 280-289.
 32. Offman E.M., Freeman D.J., Dresser G.K., et al. Red wine-cisapride interaction: comparison with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther.* 2001, Jul; 70(1): 17-23.
 33. Piscitelli S.C., Burstein A.H., Chait D., Alfaro R.M., Falloon J. Indinavir concentrations and St John's wort. *Lancet*, 2000; 355: 547-8.
 34. Pitetti R., Singh S., Hornyak D., Garcia S.E., Herr S. Complementary and alternative medicine use in children. *Pediatr Emerg Care*, 2001; 17: 165-169.
 35. Piver B., Berthou F., Dreano Y., Lucas D. Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by epsilon-viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sci.* 2003, Jul 18; 73(9): 1199-213.
 36. Raucy J.L. Risk assessment: toxicity from chemical exposure resulting from enhanced expression of CYP2E1. *Toxicology*, 1995; 105: 217-23.
 37. Ruschitzka F., Meier P.J., Turina M., Luscher T.T., Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet*, 2000; 355: 548-9.
 38. Smith M., Lin K., Zheng Y, et al. An open trial of nifedipine-herb interactions: nifedipine with St. John's wort, ginseng or ginkgo biloba. *2001 Annual Meeting of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics. Orlando, Florida, USA. March 6-10, 2001. Clin Pharmacol Ther.* 2001 Feb; 69(2): Abstract PIII-89.
 39. Sridar C., Goosen T., Kent U., Williams J., Hollenberg P. Silybin inactivates cytochromes P450 3A4 and 2C9 and inhibits major hepatic glucuronosyltransferases. *DMD*, 2004, 32: 587-594.
 40. Sugimoto K., Ohmori M., Tsuruoka S., Nishiki K., Kawaguchi A. et al. Different effects of St John's wort on the pharmacokinetics of simvastatin and pravastatin. *Clin Pharmacol Ther*, 2001; 70: 518-24.
 41. Tsunoda S., Harris R., Christians U. et al. Red wine decreases cyclosporine bioavailability. *Clin Pharmacol Ther*, 2001; 70: 462-7.
 42. Wang Z., Gorski J.C., Hamman M.A., Huang S., Lesko L.J., Hall S.D. The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther*, 2001; 70: 317-26.
 43. Yang C.S., Chhabra S.K., Hong J., Smith T.J. Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *J Nutr*, 2001; 131: 1041S-1045S.
 44. Yoon Y.R., Kim M.J., Shin M.S., et al. Screening of *in vitro* inhibitory effects of 15 herbal medicines on CYP3A4-catalyzed midazolam hydroxylation. *2001 Annual Meeting of the American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics. Orlando, Florida, USA. March 6-10, 2001. Clin Pharmacol Ther.* 2001, Feb; 69(2): Abstract PIII-97.

45. Zhang S., Morris M.E. Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin, and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, Mar; 304(3): 1258-67.
46. Zhang S., Morris M.E. Effect of the flavonoids biochanin A and silymarin on the P-glycoprotein-mediated transport of digoxin and vinblastine in human intestinal Caco-2 cells. *Pharm Res.* 2003, Aug; 20(8): 1184-91.

PHARMACOKINETICS OF DRUGS INTERACTION WITH HERBAL PRODUCTS

D.A. Sychev, E.V. Schich, V.M. Bulaev, G.V. Ramenskaya, V.G. Kukes, S.V. Kolhir
Institute of Clinical Pharmacology NC ESMP, Moscow

Now, in increasing frequency, the patients apply various sorts of biological active additives (BAA) containing plants alongside with drugs. Much evidence on influence of these plants on activity of isoenzymes of cytochroms P-450 has been collected. This phenomenon can be of clinical significance when drugs and BAA are jointly applied. Inhibiting isoenzymes of cytochroms P-450, the plants can raise concentration of drugs in plasma and so increase risk of adverse side effects. The inhibitors of isoenzymes of cytochroms P-450 are grapefruit juice, *Silybum marianum*, *Allium savitum*, *Schisandra fruit* etc. To the contrary, some plants can reduce concentration of drugs in plasma by inducing isoenzymes of cytochroms P-450, thus they can reduce the drug efficiency. The inducers of isoenzymes of cytochroms P-450 are *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis* etc. There are plants such as *Echinacea purpurea*, *Camellia sinensis* or *Pueraria lobata* that have both inductor and inhibitor properties. It is necessary to continue studying the influence of other plants on activity of isoenzymes of cytochroms P-450. The data obtained in similar investigations shall be included in BAA application instructions to increase efficiency and safety of BAA and drugs joint therapy.

Key words: pharmacokinetical interaction, herbal products, isoenzymes of cytochrom P-450, glicoprotein-P.

Коррекция патогенетических нарушений при сахарном диабете второго типа методами клеточной трансплантации

О.И. Степанова, Н.Н. Каркищенко, Н.А. Онищенко, Е.А. Степанова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

НИИ трансплантологии и искусственных органов Росздрава, Москва

Цель данного обзора — предоставить информацию о причинах возникновения одного из самых распространенных заболеваний в мире — сахарного диабета II типа, а также оценить перспективы современных методов лечения. Анализ опыта отечественных и зарубежных ученых показал, что клеточная терапия является наиболее перспективным направлением лечения и коррекции клинических проявлений сахарного диабета и его осложнений. Терапевтический эффект при сахарном диабете был экспериментально доказан в модельных опытах на лабораторных животных, который, как полагают, обусловлен регенерацией островковых клеток поджелудочной железы, а также восстановлением адекватной реакции клеток организма, в том числе β -клеток и клеток иммунной системы на нарушения метаболизма углеводов и липидов.

Ключевые слова: сахарный диабет, стволовые клетки головного мозга, регенерация поджелудочной железы, дуктальные стволовые клетки, трансплантация.

Сахарный диабет (СД) чрезвычайно распространен в современном мире. В настоящее время в мире насчитывается около 150 миллионов больных СД, причем численность больных постоянно увеличивается и, по прогнозам ВОЗ, к 2020 году достигнет 300 миллионов. Таким образом, СД — это еще одна «эпидемия» XX (а теперь уже и XXI) века наряду с атеросклерозом и онкологическими заболеваниями. С ростом заболеваемости во всем мире увеличиваются и государственные затраты в этих странах на обследование, лечение и реабилитацию больных СД. Особенно велики государственные затраты на регулярное обеспечение больных сахароснижающими препаратами, шприцами, диагностическими средствами. Однако СД причиняет не только материальный и моральный, но и значительный социальный ущерб обществу, так как необходимость постоянного самоконтроля, соблюдения строгих диетических и режимных ограничений, трудность социальной адаптации больного в обществе (начиная от выбора профессии

и кончая проблемами создания семьи и рождения детей) — все это ложится тяжелым бременем на семью и органы соцзащиты. Поэтому не будет преувеличением считать, что число лиц, прямо или косвенно страдающих от СД, неизмеримо больше, чем это отражено в статистических сводках. Существует несколько типов СД, механизм развития каждого из которых имеет свою специфику:

- I. Инсулинзависимый сахарный диабет (I тип) развивается из-за недостаточности функции и гибели островковых клеток поджелудочной железы.
- II. Инсулиннезависимый сахарный диабет (II тип) развивается у лиц с ожирением и нормальной массой тела в результате резистентности органов (клеток-мишеней) к инсулину. Продукция инсулина β -клетками исходно не нарушена.
- III. Симптоматический сахарный диабет развивается:
 - на фоне заболеваний поджелудочной железы (рак, панкреатит);

- на фоне других эндокринных заболеваний (болезнь Иценко–Кушинга, диффузно-токсический зоб);
- на фоне применения некоторых гормональных препаратов глюкокортикоидов (стероидный диабет);
- на фоне хронической интоксикации (уремия)

IV. Диабет беременных [8].

Ниже мы рассмотрим этиологию, патогенез и лечение инсулиннезависимого сахарного диабета (ИНСД) как наиболее распространенной формы СД среди людей старше 40 лет.

1. Современные представления о патогенезе ИНСД и его осложнениях

ИНСД представляет собой заболевание, обусловленное резистентностью тканей к инсулину и развитием относительного дефицита инсулина. Инсулин представляет собой полипептидный гормон, обеспечивающий снижение содержания глюкозы в крови путем усиления ее трансмембранного транспорта в клетки в качестве энергетического субстрата. Стимуляция инсулином трансмембранного транспорта приводит к увеличению скорости поступления глюкозы внутрь клетки в 20–40 раз. Все метаболические эффекты инсулина первично реализуются на уровне цитоплазматической мембраны путем связывания инсулина со специфическими рецепторами [11].

Проникновение глюкозы через мембрану осуществляется с помощью белков-переносчиков. Инсулин стимулирует перемещение белков–переносчиков глюкозы из эндоплазматического ретикула к цитоплазматической мембране. Инсулин снижает гипергликемию не только за счет транспорта глюкозы в ткани, но и торможения глюконеогенеза в печени. Инсулин ускоряет гликолиз в клетках, способствует образованию АТФ и синтезу гликогена

в печени и мышцах, а также тормозит в них гликогенолиз.

При ИНСД инсулин исходно синтезируется островковыми клетками поджелудочной железы, однако клетки органов и тканей являются резистентными к циркулирующему инсулину в крови, в результате чего развивается гипергликемия — ведущий симптом заболевания. Гипергликемия стимулирует продукцию инсулина (гиперинсулинемия) и является показателем относительного дефицита этого гормона [4, 24].

Как правило, ИНСД поражает людей старше 40 лет, и поскольку функция бета-клеток частично или полностью сохранена, большинство больных первоначально не нуждается в инсулинотерапии [19].

Различают два типа ИНСД: с поражением отдельных генов (10–15%) и с поражением множества генов (85–90%), ответственных в клетках за связывание инсулина рецепторами клеток, за интернализацию гормоно-рецепторного комплекса, ответственного за аутофосфорилирование β-рецепторов или фосфорилирование других белковых компонентов мембран. Примером множественного повреждения может служить инсулинорезистентность клеток, обусловленная множественными мутациями гена рецептора инсулина. Обнаружено до 30 типов мутаций гена [3, 19].

То, что клинические проявления ИНСД возникают у больных во второй половине жизни (как правило после 40 лет), позволяет считать, что существующие генетические дефекты клеток-мишеней длительно компенсируются в организме с помощью вспомогательных систем регуляции углеводного обмена. Факторами, которые приводят к декомпенсации этих механизмов, являются так называемые внешние причины, которые, циркулируя в крови, ослабляют действие инсулина. К ним относится избыток контринсулярных гормонов, аутоантитела и блокирующие рецепторы инсулина. Особенно большое значение прида-

ется избыточному поступлению с пищей в организм и кровь сахаров, липидов, несбалансированных липидов (дислипидемия), в результате чего рецепторы инсулина на клеточных мембранах блокируются [4, 9].

О важном значении перечисленных факторов свидетельствуют наблюдения по восстановлению чувствительности клеток к инсулину в условиях диетотерапии (ограничения поступления в организм сахаров и липидов) и применения препаратов сульфаниламочевины, которые подавляют продукцию глюкозы и расщепление инсулина в печени.

На ранних стадиях болезни инсулинорезистентность не сопровождается выраженной гипергликемией, поскольку β -клетки секретируют достаточно инсулина, однако, уже в это время может выявляться нарушение (снижение) толерантности клеток к глюкозе. Инсулинорезистентность постепенно приводит к усилению секреции инсулина β -клетками. Однако гиперинсулинемия уменьшает число рецепторов на клетках-мишенях, и поэтому инсулинорезистентность усиливается.

В этих условиях β -клетки поджелудочной железы постепенно теряют способность реагировать на повышение уровня глюкозы. Истощается восстановительная регенерация β -клеток (потеря β -клеток преобладает над их образованием), и в результате возникает относительный дефицит инсулина в организме [11].

Из-за дефицита инсулина еще больше снижается утилизация глюкозы в тканях, особенно в мышечной, и усиливаются гликогенолиз и глюконеогенез в печени. В результате появляется выраженная гипергликемия и нарастает энергетический дефицит в тканях. На этой стадии проявляются классические симптомы сахарного диабета (полиурия, полифагия, полидипсия) и возникает необходимость применения экзогенного инсулина [9, 18, 19].

Для больных ИНСД как с ожирением, так и без него, наряду с инсулинорезис-

тентностью, характерна дислипидопротеидемия, особенно гипертриглицеридемия, поскольку избыток инсулина стимулирует липогенез и секрецию липопротеидов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП, ЛПОНП) в печени. С другой стороны, дислипидемия и атеросклероз индуцируют симптомы ИНСД, так как липидный и углеводный обмен метаболически взаимодействуют. Гиперинсулинемия и дислипидемия служат непосредственной причиной развития макроангиопатических (преимущественно при атеросклерозе и ИБС) и микроангиопатических (преимущественно при ИНСД: ретинопатия, нефропатия, нейропатия) осложнений [3].

У 30% больных ИНСД без ожирения через 5–10 лет после проявления заболевания возникает абсолютный дефицит инсулина. У части больных выявляются аутоантитела к антигенам β -клеток, и это дает основание полагать, что абсолютный дефицит инсулина вызван аутоиммунным разрушением β -клеток [9, 19].

По современным представлениям, атеросклероз является аутоиммунным заболеванием, при котором аутоантитела могут не выявляться в крови, но обнаруживаются в регионарных лимфоузлах рядом с атероматозной бляшкой [17]. Поскольку атеросклероз является спутником ИНСД, усугубляет и индуцирует его клинические проявления, то можно полагать, что при ИНСД также имеет место аутоиммунный процесс с преимущественной локализацией антител сначала в регионарных лимфоузлах, прилегающих к поджелудочной железе, а позднее уже в крови.

Из схемы, приведенной на рис. 1, видно, что для поддержания нормального уровня глюкозы в крови в условиях инсулинорезистентности клеток требуется усиленная секреция инсулина. Когда секреторная активность β -клеток становится недостаточной для преодоления инсулинорезистентности, возникают нарушения обмена глюкозы. Вначале они проявляют-



Рис. 1. Обобщенная схема патогенеза инсулинонезависимого сахарного диабета и синдрома инсулинорезистентности (по данным литературы)

ся как нарушение толерантности к глюкозе, а впоследствии — клиническими признаками ИНСД: гипергликемией, артериальной гипертензией, повышением уровня триглицеридов, ЛПНП, ЛПОНП, снижением уровня ЛПВП, а также усилением липолиза и ускорением атерогенеза в результате компенсаторно развившейся гиперинсулинемии.

Инсулинорезистентность клеток печени приводит к повышению продукции гепатоцитами глюкозы (в основном за счет усиления глюконеогенеза). В результате еще более повышается уровень глюкозы в крови.

Из-за инсулинорезистентности скелетных мышц и подавления транспорта глюкозы резко повышается уровень глюкозы в крови после приема пищи, так как утилизация глюкозы в мышцах является главным механизмом удаления её из крови. *Из-за инсулинорезистентности скелетных мышц*

происходит снижение тирозинкиназной активности рецепторов инсулина в мышцах и снижение активности гликогенсинтазы и пируватдегидрогеназы. Следствием этого становится снижение кровотока в скелетных мышцах, повышение уровня амелина и кальцитониноподобного пептида в сыворотке, а также нарушение процессов транспорта и окисления липидов [8, 9, 18, 19].

Таким образом, инсулинорезистентность клеток-мишеней в организме является пусковым механизмом развития клинических проявлений ИНСД. С общепатологической точки зрения, избыточно накапливающиеся в организме белковые продукты нарушенного межучточного обмена углеводов и липидов (гликозилированные белки и липопротеиды) становятся факторами запуска системной воспалительной реакции организма на измененные белки и индукции нарушений со стороны иммун-

ной системы, которые по современным представлениям, по-видимому, лежат в основе развития тяжелых осложнений, сопутствующих ИНСД [2, 7, 12, 17, 23].

Между тем механизмы развития осложнений ИНСД до конца не выяснены. Установлено, что гипергликемия приводит к микроангиопатическим, а сопутствующее неферментативное гликозилирование белков — к макроангиопатическим осложнениям [25].

Неферментативное гликозилирование белков, развивающееся как компенсаторная реакция для связывания сахаров и удаления их из крови, приводит к образованию гликозилированного гемоглобина, альбумина, коллагена, белков хрусталика, липопротеидов. В результате нарушаются функции этих белков и распознавание их соответствующими рецепторами: гликозилированные ЛПНП не распознаются ЛПНП-рецепторами в печени, поэтому концентрация ЛПНП в плазме возрастает. Напротив, гликозилированные ЛПВП метаболизируются в печени гораздо быстрее, чем нормальные ЛПВП. Такие нарушения метаболизма липопротеидов могут играть важную роль в патогенезе макроангиопатических осложнений, типичных для дислипидемий и атеросклероза.

Гликозилированный коллаген менее растворим и более устойчив к коллагеназе, чем нормальный коллаген. Предполагают, что утолщение базальной мембраны эндотелия при макроангиопатии и изменения структуры кожи при диабетической нейропатии обусловлены отложением в этих тканях гликозилированного коллагена [10].

Несколько гликозилированных белков могут соединяться друг с другом через остатки 3-дезоксиглюкозы, при этом образуются перекрестно сшитые гликозилированные белки. Появление таких патологически измененных белков связывание их рецепторами макрофагов и эндотелиальных клеток стимулирует в организме систем-

ную воспалительную реакцию, синтез и секрецию провоспалительных цитокинов, эндотелина-1 и тканевого фактора: активатор тканевого плазминогена и одновременно ингибитор 1-го типа активатора плазминогена (ИАП-1), которые повреждают эндотелий, нарушают сосудистый тонус, способствуют развитию ангиопатий и нарушению свертывания крови [3].

Гемодинамические нарушения при сахарном диабете обусловлены как поражением эндотелия, так и нарушением нервной регуляции сосудистого тонуса.

В итоге, конечные продукты гликирования белков связываются со специфическими рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток и клеток воспаления (макрофаги, моноциты), стимулируют секрецию факторов роста провоспалительных цитокинов. В зонах повреждения эндотелия клетки воспаления (макрофаги) прикрепляются и проникают в стенку сосуда, начинают захватывать липиды из кровотока, превращаясь в пенистые клетки и запуская процесс атерогенеза [3, 6, 10]. Однако сосудистые нарушения обусловлены не только дисфункцией эндотелия, но и развитием окислительного стресса клеток, накоплением в эндотелии и сосудистом русле активных форм кислорода, усиливающих процессы перекислого окисления липидов, в том числе фосфолипидов клеточных мембран [7, 10].

Схема патогенеза сосудистых осложнений при ИНСД представлена на рис. 2.

Как видим, центральную роль в патогенезе сосудистых осложнений при СД — в развитии макро- и микроангиопатий — играет системная воспалительная реакция, которая, как и при других хронических системных заболеваниях, проявляется повышением экспрессии специфических маркеров воспаления (фибриногена, С-реактивного белка и белка-амилоид-1), а также повышением уровня цитокинов (интерлейкины, а-фактор некроза опухолей и т.д.) [3].

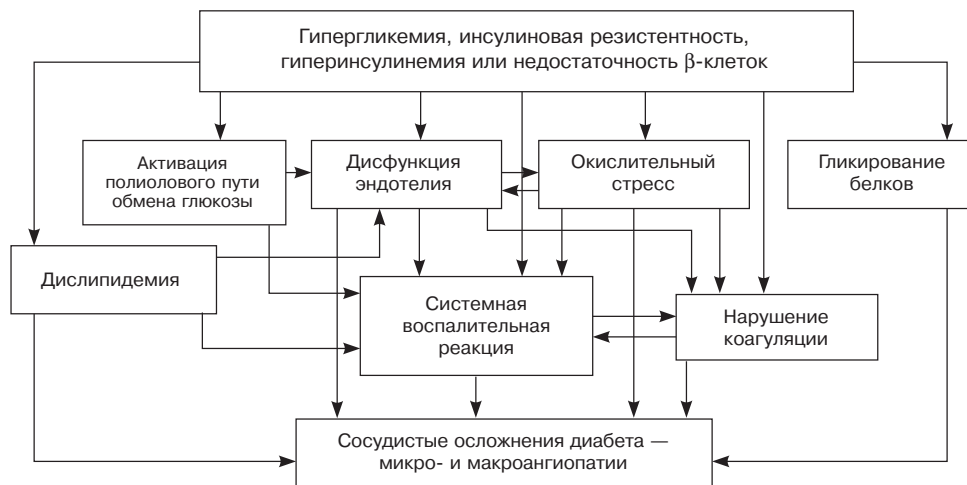


Рис. 2. Патогенез развития сосудистых осложнений при сахарном диабете II типа

Самое грозное осложнение СД и самая частая причина слепоты — это **диабетическая ретинопатия**, которая развивается у 60–80% больных СД.

От 20 до 85% больных СД поражает **диабетическая нейропатия**, которая проявляется сенсорными, двигательными и вегетативными нарушениями. Различают несколько клинических типов нейропатии: периферическую полинейропатию, вегетативную нейропатию, мононейропатию и радикулит. Диабетическая стопа — синдром, обусловленный периферической нейропатией и макроангиопатией, включает поражения костей и сосудов стопы и язвенные поражения стопы.

У 10–20% больных СД развивается **диабетическая нефропатия**. Больные инсулинозависимым СД (I типа) особенно подвержены этому осложнению: у 30–40% больных через 15–20 лет после клинического проявления болезни развивается терминальная почечная недостаточность.

Особенно подвержены диабетической нефропатии люди, страдающие артериальной гипертонией, инфекцией мочевых путей, и те, кто применяет нефротоксичные лекарственные средства.

Атеросклероз — типичное макроангиопатическое осложнение ИНСД, повышающее риск инфаркта миокарда и инсульта: распространенность инфаркта миокарда среди больных сахарным диабетом в два раза выше, чем среди общей массы населения [10, 17, 18, 25]. Атеросклеротические поражения артерий ног способствуют развитию диабетической стопы.

Несмотря на то, что в патогенезе ангиопатий при сахарном диабете I и II типа имеются общие черты, различная частота и специфичность поражения отдельных сосудов свидетельствуют о наличии не только общих, но и специфических механизмов развития сосудистых осложнений. Таблица дает представление об особенностях клинических проявлений ангиопатий при сахарном диабете I и II типа.

Из таблицы видно, что СД I и II типа характеризуется различной частотой, распространенностью и локализацией патологического процесса в разных частях сосудистой системы.

Сосудистые нарушения при СД (I и II типов) являются следствием адаптационных изменений в тканях организма при гипергликемии и нарушении межклеточ-

Особенности сосудистых осложнений при СД I и II типа (по М.И. Балаболкину [3])

Сосудистые осложнения	Сахарный диабет I типа	Сахарный диабет II типа
Причины снижения остроты зрения и развития слепоты	Микроангиопатия – пролиферативная ретинопатия	Макулопатия, ретинопатия значительно реже
Нарушение функции почек (нефропатия)	Микроангиопатия вплоть до развития ХПН	Поражение крупных сосудов почек, пиелонефрит и другая патология почек
Макроангиопатия (ИБС и инфаркт миокарда, инсульт, гангрена нижних конечностей)	Встречается редко	Встречается в несколько раз чаще по сравнению с диабетом I типа
Частота гипертензии	Встречается при наличии клинически выраженной нефропатии	У 40–50% больных имеется уже при манифестации диабета

ного обмена, которые приводят к мобилизации защитных систем организма и развитию системной воспалительной реакции. Важным звеном этой реакции является поражение сосудистой выстилки эндотелия и гиперактивизация макрофагальной системы. Поскольку нарушения углеводного обмена взаимно влияют на нарушения липидного обмена, то изменения сосудистого русла при СД II типа близки к ангиопатиям при атеросклерозе, которые патологически характеризуются как макроангиопатия. Для диабета I типа, который относят к аутоиммунным заболеваниям, характерны микроангиопатии; диабет II типа в поздней стадии развития, как и СД I типа, связан с гибелью островковой ткани и его также относят к аутоиммунным заболеваниям.

Аутоиммунный компонент является непременным участником развития сосудистых осложнений [17].

Развитие системной воспалительной реакции и аутоиммунного поражения островковой ткани поджелудочной железы, в особенности на поздних сроках развития ИНСД, позволяет прийти к заключению, что прогрессирование ИНСД и развитие опасных для жизни осложнений являются результатом глубокой дисфункции иммунной системы, которая, как известно, в норме регулирует не только им-

муногенез (поддержание постоянства антигенного состава организма), но и морфогенез, то есть ответственна за процессы восстановительной регенерации клеток разных органов и тканей [1, 2].

2. Современные методы лечения СД

Лечение несложных форм ИНСД часто может быть эффективным при соблюдении **диеты с ограничением углеводов и жиров** и режима **физической нагрузки**. Если не удаётся этими мерами поддерживать нормальные значения глюкозы в крови, назначают лекарственные препараты — **пероральные сахаропонижающие средства** (обычно производные сульфанилмочевины и/или инъекции инсулина). Инсулин — основное средство терапии СД I типа.

2.1. Медикаментозная терапия

Основной механизм действия всех производных сульфанилмочевины (глибенкламид, гликлазид, глипизид, гликвидон и др.) одинаков: они связываются с АТФ-зависимыми калиевыми каналами в мембранах β-клеток, блокируют эти каналы и тем самым стимулируют секрецию инсулина. Кроме того, производные сульфанилмочевины подавляют продукцию глюкозы и расщепление глюкогена в печени,

а также повышают чувствительность тканей к инсулину. Все производные сульфаниламочевины метаболизируются в печени и выводятся почками [19, 25].

Производные сульфаниламочевины лучше всего подходят для больных с ожирением, не предрасположенных к кетонемии и диабетическому кетоацидозу, старше 50 лет, с нормальной осмоляльностью плазмы, без тяжелой гипергликемии. У таких больных эти препараты обычно снижают уровень глюкозы в крови натощак до 3,9–4,4 ммоль/л. Препараты назначают только после того, как все попытки нормализовать уровень глюкозы в крови с помощью диеты и физических нагрузок оказались безуспешными. Производные сульфаниламочевины менее эффективны у больных без ожирения и при тяжелых метаболических нарушениях. Для таких больных показан инсулин.

Примерно у 5% больных ИНСД лечение производными сульфаниламочевины с самого начала оказывается безуспешным. У 15–30% больных потеря чувствительности к производным сульфаниламочевины наблюдается через 5–10 лет после начала лечения. Среди возможных причин указывают на десенсибилизацию калиевых каналов, скрытое аутоиммунное разрушение β -клеток, несоблюдение режима лечения и диеты. В таких случаях производные сульфаниламочевины отменяют и переходят к инсулинотерапии [25].

Самыми частыми осложнениями при медикаментозном лечении являются гипогликемии в результате передозировки препарата, пропуска приема пищи, тяжелой физической нагрузки и употребления алкоголя.

Некоторые лекарственные средства взаимодействуют с производными сульфаниламочевины, усиливая их гипогликемизирующее действие. К таким средствам относятся салицилаты, варфарин, фенилбутазон, фенитоин, сульфаниламиды. Одновременный прием таких лекарств мо-

жет вызвать тяжелую гипогликемию. Возможны побочные эффекты от применения сульфаниламочевины: аллергические реакции (зуд, крапивница, отек Квинке), лейкопения, тромбоцитопения, гипохромная анемия, желудочно-кишечные нарушения (тошнота, рвота, холестатическая желтуха).

Существует ряд противопоказаний для лечения препаратами сульфаниламочевины, среди которых инсулинозависимый сахарный диабет, диабетический кетоацидоз, прекома, кома, тяжелая диабетическая нефропатия, печеночная недостаточность, лейкопения, тромбоцитопения, беременность, лактация и аллергия к данному препарату и другим производным сульфаниламочевины, сульфаниламидам. При указанных состояниях и осложнениях обычно переходят к инсулинотерапии.

Инсулинотерапия является эффективным средством борьбы с СД I и II типа, тем не менее при длительной терапии инсулином возникает ряд осложнений, среди которых наиболее серьезными является ослабление терапевтического эффекта инсулина за счет развития антител к используемому инсулину. Кроме того, важно точно дозировать инсулин, так как неадекватная доза препарата может вести к развитию как гипо-, так и гипергликемических состояний. Важно подчеркнуть, что инсулин малоэффективен при лечении ангиопатических осложнений. Терапия этим препаратом требует постоянных, ежедневных введений и регулярного контроля адекватности используемой дозы.

Ограничения, связанные с медикаментозной терапией СД, в последние годы способствовали разработке новых методов терапии, которые основаны на применении клеточных технологий. Основным достоинством этих технологий является возможность биологической саморегуляции уровня глюкозы в организме (система с обратной связью).

2.2 Клеточная терапия сахарного диабета

Успехи клеточной биологии последних десятилетий создали научные и практические предпосылки для развития новой области трансплантологии — клеточной трансплантации.

Благодаря клеточной трансплантации появилась возможность возмещения отсутствующих клонов специализированных клеток, а также активизации в сохранившихся клетках органа собственного резерва регенерации и пролиферации [21, 36].

2.2.1. Терапия дифференцированными фетальными и неонатальными островковыми клетками поджелудочной железы

Терапия СД донорскими островковыми клетками (ОК) поджелудочной железы (ПЖ) разрабатывается уже более 30 лет. Для терапии используются донорские ОК, аллогенные или ксеногенные, причем в качестве донора используется фетальные, неонатальные ткани ПЖ. Терапия донорскими ОК, возмещающая дефицит клонов β -клеток у реципиента, оказалась весьма эффективной для лечения СД I типа. Первоначально для коррекции СД I типа в клинике использовали аллогенные островковые клетки плодов человека, однако из-за дефицита донорского материала, пришлось перейти на использование ксеногенных донорских клеток. Эти работы проводятся исследовательскими группами в ряде стран мира (США, Канада, Индия, Япония и др.), в том числе и в России. Особенно большой опыт по применению гормонально-активных культур аллогенных и ксеногенных ОК ПЖ имеется в ФГУ НИИТ и ИО Росздрава [24]. К настоящему времени в этом институте выполнено более 1500 трансплантаций, а в качестве донорского материала стали наиболее широко использоваться ОК ПЖ новорожденных кроликов. Путем трансплантации донорских ОК у больных СД I типа удалось в течение 8–12 месяцев снизить ги-

пергликемию, стабилизировать течение лабильных форм СД и получить выраженный клинический эффект в лечении осложнений СД [20, 21, 22, 24].

В то же время нерешенность этических и юридических проблем использования человеческого фетального материала, с одной стороны, и опасность переноса инфекций от животного человеку ксеногенного донорского материала — с другой, не позволяют в настоящее время рекомендовать метод трансплантации алло- и ксеноостровковых клеток ПЖ для широкого применения в практике лечения СД. Кроме того, при использовании чужих ОК возникает проблема несовместимости пары донор-реципиент, которая сокращает сроки терапевтического эффекта. Для лечения СД II типа этот метод не применялся, и это, очевидно, связано с тем, что трансплантация ОК производится для возмещения дефицита островковой ткани у реципиента, которая у больных ИНСД не наблюдается. Мы полагаем, что трансплантация островковой ткани могла бы быть терапевтически полезной благодаря продукции ОК в процессе жизнедеятельности комплекса регуляторных тканеспецифических пептидов, которые могли бы осуществить восстановление нарушенной регуляции метаболизма углеводов и липидов [5, 6, 14, 42]. С разработкой учения о стволовых клетках появилась надежда и возможность регуляции липидного и углеводного обмена в организме с помощью аутологичных стволовых клеток костного мозга [13, 14].

2.2.2. Коррекция стволовыми клетками

Стволовыми клетками (СК) в настоящее время называют клетки, способные пролиферировать без дифференцировки и превращаться, по крайней мере, в два типа клеток. Полагают, что именно из СК происходят все специализированные клетки различных органов и тканей эмбриона, плода и взрослого человека. По происхож-

дению различают две группы СК: эмбриональные и взрослые (или регионарные СК), потенции генома которых существенно различаются между собой. Эмбриональные СК, полученные из эмбриона на стадии морулы или бластоцисты (несколько дней гестации), обладают потенциями к пролиферации и дифференцируются во все известные типы клеток. Благодаря тотипотентности эти клетки привлекают наибольшее внимание исследователей, но при этом остается нерешенным ряд правовых и этических проблем применения эмбриональных стволовых клеток. Отсутствие законодательства по их использованию и опасность образования во взрослом организме тератокарциномных опухолей заставили исследователей обратиться к изучению терапевтических возможностей взрослых СК.

Хотя взрослые СК имеют ограниченную способность к самообновлению (репопуляции) и дифференцируются преимущественно в тот тип клеток, который предопределен эмбриональным лепестком их происхождения, взрослые СК имеют то достоинство, что могут быть получены и применены аутогенно, и таким образом снимается проблема поиска адекватного донора. Кроме того, взрослые СК обладают свойством хоминга, в результате чего они могут засевать при введении в кровотоки идентичные органы взрослого человека. Мембраны взрослых СК обладают свойством, позволяющим этим клеткам сливаться с мембранами соматических дифференцированных клеток и образовывать гибридные (полиплоидные) клетки, обладающие более высокими адаптивными и компенсаторными возможностями.

Источником получения взрослых СК является костный мозг, периферическая и пуповинная кровь, а также биопсийный материал из органов [16].

Для лечения СД стволовыми клетками в эксперименте используют регионарные (взрослые) стволовые клетки [27, 31, 33, 38,

40]. Такие клетки были выделены из эпителия протоков и из самой ткани ПЖ. Возможность их дифференцировки в β -клетки продемонстрирована Катдаре (Katdare) и др. [33]. На рис. 3 показана возможность дифференцировки дуктальных эпителиальных клеток ПЖ в инсулинпродуцирующие клетки, выявление которых осуществлялось путем окраски дитизином.

Стволовые клетки протоков ПЖ, дифференцированные в инсулинпродуцирующие клетки, были использованы у мышей-самцов (линия BALB/c) с СД I типа, вызванного стрептозотоцином (STZ). Клетки вводили в хвостовую вену в количестве 500 островков на 1 животное.

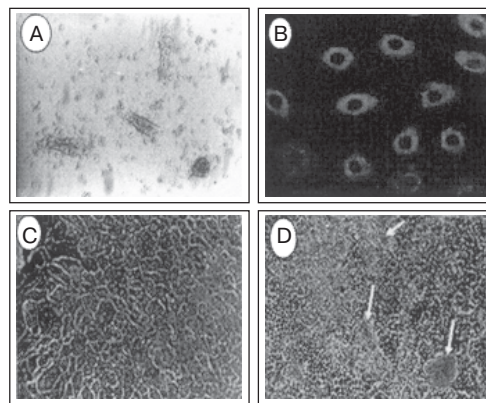


Рис. 3. (Этапы дифференцировки эпителиальных клеток протоков поджелудочной железы мышей в инсулинпродуцирующие клетки (по Katdare et al., 2004):

A – культура фрагментов клеток из протоков ПЖ; B – окраска дуктальных эпителиальных клеток антителами antiCK-19 (маркер эпителиальных клеток); C – дуктальные клетки после 2-недельной инкубации и окраска дитизином (DTZ) Монослой пока не продуцирует инсулин; D – дуктальные клетки после 4-недельной инкубации, окраска DTZ. Появление инсулинпродуцирующих клеток отмечено белыми стрелочками

Контроль уровня глюкозы у мышей-реципиентов инсулинпродуцирующих клеток осуществляли в динамике на 3, 5 и 20-й день после трансплантации. Динами-

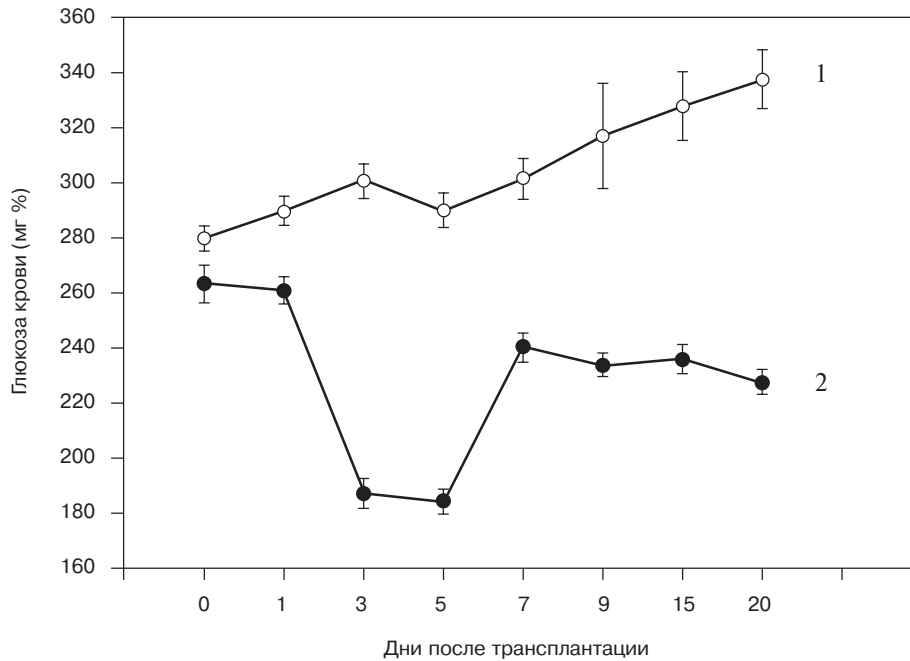


Рис. 4. Динамика изменения содержания глюкозы крови у мышей с диабетом (1) и у мышей с диабетом на фоне трансплантации инсулинпродуцирующих клеток (2)

ка изменений уровня глюкозы у этих мышей представлена на рис. 4.

Из рис. 4 видно, что инсулинпродуцирующие клетки, полученные из аллогенной ПЖ, позволяют корректировать уровень глюкозы в крови. Хотя стволовые клетки из протоков ПЖ могут оказаться эффективными для коррекции не только СД I типа, но и для ИНСД, использование их для лечения СД, по-видимому, не будет иметь практического применения. Описанные наблюдения лишь подтверждают положение о том, что взрослые стволовые клетки могут дифференцироваться в этот тип клеток, который предопределен эмбриональным лепестком происхождения.

Мы полагаем, что перспективным для лечения инсулинзависимого СД, как и ИНСД, является применение стволовых клеток аутологичного костного мозга. Костный мозг — важнейший орган иммунной системы и его клеткам присуща

не только высокая миграционная, но и пролиферативная активность. Из костного мозга могут быть получены гемопоэтические стволовые клетки, являющиеся источником клеток крови и стромальных (мезенхимальных) стволовых клеток, из которых можно получить клетки, дифференцирующиеся в клетки опорно-двигательного аппарата: остеобласты, хондробласты, фибробласты, миобласты, кардиомиобласты и др. Полагаем, что стромальные клетки являются источником получения эндотелиоцитов, которые участвуют в процессах неоангенеза. Поскольку стромальные клетки создают остов различных органов и, интегрируясь с паренхиматозными клетками, обеспечивают их функционирование, то становится понятным, почему стволовые клетки костного мозга стали широко использовать в терапевтических целях при различных патологиях. Для лечения СД представляется наиболее пер-

спективным использование не стромальной фракции стволовых клеток, а (моноклеарной) фракции гемопоэтических стволовых клеток [16].

Это связано с тем, что моноклеарная фракция клеток костного мозга содержит значительное количество прогениторных клеток, состоящих из клеток лимфоидного ряда различной степени зрелости. Эти клетки способны не только мигрировать и пролиферировать, но и индуцировать регенерацию паренхиматозных органов и клеток, выделяя в процессе жизнедеятельности регуляторные пептиды и факторы, способствующие репаративной и физиологической регенерации [2].

Регуляторные пептиды органов, в особенности иммунной системы, осуществляют передачу информационных сигналов с надклеточного уровня внутрь клетки и от клетки к клетке, выполняя роль мессенджеров межклеточных взаимодействий [1, 5, 12, 14].

В условиях хронической патологии организма, связанной с повреждением того или иного органа, ослабевает взаимодействие между надклеточным и внутриклеточным уровнем регуляции, в результате чего нарушается информационный и структурный гомеостаз органов, нарушаются процессы их репаративной регенерации, что усугубляет дисфункцию поврежденного органа [23].

Выше мы указали, что СД является хронической патологией с глубокой дисрегуляцией моноцитарно-макрофагальной и иммунной системы: резко активирована системная воспалительная реакция на фоне прогрессирующего аутоиммунного процесса.

Все вышеизложенное позволяет предположить, что стволовые клетки костного мозга могут оказаться эффективными для лечения СД путем коррекции нарушений, обусловленных развившейся системной воспалительной реакцией и иммунным дисбалансом [29, 34].

Действительно, было показано [34], что нефракционированный костный мозг, полученный из бедренной кости здоровых мышей, способен корригировать уровень сахара в крови у мышей-реципиентов (швейцарские мыши-альбиносы) с СД I типа, вызванным STZ.

Этим животным вводили в хвостовую вену по 1 млн. клеток однократно или многократно с интервалом в 6 дней. Оказалось, что как при однократном, так при многократном введении клеток костного мозга достигалась нормализация уровня глюкозы в крови. Такой уровень глюкозы держался не более 30 дней у животных с однократным введением, а при многократном введении сохранялся до конца эксперимента (4 месяца).

Исследование толерантности этих животных к глюкозе (рис. 5) показало, что при трансплантации клеток костного мозга возникла адекватная реакция (как у здоровых животных) на введение глюкозы, и хотя она была менее выраженной, однако, достоверно отличалась от реакции у животных с СД без клеточной терапии.

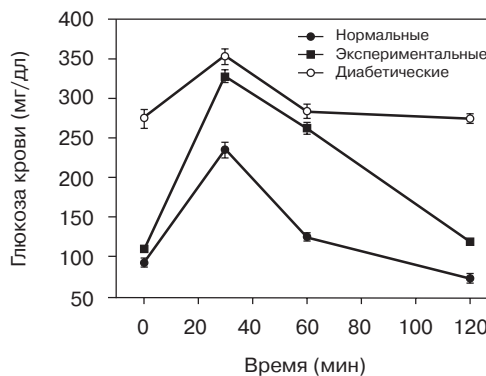


Рис. 5. Динамика содержания глюкозы крови у мышей с СД без и после в/в введения клеток костного мозга

Гистологическое исследование ПЖ показало, что у животных с СД и введением клеток костного мозга был отчетливо выражен эффект её регенерации. На рис. 6

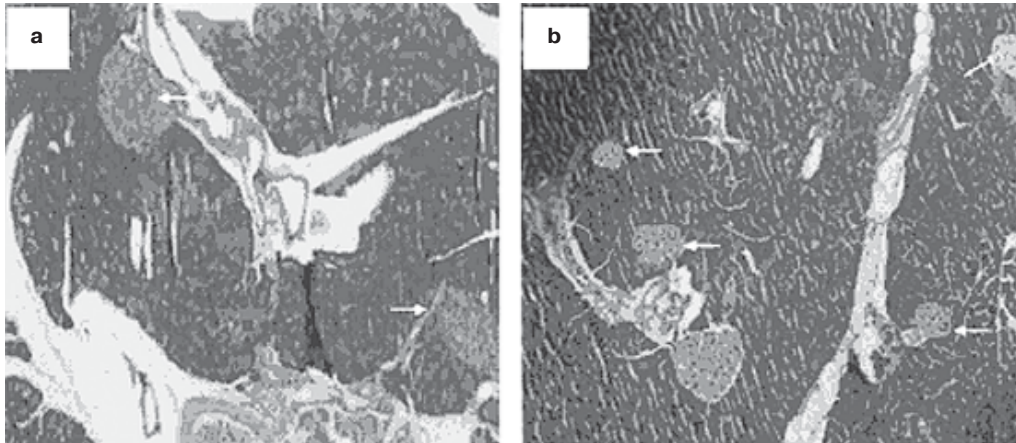


Рис. 6. Гистологический срез ткани ПЖ здоровых мышей (а) и мышей с СД после введения клеток костного мозга (b)

показано образование новых островков (белые стрелки) ПЖ у экспериментальных животных с СД после введения клеток костного мозга.

Результаты этих исследований продемонстрировали, таким образом, не только снижение уровня гликемии, но и улучшение морфологии ПЖ.

В исследовании, выполненном Д. Хесом и др. [29], была показана возможность коррекции сахарного диабета с помощью стволовых клеток костного мозга. Для доказательства этого в качестве доноров были использованы здоровые мыши GFP с геном зеленого белка. Клетки этих мышей использовались для выявления приживляемости клеток костного мозга у реципиентов, которыми были мыши линии C57Bl/6 со стрептозотоциновым (STZ) сахарным диабетом [29].

Через 7 дней после введения стволовых клеток наблюдалось снижение уровня глюкозы в крови до нормальных значений, а также была обнаружена внутриклеточная регенерация ОК ПЖ, причем донорские клетки обнаруживались как в дуктальной, так и в островковой частях ПЖ мышей-реципиентов (рис. 7). Из рис. 7 видно, что стволовые клетки кост-

ного мозга от доноров GFP мигрируют при внутривенном введении в дуктальную и островковую часть ПЖ, и это доказывает их участие в процессе регенерации поврежденной ПЖ.

В 2002 году Н.Энде и др. [30] применили ксенотрансплантацию мононуклеарных клеток из пуповинной крови человека для снижения уровня гликемии и нормализации функции почек у трансгенных мышей (B6.Y-Lep-obese), являющихся моделью сахарного диабета II типа. Этим животным вводили по 200 млн. клеток в ретроорбитальное венозное сплетение, контролировали уровень гликемии, вес животных и изучали морфологию почек до и в течение 9 месяцев после трансплантации клеток, без применения иммуносупрессии.

Было установлено, что однократная трансплантация клеток стабильно снижала уровень глюкозы в крови у экспериментальных животных на протяжении всего срока наблюдения. К концу эксперимента уровень глюкозы в крови у контрольных животных (без трансплантации) составлял 344 мг/дл., а у экспериментальных — 262 мг/дл (близко к норме). Выживаемость животных в экспериментальной группе

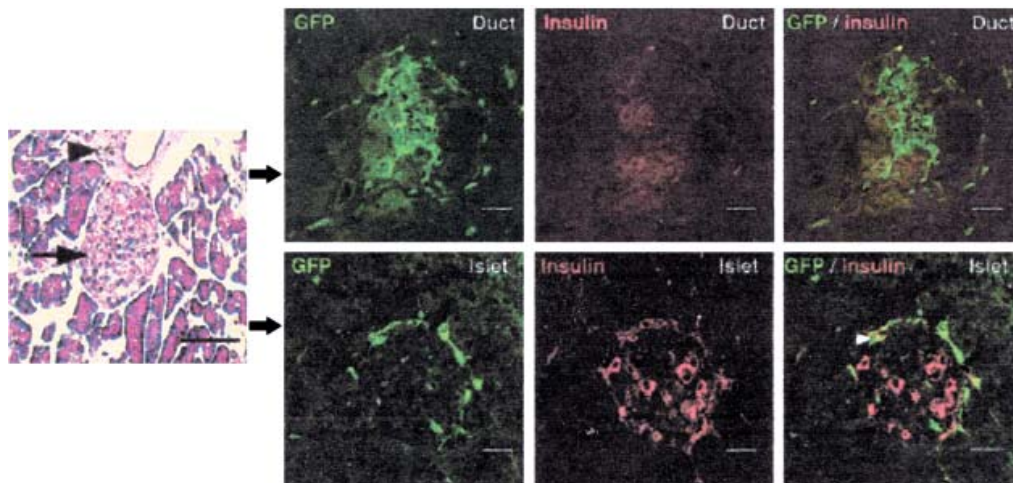


Рис. 7. Люминесцентная микроскопия срезов протока и островковых клеток ПЖ у мышей с СД после введения донорских стволовых клеток мышей GFP – носителей гена зеленого белка [29]

также была выше, чем в контрольной (анализ выживаемости по методу Каплана-Мейера). До конца эксперимента (392 дня) в контрольной группе «выжили» только два животных, а в экспериментальной — пять. При изучении морфологии почек было выявлено, что клеточная трансплантация способствовала снижению выраженности гипертрофии клубочков и дилатации канальцев. Кроме того, контрольные животные значительно быстрее набирали лишний вес, чем экспериментальные.

Главным результатом этого исследования явилось долговременное снижение (9 месяцев) уровня глюкозы до субнормальных цифр даже после однократного введения стволовых клеток. В отличие от трансплантации клеток костного мозга при трансплантации дифференцированных инсулинпродуцирующих клеток, полученных от здоровых фетальных плодов, мышам со стрептозотоциновой моделью СД наблюдалось лишь кратковременное снижение уровня гликемии до нормы; у 40% мышей через 12 недель цифры гликемии возвращались на прежний повышенный уровень [30, 39].

Сравнительный анализ результатов использования фетальных инсулинпродуцирующих клеток и стволовых клеток костного мозга у животных с моделями СД I и II типа позволил установить, что одновременное введение клеток костного мозга и однократная трансплантация фетальных клеток животным с СД I типа приводила к краткосрочной нормализации углеводного обмена, а многократное введение клеток костного мозга пролонгировало позитивный клинический эффект у животных с СД I типа. Особенно выраженный эффект наблюдался у мышей с СД II типа при введении стволовых клеток костного мозга, количество которых превосходило количество клеток в других опытах во много раз. Эти наблюдения позволяют прийти к заключению, что для восстановления функции пораженного органа с помощью клеточной терапии необходимо, чтобы масса биологической активности донорского материала была достаточной для индуцирования собственного резерва регенерации поврежденного органа. В тоже время масса ткани органов-мишеней также должна быть достаточной для восприятия

пролиферативных и регуляторных сигналов от используемого биоматериала. В этой связи нам представляется, что СД II типа, при котором отсутствует дефицит ткани ПЖ, а нарушены лишь механизмы адаптации и компенсации органов-мишеней, участвующих в регуляции углеводного и липидного обмена, окажется более благоприятной формой СД для терапевтического применения клеточных технологий.

Среди клеток, используемых для клеточной терапии, более выраженный эффект при СД II типа следует ожидать от стволовых клеток костного мозга, которые способны участвовать в регенеративных процессах, и не только потому, что они наделены свойствами стволовых клеток, но и потому, что они обладают свойствами клеток иммунной системы, которые всегда участвуют в регуляции процессов регенерации и на всех этапах онтогенетического развития организма. За счет регуляции иммунитета и торможения признаков системной воспалительной реакции должен наступить регресс клинических проявлений СД, в том числе тяжелых диабетических осложнений.

С помощью клеточной технологии, в особенности с применением клеток аутологичного костного мозга, может быть достигнута не только медицинская и социальная реабилитация больных, но могут быть отодвинуты сроки или предотвращено наступление инвалидности, а также увеличена продолжительность жизни больных с СД.

Литература

1. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. М.: Медицина 1985, с. 285-286.
2. Бабаева А.Г. Единство и противоположность цитогенетической активности лимфоцитов и их антителообразующей функции при восстановительных процессах в органах. *Бюлл. экспер. биол. мед.* № 11, 1999, с. 484-490.
3. Балаболкин М.И. Молекулярные основы патогенеза сосудистых осложнений сахарного диабета. *Медицинская кафедра, № 1(9), 2004, с. 48-57.*
4. Балаболкин М.И. Сахарный диабет. М.: Медицина, 1994, с. 384-387.
5. Берснев А.В., Крашениников М.Е., Кобозева Л.П., Аврамов П.В. Клеточная и пептидная терапия ранних стадий атерогенеза. *Вестн. трансплантол и искусств. органов, № 3-4, 2002, с. 89-90.*
6. Берснев А.В., Крашениников М.Е., Онищенко Н.А. Клеточная терапия дислипидемий и атеросклероза. *Вестн. трансплантол и искусств. органов, № 2, 2002, с. 46-53.*
7. Джеральд М. Фаллер, Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. Молекулярное строение и функциональные компоненты клеточных мембран. М.: Бинном-Пресс, 2004, с. 27-55.
8. Жданова О., Стефанович И. Сахарный диабет без иллюзий и осложнений. СПб.: БВХ-Петербург, 2005, с. 45-101.
9. Зайчик А.Ш., Гурилов Л.П. Инсулинонезависимый сахарный диабет (ИНСД). Основы патохимии. СПб.: ЭЛБИ-СПБ, 2001.
10. Зайчик А.Ш., Гурилов Л.П. Атеросклероз. Основы патохимии. СПб.: ЭЛБИ-СПБ, 2001, с. 162-173.
11. Кендыш И.Н. Регуляция углеводного обмена. М.: Медицина, 1985, с. 270-271.
12. Новикова В.С. Программированная клеточная гибель. СПб.: Наука, 1996.
13. Онищенко Н.А. Инфузия регуляторных пептидов селезенки, трансплантация стволовых клеток костного мозга как два подхода к восстановительному лечению поврежденных органов. *Вестн. трансплантол и искусств. органов, № 3, 2002, с. 91-92.*
14. Онищенко Н.А. Пептидная биоциркуляция восстановительных процессов в поврежденных органах. *Вестн. трансплантол. и искусств. органов, № 3-4, 2001, с. 87-93.*
15. Онищенко Н.А. Клеточные технологии и современная медицина. *Вестн. трансплантол. и искусств. органов, № 3, 2004, с. 2-10.*
16. Онищенко Н.А., Крашениников М.Е. Современные представления о биологии стволовых клеток костного мозга и крови в аспекте их клинического применения. *Вестн. трансплантол. и искусств. органов, № 4, 2004, с. 50-55.*

17. Пигаревский П.В., Мальцева С.В., Селивестрова В.Г. Иммунная система, атеросклероз и персистирующая инфекция. *Вестник РАМН*, 2005, № 2, с. 17-22.
18. Романова Е.А., Чапова О.И. Сахарный диабет. М.: Эксмо, 2004, с. 31-35.
19. Саланс С. Инсулинонезависимый сахарный диабет: диагностика и лечение. В кн.: *Эндокринология. Под ред. М.Лавина. М.: Практика*, 1999, с. 925-941.
20. Скалецкий Н.Н., Гончарова Т.Н., Засорина Л.В., Кирсанова Л.А., Скалецкая Г.Н., Новиков В.К. Ксенотрансплантация культур островковых клеток на пути достижения длительной инсулинонезависимости у больных сахарным диабетом 1 типа. *Вестн. трансплантол. и искусств. органов*, № 3, 2002, с. 85-86.
21. Скалецкий Н.Н., Онищенко Н. А. Клеточная трансплантация: достижения и перспективы. *Вестн. трансплантол. и искусств. органов*, № 3-4, 2001, с. 94-102.
22. Скалецкий Н.Н., Шумаков В.И. Лечение инсулинзависимого сахарного диабета методом трансплантации островковых клеток поджелудочной железы плодов и новорожденных. *Трансплант. фетальных тканей и клеток*. 1996, с. 33-40.
23. Хавинсон В.Х., Кветковой И.М. Пептидные биорегуляторы ингибируют апоптоз. *БЭБМ*, 2000, т. 130, № 12, с. 657-659.
24. Шумаков В.И., Скалецкий Н.Н. Регуляция углеводного обмена и коррекция его нарушений при сахарном диабете. В кн.: *Очерки по физиологическим проблемам трансплантологии и искусственных органов. Под ред. акад. В.И.Шумакова. Тула: Реприкс*, 1998, с. 93-118.
25. Эйдельман С. Перспективы диагностики и лечения сахарного диабета. В кн.: *Эндокринология. Под ред. М.Лавина. М.: Практика*, 1999, с. 960-972.
26. Suzuki A., Nakauchi H., Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *J. Diabetes*, 2004, vol. 53, 2143-2152.
27. Bouwens Luc, Braet Filip, Heimberg Harry. Indentification of rat pancreatic duct cells by their histochemistry and cytochemistry. *Endocrinology*, 1995, vol. 43, 3, 245-253.
28. Choi J.B., Uchino H., Azuma K. et al. Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Journal Diabetologia*, 2003, vol. 46, 1366-1374.
29. Hess D., Li L., Martin M., Sakano S., et al. Bone marrow — derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nature Biotechnology*, 2003, Vol. 21, 7, 763-769.
30. Ende N., Chen R., Mack R. NOD/LtJ type 1 diabetes in mice and the effect of stem cells derived from human umbilical cord blood. *J. Med.*, 2002, No. 33, 181-187.
31. Gmyr V., Kerr-Conte J., Vandewalle B. et al. Human pancreatic ductal cells: large scale isolation and expansion. *Cell Transplantation*, 2001, No. 10, 109-121.
32. Hardikar A.A., Karandikar M.S., Bhonde R.R. Effect of partial pancreatectomy on diabetic status in BALA/C mice. *Journal of Endocrinology*, 1999, No. 162, 189-195.
33. Katdare M.R., Bhonde R.R., Parab P.B. Analysis of morphological and functional maturation of neoislets generated in vitro from pancreatic ductal cells and their suitability for islet banking and transplantation. *Journal of Endocrinology*, 2004, No. 182, 105-112.
34. Banerjee M., Kumar A., Bhonde R. Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation. *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, 2005, No. 328, 318-325.
35. Quesenberry, P. et al. Studies on the regulation of hemopoiesis. *Exp. Hematol.*, 1985, 13, 43-48.
36. Raffii S., Lyden O. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *J. Nat. Med.*, 2003, No. 9, 702-712.
37. Ramiya V.K., Maraist M., Afors K.E. et al. Reversal of insulin dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nature Medicine*, 2000, No. 6, 278-282.
38. Githens S. Pancreatic duct cell cultures. *Annu. Rev. Physiol.*, 1994, No. 56, 419-443.
39. Soria M. et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Diabetes*, 2000, No. 49, 157-182.
40. Bonner-Weir S., Taneja M., Weir G. et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *PNAS*, 2000, vol. 97, No. 14, 7999-8004.

41. Wang, X. et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *J. Nature*, 2003, No. 422, 897-901.
42. Yechoor Y., Chan L. Gene therapy progress and prospects. Gene therapy for diabetes mellitus. *J. Gene Therapy*, 2005, No. 12, 101-107.
43. Zysset T., Sommer L. Diabetes alters drug metabolism – in vivo studies in a streptozotocin-diabetic rat model. *J. Experientia*, 1986, No. 42, 560-562.

NON-INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS AND PERSPECTIVE METHODS OF TREATMENT

O.I. Stepanova, N.N. Karkischenko, N.A. Onischenko, E.A. Stepanova

Research Center for Biomedical Technology of RAMS, Moscow

One of the most widespread diseases in the modern world, diabetes mellitus, is reviewed. Here the purpose is to classify information on pathogenesis and origin of this disease and outline the prospects of up-to-date methods of therapy. To generalize the experience of the research groups, the experimental results of stem cells transplantation for the diabetes therapy have been analyzed. The researchers cultivate different types of stem cell. Using the pancreas of adult BALB/c mice, the ductal stem cells were cultivated/extracted. With transgenic GFP mice as donors, the bone marrow stem cells were cultivated. In some cases the umbilical human blood was used to refine the mononuclear cells cultures. It was found that all types of stem cells can produce therapeutic effects (pancreatic regeneration, reducing glucose blood level and regeneration of β -cells functions). The cell transplantation is a new alternative in medical treatment of diabetes.

Key words: diabetes mellitus, bone marrow stem cells, pancreatic regeneration, ductal stem cells, transplantation.

Тайны семейства *Cricetidae*

Е.Ф. Шмидт, А.В. Суров

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Научно-исследовательский Институт проблем эволюции и экологии

им. А.Н. Северцова РАН, Москва

Изложена история открытия вида *Mesocricetus auratus* (золотистый, или сирийский, хомяк), его разведения и распространения в качестве лабораторного и домашнего животного. Обсуждается гипотеза о происхождении данного вида как тетраплоида от скрещивания в природе двух видов сем. *Cricetidae*. Даны описания 14 видов этого семейства, обитающих на территории России и сопредельных стран.

Ключевые слова: золотистый (сирийский) хомяк; барабинский, китайский хомячок.

Герой является ребёнком весьма знатных родителей. Его рождению предшествуют различные трудности, такие, как воздержание, долгое бесплодие, тайная, из-за внешних препятствий или запретов, близость родителей. Затем его спасают животные или люди низкого происхождения и вскармливает звериная самка или женщина-простолоюдинка. Выросший герой находит своих знатных родителей и, в конце концов, добивается высокого положения и почёта.

Отто Ранк. «Миф о рождении героя»

Жило на свете и живёт поныне благородное семейство *Cricetidae* (Хомяковые). И, хотя семейство это не столь уж древнее (по эволюционным меркам, разумеется), занимает оно вполне достойное место в обширном и преуспевающем отряде *Rodentia* (Грызуны) могучей когорты *Grillis* (Когтистые). До недавнего времени отношения между семейством *Cricetidae* и видом *Homo sapiens* оставались, мягко выражаясь, довольно прохладными, если не сказать враждебными, переходящими от скрытой конфронтации к прямой агрессии со стороны последнего. *H. sapiens*, этот наглый выскочка из животного мира, захватил большую часть планеты и узурпировал власть над ней. Он самовольно распахал степи, некогда дававшие стол и кров семейству Хомяковых, вынудив обездоленных похищать малую толику урожая, дабы прокормить себя и своё многочисленное потомство. Однако во второй по-

ловине XX века ситуация стала меняться и тысячелетняя вражда, хоть и не угаля вовсе, но заметно пошла на убыль. Истинным миротворцем, посланником любви и заложником вероломной дружбы *H. sapiens*, стал скромный герой, представитель славного семейства Хомяковых, *Mesocricetus auratus* — золотистый хомяк, более известный под прозвищем сирийский.

Природа или Создатель — большие шутники. История появления, приручения и распространения этого маленького зверька, изложенная в строгом соответствии с научными фактами, до смешного напоминает миф о рождении героя, в том или ином варианте существовавшем во все времена и у всех народов: от мифов о Саргоне Первом, основателе Вавилона (2800 г. до н.э.) и Геракле, (Древняя Греция) до саги о Гидреке (Сигурде, Зигфриде), у древних скандинавов и германцев (IX–XIII век н.э.) [9]. В ней присутствуют все элементы бессмертного

сюжета, многократно растиражированного последователями З. Фрейда и К. Юнга, и успешного изрядно поднадоесть читающей публике (см. эпиграф). Судите сами.

В 1839 г. английский зоолог Дж.Р. Уотерхаус (Waterhouse) (рис. 1) в Алеппо (Сирия) описал и зарегистрировал новый вид хомяка, назвав его *Cricetus auratus* (хомяк золотистый). Впоследствии было установлено, что он относится к неизвестному ранее роду, и золотистый, или сирийский, хомяк был переименован в *Mesocricetus auratus* [1].



Рис. 1. Джордж Роберт Уотерхаус

Однако первое упоминание об этих хомяках появилось ещё в 1797 году во втором (посмертном) издании «Истории природы Алеппо Александра Расселя с дополнительными примечаниями его младшего брата Патрика» (цит. по Whitney, 1963 [11]). Но по неизвестным причинам братья Рассель не оформили соответствующим образом открытие нового вида, поэтому лавры первооткрывателя достались Уотерхаусу, опубликовавшему его описание в 1840. В нём говорилось следующее: «Этот вид меньше, чем обыкновенный хомяк, у него замечательный золотисто-жёлтый окрас. Шерсть умеренной длины и очень мягкая с шелковистым глянцем. Ноги и хвост — белые. Уши среднего размера. Вибриссы («усы») состоят из тёмных и белых волосков». У самцов хорошо развита бедренная железа — пигментированное пятно загрубевшей кожи в обла-

сти бедра, покрытое жёсткими тёмно-окрашенными волосками. У самок железа развита слабей и едва видна [11]. Как у всех хомяковых, кожа у них свободно свисает и скрывает истинный контур тела.

Животное, пойманное Уотерхаусом, оказалось самкой, причём, как вскоре выяснилось, — беременной. На протяжении 40 лет потомки этой самки успешно размножались, и в 1880 году были вывезены в Англию, где их разводили вплоть до 1910 года, когда вся колония погибла, а шкурка и череп почтенной прародительницы поныне хранятся в Лондонском музее естественной истории (рис. 2). Как ни странно, в природе на протяжении почти целого столетия никто больше не встречал золотистых хомячков, и среди зоологов крепло мнение, что редкий вид вымер окончательно.



Рис. 2. Сирийский хомячок, описанный Уотерхаусом

Однако жил в то время учёный, который верил, что сирийские хомяки не исчезли в природе и что их ещё удастся отыскать. Звали его Саул Адлер (Adler) и был он паразитологом Еврейского университета в Иерусалиме. Адлер занимался исследованием лейшманиоза, эксперименты предполагалось провести на китайских хомячках, известных как подходящая биологическая модель для данной цели, но хомячки упорно не желали размножаться на Святой Земле. Вот тогда Адлер и вспомнил о золотистых хомяках Уотерхауса. Ведь они, будучи

коренными жителями Сирии, должны были бы прекрасно себя чувствовать в местном климате. Он попросил коллег из Зоологического департамента поймать для него несколько таких хомячков.

Поисками занялся Израэль Ахарони (Aharoni), зоолог, переоткрывший многие виды животных, обитавших в странах Ближнего Востока и считавшихся утраченными. Территория Алеппо в то время контролировалась Турцией, и Ахарони, проявив немалый дипломатический талант, приобрёл покровительство турецких властей тем, что подарил «главе местной администрации», коллекционировавшему бабочек, некоторые экземпляры из своей коллекции.

Далее, как это нередко бывает в исторических хрониках, «показания летописцев» расходятся. По одной версии строительные рабочие—арабы при рытье котлована случайно раскопали нору, по собственной инициативе поймали неизвестного им зверька с детёнышами и отдали их совершенно случайно проходившему мимо Ахарони. При всём уважении к сирийским пролетариям, версия кажется маловероятной. Куда убедительней выглядит другая, по которой Ахарони обратился к местному шейху с просьбой, поспособствовать поимке живых и по возможности здоровых хомячков. Чем ловкий зоолог оплатил услуги шейха, история умалчивает, во всяком случае, шейх оповестил своих соплеменников, что тот, кто поймает зверьков, получит вознаграждение. Жители откликнулись на призыв с большим энтузиазмом, поскольку эти мелкие твари, ко всему прочему, причиняли ущерб зерновым. Методика ловли была проста: рыли ямы на участках поля с повреждённой пшеницей. Через несколько часов на глубине 11 футов раскопали гнездо самки с 12 ещё слепыми детёнышами. К сожалению, самку пришлось усыпить, так как, попав в плен, она принялась пожирать своё потомство. Всё же 9 животных выжило. По возвращении Ахарони вручил уцелевших

хомячков основателю и главе Еврейского ветеринарного университета Хейну Бен-Меначену. На следующее утро обнаружилось, что 4 зверька убежали. Ещё одна самка была убита самцом. Среди четырёх оставшихся была то ли одна, то ли две самки. Тем ни менее, животные стали размножаться, и через год колония насчитывала уже около 150 голов.

Помня о злосчастной судьбе первой английской колонии золотистых хомячков, Адлер постарался создать их лабораторные популяции в разных странах. Так, в 1931 году он контрабандой ввёз в Англию сирийских хомячков в кармане пальто. Он передал их Е. Хиндли из Зоологической Ассоциации в Лондоне. В 1938 году они были завезены в Америку и постепенно распространились по лабораториям всего мира. Отныне существованию этого вида, по крайней мере в неволе, уже ничто не угрожало [11]. Можно считать, что «крёстным отцом» одомашненных сирийских хомячков был Саул Адлер, «повитухой» — Израэль Ахарони, а «приёмным родителем» — Хейн Бен-Меначе. Но, как с ними обстояло дело в природе?

Однако пришло время познакомить читателя с близкими и дальними родственниками нашего героя.

Семейство Хомяковых, как всякое благородное семейство, просто обязано иметь своё генеалогическое древо. Вот оно — на рис. 3.

Сразу оговоримся, что в этой правдивой истории речь пойдёт только о тех Хомяковых, которые обитают или обитали на просторах нашей некогда необъятной Родины, или, выражаясь иначе, в России, странах ближнего зарубежья и на сопредельных территориях. По той же геополитической причине в определителях и систематиках млекопитающих, издаваемых после распада СССР, отсутствуют данные о «бывших наших» хомяках, в одночасье превратившихся в иностранных, о чём они и не ведают.

Мы не станем пускаться в глубокомысленные рассуждения о том, являются ли Хомяковые самостоятельным семейством *Cricetidae* [10, 8] или всего лишь подсемейством *Cricetinae* семейства Мышиных (*Muridae*) [5, 1]; подразделяется ли оно на надроды или представлено отдельными родами, одни из которых более сходны между собой, а другие — менее. Для исследователей, использующих в качестве лабораторных животных хомяков тех или иных видов и для любителей, их разводящих, это не суть важно.

Центральный ствол дерева, хомяки пёстрые, разделяется на две ветви: род настоящие хомяки (*Cricetus*), представленный единственным видом, хомяк обыкновенный, и род средние хомяки (*Mesocricetus*), насчитывающий три или четыре вида [10, 8].

Начнём знакомство с наиболее почтенного и весомого (в физическом смысле) члена семейства — с хомяка обыкновенного (*Cricetus cricetus*). Он был описан Линнеем в 1758 году, первым из всего семейства [1]. Самый крупный из хомяков (длина тела до 35 см, хвоста — почти до 6 см), то есть, размером с большую крысу (рис. 4)*. Имеет красивую шкурку, за что порой и страдает. Окрас яркий, чаще трёхцветный: верх рыжевато-бурый, брюшко чёрное, на шее и по бокам головы — белые пятна, иногда встречаются чёрные особи (меланисты). На первом пальце передних конечностей вместо когтя — плоский ноготь. Диплоидный набор хромосом — 22. В природе широко распространён — по всей степной и лесостепной зоне Евразии, доходя на востоке до Енисея, но численность везде невысокая. Предпочитает разнотравную и злаково-разнотравную степь или лесостепь. Проникает в лесную зону по лугам и в горы до нижней границы лесов. Заселяет лесополосы, сады, огороды. Роет глубокие, сложные норы, име-

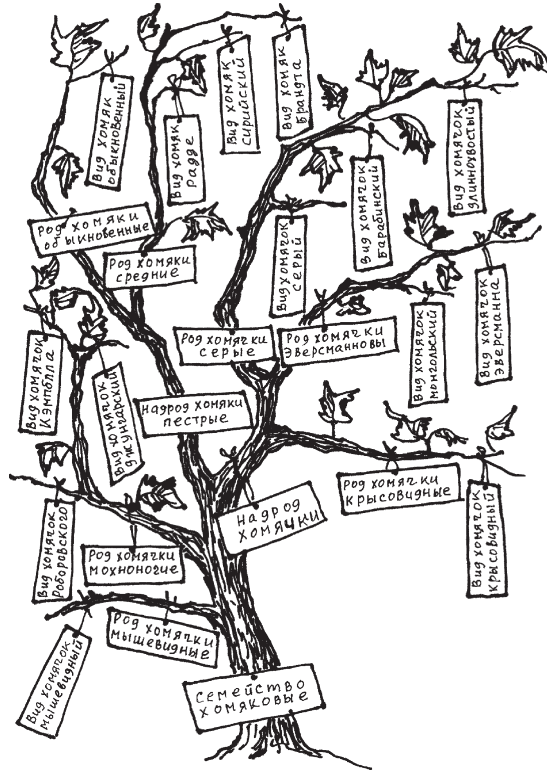


Рис. 3. Генеалогическое дерево семейства Cricetidae

ющие до 10 входных отверстий. Хорошо плавает. Осенью иногда совершают кормовые миграции на убранные поля, во время которых преодолевают значительные расстояния и переплывают большие реки, а весной возвращаются обратно в степь. Всеядны, однако на протяжении большей части года в питании преобладают растительные корма. Хомяк — хозяйственное животное: он запасает на зиму в специальных кладовых камерах норы по 10–16 кг зерна (чем весьма раздражает аграриев), причём каждый сорт

* Все фотографии сделаны ст.н.с. Научно-исследовательского института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, канд. биол. наук, А.В. Суворым



Рис. 4. Хомяк обыкновенный (*Cricetus cricetus*)

зерна хранит отдельно [2, 3, 8]. Контакт с животным, изъятым из естественной среды, или манипуляции с его тушкой представляют угрозу для человека, так как хомяк и паразитирующие на нём блохи могут быть разносчиками особо опасных болезней, таких, как чума и туляремия. Последнее замечание относится к хомякам всех видов и другим грызунам, обитающим в эндемических природных очагах этих заболеваний. В лабораториях практически не используется из-за трудности разведения [10]. Будучи прирученным, по пустякам не кусается, но, если цапнет — мало не покажется. С сородичами неуживчив, большую часть года проводит в одиночестве. Впрочем, ничто человеческое, пардон, животное, ему не чуждо. Но, увы, в наши дни даже хомяк, находясь на отдыхе, в приватной обстановке, не застрахован от внимания вездесущих папарацци (рис. 5).



Рис. 5. Сцена из интимной жизни хомяков обыкновенных

Другой ветвью хомяков пёстрых является род **средние хомяки** (*Mesocricetus*). От **настоящих хомяков** они отличаются меньшими размерами (до 28 см), очень коротким хвостом и другим расположением светлых и тёмных пятен на голове, шее и передней части тела [1, 5, 8]. К этому роду относится главный герой нашего правдивого повествования — **хомяк золотистый** (*Mesocricetus auratus*), он же — **сирийский**, он же — **переднеазиатский** (рис. 6). В кариотипе — 44 хромосомы [11].



Рис. 6. Дикий тип сирийского (золотистого) хомяка (*Mesocricetus auratus*)

Ареал вида, первоначально описанного под этим названием, охватывал Балканы, Турцию, Иран, Сирию, Ливан, а возможно и часть Закавказья, однако современная систематика рассматривает в качестве *M. auratus* вид, обитающий только в Сирии и прилегающей небольшой части Турции. Предпочитает сухие безлесные нагорья (до высоты 2300 м) [10]. Поедает траву, семена, зёрна, корни, клубни и всё что подвернётся. Отнюдь не является убеждённым вегетарианцем. Нора, глубина которой может достигать 2 м, разделена на спальню, кладовки, туалет, имеет до трех входных отверстий [1].

На золотистого хомяка очень похожи его собратья по роду — **хомяки Брандта, Радде и Ньютона**, которые были описаны в последнем десятилетии XIX века. Ареалы этих видов частично накладываются друг на друга [1, 8].

Хомяк Брандта (*Mesocricetus brandti*), он же — **малоазиатский**, он же — **закавказский**, довольно блёклый и некрупный (длина тела до 15 см). Окраска преимущественно желтовато- или серовато-охристая, менее яркая чем у других видов **пёстрых хомяков**, расположение пятен сходное с остальными **средними хомяками**. В кариотипе — 42 хромосомы, хотя встречаются формы с 44. Распространён в сухих нагорных степях Малой Азии и Закавказья [8]. Избегает увлажнённых мест. Нора обычно состоит из горизонтального хода и нескольких вертикальных отнорков с единственным входным отверстием. Гнездовая камера располагается примерно на глубине 2 м. В основном употребляет растительную пищу, собирает на зиму значительные запасы [10].

Хомяка Радде (*Mesocricetus raddei*), иначе — **предкавказского**, иначе — **дагестанского**, первоначально принимали за разновидность сирийского хомяка. Из **средних хомяков** он самый крупный (до 28 см) и занимает по размеру промежуточное положение между обыкновенным хомяком и сирийским, а вот хвост у него до смешного короткий — менее 1,5 см. У животных, которых относили к данному виду, насчитывали 42–44 хромосомы, то есть предполагалось, что этот вид отличается хромосомным полиморфизмом. Однако позже стали склоняться к тому, что в природе встречаются два подвида (а возможно самостоятельных вида): собственно ***M. Raddei*** и ***M. nigriculus*** [8]. В окрасе классической разновидности преобладают буровато-охристые тона, а для ***M. nigriculus*** характерна более контрастная окраска с черноватым «чепраком» (рис. 7).

Водится в сухих степях среднего пояса гор Предкавказья. Обитатель степей. Роет глубокие, сложные норы с несколькими входными отверстиями, кладовыми и целой системой вертикальных и горизонтальных ходов. Весной и в начале лета питается травянистой растительностью (клевером,



Рис. 7. Хомяк Радде (*Mesocricetus raddei* подвид *M. nigriculus*)

донником, люцерной и др.) а осенью — семенами, особенно бобовых, а также корнеплодами, которые запасает на зиму в огромных количествах — более 16 кг «на душу населения» [2].

Возвращаясь к истории **золотистого хомяка**, заметим, что путь его усеян сплошными загадками. Зоологи с удивлением обнаружили, что, хотя ареал этого вида достаточно велик, а животные отнюдь не являются редкими (если судить по жалобам местных жителей на урон, урожаю), сирийские хомяки периодически как будто бы полностью исчезают, и их не удаётся обнаружить в природе на протяжении нескольких лет или даже десятков лет. А затем участники очередной экспедиции по их изучению, буквально в первый же день, с лёгкостью отлавливают нужное количество животных под бесконечные причитания аборигенов о понесённых из-за «проклятых хомяков» убытках. Для объяснения таинственных исчезновений и не менее загадочных появлений этого вида-миража Сэч (Sach) выдвинул в 1952 году оригинальную гипотезу [11]. Но прежде чем перейти к её изложению, мы должны познакомиться со следующей партией родственников золотистого хомяка.

На генеалогическом древе семейства **Хомяковых** есть могучая ветвь: надрод **Хомячки (*Cricetulus*)**. Она разделяется на три рода: **Хомячки серые (*Cricetulus*)**, **Хомячки**

Эверсманновы (*Allocricetulus*) и Хомячки крысovidные (*Tscherskia*) [8].

Последний из перечисленных родов представлен в фауне России одним видом с одноимённым названием — **хомячок крысovidный (*Tscherskia triton*)**. Это весьма своеобразный во всех отношениях вид, действительно больше похожий на дикую серую крысу, чем на хомячка, и внешне, и по характеру. Выражение морды — соответствующее. Взгляд осмысленный, с эдаким знакомым прищуром, типа: «А, что вы делали, дорогой товарищ, до семнадцатого года?». Длина тела — до 25 см, хвоста — до 10 см. Окрас серо-бурий, брюхо белесое, кончик хвоста часто тоже белый (рис. 8).



Рис. 8. Хомячок крысovidный (*Tscherskia triton*)

От крыс отличается отсутствием чётких поперечных колец на хвосте (иногда они есть, но слабые) и опушением подошв задних лап, от восточной полёвки — короткими и редкими волосками на хвосте [10]. В кариотипе 28 хромосом, но могут быть и добавочные (В-хромосомы), которые не входят в диплоидное число. Это, скорей всего, говорит о существовании двух подвидов. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что крысovidные хомячки из Северного Приморья значительно крупнее, чем из Южного [7].

Обитают в Северо-Восточном Китае, Корее, на юге Приморья. В отличие от других хомячков тяготеют к берегам водоемов, расселяясь по пойменным лугам и кустар-

никовым зарослям в речных долинах. Нередко используют для жилища строения человека. Норы сравнительно сложные, состоящие из вертикальных и горизонтальных ходов, камер и отнорков. Гнездовая камера располагается на глубине примерно 1,5 м. Питаются в основном не зерновыми, как остальные хомячки и хомяки, а соевыми бобами, кукурузой и подсолнечником, семенами диких трав, жёлудями, побегами лебеды, иногда употребляют животные корма — насекомых, яйца птиц. Делают запасы на зиму (до 10 кг). Используются как лабораторные животные [10]. В природе нередко являются носителями очаговых заболеваний, в том числе лихорадки цуцугамуши, а в Юго-Восточной Азии — чумы [7].

Два вида хомячков из рода **Эверсманновы (*Allocricetulus*)** — **хомячок Эверсмanna и хомячок монгольский (*A. curtatus*)** — сравнительно плохо изучены. Известно только, что **хомячки Эверсмanna (*Allocricetulus evermanni*)** чуть крупней (длина тела до 16 см), имеют более тёмную окраску буроватых или песчано-охристых тонов и тёмное пятно на груди (рис. 9).

Кариотип — 26 хромосом. Они более многочисленны и обитают западней (от Волги до северного Сибиряна, включая Заволжье, Южный Урал и Северный Казахстан) [6, 8]. Предпочитают селиться в сухих равнинных степях, полупустынях, пустынях на песчаных, щебнистых и за-



Рис. 9. Хомячок Эверсмanna (*Allocricetulus evermanni*)

соленных почвах, на закреплённых бугристых песках, в лесостепных зонах — по опушкам колков. Придерживаются участков злаково-полынной степи, солонцов, залежей и окраин распаханых массивов. Живут в глубоких, но просто устроенных норах [1, 10]. В их питании животные корма (насекомые, моллюски, ящерицы, птенцы, полёвки) составляют большую долю, чем у других хомячков и хомяков. Отмечены случаи нападения эверсманновских хомячков даже на молодых сусликов. К сожалению, остальная часть рациона состоит в основном из сельскохозяйственных культур, в том числе — бахчевых [6].

Агрессивны к сородичам, однако, несмотря на свои хищнические наклонности, при содержании в неволе по отношению к человеку — милые, кроткие, послушные существа, истинные ангелы среди хомячков. Непонятно, почему их не разводят в качестве домашних или лабораторных животных.

Монгольские хомячки (*Allocricetulus curtatus*) мельче (до 15 см), светлей окрашены, не имеют тёмного пятна на груди, малочисленны и распространены восточней Эверсманновых — в Монголии, Туве, Цинхае и Северном Синьцзяне. Кариотип — 20 хромосом. Образ жизни плохо изучен. Значительное место в питании занимает саранча [10].

Род **Хомячков серых (*Cricetulus*)** включает три вида хомячков, из которых барабинский и серый были описаны ещё Палласом в 1773 году, а длиннохвостый — почти на сто лет позже [5, 8].

Хомячок даурский (*Cricetulus barabensis*), он же — **барабинский**, — мелкий, чуть крупней мыши, как и прочие серые хомячки, зверёк (длина тела — до 13 см). Длина хвоста составляет не более 1/3 длины тела. Спинка светло-коричневая, с охристыми и ржавыми тонами. Вдоль хребта проходит чёрная полоса, иногда несколько размытая. Брюшко беловатое, на ушах белая кайма (рис. 10).



Рис. 10. Даурский хомячок (барабинский) (*Cricetulus barabensis*)

В кариотипе 20 хромосом, но встречаются кариоморфы. Выделяют 4 подвида. Распространён от лесостепей до полупустынь юга Западной Сибири, Тувы, Забайкалья, Монголии, Северо-Восточного Китая, Приморья, Кореи. Часто селится на освоенных землях — пашнях, залежах, в жилых постройках, в том числе — в каменных домах. Живет в сложных норах, чаще вырытых животными других видов. Питается в основном растительными кормами, но поедает и насекомых [2, 10]. Один из подвидов даурского хомячка, китайский, иногда рассматриваемый в качестве отдельного вида (*Cricetulus griseus*), был первым из семейства *Cricetidae* интродуцирован как лабораторное животное в 1919 г. для изучения лейшманиоза (кала-азара). Этот вид особенно подходит для цитогенетических исследований, его диплоидный набор — 22 хромосомы.

Разводить китайских хомячков несложно, так как они легко приручаются, размножаются на протяжении всего года при надлежащем уходе и не имеют неприятного запаха. Их используют для исследования проказы и риккетсиозов, индукции хромосомных aberrаций под действием радиации, в изучении стрессов. По ответу надпочечников на хронический стресс китайские хомячки скорее сходны с другими видами лабораторных животных, чем со своими ближайшими родственниками — золотистыми хомяками,

поскольку жировая ткань у них в надпочечниках более равномерно распределена в кортексе, чем у последних [11].

Хомячок длиннохвостый (*Cricetulus longicaudatus*) очень похож на представителей двух других видов этого рода. От даурского хомячка он отличается отсутствием чёрной полосы по хребту [10], от серого хомячка — более длинным хвостом (длина хвоста равна 1/3 длины тела или превышает её) и белой каймой на ушах [5]. Он, если так можно выразиться, серее серого хомячка и несколько темней его по окраске. В кариотипе 24 хромосомы.

Распространён в горных степях Северного и Северо-Западного Китая, Монголии, Тувы, Забайкалья в Саянах. Заселяет, как правило, каменистые склоны предгорий в полупустыне (до высоты 1900 м над уровнем моря), низкотравные и полынно-злаковые степи. Живёт как в естественных укрытиях, так и в самостоятельно вырытых норах, имеющих до 6 входных отверстий. Питается главным образом семенами диких растений. На небольших участках мест обитания численность бывает довольно высокая, но в целом вид скорее редкий [10].

У хомячка серого (*Cricetulus migratorius*) в отличие от даурского нет чёрной полосы вдоль хребта. От длиннохвостого он отличается более коротким хвостом (менее 1/3 длины тела) и отсутствием белой каймы на ушах. Уши одноцветные, сравнительно большие, округлые, морда острая (рис. 11).



Рис. 11. Хомячок серый (*Cricetulus migratorius*)

Окраска верхней стороны — от тёмно-серой, дымчато-серой, буровато-серой до рыжевато-песчаной. На голове и по хребту может быть потемнение, но нечёткое, брюшко светлое [10].

Различают 10–11 подвидов. В кариотипе 22 хромосомы, но, вероятно, существует форма с 24 хромосомами. Распространён от Греции до Алтая и от северных пределов лесостепи до Ирана и Афганистана. На территории России встречается по всему югу её Европейской части (северная граница ареала проходит по линии Калуга — Рязань — Нижний Новгород — Казань) и в степях на юге Новосибирской области. Водится также в Закавказье, по всей Средней, Малой, Передней Азии, Казахстану, на Памире (до 4300 м над уровнем моря). Южная граница ареала проходит по Афганистану Синьцзяну, Южной Монголии [1, 2]. Заселяет равнинные и горные степи. Нередко распространяется вслед за человеком по увлажнённым участкам пустынь и полупустынь. Вырытые им норы имеют простое устройство, чаще всего с двумя ходами и одной камерой. Охотно поселяется в заброшенных норах других грызунов и в естественных убежищах. Нередко забирается в жилища человека, на юге обитает даже в многоэтажных домах крупных городов (Ашхабад, Бишкек, Ереван), вплоть до чердаков. Способен даже вытеснять оттуда мышей [2].

Питается в основном семенами дикорастущих и культурных растений. Постоянно поедает животные корма: моллюсков, жуков, муравьёв, вплоть до фаланг и скорпионов [2, 10]. В Армении предпринималась попытка разводить *Cr. migratorius* в лабораториях Еревана, однако, судьба, постигшая колонию после распада СССР, неизвестна.

Вот теперь, после знакомства с родом серых хомячков, можно вернуться к гипотезе Сэча, пытавшегося разгадать, почему периодически исчезает и откуда вновь появляется золотистый хомяк. Он обратил



внимание на то, что обыкновенный хомяк и один из видов серых хомячков имеют диплоидный набор 22 хромосомы, а золотистый хомяк — 44. Ареалы первых двух видов намного шире, чем у последнего, кроме того, они частично накладываются друг на друга, а область распространения сирийского хомяка находится как раз в месте наложения этих ареалов. Кроме того, в эволюционном плане золотистый хомяк как вид намного моложе.

Сопоставив эти три факта, Сэч сделал вывод о том, что сирийский хомяк является тетраплоидом, происходящим от скрещивания в природе двух родительских видов [11]. Поскольку плод адюльтера оказался недостаточно приспособлен для тягот борьбы за существование, он время от времени вымирает под действием естественного отбора.

Однако обыкновенные хомяки и кое-кто из рода серых хомячков с достойным сожалением упорством предаются запретной любви вновь и вновь. Гипотеза остроумная, хотя и несколько фривольная. Но, увы, науке до сих пор неизвестны случаи возникновения новых видов таким путём и, как свидетельствуют современные генетические исследования, *Mesocricetus auratus* не является исключением из этого правила. К тому же, выдвигая предположение о гибридном происхождении сирийских хомячков, Сэч допустил досадную ошибку.

Дело в том, что даурский хомячок, именуемый по-русски также барабинским, а иногда и китайским, как было сказано выше, на латыни называется *Cricetulus barabensis*, а одна из его разновидностей — *Cr. pseudogriseus* (что в буквальном переводе означает «ложно-серый»). На английском же языке название этого вида “grey hamster”, что, опять-таки, в буквальном переводе означает «серый хомячок». Но русские зоологи называют серым хомячком другой вид — *Cr. migratorius* (в переводе с латыни — «мигрирующий»). Один из предполагаемых родительских видов Сэч

именует даурским, китайским, серым, указывая в качестве его латинского названия *Cr. griseus* и *Cr. barabensis*. Так что речь как будто бы идёт о барабинском хомячке. Однако в его кариотипе не 22, а 20 хромосом. Но даже если считать, что к амурным шалостям с другим видом склонна какая-то изоморфная раса, имеющая подходящее число хромосом, остаются географические нестыковки, так как, хотя ареалы обыкновенного хомяка и барабинского хомячка и граничат друг с другом, область соприкосновения занимает часть территории Западной Сибири, но не имеет отношения к Сирии. В то же время, ареалы обыкновенного хомяка и серого хомячка (*Cr. migratorius*) совпадают на значительной площади, и область распространения золотистого хомяка находится как раз в её центре, кроме того, в кариотипе серого хомячка именно 22 хромосомы. Так что, по-видимому, Сэч имел в виду всё-таки серого хомячка.

Но вне зависимости от того, явился ли сирийский хомяк на свет в результате кровосмесительной связи двух зоологических видов из разных родов, или менее экстравагантным способом, он оказался поистине бесценным лабораторным животным для биомедицинских экспериментов. Этот вид широко используют при изучении инфекционных заболеваний: паразитологических (лейшманиоз, описторхоз), бактериологических и вирусологических (полиомиелит, болезнь Ньюкасла).

Золотистые хомяки страдают кариесом при соответствующем рационе, вызывающим изменение микрофлоры ротовой полости, поэтому на них проводят эксперименты в области стоматологии. Они подходят для изучения естественной или индуцированной гипотермии. Наличие у них лишённого шерсти защёчного мешка удобно для исследования микроциркуляции. Сирийские хомяки особенно полезны в изучении процессов репродукции, как из-за необычайно короткого периода

выкармливания (16 дней), так и благодаря на редкость чётким эстральным циклам у самок. Гистохимический липидный ответ надпочечников золотистых хомячков на стрессорные воздействия иной, чем у других лабораторных животных. Они также обладают необычными иммуногенетическими особенностями, которые могут оказаться весьма ценными при испытаниях химиотерапевтических препаратов для лечения злокачественных опухолей человека [11].

Помимо всего вышеперечисленного, триумфальному шествию сирийских хомячков по всему миру более всего способствовало их природное обаяние. Сотрудники лабораторий, где разводили этих животных, приносили золотистых зверьков домой, в подарок детям. Там они тоже плодились и размножались. Так что в настоящее время количество сирийских хомячков, разводимых любителями в домашних условиях, значительно превышает число тех, которых содержат в научных учреждениях. За последние полвека у одомашненных золотистых хомячков выявлено и поддерживается несколько десятков мутаций окраски и структуры шерсти (рис. 12).



Рис. 12. Мутантные формы сирийского (золотистого) хомячка

Популярность сирийских хомячков объясняется не только их яркой внешностью, чистоплотностью и отсутствием неприятного запаха, но и «манерой поведения». Дж. Даррелл неоднократно писал,

что среди животных встречаются, с человеческой точки зрения, прирождённые комики, причём очень талантливые [4]. Сказанное им в полной мере относится к золотистым хомячкам. Невозможно смотреть без смеха за тем, как они с озабоченным видом набивают защёчные мешки семечками, безошибочно отбрасывая пустые или испорченные или, повиснув на прутике, как на турнике, вдруг отпускают одну лапку, чтобы почесать брюшко, а затем, не имея сил подтянуться, всё более провисают, выпучив глазки от удивления и, наконец, падают на пол клетки, как переспевшая груша. После чего всё повторяется с начала.

Впрочем, вслед за сирийскими хомячками в биомедицинские лаборатории мира проник и обосновался там ещё один представитель семейства Cricetidae, **джунгарский мохноногий хомячок**.

Один из видов рода **Хомячков мохноногих** (*Phodopus*), небольших животных (длина тела до 10 см) с едва выступающим из пышного меха хвостом и сплошь покрытыми мехом подошвами задних лап, — **Хомячок джунгарский** был описан Палласом в 1773 году, а два других — **Хомячок Кэмпбелла** и **Хомячок Роборовского** — более чем 130 лет спустя.

Хомячок джунгарский (*Phodopus sungorus*) — мелкий, чуть крупнее мыши, зверёк с очень коротким хвостом (до 2 см длиной). В окраске верхней части тела преобладают буровато- или охристо-серые тона. Вдоль хребта проходит чёрная полоска. Тёмная окраска спинки двумя или тремя отчётливыми выступами вдаётся в светлую окраску боков. Морда не заострена, хотя лицевой отдел черепа относительно длинный, уши небольшие. Мех густой и пышный (рис. 13).

Кариотип — 28 хромосом. Распространён на юге Западной Сибири, в Восточном Казахстане. Имеется изолят в Хакасии. Населяет сухие равнинные и горные степи без кустарников, встречается в щерб-

Рис. 13. Хомячок джунгарский (*Phodopus sungorus*)

нистых степях, хотя предпочитает злаково-попынные. Роет норы с ветвящимися ходами, одной или двумя камерами на глубине до 1 м. Охотно селится в норах других грызунов, иногда живёт в общей норе с ними. К зиме накапливает подкожный жир, хотя в спячку и не впадает. От всех Хомяковых отличается тем, что окрас меха имеет чётко выраженную сезонность: зимой он становится намного светлей (вплоть до белого в Восточной части ареала). Кроме растительной пищи (семян), часто поедает насекомых и их личинки. Численность местами довольно высокая. Может являться разносчиком многих опасных и особо опасных болезней: чумы, туляремии, пастереллёза, сыпнотифозной лихорадки [1, 5, 8, 10]. Хорошо размножается в неволе. Широко используется в качестве лабораторного животного.

Здесь следует сделать небольшое отступление.

Разумеется, в биомедицинских лабораториях для некоторых исследований джунгарский хомячок незаменим, и тут уж ничего не поделаешь. Но в последние десятилетия среди любителей в России стало модным держать джунгарских хомячков в качестве домашних животных. Только прежде чем их заводить, стоит хорошенько подумать. Нет, выглядят они очаровательно, особенно в зимнем меху: такие маленькие хомячки Санта-Клаусы в сереньких шубках с тёмной полосочкой

по спине, с пышными, словно сделанными из ваты, белыми «усами» и «бородой». Но, вот их нрав ... Чтобы не возводить напраслину на бессловесных тварей, просто замечу, что Вселенная в представлении джунгарского хомячка состоит из двух основных частей: той, от которой можно откусить, и той, которую можно укусить. Остальная, крайне незначительная часть мироздания джунгарского хомячка не волнует. Добавим, что при своих мелких размерах эти зверьки обладают вполне приличными и очень острыми самозатачивающимися резцами. Так что мазохисту-любителю перед приобретением джунгарских хомячков следует обзавестись металлической клеткой с частой сеткой (деревянную прогрызут в первую ночь), или стеклянным террариумом, садовыми рукавицами и достаточным количеством перевязочных материалов и перекиси водорода.

Хомячок Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*) по внешнему виду почти неотличимо похож на джунгарского, но окрас более светлый, палевый. В отличие от джунгарского у него не наблюдается сезонного изменения окраски (рис. 14). Видовая обособленность от джунгарского хомячка доказана гибридологически. Распространён в Монголии, Туве, Забайкалье [8]. Широко используются в лабораториях, а также разводятся любителями как домашнее животное. На одном из сайтов, объединяющем любителей хомячков в Интернете, было на-

Рис. 14. Хомячок Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*)

писано, что «хомячки Кэмпбелла несколько злее джунгарских». Трудно вообразить — впрочем, нет предела совершенству.

Из-за того, что хомячок Кэмпбелла был выделен как отдельный вид относительно недавно, возникли терминологические сложности: хомячков этого вида **иногда тоже называют джунгарскими** или **оба вида — сибирскими**; более того, зоологи англоязычных стран именно **хомячков Кэмпбелла** именуют **джунгарскими**, либо **сибирскими**. Любители мохноногих хомячков утверждают, что продавцы на Птичьем рынке придерживаются английского толкования (ох, уж это наше низкопоклонство перед Западом!). Путаницу с названиями усугубили следующие обстоятельства.

Хомячков Кэмпбелла впервые ввела в лабораторную практику Е.Е. Погосянец в 1965 году. Она создала и поддерживала колонию этих животных в Институте онкологии АМН СССР, где на протяжении многих лет их использовали в опытах. В то время зоологи ещё не разделяли мохноногих хомячков на *Ph. sungorus* и *Ph. campbelli*, а называли и тех, и других джунгарскими. Таким образом, мохноногие хомячки данной разводки получили известность как джунгарские.

Под этим названием их разводили в 70-х годах прошлого века в питомнике «Столбовая» АМН СССР (Московская область) и поставляли в НИИ для экспериментов, однако в действительности это были хомячки Кэмпбелла. Собственно джунгарские хомячки чаще используются в лабораториях Западной Европы и в Америке для изучения фотопериодизма, так как сезонная смена окраски меха жёстко коррелирует у них с уровнем гормонов и продолжительностью световой экспозиции.

Хомячок Роборовского (*Phodopus roborovskii*) самый маленький из мохноногих хомячков (длина тела до 9 см, хвоста — около 1 см). Верхняя часть окрашена в относительно светлые, розовато-охристые тона. Чёрной полоски вдоль хребта нет. Более

тёмная окраска спинки вдаётся уступами в более светлую окраску боков, но чётко выражен только один выступ (рис. 15).



Рис. 15. Хомячок Роборовского (*Phodopus roborovskii*)

В кариотипе 34 хромосомы. Распространён в Монголии и прилежащих территориях России (юг Тувы), Казахстана (Зайсанская долина) и Китая [8, 10]. Заселяет песчаные пустыни и полупустыни. Предпочитает закреплённые пески и песчаные степи. Роет в песке простые норы из 1-2 ходов и гнездовой камеры. В летнее время забивает входные отверстия песком. Более активен и подвижен, чем другие мохноногие хомячки. Питается в основном семенами солянок, осок, злаков, тюльпанов [10].

Как лабораторное животное не используется, хотя может представлять интерес для изучения стрессов. Разводится любителями в домашних условиях, но его содержание требует большой осторожности из-за повышенной чувствительности к стрессам, нередко приводящим к гибели животного.

Вспомним, наконец, и о тоненькой веточке на генеалогическом древе семейства хомяковых, **мышевидных хомячках (*Calomyscus*)**. По-совести говоря, это и не хомячки вовсе, так, подкидыши какие-то. Пожалуй, зоологи просто не знали, куда их приткнуть: на хомячков *Calomyscus* не слишком похожи, но на остальных грызунов похожи ещё меньше, а выделять отдельное семейство для таких крох как-то



несолидно. Этот странный род представлен 5–6 видами.

Хомячок мышевидный (*Calomyscus baliwardi*) очень мелкий зверёк, размером с некрупную мышь (длина тела до 8 см). Зато хвост у него очень длинный, до 10 см, да к тому же покрыт густой шерстью, с узкой кисточкой на конце наподобие метёлки. Мордочка острая, уши большие, округлые, задние конечности развиты заметно лучше передних. Спинка и бока палево-песчаные, брюшко и лапки чисто белые, хвост тоже двухцветный: сверху тёмный, снизу белый.

Распространён в Белуджистане, Афганистане, Иране. На территории бывшего СССР отмечен в Туркмении (горы Копетдага) и в Закавказье (Нахичевань). Обитает среди скал, по осыпям крупных камней, в ущельях, пещерах [1]. Норы устраивает в щелях, трещинах и пустотах среди камней. Питается преимущественно семенами, орехами, употребляет животные корма.

Исключительно быстрый и проворный зверёк, прекрасно лазает по камням и узким трещинам [10]. В отличие от всех других хомяковых, живёт в тесном соседстве с себе подобными. В неволе мышевидных хомячков содержат группами в просторных террариумах или в вольерах со стеклянными стенками. Трудно передать всю красоту и изящество движений стайки этих животных, непрерывно кружащихся в каком-то завораживающем танце. Создаётся впечатление, будто они скользят в воздухе, словно колибри или пчелиный рой.

Подводя итог нашему знакомству с хомяковыми, отметим их общие фамильные черты. Члены этого семейства (по крайней мере те, что обитают в Старом Свете) имеют защёчные мешки, служащие им тарой для транспортировки кормов. У одних видов они хорошо развиты, например, у обыкновенных хомяков, у других (мышевидных хомячков) — рудиментарны. Большинство хомяковых делает прилич-

ные запасы пищи на зиму, иногда явно избыточные. У них нет настоящей зимней спячки, при которой наблюдается гипотермия, снижается частота дыхания и организм погружается в парабиоз, а питание организма осуществляется за счёт накопленного бурого жира. Но у многих видов хомяков наблюдается более или менее продолжительный зимний сон с периодическими пробуждениями или сезонное снижение активности.

Все хомяки и хомячки живут в норах, по крайней мере, в определённые периоды года. Роят норы, как правило, самостоятельно, но, бывает, используют и чужие. Некоторые из них не гнушаются выгонять оттуда «законных» хозяев или живут в «коммуналке» с животными других видов. Из-за склочного и агрессивного нрава колоний не образуют (кроме китайских, мохноногих и мышевидных), семейных пар — тоже. Некоторые виды хомячков при разведении в неволе удаётся содержать попарно или даже группами, но это уже результат селекции.

И, наконец, сакраментальный вопрос: являются ли хомяки вредителями? Не имеет смысла отрицать, что своей заготовительной деятельностью они наносят определённый ущерб сельскому хозяйству. Но экологи давно доказали, что не существует деления на «чистых» и «нечистых» тварей, «полезных» и «вредных» животных. В природе хомяки играют важную и конструктивную роль, не только как пищевая база для редких видов хищников. Рытвё нор хомяками способствует аэрации почвы, её удобрению и наращиванию плодородного слоя.

Поскольку хомяки почти никогда не съедают полностью накопленные на зиму запасы семян дикорастущих трав, косточковых, клубней и луковиц, они способствуют их распространению в природе и, тем самым, закреплению песков и естественной «рекультивации» пустынь и полупустынь в степи и лесостепи.

Вместо заключения

Основная цель данного экскурса в историю семейства **Хомяковых** заключается в том, чтобы запечатлеть в памяти работающих с лабораторными животными экспериментаторов (а это главным образом медики) ряд несложных постулатов.

1. На территории бывшего СССР и сопредельных стран обитает не менее 14 видов подсемейства *Cricetinae* семейства *Cricetidae*. В лабораторной практике используются хомяки и хомячки 5 зоологических видов (китайские, сирийские, Кэмпбелла, джунгарские, и, возможно серые). Хомячки ещё одного вида (Роборовского) разводятся любителями как домашние животные.
2. Хомячки - это не детёныши хомяков, а представители других родов, существенно отличающихся как от рода хомяков, так и друг от друга.
3. Джунгарский хомячок в представлении российских зоологов — *Phodopus sungorus*, а на Диком Западе (в США) и на не менее диком Птичьем рынке — *Phodopus campbelli*.

Так является ли сирийский хомяк, в действительности, природным гибридом двух разных зоологических видов, к тому же принадлежащих к разным родам? Трудно сказать. Романтично, но маловероятно. Впрочем, кто может утверждать, что Геракл на самом деле был сыном Зевса, Тезей — Посейдона, а Зигфрид — Вотана? Таков миф.

Литература

1. *Бобринский Н.А., Кузнецов Б.А., Кузякин А.П.* Определитель млекопитающих СССР. М.: Просвещение, 1965, с. 306-313.
2. *Громов И.М., Ербаева М.А.* Млекопитающие фауны России и сопредельных территорий. Зайцеобразные и грызуны. СПб., 1995.
3. *Громов И.М., Поляков И.Я.* Полёвки (*Microtinae*). Фауна СССР, млекопитающие. Л.: Наука, 1977, 3 (8).
4. *Даррелл Дж.* Под пологом пьяного леса. М.: Мысль, 1964, с. 29.
5. *Кузнецов Б.А.* Определитель позвоночных животных фауны СССР. Часть 3. Млекопитающие. М.: Просвещение, 1975.
6. Млекопитающие Казахстана, т. 1 (3). Песчанки, полёвки, алтайский цокор. Алма-Ата: Наука, 1978.
7. Наземные млекопитающие Дальнего Востока (определитель). М.: Наука, 1984.
8. *Павлинов И.Я., Россолимо О.Л.* Систематика млекопитающих СССР. М.: Изд-во МГУ, 1987.
9. *Ранк О.* Миф о рождении героя. М.: Рефлбук — Ваклер, 1997, с. 168-216.
10. *Флинт В.Е., Чугунов Ю.Д., Смирин В.М.* Млекопитающие СССР. М.: Мысль, 1970, с. 336-353.
11. *Wintley R.* Hamsters. In: *Animals research*. Ed. W. Lane-Petter. London—N.Y. Academic Press, 1963, pp. 287-321.

THE MYSTERIES OF CRICETIDAE

E.F. Schmidt, A.V. Surov

*Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow
A.N. Sevetsev Research Institute for Evolution and Ecology Problems*

The history of *Mesocricetus auratus* (golden, or syrian hamster), its cultivation and distribution is related. The hypothesis about its origin by crossing two species of the *Cricetidae* in nature is discussed. Descriptions of 14 species of this family living on the territory of Russia and neighbouring countries are given.

Key words: golden (sirian) hamster, barabiens, chinese hamster.



БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

Новые биомодели для оценки высоковирулентных штаммов чумы *Yersinia pestis*

В.Н. Каркищенко, Е.В. Брайцева

Институт новых технологий РАН, Москва

Научный центр биомедицинских технологий РАН, Москва

В связи с необходимостью унификации использования биологических моделей при испытании возбудителей чумы был проведен ряд экспериментов на лабораторных мышах. Были выполнены исследования по чувствительности мышей инбредных линий BALB/c, C57BL/6, CBA/Lac, DBA/2 и гибридов F1(CBAxB6) и F1(B6xDBA/2) к возбудителю чумы *Y. pestis*. В экспериментах использовали классический штамм возбудителя чумы *Y. pestis* 231, высоковирулентный для нелинейных мышей и гибридов. Группой сравнения служили нелинейные мыши из питомника «Андреевка». Полученные данные выявили меньшую по сравнению с нелинейными мышами чувствительность к возбудителю чумы гибридных мышей. Оценивалась средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей после заражения. Средняя продолжительность жизни павших мышей всех линий, за исключением BALB/c была существенно больше при заражении малыми дозами. Резких отклонений от показателей, полученных в контроле, выявлено не было. Мыши всех испытанных линий оказались чувствительны к использованному высоковирулентному штамму чумного микроба, однако, величина LD₅₀ для гибридов была на порядок меньше. Ещё большей оказалась величина LD₅₀ для мышей линии BALB/c. Отличия статистически достоверны.

Ключевые слова: чума, штамм *Y. pestis* 231, вирулентность, гибриды.

Поиск животных-биомоделей для оценки эффектов чумы (*Yersinia pestis*) предопределен разной чувствительностью к *Yersinia pestis* грызунов, носителей возбудителя. Учитывая, что в общую картину развития чумы основной вклад вносит экзотоксин FII или «мышинный токсин» [1, 4, 8, 9], представляло интерес провести исследование наиболее вирулентного штамма *Y. pestis* 231 на линейных мышах BALB/c, C57BL/6, CBA/Lac, DBA/2 и гибридах F1(CBAxC57BL/6) и F1(C57BL/6xDBA/2). Характерной особенностью «мышинного» токсина является его особенность поражать лабораторных мышей и крыс (табл.1), но не морских свинок. В то же время морские свинки более чувствительны к эндотоксину FI *Y. pestis*, содержащему липополисахариды (ЛПС I и II) в сильно агрегированном состоянии [4, 5, 6, 7].

Известно [2], что белки «мышинного» токсина, входящие в состав мембран, и липополисахариды эндотоксина образуют единый токсический комплекс *Y. pestis* в организме чувствительного к чуме хозяина [1, 2, 10, 11].

Поиск оптимальных биомоделей для исследования вакцинных и противомикробных препаратов в отношении чумного микроба определяется тем, что в природе имеются не только капсульные, но и вирулентные бескапсульные штаммы этого возбудителя. Последние направляют иммунные реакции в химерном направлении, уходя от иммунологического контроля. Это определяет необходимость поиска оптимальных биологических моделей [3] для исследования и стандартизации вирулентности возбудителя чумы.

Показатели физиологических изменений в организме мышей под влиянием чумных «мышинного» экзотоксина и эндотоксина [1]

Показатели	«Мышинный» токсин	Эндотоксин	Инфекционный процесс
LD ₅₀	0,1-3 мкг	300-10000 мкг	1 клетка в организме мыши размножается до 1-10 млрд. клеток
Время гибели	Спустя 8-9 ч	Спустя 12-15 ч	2-5 дней в зависимости от величины заражающей дозы
Патология	Мелкие сосудистые расстройства в мозге, легких, брюшине	Тяжелые сосудистые расстройства и геморрагии во многих органах	Множество бактерий в сосудах с геморрагиями и некрозами во внутренних органах

Содержание животных и работа с ними

Животные содержались по 10 голов в клетках и наблюдались в течение 10 дней. За этот период мыши F1(CBA×B6), F1(B6×DBA/2), BALB/c, C57BL/6, CBA/Lac и DBA/2 хорошо перенесли адаптационный период: были клинически здоровы, активны, павших не было. После адаптации животные были размещены и промаркированы в соответствии с условиями эксперимента.

Вся работа по содержанию экспериментальных животных и уходу за ними строилась в соответствии с распорядком дня и утвержденным регламентом. Под распорядком дня подразумевается: санитарная обработка помещений и оборудования, раздача кормов, проведение экспериментальных работ и манипуляций. Уход, содержание, заражение, текущая и заключительная дезинфекция, кремация павших и вышедших из опыта инфицированных животных проводилась в соответствии с СП 1.2.011-04 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности».

Для содержания биопробных животных использовалось клеточное оборудование итальянской фирмы Techniplast, обеспечивающее требуемые комфортные и

санитарно-гигиенические условия содержания животных. Смена чистых, заранее дезинфицированных клеток, стерильного подстилочного материала, кормушек и поилок проводилась 2 раза в неделю как для интактных, так и для зараженных животных.

Раздача кормов и поение лабораторных мышей осуществлялось только после окончания текущей дезинфекции помещений или смены клеток и выноса их в мочно-дезинфекционное отделение.

В течение всего эксперимента проводился ежедневный контроль условий содержания животных. На требуемом уровне поддерживались все основные показатели микроклимата: температура воздуха 20–22 °С, относительная влажность воздуха 50–55 %, скорость движения воздуха 0,1–0,2 м/сек, кратность воздухообмена в клетках содержания инфицированных животных составляла 5–7 м³/час.

Кормление биопробных животных осуществлялось в соответствии с нормами, утвержденными приказом Министерства здравоохранения СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Учитывая, что в эксперименте использовались мыши F1(CBA×B6), помимо основного гранулированного корма ПК 120-3, в рацион питания этих животных были

включены дополнительные ингредиенты. Таким образом, в ежедневный рацион питания из расчёта на одну мышь входили: гранулированный комбикорм – 11,0 г, морковь – 2,8 г, творог – 2,0 г, мясо (говядина отварная) – 0,5 г. Перед кормлением экспериментальных животных гранулированный корм ПК 120-3 подвергался стерилизации при температуре 121 °С в течение 20 минут. Питьевая вода проходила очистку и стерилизацию через проточную установку СТЭЛ-4Н производства НПО «Экран».

Исследования чувствительности инбредных и гибридных линий мышей к возбудителю чумы *Y. pestis* выполнены на базе лаборатории Ростовского научно-исследовательского противочумного института.

В экспериментах использовали классический штамм возбудителя чумы *Y. pestis* 231, высоковирулентный для лабораторных мышей и морских свинок. Для мышей в различных опытах определялась LD₅₀ в пределах 3–6 КОЕ при подкожном введении бактерий. Бактерии штамма перидически пассируются через организм чувствительных к чуме экспериментальных животных для поддержания вирулентности на высоком уровне и сохранения однородности популяции по детерминантам вирулентности. Данный штамм содержит все три типичные для классического чумного микроба плазмиды (табл. 2).

Многочисленными исследованиями установлена связь между патогенностью или

вирулентностью чумного микроба с плазмидами. Что касается возбудителя *Y. pestis*, то он экспрессирует известные основные детерминанты вирулентности (табл. 3).

Заражение экспериментальных животных

Чувствительность к возбудителю чумы определяли у мышей инбредных линий BALB/c, C57BL/6, CBA/Lac, DBA/2 и гибридов F1(CBAxВ6) и F1(В6x DBA/2), имеющих соответствующие сертификаты качества. Группой сравнения служили нелинейные мыши. Условия содержания и кормления экспериментальных животных описаны выше.

Заражение проводили подкожно в правую заднюю лапку различными дозами бактерий указанного выше штамма, выращенных на агаре LB (18 час при 28 °С).

Взвесь бактерий готовили в физиологическом растворе, содержащем фосфатный буфер М/30 для поддержания рН 7,2. Из исходной взвеси (10⁹ м.к.), приготовленной по стандарту мутности (методика НИИЭМ им. Гамалеи) готовили ряд десятикратных разведений для получения рабочих взвесей, которые содержали требуемые заражающие дозы в 0,1 мл. Параллельно определяли процент клеток, способных образовывать колонии (КОЕ). Их подсчитывали после посева на 5 чашечек того же агара LB по 100 м.к. (по стандарту мутности).

Таблица 2

Плазмиды чумного микроба и кодируемые ими свойства [1]

Плазмида	Мол.м. (мД)	Кодируемые свойства
pPst	6	Пестициногенность, фибринолизин, плазмокоагулазар
Cad	47	Зависимость от кальция, синтез VWa и других поверхностных белков
Fra	61–65	Fl, «мышиный» токсин

Оценка чувствительности лабораторных мышей разных генотипов к бактериям высоковирулентного штамма возбудителя чумы по величине LD₅₀, летальному эффекту и средней продолжительности жизни павших животных

Мыши	Доза заражения по стандарту мутности, м.к.	Доза заражения, КОЕ	Число павших мышей из 10 заражённых	Средняя продолжительность жизни павших (СПЖ), сутки	Всего павших из 50 заражённых	Значение LD ₅₀ , КОЕ
F1(CBAxВ6)	10	4,6	2	7,0	38 (76%)	23 (9,1 – 57,8)
	10 ²	4,6×10 ¹	9	6,8		
	10 ³	4,6×10 ²	7	6,7		
	10 ⁴	4,6×10 ³	10	4,4		
	10 ⁵	4,6×10 ⁴	10	4,2		
F1(В6хDBA/2)	10	4,6	2	10	35 (70%)	72,2 (30 – 183,1)
	10 ²	4,6×10 ¹	7	6,8		
	10 ³	4,6×10 ²	6	6,3		
	10 ⁴	4,6×10 ³	9	5,8		
	10 ⁵	4,6×10 ⁴	9	4,0		
BALB/c	10	4,6	1	5,0	39 (78%)	18,3 (7,3 – 46)
	10 ²	4,6×10 ¹	8	6,1		
	10 ³	4,6×10 ²	10	5,8		
	10 ⁴	4,6×10 ³	10	4,3		
	10 ⁵	4,6×10 ⁴	10	4,2		
C57BL/6	10	4,6	8	8,1	46 (92%)	3,6 (1,4 – 9,1)
	10 ²	4,6×10 ¹	9	7,2		
	10 ³	4,6×10 ²	9	5,2		
	10 ⁴	4,6×10 ³	10	4,4		
	10 ⁵	4,6×10 ⁴	10	3,6		
CBA/Lac	10	4,6	5	8,6	44 (88%)	5,8 (2,3 – 14,5)
	10 ²	4,6×10 ¹	9	7,2		
	10 ³	4,6×10 ²	10	5,3		
	10 ⁴	4,6×10 ³	10	4,3		
	10 ⁵	4,6×10 ⁴	10	3,2		
DBA/2	10	4,6	7	8,1	47 (94%)	2,3 (1 – 7,3)
	10 ²	4,6×10 ¹	10	7,1		
	10 ³	4,6×10 ²	10	5,5		
	10 ⁴	4,6×10 ³	10	5,8		
	10 ⁵	4,6×10 ⁴	10	6,0		
Нелинейные	10	4,2	8	9,5	48 (86%)	2,1 (1 – 5,8)
	10 ²	4,2×10 ¹	10	6,7		
	10 ³	4,2×10 ²	10	4,4		
	10 ⁴	4,2×10 ³	10	4,1		
	10 ⁵	4,2×10 ⁴	10	3,9		

Подсчёт колоний производили на вторые и, окончательно, на третьи сутки после инкубации посевов при 28 °С. Математические средние показатели числа выросших колоний определяли по результатам подсчёта всех 5 посевов.

Оценка вирулентности *Y. pestis* 231

При сравнительных исследованиях была определена вирулентность *Yersinia pestis* 231 (фенотип Fga⁺, Tox⁺, Lcr⁺, Pst⁺, Pla⁺, Pgm⁺, рН6⁺) для нелинейных мышей и гибридов F1(СВА×В6) из филиала «Андреевка» НЦБМТ РАМН. С этой целью мышей заражали суспензией суточной (28 °С) агаровой культуры подкожно в дозах 5-10-20-40-80-160 м.к. по стандарту мутности ОСО 42-28-85-ОЗП. Для инфицирования использовали по 4, 6 или 10 мышей в каждой группе. За животными наблюдали в течение 14 суток. Павших животных вскрывали с посевом органов и тканей на пластины агара Хоттингера рН 7,1±0,1. У всех мышей наблюдали генерализацию процесса с выделением культур *Y. pestis* 231 из региональных лимфатических узлов, селезёнки, печени, крови, лёгких. Оценивалась средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей после заражения (табл. 4). Расчёт значений ЛД₅₀ проводили по формуле Кербера в модифика-

ции И.П.Ашмарина и А.А.Воробьёва (1962). Результаты представлены в табл. 4. Значение LD₅₀, доверительный интервал м.к. 7 (1 ... 22), соответствовало 3 КОЕ.

Данные опыта свидетельствуют о высокой степени вирулентности использованной нами субкультуры *Y. pestis* 231. В дальнейшем в эксперимент были взяты партии гибридных F1(СВА×В6) и нелинейных мышей. Сразу же после завершения адаптации животные из обеих групп были заражены теми же дозами *Y. pestis* 231 (из одной суспензии). Использовали субкультуру, выделенную из нелинейной мыши предыдущего опыта. Результаты представлены в табл. 4 и 5.

Полученные данные выявили меньшую по сравнению с нелинейными мышами чувствительность к возбудителю чумы гибридных мышей. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в значениях LD₅₀, в группах гибридных мышей полной гибели животных в зависимости от увеличения заражающей дозы возбудителя чумы (40-80-160 м.к.) не наблюдали.

Культуру, выделенную от гибрида, зараженного 20 м.к. (по мутности), вновь использовали для инфицирования мышей F1(СВА×В6), в дозах 80-160-320-640-1280 м.к. (по стандарту мутности). Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 4

Вирулентность *Y. pestis* 231 для нелинейных мышей

Заражающая доза по стандарту мутности, м.к.	Число павших мышей из 4 зараженных	СПЖ, сутки	Значение LD ₅₀ , доверительный интервал, м.к.
5	2	6,0	7 (1 ... 22), что соответствовало ~3 КОЕ
10	3	7,0	
20	3	9,0	
40	4	6,0	
80	4	5,7	
160	4	6,5	

Пассирование *Y. pestis 231* через организм гибрида не привело к повышению вирулентности для этого вида животных: от 1280 м.к. пала лишь одна мышь.

В связи с этим проведено сравнительное изучение вирулентности субкультуры *Y. pestis 231*, прошедшей двукратное пассирование через организм беспородных мышей при малых заражающих дозах. Для инфицирования использовали дозы $2 \cdot 10^1$, $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$ м.к. (по стандарту мутности).

На каждую инфицирующую дозу брали по 6 гибридных и белых мышей. Результаты представлены в табл. 7.

Как видно из табл. 7, падеж гибридов по мере увеличения заражающих доз оказался ровнее, хотя одно животное, из 6 взятых для дозы $2 \cdot 10^4$ м.к. (по мутности), не пало. При вскрытии всех выживших гибридов на 14-е сутки после заражения (регионарный лимфоузел, селезёнка, печень, кровь, лёгкое) культур чумного микроба выделено не было.

Таблица 5

Сравнительная характеристика вирулентности *Y. pestis 231* для нелинейных мышей и гибридов F1(СВА×В6)

Заражающая доза по стандарту мутности м.к.	Число павших мышей из 6 заражённых	СПЖ, сутки	Значение LD ₅₀ , доверительный интервал, м.к.	Число павших мышей из 6 заражённых	СПЖ, сутки	Значение LD ₅₀ , доверительный интервал, м.к.
5	2	4,5	11 (3 ... 35) по мутности, что соответствовало ~ 4 КОЕ	0	—	25 (8 ... 80) по мутности, что соответствовало ~ 10 КОЕ
10	3	7,0		3	10,3	
20	3	6,3		6	7,7	
40	[6]	5,0		[4]	5,2	
80	[6]	4,7		[3]	4,7	
160	[6]	4,6		[3]	5,3	

Таблица 6

Вирулентность *Y. pestis 231* (от гибрида) для мышей F1(СВА×В6)

Заражающая доза по стандарту мутности, м.к.	Число павших мышей из 6 зараженных	СПЖ, сутки	Значение LD ₅₀ , доверительный интервал, м.к.
80	5	6,6	160 (50 ... 500), что соответствовало ~10 КОЕ
160	3	7,0	
320	6	7,5	
640	6	6,6	
1280	[1]	7,0	

Наблюдение за животными проводили в течение 15 суток. Павших вскрывали, контролируя патанатомическую картину, делали высевы на агар крови сердца. Посевы выращивали при 28 °С в течении 2-3 суток. Выросшие культуры проверяли на чистоту визуально микроскопически и диагностическим тестом.

LD₅₀ (или MLD) определяли, как принято, по формуле:

$$\lg LD_{50} = \lg DN - \sigma (\Sigma Li - 0,5) n,$$

где: *N* – общее число испытанных доз;
n – общее число животных, которым введена каждая доза;

σ – логарифм кратности испытанных доз;

Таблица 7

Вирулентность *Y. pestis* 231 для нелинейных мышей и гибридов F1(CBA×B6)

Заражающая доза по стандарту мутности м.к.	Число павших мышей из 6 заражённых	СПЖ, сутки	Значение LD ₅₀ , доверительный интервал, м.к.	Число павших мышей из 6 заражённых	СПЖ, сутки	значение LD ₅₀ , доверительный
2·10 ¹	3	6,7	20 (2 ... 40) по мутности, что соответствовало ~ 8 КОЕ	4	10,2	63 (16 ... 200) по мутности, что соответствовало ~ 25 КОЕ
2·10 ²	[6]	4,7		[3]	5,3	
2·10 ³	6	4,1		6	7,8	
2·10 ⁴	[6]	3,9		[5]	4,6	

Таблица 8

Средняя продолжительность жизни лабораторных мышей в зависимости от дозы заражения *Y.pestis*

Доза заражения, LD ₅₀	Контроль (нелинейные)	F1(CBA×B6)	F1(B6×DBA/2)	BALB/c	C57BL/6	CBA/Lac	DBA/2
1	9,5	7,0	10,0	5,0	8,1	8,6	8,1
% к контролю	100	73,7	105,3	52,7	85,3	90,5	85,3
10	6,7	6,8	6,8	6,1	7,2	7,2	7,1
% к контролю	100	101,5	101,5	91,0	107,5	107,5	105,8
10 ²	4,4	6,7	6,3	5,8	5,2	5,3	5,5
% к контролю	100	152,8	143,2	131,9	118,2	120,5	125,0
10 ³	3,9	4,2	4,0	4,2	3,6	3,2	6,0
% к контролю	100	102,4	102,6	107,7	92,3	82,0	153,8
Средний показатель и % по всем дозам	5,7	5,8	6,0	5,1	5,7	5,7	6,5
	100	101,8	105,3	89,5	100	100	114,0

Li – отношение числа животных, погибших от данной дозы, к общему числу животных, которым введена данная доза; DN – максимальная доза (105 м.к.).

Итоги титрования средней летальной дозы представлены в табл. 6 и 7 и в сводной табл. 8.

Мыши всех испытанных линий оказались чувствительны к использованному высоковирулентному штамму чумного микроба, однако величина LD_{50} для гибридных мышей была на порядок меньше. Отличия статистически достоверны. Несколько большей оказалась величина LD_{50} для мышей линии VALB/c.

Патоморфологическая картина у животных-биомodelей

Патанатомическая картина была практически одинакова у всех павших мышей, независимо от принадлежности к линии, и такой же, как у нелинейных мышей, и типичной для чумной инфекции у этих грызунов. Именно у мышей, павших на 3-4-е сутки, обнаружили в месте введения гиперемию подкожной клетчатки и кровоизлияния, сильно увеличенный региональный лимфоузел, увеличенную печень, суховатую на разрезе, сильно увеличенную полнокровную селезёнку, гиперемированные лёгкие с очагами геморрагий. У павших на 6-е сутки и позже зарегистрированы дополнительные изменения в виде появления в паренхиме селезёнки некротических «просяных» зёрен. Особенностью мышей F1(CBA×B6) и CBA/2 было наличие у павших животных серозной жидкости в брюшинной полости.

От всех павших мышей из всех органов выделены культуры возбудителя чумы инфицирующего штамма, что свидетельствует об интенсивной септицемии. Средняя продолжительность жизни павших животных всех генотипов, за исключением VALB/c, была несколько больше при

заражении малыми дозами. Резких отклонений от показателей, полученных в контроле, выявлено не было.

Летальный эффект чумного микроба без учёта инфицирующей дозы использованного штамма был наименьшим в отношении гибридов F1(B6×DBA/2). Для мышей F1(CBA×B6) и VALB/c он казался лишь несколько ниже контрольного.

Литература

1. Домарадский И.В. Чума, М.: Медицина, 1998.
2. Зюзина В., Демидова Г., Плещитная А. Реализация токсических свойств капсульным веществом *Yersinia pestis*. *Материалы 7-го съезда Всерос. о-ва эпидемиол., микробиол., паразитол. М., 1997, с. 293-294.*
3. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: Изд. ВПК, 2004.
4. Наумов А.В., Кузьмиченко И.А., Тарасенко Т.И. Биохимические аспекты патогенности возбудителя чумы. *Мед. паразитол.*, № 4, 1995, с. 17-22.
5. Проценко О.А., Анисимов П.И., Можаров О.Т. и др. Выявление и характеристика плазмид *Yersinia pestis*, детерминирующих синтез пептидина 1, фракции 1 и «мышинного» токсина. *Генетика*. 1983, т. 19, с. 1081-1090.
6. Bennet L., Tornabene T. Characterization of the antigenic subunits of envelope protein of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 1974, v. 177, 48-55.
7. Giardi J., McGhee J., Keith M. Summary and recommendations for future research. *In.: Genetically engineered vaccines. N.Y.- London: Plenum Press, 1992, p. 301-314.*
8. Holmstrom A. Identification and characterization of novel virulence determinant of *Yersinia pseudotuberculosis*: a possible role for YorK in regulating translocation. *Lisentiate thesis. Ulmea, 1995.*
9. Hurtrel B.J., Alonso M., Lagrange P., Hutrel M. Delayed-type hypersensitivity and acquired resistance to plague in mice immunized with killed *Yersinia pestis* and immunoregulators. *Immunology*, 1981, v. 44, 297-304.

10. Leary S., Williamson E., Griffith K. et al. Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects against plague. *Infect. and Immun.*, 1995, v. 63, 2854-2858.
11. Nakajama R., Motin V., Brubaker R. Suppression of cytokines in mice by protein A-, V-antigen fusion peptide and restoration of synthesis by active immunization. *Infect. and Immun.*, 1995, v. 63, 3021-3029.

NEW BIOMODELS FOR ESTIMATION OF HIGH VIRULENT STRAIN OF YERSINIA PESTIS PLAGUE

V.N. Karkischenko, E.V. Braitseva

*Institute of New Technologies of RAMS
Research Center for Biomedical Technologies of RAMS*

BALB/c, C57BL/6, CBA/Lac and DBA/2 mice, F1(CBAx C57BL/6) and F1(C57BL/6xDBA/2) hybrids were examined for sensitiveness to the pathogenic organism of plague (strain *Y. pestis 231*). The sensitiveness of nonlinear outbred mice was lesser than that of hybrid mice. At infection of small doses, the average length of life of died mice of all strains, except BALB/c, was longer. Mice of all strains were sensitive to the high virulent strain of plague microbe, but the LD₅₀ value for the hybrid mice was one order lower, and the LD₅₀ value for BALB/c was higher. This difference is statistically reliable.

Key words: plague, *Y. pestis 231* strain, virulent, hybrids.

Особенности фармакокинетики распределения актопротекторов бромантана и хлодантана у крыс

В.В. Хоронько, Ю.С. Макляков, С.А. Сергеева, А.В. Сафроненко

*Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону
НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва*

Исследовалась фармакокинетика распределения двух актопротекторов, производных адамантана: бромантана и хлодантана в тканях нелинейных крыс. По химической структуре бромантан является N-(2-адамантил)-N-(пара-бромфенил)амином, а хлодантан N-(2-адамантил)-N-(пара-хлорбензоил)амином. Установлено, что существуют три вида тканей, характеризующихся различными скоростями обмена бромантана с плазмой крови: первая — ткани, быстро приходящие в равновесие с плазмой крови (мозг, печень, селезенка, семенники); вторая — ткани, для которых характерна средняя скорость переноса (почки); третья — ткани, медленно приходящие в равновесие с плазмой крови (легкие, скелетные мышцы, жировая ткань). Также существуют два вида тканей, характеризующихся различными скоростями обмена хлодантана с плазмой крови: первая — ткани, быстро приходящие в равновесие с плазмой крови (мозг, печень, селезенка, семенники, почки легкие, скелетные мышцы); вторая — ткани, медленно приходящие в равновесие с плазмой крови (жировая ткань).

Ключевые слова: актопротектор, бромантан, хлодантан, ФК-распределения препаратов.

Цель фармакокинетических исследований лекарственных препаратов заключается в повышении эффективности их использования в клинической практике. Основные направления современной фармакокинетики включают в себя изучение и анализ скоростей и интенсивностей процессов всасывания, распределения по органам и тканям, направленность и количественную оценку процессов биотрансформации, путей и скорости выведения лекарственных препаратов. В последние годы фармакокинетические параметры приобретают решающее значение при создании, испытании и разработке оптимальных режимов фармакотерапии лекарственными препаратами. Важные прикладные аспекты фармакокинетики лекарственных препаратов могут решаться только в рамках современных мультидисциплинарных исследований, которые должны учитывать взаимосвязи фармакокинетики и динамики развития фармакологических эффектов [6]. Актуальны поиск и разработка лекарствен-

ных препаратов, повышающих функциональное состояние организма и работоспособность человека при воздействии экстремальных факторов [1, 7]. В НИИ фармакологии РАМН разрабатываются препараты с актопротекторным и адаптогенным типом действия, обладающие достаточно высоким спектром воздействий, что позволяет использовать их в качестве медицинских средств защиты в чрезвычайных ситуациях. Среди них важное место занимают производные адамантана.

В данной работе исследовались два производных адамантана: актопротектор бромантан, и адаптоген экстренного типа действия — хлодантан [3]. По химической структуре бромантан является N-(2-адамантил)-N-(пара-бромфенил)амином — принципиально новым по своему спектру действия актопротектором, а также перспективным нейроиммунomodулятором [3, 4, 8]. Хлодантан по химической структуре является N-(2-адамантил)-N-(пара-хлорбензоил)амином (АДК-910). Спектр адап-

тогенного действия хлодантана и бромантана идентичен, однако, отличается по выраженности отдельных элементов.

Большей адаптогенной активностью обладает хлодантан. В частности, он обладает более выраженным иммуностимулирующим действием [4]. Принципиально эти соединения отличаются по нейрорепсихотропной активности, не выраженной у хлодантана и имеющей отчетливый депримирующий характер у бромантана [5].

Биомодели и методы

Фармакокинетические исследования были выполнены на 150 половозрелых конвенциональных нелинейных крысах-самцах массой 200–250 г, возраста 6–9 месяцев [9]. Животные содержались в условиях вивария при температуре +20 °С 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.

Для изучения особенностей фармакокинетики препараты вводили по следующей схеме:

пути введения бромантана:

- перорально (зондом) в виде 2%-ного раствора в полиэтиленгликоле–400 в дозе 100 мг/кг;
- внутривенно (в хвостовую вену) в виде 2%-ного раствора в полиэтиленгликоле–400 в дозе 10 мг/кг;

пути введения хлодантана:

- перорально (зондом) в виде водного раствора в дозе 100 мг/кг.

При изучении распределения при однократном пероральном введении концентрацию хлодантана и бромантана определяли в органах и тканях крыс через 1 час

после однократного введения и через 0,5, 1, 2, 4, 5, 6, 8 и 24 часа после последнего введения (при курсовом пероральном режиме применения).

Контрольным животным (25 экспериментальных крыс) вводился раствор полиэтиленгликоля–400 в аналогичном объеме.

Изучали распределение соединений в плазме крови и в тканях крыс. Взятие проб производили через 5, 30 минут и через 1, 2, 4, 6, 8 и 24 часа после введения бромантана и хлодантана через 2, 5, 30 минут и через 1, 2 и 4 часа после инъекции раствора бромантана; и через 5 минут в контрольной группе животных. Для проведения фармакокинетических исследований ткани измельчались и гомогенизировались до превращения в 20% водный гомогенат.

Для количественного определения соединений использовался метод газовой хроматографии на газовом хроматографе модели 3700 с электронно-захватным детектором, содержащим ⁶³Ni-β-ионизационный источник и состоящим из инжектора, насоса высокого давления, стеклянной колонки и УФ-детектора. Для хроматографического анализа субстанций бромантана и хлодантана использовалась стеклянная колонка длиной 2 м, с внутренним диаметром 2,5 мм. В качестве сорбента использовался Chromaton N-Super с 3%-ной жидкой фазой SE-30.

Данные регистрировались на самописце TZ 4620 (Чехия) со скоростью протяжки бумаги 0,15 см/мин.

Результаты

Полученные экспериментальные данные анализировались модельно-независимым методом. Площадь под фармакокинетической кривой (AUC) рассчитана с помощью смешанного линейно-логарифмического метода статистических моментов [2].

Оценка фармакокинетики препаратов проводилась на основе моделирования (с помощью 2-камерной фармакокинети-

ческой модели с учетом всасывания из места введения), которое позволило не только установить оптимальные дозы и интервалы, но и выявить степень накопления препаратов в плазме крови и других органах.

ФК-параметры после внесосудистого введения описывались с помощью модели, состоящей из трех компарментов.

При использовании подобной модели расчет параметров проводился начиная от более поздних фаз по направлению к более ранним. Так, для расчета параметров терминальной фазы элиминации (бета-фазы) сначала применялся метод линейной регрессии (как и в случае применения метода последовательного логарифмирования), а затем для расчета параметров фазы распределения (альфа-фазы) и параметров фазы всасывания использовались численные методы нахождения этих величин [2].

При оценке ФК-распределения препаратов в различные ткани организма необходимо оценивать:

- ✓ степень и скорость проникновения препарата в кровь и ткани ($F\%$, k_{12} , k_{13});
- ✓ время (t_{\max}) и значение максимальной концентрации препарата в ткани (C_{\max});
- ✓ длительность пребывания препарата в той или иной ткани (MRT);
- ✓ скорость удаления препарата из соответствующей ткани ($t_{1/2}$).

Проведенная оценка фармакокинетики распределения бромантана и хлодантана показала, что из плазмы крови он активно переносится в различные ткани, такие, как легкие, почки, печень, селезенка, мозг, скелетные мышцы, жировая ткань и семенники (табл. 1 и 2).

Считается, что особенности биологического действия производных адамантана во многом связаны с наличием объемного и высоколипофильного каркасного ядра. Липофильность/гидрофобность адамантанового ядра определяет возможности непосредственного взаимодействия

молекул его замещенных производных с биологическими мембранами, содержащими липидный слой, а также с гидрофобными фрагментами белков, в том числе входящими в структуру рецепторных образований. Использование высокой липофильности и большого объема адамантального радикала для модификации эффектов и фармакологических свойств уже известных соединений не исчерпывает возможностей данного ряда каркасных углеводов. На основе адамантана представляется возможным синтезировать жестко конформационно закрепленные структуры известных биологически активных веществ или их фрагментов, которые могут использоваться при проведении научных исследований. Производные адамантана используются при синтезе биологически активных веществ, например, пептидов с целью защиты реакционноспособных групп на определенных стадиях процесса [10]. Адамантаны находят применение в лабораторной практике для быстрого и высокоточного определения щелочной фосфатазы, РНК и ДНК, различных продуктов полимеризации, трансферрина и антител к ВИЧ-1 и других биогенных субстратов [11-13].

В результате проведенного исследования установлено, что существуют три вида тканей, характеризующихся различными скоростями обмена бромантана с плазмой крови: первая — ткани, быстро приходящие в равновесие с плазмой крови (мозг, печень, селезенка, семенники); вторая — ткани, для которых характерна средняя скорость переноса (почки); третья — ткани, медленно приходящие в равновесие с плазмой крови (легкие, скелетные мышцы, жировая ткань). Также существуют два вида тканей, характеризующихся различными скоростями обмена хлодантана с плазмой крови: первая — ткани, быстро приходящие в равновесие с плазмой крови (мозг, печень, селезенка, семенники, почки легкие, скелетные

Таблица 1

Особенности распределения бромантана в ткани

Биосреда	F(%)	k_{13}	$t_{1/2}$	t_{max}	C_{max}
Плазма крови (по сравнению с в/в введением)	89	2,6677	0,2598	0,5	326,7
Легкие	886	0,1136	6,1	48	1497,0
Почки	984	0,2016	3,44	24	1875,1
Печень	157,7	0,3577	24,393	0,67	1984,2
Мозг	250	1,795	91,556	1,0	1191,8
Скелетные мышцы	810	0,1136	6,1	48	1369,5
Жировая ткань	28 960	0,0232	29,9	72	38 980,8
Семенники	902	0,2016	3,44	24	1717,33

Таблица 2

Особенности распределения хлодантана в ткани

Биосреда	F(%)	k_{13}	$t_{1/2}$	t_{max}	C_{max}
Плазма крови (по сравнению с в/в введением)	88	0,0055	125,53	1,0	594,7
Легкие	384	0,0039	178,8	1,0	1659,9
Почки	313	0,02	34,07	1,0	6213,4
Печень	73	0,046	15,16	1,0	6893,0
Мозг	93	0,02	35,06	1,0	3065,0
Скелетные мышцы	5945,5	0,0016	426,8	1,0	11 383,5
Жировая ткань	3780	0,083	8,32	24,0	8121,1
Семенники	437	0,0077	89,9	1,0	4589,5

F (%) — биодоступность; k_{13} — скорость распределения в ткань (час⁻¹); $t_{1/2}$ — терминальный период полувыведения (час); t_{max} — время достижения максимальной концентрации (час); C_{max} — величина максимальной концентрации (нг/г)

мышцы); вторая — ткани, медленно приходящие в равновесие с плазмой крови (жировая ткань). Предложенные фармакокинетические модели позволяют прогнозировать степень насыщения тканей и скорость проникновения препарата в них, а также скорость удаления препарата из этих тканей, что дает возможность оценить степень кумуляции препаратов в случае многократных приемов препарата.

Литература

1. Бобков Ю.Г., В.М. Виноградов, В.Ф. Катков. Фармакологическая коррекция утомления. М., 1984.
2. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика. Ростов-н/Д, Феникс, 2001.
3. Морозов И.С., Арцимович Н.Г., Климова Н.И. и др. 2-(пара-бромбензоил) или 2-(пара-хлорбензоил) аминаоадамантаны, повышающие резистентность организма к действию экстремальных факторов среды обитания и обладающие иммуностимулирующей активностью. Пат. РФ №1646256, 1991, Бюл. изобрет. 1996, № 16.

4. Морозов И.С., Барчуков В.Г., Быков Н.П., и др. Необходимость и возможности фармакологической коррекции расстройств профессиональной работоспособности в экстремальных условиях. *Тезисы 1-го съезда Рос. научн. общ. фармакологов, 9-13 октября 1995 г., Волгоград. Фундаментальные исследования как основа создания лекарственных средств.* М., 1995.
5. Морозов И.С., Климова Н.В., Авдюнина Н.И. и др. Фармакология нового психостимулятора броматана. *Тезисы VII Научно-практической конференции стран СНГ «Перспективы развития химии и практического применения каскадных соединений», 5-7 сентября 1995 г., с. 166-167.*
6. Сергеева С.А., Красных Л.М. Фармакокинетика адамантанов. *Экспериментальная и клиническая фармакология, 1994, № 3, с. 69-74.*
7. Сергеева С.А., Хоронько В.В., Красных Л.М. и др. Анализ взаимосвязей между фармакокинетикой и динамикой нейрохимических эффектов броматана. *Тезисы 1-го съезда Рос. научн. общ. фармакологов, 9-13 октября 1995 г. Фундаментальные исследования как основа создания лекарственных средств, 1995.*
8. Фадеева Т.А., Галушина Т.С., Арцемович Н.Г. Роль броматана в регуляции иммунитета. *Тезисы VII Научно-практической конференции стран СНГ «Перспективы развития химии и практического применения каскадных соединений», 5-7 сентября 1995 г., с. 24-25.*
9. Фирсов А.А., Жердев В.П., Барманова Е.Ю. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению фармакокинетики лекарственных средств. М., 2000.
10. Igushi S., Tsuda Y., Okada Y. Amino acids and peptides. XXV. Application of newly developed beta-1 and beta-2-adamantylaspartates to peptide synthesis by solid phase and conventional solution methods. *Chem. Pharm. Bull., Tokio, 1989, v. 37, No. 8, 2209-2211.*
11. Bronstein I., Voyta J.C., Murphy O.J. et al. Improved chemiluminescent western blotting procedure. *Biotechniques, 1992, v. 12, No. 5, 748-753.*
12. Chapple I.L., Matthews J.B., Thorpe J.N. et al. A new ultrasensitive chemiluminescent assay for site-specific quantification of alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid. *J. Periodontal Res., 1993, v. 28, No. 4, 266-273.*
13. Holmstorm K., Rossen L., Rasmussen D.F. A highly sensitive and fast nonradioactive method for deflection of polymerase chain reaction products. *Anal. Biochem., 1993, v. 209, No. 2, 278-283.*

PHARMACOKINETICS OF BROMANTANE AND CHLORDANTANE ACTOPROTECTORS DISTRIBUTION IN RATS

V.V. Khoronko, Yu.S. Makljakov, S.A. Sergeeva, A.V. Safronenko

Rostov State Medical University, Rostov-on-Don

V.Zakusov Reserach Institute of Pharmacology RAMN, Moscow

Pharmacokinetic peculiarities of bromantane and chlodantane at per oral and intravenous introduction to rats are studied. Quantitative analysis of bromantane and chlodantane distribution in tissues and blood is carried out with a gas chromatography method. Statistical data are analyzed with a model-independent method. It can be concluded that pharmacokinetics of adamantane derivatives, bromantane and chlodantane is characterized by intensive penetration of those drugs in organs and tissues of experimental animals as well as by high cumulative ability compared to its relatively low content in blood.

Key words: pharmacokinetic, bromantane, chlodantane, gas chromatography.

Изменчивость предпочтения алкоголя у лабораторных мышей в зависимости от генотипа и среды

Е.Ф. Шмидт

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Изучали изменчивость предпочтения алкоголя у лабораторных мышей 15 инбредных линий в зависимости от генотипа и условий содержания. Использовали тест свободного предпочтения 8%-ного этанола. Продолжительность каждой серии опытов составляла 6 недель. Мыши СС57W были «высокопьющими» (9,64 г абсолютно этанола на 1 кг массы тела за 24 часа), также как С57BL/6 (8,06 г/кг) и СС57BR (7,60 г/кг). Мыши DBA/2 (0,23 г/кг) и 101/H (0,29 г/кг) были «низкопьющими». Получение предпочитаемого корма уменьшало склонность к алкоголю у животных всех испытанных генотипов. Наличие в клетке гнездостроительного материала уменьшало потребление этанола у мышей одних линий (С57BR с 7,60 до 3,30 г/кг; TPS с 2,03 до 0,46 г/кг), увеличивало у других (С3НА с 1,00 до 5,25 г/кг; 101/H с 0,29 до 1,65 г/кг) и не оказывало эффекта на третьих (СВА/Lac, WR, BALB/c).

Ключевые слова: мыши, алкоголь, генотип, окружающая среда.

Введение

Исследование изменчивости предпочтения этанола лабораторными животными (в частности, мышами инбредных линий) представляет значительный интерес в связи с изучением биологических основ формирования алкогольной мотивации и алкогольной зависимости, а также для разработки и испытания медицинских препаратов, снижающих влечение к алкоголю.

Для определения склонности к алкоголю обычно используют один из двух поведенческих тестов: потребления или предпочтения. В первом случае животных лишают воды и предоставляют им для питья этанол определённой концентрации, во втором — как этанол, так и воду. Первый тест не вполне корректен, поскольку потребление алкоголя является вынужденным, поэтому для модельных экспериментов желательно использовать тест предпочтения.

Среди эндогенных факторов, обуславливающих отношение лабораторных животных к этанолу, важнейшими являются генетические, половые и возрастные [1,

11, 12]. Существенную роль играет и микрофлора пищеварительного тракта, состав которой в свою очередь зависит от указанных особенностей. Действию экзогенных (средовых) факторов на предпочтение алкоголя также посвящено немало работ, рассматривающих влияние как абиотических (температура, шум), так и биотических (калорийность и состав диет), а также этологических воздействий (изоляция, стресс) [2]. Изучение эффектов экзогенных влияний может быть вполне корректным только при условии использования в эксперименте животных определённых генотипов, так как на одно и то же средовое воздействие различные в генетическом отношении особи реагируют по-разному, причём, нередко, противоположным образом.

Цель данной работы заключалась в оценке изменчивости генетически детерминированного уровня потребления алкоголя у лабораторных мышей инбредных линий в условиях свободного доступа к воде и этанолу (тест предпочтения), а также влияния на него некоторых внутренних и средовых факторов.

Материалы и методы

Исследование проводилось на половозрелых самках в возрасте 2–3 месяцев из коллекционного фонда лабораторных мышей РАМН, содержащихся в конвенциональных условиях, группами по 5 голов в клетках размером 20 × 15 × 13 см фирмы ВЕ-ЛАЗ. В качестве подстилочного материала применялись древесные опилки. Животные получали полнорационный гранулированный корм в избыточном (неограниченном) количестве. Мышей содержали группами, чтобы исключить воздействие на них изоляционного стресса. По этой причине для опыта были выбраны самки, так как совместное содержание взрослых самцов могло спровоцировать проявления агрессивности. Каждая клетка была оборудована двумя поилками, ёмкостью 300 мл, одну из которых заполняли 8%-ным этиловым спиртом (весовые проценты), а другую — кипячёной водой, подкисленной соляной кислотой (в соответствии с рекомендациями ICLAS). Животные имели постоянный свободный доступ к обеим поилкам. Для контроля механического вытекания жидкостей от случайных сотрясений служили пустые клетки, снабжённые такими же ёмкостями.

Продолжительность каждой серии опытов составляла 6 недель. Взвешивания мышей, замеры объёмов жидкостей и заполнение бутылок производили еженедельно, при этом поилки с водой и спиртом меняли местами, так как по некоторым данным у лабораторных грызунов может вырабатываться условный рефлекс на положение сосуда с предпочитаемой жидкостью. Эксперименты выполняли последовательно в течение трёх лет для уменьшения влияния годовых и сезонных колебаний.

Оценку результатов проводили по двум показателям: потреблению алкоголя в граммах 100%-ного этанола на 1 кг массы тела за одни сутки, и по доле 8%-ного этанола от общего объёма потреблённой жидкости (в процентах).

Результаты

Генетическая изменчивость потребления и предпочтения алкоголя (в тесте предпочтения) у мышей 15 инбредных линий с учётом генотипов окраски шерсти и гаплотипа H-2 показана в табл. 1.

Свободное потребление алкоголя (в пересчёте на 100%-ный этанол) на единицу массы тела за одни сутки колеблется от 0,23 г/кг у мышей DBA/2 до 9,63 г/кг у CC57W, т. е. размах фенотипической изменчивости по данному признаку составляет 9,40 г/кг. Наибольшей внутрилинейной вариабельностью отличаются мыши C57BL/6 ($\sigma = 1,52$) и CC57W ($\sigma = 1,34$), наименьшей — C3HA ($\sigma = 0,01$). Таким образом, межлинейная изменчивость потребления этанола ($\sigma = 2,92$) почти в два раза превышает внутрилинейную. Животных исследованных инбредных линий можно разделить на три условные группы: «сильнопьющие» (потребляющие свыше 6,4 г/кг этанола в сутки), «умереннопьющие» (потребляющие до 6,4 г/кг этанола) и «малопьющие» (потребляющие не более 3,2 г/кг этанола). Границы классов были определены делением уровня потребления этанола у максимально «пьющей» линии на три. Среди «сильно»- и «умереннопьющих» мышей оказалось достоверно больше несущих гаплотип *b*, чем среди «малопьющих» (метод χ^2 , $p < 0,01$). Не обнаружено корреляции между потреблением этанола и генами окраски шерсти, хотя аллель *a* (неагути) чаще встречался у «сильно»- и «умереннопьющих» линий, но разность недостоверна ($t_d = 3,6 < t_{st} = 3,8$; $p > 0,05$).

Межлинейная изменчивость предпочтения алкоголя воде (по доле, которую составлял 8%-ный этанол от общего объёма потреблённой жидкости, выраженной в процентах) варьировала от 2,7 у DBA/2 до 95,5 у CC57W. Наименьшая вариабельность по данному признаку отмечена у мышей I/St ($\sigma = 1,3$), наибольшая — у WR ($\sigma = 21,3$),

Таблица 1

Вариабельность потребления и предпочтения алкоголя мышами различных генотипов в тесте предпочтения (N = 52 группы)

Линия	Количество групп	Гены окраски шерсти	Гаплотип H-2	Потребление (грамм 100%-ного этанола на 1кг массы тела за 1 сутки)	Предпочтение (доля 8%-ного этанола от общего объема выпитой жидкости в %)
CC57W	2	a, b, c	b	9,63 ± 0,94	95,5 ± 2,4
C57BL/6	3	a	b	8,06 ± 1,03	94,0 ± 1,4
CC57BR	2	a, b	b	7,60 ± 0,57	89,5 ± 2,4
BRSUNT	3	a, b	j	5,00 ± 0,21	53,3 ± 5,6
C57L	4	a, b, d, ln	b	4,69 ± 0,43	48,3 ± 6,1
CBA/Lac	6	+	k	4,30 ± 0,51	64,5 ± 6,6
WR	6	a	b	3,75 ± 0,75	50,5 ± 8,7
C3H/Sn	2	+	k	2,73 ± 0,40	37,0 ± 5,0
BALB/c	6	b, c	d	2,47 ± 0,40	34,2 ± 6,2
TPS	4	a	k	2,03 ± 0,27	25,0 ± 5,7
SWR	2	c	q	1,83 ± 0,33	20,0 ± 2,0
C3HA	2	+	k	1,00 ± 0,05	13,0 ± 1,0
I/St	4	a, b, d, p, s	j	0,92 ± 0,08	10,5 ± 0,6
101/H	3	A ^w	k	0,29 ± 0,09	2,7 ± 0,9
DBA/2	3	a, b, d	d	0,23 ± 0,12	2,7 ± 1,4

межлинейная изменчивость несколько выше ($\sigma = 32,05$).

Оба показателя (потребления и предпочтения алкоголя) у «сильно»- и «мало»-пьющих линий изменялись прямо пропорционально, тогда как «умереннопьющие» линии по потреблению этанола на 1 кг массы тела располагались в порядке: BRSUNT > C57L > CBA/Lac > WR, а по его предпочтению — CBA/Lac > BRSUNT > WR > C57L.

Доза алкоголя, потребляемого лабораторными мышами в зависимости от продолжительности контакта с ним. Животные разных генотипов отличались по динамике потребления этанола (см. рисунок).

Потребление алкоголя на протяжении эксперимента повышалось у самок четырех из 15 испытанных линий (BALB/c, CBA/Lac, CC57BR, C3HA), снижалась также у четырех (I/St, CC57W, C3H/Sn, BRSUNT) и колебалась незначительно у шести линий (DBA/2, C57BL/6, TPS, WR, 101/H, C57L). Примечательно, что у мы-

шей линии SWR при почти одинаковом потреблении алкоголя в первую и последнюю неделю эксперимента в середине опыта (третья неделя) наблюдался резкий скачок этого показателя в сторону увеличения.

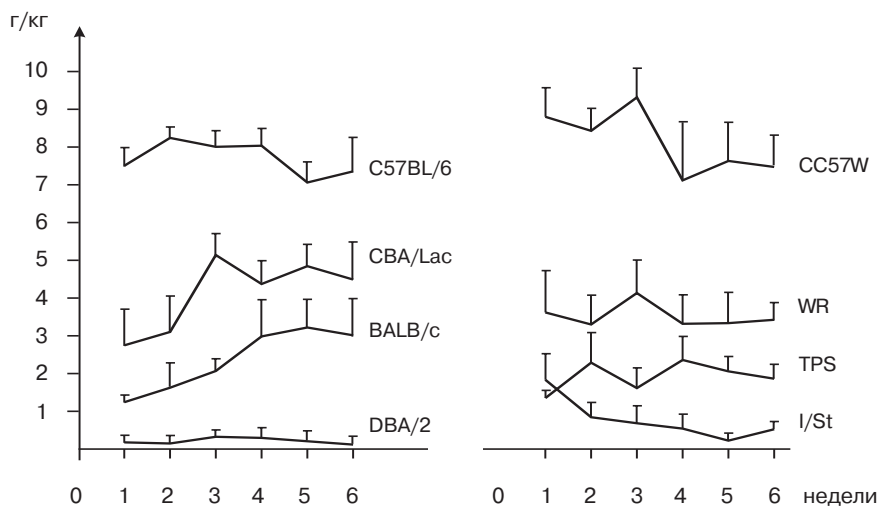
Влияние предпочитаемого корма на потребление этанола. Животным 5 инбредных линий, помимо физиологически сбалансированных гранул, предоставляли излюбленный ими корм — овсяную кашу. Самки всех испытанных линий, получавшие предпочитаемый корм, потребляли меньше этанола, чем мыши, содержащиеся на стандартной диете (табл. 2). Размах изменчивости в опыте составлял 0,44–3,28 г/кг за 1 сутки, а в контроле 0,97–8,32 г/кг ($\sigma = 1,46$ и 3,24 соответственно).

Влияние наличия или отсутствия гнездостроительного материала на свободное потребление алкоголя. В клетки, где содержались экспериментальные группы животных, помимо обычного подстилочного материала (древесных опилок), помещали вискозную вату, из которой мыши могли

строить гнёзда, тогда как в клетках с контрольными группами имелись только опилки. Из табл. 3 видно, что в присутствии гнездостроительного материала потребление этанола уменьшалось у самок 5 инбредных линий из 10: CC57W, C57BL/6, CC57BR, C57L и TPS, причём у CC57BR и TPS — статистически достоверно.

За исключением TPS, это мыши «сильнопьющих» линий, родственных по происхождению. Самки двух «малопьющих»

линий 101/H и СЗНА, напротив, увеличивали потребление этанола при наличии ватки в клетке (хотя разность значений статистически недостоверна, вероятно, из-за размеров выборки). У мышей трех «умереннопьющих», неродственных друг другу линий CBA/Lac, WR и BALB/c помещение в клетку синтетической ваты не влияло на потребление алкоголя. Изменчивость по данному признаку была несколько ниже при наличии в клетке вис-



«Добровольное» потребление 100%-ного этанола лабораторными мышами инбредных линий (грамм на 1 кг массы тела за сутки)

Таблица 2

Изменчивость потребления алкоголя в зависимости от предпочитаемых кормов у лабораторных мышей

Линия	Число опытов	Потребление алкоголя (в граммах 100%-ного этанола на 1 кг массы тела)		Порог вероятности ошибочных прогнозов
		Полнорационные гранулы + предпочитаемый корм	Полнорационные гранулы	
CC57W	8	3,28 ± 0,94	8,34 ± 0,87	p < 0,001 p < 0,01 p < 0,05
C57BL/6	8	4,23 ± 0,75	7,82 ± 0,43	
CBA/Lac	8	2,82 ± 0,01	4,31 ± 0,51	
BALB/c	9	1,74 ± 0,88	2,47 ± 0,40	
101/H	8	0,44 ± 0,11	0,97 ± 0,55	

Таблица 3

Изменчивость потребления алкоголя в зависимости от гнездостроительного материала у лабораторных мышей

Линия	Число опытов	Потребление алкоголя (в граммах 100%-ного этанола на 1 кг массы тела)		Порог вероятности ошибочных прогнозов
		Подстилочный + гнездостроительный материал	Подстилочный материал	
C57BL/6	6	7,54 ± 0,14	8,06 ± 1,03	p < 0,05
CC57W	4	7,05 ± 0,58	9,63 ± 0,94	
C3HA	4	5,25 ± 1,19	1,00 ± 0,05	
C57L	4	4,31 ± 0,90	5,07 ± 0,20	
CBA/Lac	6	4,17 ± 0,26	4,44 ± 1,00	
WR	6	3,82 ± 0,67	3,67 ± 1,55	
CC57BR	5	3,30 ± 1,16	7,60 ± 0,57	
BALB/c	6	2,79 ± 0,20	2,14 ± 0,80	
101/H	6	1,65 ± 1,00	0,29 ± 0,09	p < 0,01
TPS	8	0,46 ± 0,08	2,03 ± 0,27	

козной ваты, чем в контроле: в первом случае размах изменчивости составлял 1,65–7,05 г/кг, ($\sigma = 2,22$), во втором 0,29–9,63 г/кг, ($\sigma = 3,18$).

Обсуждение результатов

Связь между генотипом лабораторных мышей и склонностью к добровольному потреблению этанола установлена давно [9]. Полигенная природа алкоголизма у человека и животных подтверждается современными исследованиями по картированию генов, детерминирующих определённые аспекты отношения к алкоголю. Такие гены обнаружены на всех хромосомах мыши, кроме 2, 5, 12, 13 и X-й хромосомы [15]. Особенно сильное влияние на предпочтение этанола оказывают гены, расположенные на 15-й хромосоме мыши [8]. Наши данные согласуются с мнением о существенной роли главного локуса гистосовместимости мышей (или тесно сцепленных с ним генов) в предрасположенности к потреблению алкоголя [4].

Оценка отношения животных к алко-

голю по доле этанола в общем объёме выпитой ими жидкости оказалась недостаточно информативной (см. табл. 1). Причина этого, вероятно, заключается в том, что мыши разных инбредных линий поглощают различное количество жидкости на единицу массы тела. Так, например, самки линии C57L выпивали за сутки $130,00 \pm 6,36$ мг/кг жидкости, а самки CBA/Lac — $87,92 \pm 2,92$ мг/кг (разность достоверна при $p < 0,001$).

Анализ кривых потребления алкоголя от продолжительности контакта с ним показал, что данная функция не является линейной и, следовательно, процесс привыкания к этанолу достаточно сложен. Это подтверждается множеством современных работ, описывающих биохимические механизмы формирования алкогольной зависимости. Однако единства мнений по данному вопросу нет, так одни исследователи отводят большую роль метаболизму триптофана и серотонина в развитии пристрастия к алкоголю [6], тогда как другие влияния этих веществ не обнаруживают [3]. Есть основания, позволяющие пред-

положить, что значительный вклад в предрасположенность к потреблению этанола может вызывать генетический полиморфизм каппа-опиоидных рецепторов [14].

Интересно, что дополнительное предоставление экспериментальным животным «лакомства» в виде предпочитаемой ими овсяной каши, снижало потребление алкоголя у мышей всех испытанных линий. Причём снижение потребления этанола в опыте прямо коррелировало с уровнем его потребления животными данной линии в контроле (см. пороги вероятностей ошибочных прогнозов). Поскольку мышам из контрольных групп полноценные в пищевом отношении гранулы предоставлялись в неограниченном количестве, такой эффект нельзя объяснить исключительно энергетическими или физиологическими причинами. Вероятно, возможность потреблять предпочитаемый корм психологически отвлекает животных от этанола, препятствуя выработке алкогольной мотивации, причём тем сильнее, чем более выражена у них склонность к приёму алкоголя. Это означает, что замена отдельных ингредиентов в рационе другими, физиологически равноценными, может стать причиной искажения результатов эксперимента.

Наиболее парадоксальными оказались результаты экспериментов с предоставлением лабораторным мышам гнездостроительного материала. Если бы животные всех или большинства генотипов ответили на него снижением потребления алкоголя, это можно было бы объяснить уменьшением теплоотдачи за счёт термосберегающих свойств ваты. Однако, как уже отмечалось, мыши разных инбредных линий продемонстрировали весь спектр возможных реакций — от отсутствия какой-либо реакции до чётко выраженного и статистически достоверного «плюс»- и «минус»-эффекта. Можно предположить, что для мышей одних генотипов отсутствие убежища или невозможность реализовать гнездостроительный инстинкт является стрессом, вызывающим

усиленное потребление этанола [13], тогда как для животных других линий более значительным стрессом оказывается появление в клетке незнакомого предмета, что также приводит к возрастанию алкогольной мотивации [5].

Перспективы изучения основ формирования алкогольной зависимости и алкогольной мотивации у человека и животных в дальнейшем, по-видимому, будут связаны с широким использованием в модельных экспериментах трансгенных и нокаутных мышей [7].

Выводы

1. Изменчивость свободного потребления алкоголя определяется в первую очередь генотипом животного, поскольку генетически детерминированная межлинейная вариабельность по данному признаку превышает внутрелинейную, обусловленную неконтролируемыми флуктуациями среды и физиологического состояния организма.
2. Прослеживается связь между высоким потреблением этанола и гаплотипом *b* у лабораторных мышей.
3. Уровень потребления алкоголя мышами зависит от продолжительности контакта с ним, а динамика этого показателя во времени является специфической для каждой инбредной линии.
4. Предоставление предпочитаемого корма уменьшает влечение к этанолу у животных всех испытанных генотипов.
5. Помещение в клетку гнездостроительного материала снижает потребление спирта у мышей одних линий, повышает его у других и не оказывает влияния на третьих.
6. Для моделирования развития алкоголизма у человека, с учётом социальных аспектов, целесообразно использовать мышей линий CC57BR, TPS и, возможно, C3HA, так как количество добровольно потребляемого ими этанола напрямую зависит от неблагоприятных условий содержания.

Литература

1. Андропова Л.М., Барков Н.К. Особенности формирования и течения экспериментального хронического алкоголизма в зависимости от пола. *Фармакол. и токсикол.*, 1979, т. 42, № 1, с. 71-76.
2. Буров Ю.В., Власова Н.В., Родионов А.П. Влияние изоляционного стресса на фармакогенетику этанола в крови крыс. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 1984, № 9, с. 320-321.
3. Каледин В.И., Климова Н.В., Васильев Г.Б., Иванова Е.А., Васильева Е.Д., Ильницкая С.И. Изучение предрасположенности к алкоголизму, активности триптофаноксигеназы и структуры интрона 6 соответствующего гена у мышей линий C57BL/6, CC57BR/Mv и BALB/c. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 2003, т. 136, № 10, с. 435-437.
4. Шошина С.В., Майский А.И. Главная система гистосовместимости мышей (H-2) и реакции организма на этанол. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.*, 1982, т. 94, № 7, с. 55-58.
5. van Abeelen J.H.F. Genetic analysis of behavioural responses to novelty in mice. *Nature*, 1975, v. 254, No. 5497-5, 239-41.
6. Badawy A.A. Tryptophan metabolism in alcoholism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999, 467, 265-74.
7. Bowers B.J. Applications of transgenic and knockout mice in alcohol research. *Alcohol Res. Health*, 2000, 24(3): p. 175-84.
8. Browman K.E., Crabbe J.C. Quantitative trait loci affecting ethanol sensitivity in BXD recombinant inbred mice. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2000, Jan., 24(1), 17-23.
9. Crabbe J.C. Sensitivity to ethanol in inbred mice: genotypic correlations among several behavioural responses. *Behav. Neurosci.*, 1983, 97, 280-89.
10. Deitrich R.A., Bludeau P., Erwin V.G. Phenotypic and genotypic relationships between ethanol tolerance and sensitivity in mice selectively bred initial sensitivity to ethanol (SS and LS) or development of acute tolerance (HAFT and LAFT). *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 2000, May, 24(5), 595-604.
11. Fuller J.L., Collins R.L. Ethanol consumption and preference in mice: a genetic analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1972, v. 197, 42-48.
12. Grieve S.J., Littleton J.M. Age and strain differences in the rate of development of functional tolerance to ethanol by mice. *J. Pharm. and Pharmacol.*, 1979, v. 31, No. 10, 696-700.
13. Heyman G.M. An economic approach to animal models of alcoholism. *Alcohol Res. Health*, 2000, 24(2), 132-39.
14. Vadasz C., Saito M., Gyetvai B. et al. Scanning of five chromosomes for alcohol consumption loci. *Alcohol*, 2000, Aug., 22(1), 25-34.
15. Vadasz C., Saito M., Balla A. et al. Mapping of quantitative trait loci for ethanol preference in quasi-congenic strains. *Alcohol*, 2000, Feb., 20(2), 161-71.

THE VARIABILITY OF ALCOHOL PREFERENCE IN LABORATORY MICE ACCORDING TO THEIR GENOTYPE AND ENVIRONMENT

E.F. Schmidt

Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

The variability of alcohol (8%-ethanol) preference in laboratory mice of 15 inbred strains according to their genotype and environment was studied. It appeared that CC57W mice were "high-drinking" (9.63 g of absolute ethanol per 1 kg of body weight for 24 h), along with C57BL/6 (8.06 g/kg) and CC57BR (7.60 g/kg) mice, whereas DBA/2 (0.23 g/kg) and 101/H (0.29 g/kg) mice were "low-drinking". Preferable food decreased inclination to alcohol in animals of all genotypes tested. The presence of nest-building material in cage decreased ethanol consumption in some groups of mice strains (CC57BR — from 7.60 g/kg to 3.30 g/kg, TPS — from 2.03 g/kg to 0.46 g/kg), or increased it in the other groups (C3HA — from 1.00 g/kg to 5.25 g/kg, 101/H — from 0.29 g/kg to 1.65 g/kg), or had no effect in the rest groups (CBA/Lac, WR, BALB/c).

Key words: mice, alcohol, genotype, environment.

Экспериментальная модель алкогольного опьянения и ее описание в параметрах условно-рефлекторной активности

А.Г. Погорелов, Е.И. Маевский, В.Н. Погорелова, М.Л. Учитель

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пущино

В работе рассматривается экспериментальная модель алкогольного опьянения. Оценку состояния животных при алкогольной интоксикации проводили по изменению параметров условно-рефлекторной активности мышей в крестообразном лабиринте. Данная модель может быть использована при доклиническом тестировании специфической активности антиалкогольных препаратов и алкогольсодержащих напитков.

Ключевые слова: алкогольное опьянение, мыши NMRI, условно-рефлекторная активность, крестообразный лабиринт.

Введение

Свойства водки как пищевого продукта обусловлены многими веществами природного происхождения, растворенными в этиловом спирте. Их присутствие, даже в гомеопатических концентрациях, может значительно изменить физиологическую реакцию на этанол. Под термином «физиологическая реакция» следует понимать спектр ответов организма на алкогольную интоксикацию: от острой летальной токсичности и этанолового наркоза до нарушения условно-рефлекторной активности в состоянии опьянения и изменения органолептических показателей при дегустации [4].

Учитывая социальную остроту проблемы алкоголизма и необходимость поиска способов его коррекции, актуальной представляется разработка методов лабораторного тестирования биологической активности алкогольных напитков [3]. Одновременно при этом решается задача создания новых подходов к доклиническому испытанию специфического действия антиалкогольных препаратов [5]. Поскольку наиболее быстрым и выраженным проявлением алкогольной интоксикации является нарушение условно-рефлекторной активности, целью данной работы было раз-

витие методики, моделирующей состояние опьянения у животных при пероральном способе приема алкоголя.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на конвенциональных мышах (самцах) NMRI в возрасте 2,5 месяцев. Животные содержались в питомнике ИТЭБ РАН по 10 особей в клетке, изготовленной из пластика, и с крышкой из нержавеющей стали. В качестве подстилочного материала использовали свежие древесные опилки из сосны при ежедневной смене подстилки. Условия содержания стандартные: температура в комнате 20 ± 2 °С, гранулированный корм ПК-121-2 (ООО «ИНФОРМКОРМ»), питье *at libitum*. Воду и корм заменяли ежедневно без предварительной их обработки.

За час до начала эксперимента животных лишали пищи при свободном доступе к питью. Для моделирования ситуации алкогольного опьянения использовали 40⁰-ный водный раствор этилового спирта «Экстра», который перорально вводили зондом в желудок мыши. В качестве плацебо использовали физиологический раствор (0,9%-ный NaCl). Для абсолютного контроля брали животных, которым ничего не вводили.

В эксперименте исследовали влияние дозы 3 мл/кг (по этанолу). Объем вводимой пробы 40° алкоголя определяли для каждого животного индивидуально с учетом массы его тела из выражения

$$V = 7,5 m,$$

где: V – объем пробы, мкл; m – масса тела мыши, г.

Через 20 минут после введения алкоголя или плацебо состояние животного оценивали по условно-рефлекторной активности в крестообразном лабиринте. Аппарат состоит из 4 одинаковых тупиковых камер (отсеков), соединенных между собой через такую же пятую центральную камеру. Каждый отсек представляет собой куб с ребром длиной 15 см и отверстием (7×7 см) в стенке для входа со стороны центральной камеры. По дну проведены линии, разъединяющие поле отсека и центральной камеры. Мышь помещается в центральную камеру, после чего начинает исследовать крестообразный лабиринт в течение 4 минут. Заход в тупик считается состоявшимся, если животное переносит все 4 лапы через линию, отделяющую этот отсек от центральной камеры. Оцениваются следу-

ющие параметры поведения: количество посещенных тупиков — уровень поисковой активности; латентный период начала исследования — показатель принятия решения; время нахождения в первом тупике — наличие эмоции страха; время полного обхода лабиринта — способность к пространственной ориентации (элементарная форма рассудочной деятельности); количество возвратов в предыдущий тупик — показатель ошибок краткосрочной памяти; поочередное посещение двух из четырех тупиков — поведенческая стереотипия; количество левых и правых поворотов при переходе из тупика в тупик — асимметрия локомоции; количество стоек — уровень исследовательской активности.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью приложения Excel. Для каждого параметра определяли среднее арифметическое и среднеквадратичную ошибку среднего для группы из 10 мышей.

Результаты

В таблице приведены результаты изучения условно-рефлекторной активности мышей

Параметры поведения в крестообразном лабиринте мышей, на которых не оказывали воздействия (контроль), и через 20 минут после перорального введения плацебо (0,9% NaCl) или 40° алкоголя в дозе 3 мл/кг (по этанолу)

Группа	Параметры условно-рефлекторной активности*									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Контроль	15±2	3±1	12±3	82±12 (5±1)	2±1	3	4±1	6±1	4±1	39±5
Плацебо (0,9% NaCl)	17±2	4±1	11±2	86±15 (6±1)	3±1	3	4±1	8±2	3±1	36±5
40° алкоголь	25±4	2±1	6±1	52±7 (6±1)	10±2	9	6±1	7±1	12±2	20±4

* Параметры условно-рефлекторной активности: 1 – количество тупиков лабиринта, посещенных за 4 минуты; 2 – латентный период начала исследования лабиринта; 3 – время нахождения в первом тупике лабиринта; 4 – время полного обхода всех тупиков лабиринта и количество тупиков (в скобках), посещенных при этом; 5 – количество поочередных посещений двух из четырех тупиков; 6 – на группу количество возвратов в тупик, посещенный при предыдущем визите; 7 – количество правых поворотов при переходе из тупика в тупик; 8 – количество левых поворотов при переходе из тупика в тупик; 9 – количество диаметральных переходов из тупика в тупик; 10 – количество стоек.

в тесте крестообразного лабиринта при алкогольной интоксикации, моделирующей опьянение.

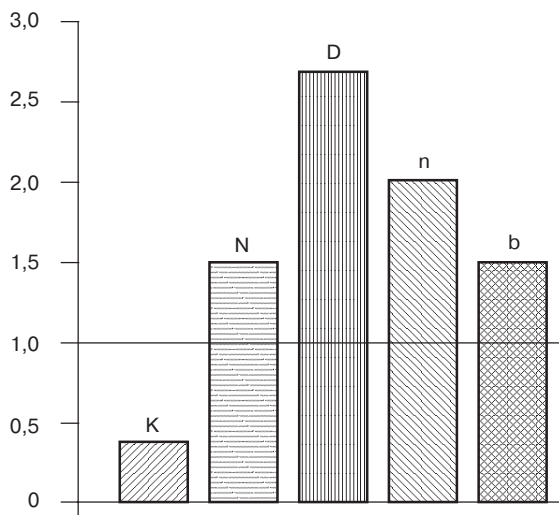
Асимметрию локомоции оценивают по среднему количеству поворотов разной направленности. Этот критерий позволяет выявить патологию, если исследуемое воздействие вносит дезориентацию одного типа у большинства животных, например выключает движение по направлению «часовой стрелки». Однако такого не наблюдается в случае алкогольного опьянения. Поэтому мы применили другой параметр — среднее абсолютных значений разности разнонаправленных поворотов для каждого животного в группе.

Для описания изменения в поведении животных полезно также использовать коэффициент «исследовательской активности», который определяется как отношение числа стоек к числу посещенных отсеков лабиринта. Под воздействием алко-

голя числовые значения указанных параметров меняются разнонаправленно, что приводит к значительному изменению величины их отношения по сравнению с контрольным уровнем.

Обсуждение результатов

Методы оценки токсичности алкоголя основаны на интоксикации животных посредством внутрибрюшинной инъекции раствора этилового спирта. При таком способе введения исключается влияние на скорость и выраженность действия алкоголя желудочно-кишечного тракта. Поэтому в данном исследовании 40⁰-ный алкоголь вводили перорально зондом в желудок. Этот приём является более физиологичным по сравнению с внутрибрюшинными инъекциями и более адекватным обычному способу потребления напитков человеком, что по-



Изменение во времени характерных параметров поведения мышей при алкогольном опьянении. Данные представлены как отношение значения параметра в фазе опьянения к его величине для контрольной группы, в которой животным вместо алкоголя вводили плацебо (0,9% NaCl): K – коэффициент исследовательской активности (отношение количества стоек к количеству посещенных тупиков); N – количество посещенных тупиков лабиринта; D – количество диаметральных переходов из тупика в тупик; n – количество поочередных посещений двух из четырех тупиков; b – количество возвратов в тупик. Сплошной линией на уровне «1» отмечена контрольная группа

звояет оценивать комплексный вклад всего организма в развитие алкогольной интоксикации.

В случае потребления алкоголя в дозе 3 мл/кг (по этанолу) наибольший эффект опьянения проявляется в поведении животных на 20-й минуте. У «трезвых» животных через 20 минут после стресса, вызванного введением зонда в желудок, все параметры поведения возвращаются к уровню контрольной группы. В такой ситуации следует ожидать, что изменения в условно-рефлекторной активности мышей на фоне действия алкоголя обусловлены состоянием опьянения.

Видно, что у «пьяных» мышей регистрируется расторможенное поведение, которое проявляется в значительном увеличении локомоторной активности, уменьшении латентного периода исследования лабиринта и времени нахождения в первом отсеке. При этом наблюдается поведенческая стереотипия, нарушение навигационного научения и снижение коэффициента исследовательской активности, появляются ошибки краткосрочной памяти (количество возвратов в отсек лабиринта, который посещался при предыдущем визите). Наиболее яркие эффекты изменения параметров условно-рефлекторной активности в разработанной модели алкогольного опьянения представлены на рисунке.

Выводы

1. Алкоголь вызывает «растормаживание» поведения животных, снижая выраженность эмоции страха.
2. Характерными признаками опьянения у мышей являются стереотипия, нарушение навигационного научения, снижение исследовательской активности и появление ошибок в краткосрочной памяти.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999, с. 81-122.
2. Майский А.И., Салимов Р.М. Методические указания по изучению препаратов для лечения алкоголизма. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ЗАО «ИИА Ремедиум», 2000, с. 164-171.
3. Нужный В.П. Методологические аспекты оценки токсичности спиртосодержащих жидкостей и алкогольных напитков. *Токсикологический вестник*, 1999, 4, с. 2-10.
4. Погорелов А.Г., Возняк В.М., Погорелова В.Н., Маевский Е.И. Биологическая экспертиза качества этилового спирта, производимого из пищевого сырья. *Наркология*, 2003, 7, с. 2-7.
5. Погорелова В.Н., Аксиров А.М., Маевский Е.И., Погорелов А.Г., Учитель М.Л. Биологическая экспертиза специфических свойств препарата «Антип». *Горизонты биофизики: от теории к практике*. Пушкино, 2003, с. 95-100.

EXPERIMENTAL MODEL OF ALCOHOL INTOXICATION AND ITS DESCRIPTION IN TERMS OF BEHAVIORAL REACTIONS

A.G. Pogorelov, E.I. Maevsky, V.N. Pogorelova, M.L. Utchitel
Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino

Approaches for testing the alcohol intoxication using NMRI mice as an experimental model are presented. To define the mice condition, cruciform labyrinth was employed for recording the changes in behavioral parameters. This technique allows us to estimate the alcohols quality and specific effectiveness of treatments against alcohol toxicity.

Key words: alcohol intoxication, NMRI mice, behavioral reactions, cruciform labyrinth.



Психотропная активность новых синтетических производных пириимидина

Е.В. Иванова, С.А. Овчар, А.А. Батурич

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

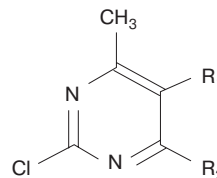
В статье отражены данные о разнообразных биологических свойствах производных пириимидина. Показана методология поиска новых химически активных субстанций пириимидинового ряда на основе квантово-химических *ab-initio* расчетов. Изучена острая токсичность нового синтетического производного пириимидина под кодом *ВМ-8*, определен его терапевтический индекс. Испытуемое вещество не уступает эталонному препарату (диазепам) по параметру острой токсичности (LD_{50}). Приведены результаты исследования психотропной (анксиолитической) активности соединения *ВМ-8*, свидетельствующие о наличии антифобических и антиагрессивных свойств.

Ключевые слова: пириимидины, подавление страха и агрессии, поведенческие реакции.

Азотсодержащие гетероциклические соединения играют важную роль в организме человека. Доказано, что пириимидины участвуют в синтезе нуклеиновых кислот, процессах иммунитета и регенерации, имеют минимальный спектр побочного действия. Данные соединения проявили свою клиническую эффективность при таких заболеваниях, как онкологические, психоневрологические, травматические состояния [2, 3]. Учитывая высокую активность и низкую токсичность эндогенных пириимидинов, логично предположить, что их синтетические аналоги обладают подобными свойствами. Синтез производных пириимидина должен строиться с учетом возможного стерического взаимодействия молекулы с основными биологическими субстанциями организма [1, 8]. Для этого целесообразно разработать новые методы классификации, которые помогут по-новому взглянуть на химические свойства активных соединений, что позволит прогнозировать синтез и скрининг веществ с заданными биологическими параметрами и фар-

макологическими свойствами. Привлечение квантово-химических расчетов и рентгеноструктурного анализа поможет осуществить программу по разработке новых лекарственных средств с максимальной эффективностью [8].

Целью работы являлось получение путем направленного синтеза азотсодержащих гетероциклических соединений с заданными биологическими свойствами. Результатом работы стал синтез веществ под кодом *ВМ*, активность которых была рассчитана сначала теоретически, а затем подтверждена исследованиями психотропных (анксиолитических) свойств на поведенческих моделях у животных. Общая формула химической конструкции имела следующий вид:



где R_1 и R_2 – различные азотсодержащие

радикалы. Наибольшую активность проявило соединение под кодом *BM-8*.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 500 конвенциональных крысах популяции *Wistar* обоего пола, в возрасте 6-9 месяцев. Животные содержались в стандартном виварии (температура от +18 до +20 °С, относительная влажность воздуха 40–60%). В каждой клетке из плексигласа, размером 55×45×15см, с подстилкой из древесных опилок, находились по шесть крыс. Животные получали гранулированный комбикорм на основе овса, ржи и пшеницы (производитель ООО «Кубань корм») два раза в день. Водой, предварительно прошедшей очистку на озоновом фильтре ОФ-М1, наполняли поилки объемом 200 мл. Смена поилки производилась два раза в сутки.

Испытуемое вещество вводили в виде суспензии внутрибрюшинно в объеме 1 мл и в дозах 1, 3 и 5 мг/кг за час до опыта. Контрольной группе физиологический раствор вводили в дозе 1 мл внутрибрюшинно. Группа сравнения получала диазепам в дозе 1 мг/кг внутрибрюшинно. Изучение острой токсичности и поведенческих реакций проводили по стандартным методикам [5, 6].

При остром введении вещество *BM-8* имеет LD_{50} – 230мг/кг. Учитывая, что LD_{50} диазепама 250 мг/кг [7], можно сказать, что вещество *BM-8* не проигрывает ему по этому параметру. Терапевтический индекс вещества *BM-8* равен 46.

Тест «Открытое поле»: крысу сажали в камеру 1,3×1,5м, пол которой разделен на квадраты с отверстиями. В течение 5 мин фиксировали число перебежек по квадратам (горизонтальная компонента), вставаний на задние лапки (вертикальная компонента) и заглядываний в норки (норковая компонента). Тест выявляет общее влияние вещества на ЦНС.

Тест «Конфликтная ситуация»: крыс лишали воды на 72 часа. На 2-й день выработывали навык взятия воды из поилки. На 3-й день крысу сажали в камеру 2,75×2,75×4,5м с поилкой. Каждое взятие воды наказывали разрядом тока (1 мА). Фиксировали за 10 мин число наказуемых взятий воды. Методика выявляет антифобические свойства вещества.

Тест «Бой самцов»: двух самцов сажали в камеру 1,5×1,0м, на пол которой подавали электроток (1 мА). Фиксировали за 10 мин число атак друг на друга. Тест выявляет антиагрессивные свойства вещества.

Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»: крыс сажали в лабиринт из темного и светлого рукавов. Фиксировали выходы в светлый рукав и время пребывания в нем. Нахождение в светлом рукаве — мера антифобического действия вещества. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с применением q^2 -критерия Даннета, позволяющего сравнивать эффект испытуемого вещества с контролем и эталонным препаратом [5, 8].

Результаты обсуждения

Наиболее активной при остром введении оказалась доза 5 мг/кг. Животные, которым вводили соединение *BM-8* в дозе 5 мг/кг, проявили повышенную активность в тесте «Открытое поле» (табл. 1). Влияя на *горизонтальную компоненту*, оно заметно уменьшало ее по сравнению с контрольной группой, не уступая диазепаму.

Вертикальная компонента под влиянием соединения *BM-8* также уменьшалась. В дозе 5 мг/кг испытуемое вещество незначительно уступало эталонному препарату. *Норковая активность* крыс под действием вещества *BM-8* снижалась по сравнению с контролем, не уступая препарату сравнения.

Учитывая, что тест «Открытое поле» отражает влияние изучаемых соединений

Таблица 1

Сравнение эффекта соединения ВМ-8 и диазепам в тесте «открытое поле»

Вещества	Горизонтальная компонента	Вертикальная компонента	Норковая активность
ВМ-8, 5 мг/кг	++++	+++	++++
Диазепам, 1 мг/кг	++++	++++	++++

Примечание. Активность препарата сравнения принята за 1 (++++). Горизонтальная компонента — число пробежек по квадратам; вертикальная компонента — число вставаний на задние лапы; норковая активность — число заглядываний в норки. Значения от + до ++++ отражают возрастание угнетающего действия пиримидинов.

на скорость нейрофизиологических процессов в центральной нервной системе, можно предположить, что вещество *ВМ-8* в дозе 5 мг/кг обладает дозозависимым селективным депримирующим действием на центральную нервную систему животных.

Дальнейшей задачей стало выяснение возможного анксиолитического действия соединения *ВМ-8*. Известно, что для констатации наличия у изучаемого вещества свойств транквилизатора, необходимо прибегнуть, в процессе скрининга, к использованию тестов, основанных как на конфликтных ситуациях, так и базирующихся на преодолении животными врожденного страха перед определенными физическими факторами (свет, звук и др.) [4, 5]. Для реализации этой задачи, сначала изучили активность соединения *ВМ-8* в тесте «Конфликтная ситуация» (табл. 2). Соединение *ВМ-8* в дозе 5 мг/кг досто-

верно, по сравнению с контролем, увеличивало число наказуемых взятий воды. Однако, оно уступало по активности почти на 50% препарату сравнения — диазепаму (табл. 2).

Возможно, что вещество *ВМ-8* проявляет антифобический эффект в более широком диапазоне доз при хроническом введении.

Выявлено, что соединение *ВМ-8* в дозе 5 мг/кг достоверно, по отношению к контролю, уменьшало число агрессивных атак самцов крыс в тесте «Бой самцов». По этому показателю испытуемое вещество совершенно не уступало эталонному препарату (табл.2). На этом основании можно заключить, что соединение *ВМ-8* обладает антиагрессивным эффектом.

Испытуемое соединение в дозе 5 мг/кг статистически значимо, по сравнению с контролем, увеличивало время нахождения крыс в светлом рукаве, не уступая

Таблица 2

Проявления анксиолитического действия соединения ВМ-8

Препарат и доза, мг/кг	Число наказуемых взятий воды	Число агрессивных выпадов	Время пребывания в светлом рукаве лабиринта, с
Контроль	3,44 ± 1,78	27,78 ± 3,22	4,12 ± 1,75
ВМ-8, 5 мг/кг	8,07 ± 1,57* ^o	5,06 ± 1,23*	18,09 ± 2,33*
Диазепам, 1 мг/кг	27,48 ± 2,07*	4,43 ± 0,86*	21,67 ± 2,12*

* – данные достоверны по отношению к контролю; ^o – данные достоверны по отношению к диазепаму.

Таблица 3

Сравнение анксиолитических свойств вещества VM-8 с эталонным препаратом

Соединения	Конфликтная ситуация	Бой самцов	Лабиринт
VM-8, 5 мг/кг	++	+++	++++
Диазепам, 1 мг/кг	++++	++++	++++

Примечание. Активность препарата сравнения принята за 1 (++++).

дiazепаму, что свидетельствует о наличии у вещества способности облегчать преодоление животными страха перед освещенным пространством (антифобическое действие).

Совокупная оценка анксиолитических свойств вещества VM-8 представлена в табл. 3. Из таблицы видно, что испытуемое соединение не уступает diaзепаму по снижению тревожно-фобического компонента поведения животных. Таким образом, исследования вновь синтезированных пиримидинов подтверждают концепцию о психотропности пиримидинов [3] и их выраженной психотропной активности.

Выводы

1. Новое синтетическое производное пиримидина под кодом VM-8 относится к группе малотоксичных соединений и оказывает широкое терапевтическое действие.
2. Соединение VM-8 обладает антифобическим и антиагрессивным эффектом,

свидетельствующим об анксиолитическом действии.

3. По анксиолитическому эффекту соединение VM-8 не уступает diaзепаму и не токсичней последнего.

Литература

1. Гудашева Т.А., Сколдинов А.П. Эксп. и клин. фармакология, 2003, № 2, с. 15-19.
2. Исмагилов А.Ф., Белов А.Е., Зарудный Ф.С., Исмагилова Л.У. Эксп. и клин. фармакология, 2003, № 4, с. 68-69.
3. Каркищенко Н.Н. Психотропизм лекарственных средств. М.: Медицина, 1993.
4. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М., 2004.
5. Положение и руководство «Лабораторные животные». М., 2004.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Ремедиум. 2001.
7. Dolores A.N., Bernardo J.A. Esp. Jour. Neurol., 1961, No. 2, 45-48.
8. Eichelbaum M., Testa B., Somogyi A. Stereochemical action and drug disposition. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2003.

PSYCHOTROPIC ACTIVITY OF NEW SYNTHETIC DERIVATIVES OF PYRIMIDINE

E.V. Ivanova, S.A. Ovchar, A.A. Baturin

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

A new synthetic derivative of pyrimidines (code VM-8) has been examined for its acute toxicity, psychotropic activity and therapeutic index.

Key words: pyrimidines, suppression of fear and aggression, behavioural reactions.

Криоконсервация эмбрионов мышей инбредных линий — гарантия сохранения их генофонда

Х.Х. Семенов, Е.Л. Игнатьева, Т.Б. Бескова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Исследована возможность сохранения жизнеспособности и генетического статуса линии мышинными эмбрионами, прошедшими процедуры замораживания, длительного хранения в низкотемпературном банке ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), размораживания и трансплантации самкам-реципиентам. Установлено, что 4-летнее хранение в криобанке эмбрионов мышей инбредной линии C57BL/6Y не повлияло ни на их жизнеспособность, ни на генетический статус линии.

Ключевые слова: криоконсервация, эмбрионы, трансплантация, хромосомы, aberrации.

Введение

Криоконсервация эмбрионов, то есть длительное хранение их при низких температурах ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) — единственная возможность сохранения генофонда некоторых представителей животного мира.

Особую актуальность она приобретает в лабораторном животноводстве, от качества продукции которого зависят во многом результаты биомедицинских исследований. В настоящее время создано такое количество инбредных, конгенно-резистентных линий и мутантных форм мышей, часть из которых представляет собой адекватные модели наследственных патологий человека, таких, как диабет, мышечная дистрофия, разные формы анемии и т. д., что ни одно, даже очень крупное, научное учреждение не в состоянии содержать весь их набор. Кроме того, всегда есть угроза потери любой линии в результате генетического засорения или болезни.

Криобанки могут обеспечить полную сохранность генетической информации в виде эмбрионов, гонад, половых и соматических клеток. Возможность получения полноценных животных из криоконсервированного материала экспериментально подтверждена для большинства лабораторных [3, 5–7, 9, 25–28], многих сельскохо-

зяйственных [1, 4, 8, 11] и некоторых диких животных [21, 22].

Работы, посвященные криоконсервации эмбрионов, носят методический характер, в которых авторы исследуют влияние различных факторов на эффективность криоконсервации, т. е. на выживаемость замороженно-оттаянных эмбрионов. Так, в частности, особо дискуссионным остается вопрос по выбору скорости и конечной температуры, до которой необходимо проводить замораживание в постоянно контролируемых условиях.

В ранних исследованиях по криоконсервации эмбрионов млекопитающих успешные результаты были получены при использовании малых скоростей как при замораживании ($0,2\text{--}0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), так и при оттаивании ($4\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$), в сочетании с длительным процессом контролируемого замораживания [12–15, 17–19]. Однако в более поздних сообщениях [16, 24, 26, 27] показано, что высокая эффективность достигается при медленном замораживании ($0,3\text{--}0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) и быстром оттаивании ($450\text{--}650\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). В этих работах помимо быстрой скорости оттаивания применены незначительные температуры охлаждения эмбрионов с постоянно контролируемой скоростью: $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$... $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Вместе с тем, вопрос о значении медленного замораживания активно оспарива-



ется. Так, Вилладсан и сотр. [23] использовали для замораживания эмбрионов млекопитающих двухступенчатые процедуры. На первом этапе, до -30°C , использовалась скорость охлаждения $0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, на втором, до $-33 \dots -36^{\circ}\text{C}$, объекты замораживались со скоростью $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а затем погружались в жидкий азот (-196°C). Применяя такой способ замораживания, авторы получили 60%-ную выживаемость эмбрионов.

Таким образом, выбор скорости и конечной температуры, до которой необходимо проводить замораживание в постоянно контролируемых условиях, должен соответствовать более плавному переводу эмбрионов в равновесное состояние.

Оптимальная скорость охлаждения — это такая скорость, при которой обеспечивается предотвращение образования внутриклеточного льда и достаточно быстрое доведение до минимума соприкосновение клеток с высокими концентрациями солей.

Вместе с тем, оптимальная скорость зависит от концентрации криопротектора, а также от процедур, используемых при замораживании, т. е. температуры, при которой осуществляется добавление криопротектора, и времени эквilibрации зародышей с ним.

Исследования [20, 24–27] эффекта добавления и разбавления криопротектора при различных температурах ($0, 20$ и 37°C) на выживаемость замороженно-оттаянных эмбрионов показали, что высокая выживаемость была достигнута путем разбавления криопротектора при температуре 37°C независимо от температуры добавления. Все другие температурные комбинации добавления и разбавления криопротектора дают средние значения выживаемости.

В литературе по криоконсервации эмбрионов млекопитающих нам не удалось обнаружить работ, изучавших влияние низкотемпературного хранения на геном животных. Поэтому в задачу настоящей

работы входило, наряду с адаптацией метода криоконсервации эмбрионов в условиях НЦ БМТ РАМН, также исследование влияния глубокого замораживания и длительного хранения их в низкотемпературном банке (-196°C) на сохранение генетического статуса линии.

Материалы и методы

В эксперименте были использованы доимплантационные эмбрионы мышей BALB/c, полученных из питомника «Светлые Горы», и C57BL/6JY и NMRI, разводимых в коллекционном фонде НЦ БМТ РАМН. Для криоконсервации использовались эмбрионы в возрасте 3,5 дней на стадии морул и бластоцит. Это достигалось путем вымывания теплой средой 199 из половых путей 2,5–3,5-месячных самок на 4-й день после обнаружения влагалищной пробки в результате ночного спаривания.

В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО). Конечная концентрация ДМСО — 1,5М. Добавление ДМСО осуществляли при комнатной температуре ступенчато:

- 0,5М ДМСО в РВ1 — 5 мин,
- 1,0М ДМСО в РВ1 — 5 мин,
- 1,5М ДМСО в РВ1 — 25 мин.

Криоконсервацию эмбрионов проводили в пластиковых трубочках с запаянными концами. Трубочка помещалась в камеру замораживания при температуре -6°C . Через 5 мин проводили сидинг, т. е. стимулировали процесс образования льда путем локального охлаждения стенки трубочки с помощью пинцета, концы которого предварительно охлаждались в жидком азоте.

Затем осуществляли контролируемое замораживание эмбрионов со средней скоростью $0,35^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ($0,2–0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) до температуры -40°C . После 3-минутной паузы трубочку с эмбрионами переносили в контейнер, который опускали в сосуд

Дьюара с жидким азотом на длительное хранение.

Размораживание эмбрионов осуществляли в теплой водяной бане при температуре 37 °С. При этом температура повышается от –196 до +37 °С за 24–27 секунд. Непосредственно после оттаивания, эмбрионы переносили в свежеприготовленный раствор 1,5М ДМСО в РВИ и отмывали от ДМСО при комнатной температуре (ступенчато) в обратной последовательности:

1,5М ДМСО в РВИ — 5 мин,

1,0М ДМСО в РВИ — 5 мин,

0,5М ДМСО в РВИ — 10 мин.

Затем эмбрионы переносили в чистую среду РВИ. После адаптационного периода в течение одного-двух часов в термостате (37 °С) эмбрионы оцениваются на жизнеспособность. Предварительная оценка жизнеспособности эмбрионов осуществляется путем прижизненной микроскопии. Для окончательного тестирования жизнеспособности эмбрионы трансплантируются в матку псевдобеременным самкам. Только рождение жизнеспособных мышей может свидетельствовать об успешности проведенных процедур по замораживанию и оттаиванию эмбрионов. В качестве самок-реципиентов были использованы мыши популяции ICR со смещением срока псевдобеременности на двое суток по сравнению со стадией развития эмбрионов.

В эксперименте по исследованию влияния глубокого замораживания и длительного хранения эмбрионов в криобанке на сохранение генетического статуса линии были использованы две группы мышей из линии C57BL/6: опытная — с потомками эмбрионов, прошедших процедуры замораживания-оттаивания и длительного хранения в криобанке (4 года), и контрольная — с их аналогами, прошедшими естественный процесс утробного развития, предки которых все 4 года нормально размножались в условиях коллекционного фонда НЦ БМТ РАМН.

Контроль гомозиготности мышей опытной группы осуществлялся по генам гистосовместимости (Н-генам). Критерием гомозиготности служило 100%-ное приживание кожных трансплантатов. Обмен кожными трансплантатами с хвоста (мышей контрольной группы) на бок (мышей опытной группы) выполняли на животных одного пола. Метод подробно описан З.К. Бландовой [2].

Также было исследовано влияние замораживания-оттаивания и длительного хранения эмбрионов на чувствительность мышей линии C57BL/6 к цитогенетическому эффекту тиофосфамида (тио-ТЭФ). В опыте участвовали 2 группы мышей 2-месячного возраста по 5 голов в каждой (по 4 самки и 1 самцу). Чувствительность оценивали по частоте клеток костного мозга с индуцированными хромосомными aberrациями на метафазных препаратах, приготовленных через 24 часа после обработки тио-ТЭФ в дозе 3 мг/кг внутривнутрино. Анализированы по 100 клеток от каждого животного. Методы введения мутагена, приготовления препаратов и учета хромосомных повреждений подробно описаны Н.И. Сурковой, А.М. Малашенко [10].

Результаты

Апробировав многочисленные варианты по исследованию влияния различных факторов на выживаемость замороженно-оттаянных эмбрионов, мы избрали метод, представленный выше, как наиболее эффективный в условиях НЦ БМТ РАМН.

В целях выявления влияния срока хранения и генотипа замороженных эмбрионов на их жизнеспособность в криобанк (–196 °С) были заложены 357 доимплантационных эмбрионов. В табл. 1 представлено число эмбрионов каждого генотипа. Срок хранения эмбрионов в криобанке в момент размораживания составил для генотипа C57BL/6 — 4 года, для BALB/c — 3 года, NMRI — 1 год.

По предварительной оценке, около 20% всех эмбрионов оказались поврежденными, причем примерно в равных количествах по каждому анализируемому генотипу. Причиной повреждений были главным образом разрывы блестящей оболочки с выходом цитоплазмы либо сжатие зародышей, по видимому, в результате нарушенного осмотического процесса. Из 119 эмбрионов генотипа C57BL/6, трансплантированных самкам-реципиентам на 2-й день псевдобеременности, родился 31 живой мышенок, что составляет 20,8% от общего числа заложенных в криобанк, или 26,0% от числа трансплантированных эмбрионов.

Результаты трансплантации замороженно-оттаянных эмбрионов у двух других исследованных генотипов мышей аналогичны или отличаются очень незначительно от C57BL/6 (табл. 1). Следовательно, на конечный результат, т. е. на число рожденных мышшей из криоконсервированных эмбрионов, практически не оказали влияния ни длительность срока хранения эмбрионов в криобанке (4 года и 1 год), ни их генотип.

Ответ на допустимость практического использования метода криоконсервации эмбрионов лабораторных животных (мышей, крыс) может дать лишь генетический контроль. Из исследуемых нами ге-

нотипов проверке генетического статуса были подвергнуты мыши линии C57BL/6, так как NMRI — неинбредная популяция, а мыши BALB/c получены из питомника «Светлые горы». Проверку мышшей на гомозиготность осуществляли методом гистосовместимости. Кожные лоскуты от мышшей линии C57BL/6, разводимых в коллекционном фонде НЦ БМТ РАМН, были трансплантированы на мышшей той же линии, но полученных после замораживания и 4-летнего хранения в криобанке (при температуре -196°C). По результатам генетического контроля установлено, что мышши, прошедшие стресс замораживания-оттаивания и длительного хранения в криобанке, были полностью гомозиготны, все трансплантаты прижились (срок наблюдения 300 дней). Таким образом была подтверждена генетическая стандартность мышшей, прошедших в эмбриональной стадии процедуры замораживания, длительного хранения в криобанке, оттаивания и трансплантации самкам-реципиентам.

Следовательно, гены, контролируемые Н-генами или генами гистосовместимости, не претерпели изменений. Однако известно, что гены гистосовместимости контролируют не весь геном. Поэтому сравнительное исследование чувствительнос-

Таблица 1

Результаты трансплантации самкам-реципиентам (ICR) замороженно-оттаянных эмбрионов мышшей

Генотип замороженно-оттаянных эмбрионов	Всего размороженных/поврежденных эмбрионов	Трансплантировано эмбрионов	Родилось мышшей живых/мертвых	Доля рожденных мышшат (%)	
				От общего числа размороженных эмбрионов	От общего числа трансплантированных эмбрионов
C57L/6JY	149/30	119	31/–	20,8	26,0
BALB/cY	68/11	57	13/2	22,0	26,3
NMRI	140/28	112	28/2	21,4	26,8

ти мышей к действию мутагена может дать дополнительную информацию о состоянии генома потомков мышей, полученных от эмбрионов, переживших стресс замораживания-оттаивания и длительного хранения в криобанке.

Результаты цитологического анализа клеток костного мозга потомков мышей, прошедших процесс замораживания-оттаивания и длительного хранения в низкотемпературном банке, а также их аналогов из коллекционного фонда после воздействия тио-ТЭФ в дозе 3 мг/кг представлены в табл. 2.

Сопоставив результаты настоящего опыта с ранее полученными данными [10] на мышах этой же линии, но с исследованиями спонтанного уровня хромосомных повреждений в клетках костного мозга, нетрудно заметить, что тио-ТЭФ в дозе 3 мг/кг вызвал достоверное увеличение клеток с абберациями в костном мозге обеих исследованных групп мышей. Основным типом структурных повреждений как в опытной группе мышей, так и в контрольной были фрагменты. Незначительное число аббераций представлено кольцами и хроматидными обменами. В контрольной

группе мышей обнаружена одна клетка с множественными абберациями, т. е. у них имелись хромосомные повреждения, относящиеся к нескольким типам аббераций. Прослеживая ответ мышей опытной и контрольной групп на одну и ту же дозу тио-ТЭФ, мы видим, что различия между ними по частоте хромосомных нарушений в клетках костного мозга не достоверны.

Таким образом, все манипуляции с эмбрионами, а именно заморозка, длительное хранение при низкой температуре, разморозка, расконсервация и трансплантация приемным матерям, не оказали значимого влияния на чувствительность клеток костного мозга родившихся из них мышей. Полагаем, что вышеприведенные исследования дают основание считать, что хранение эмбрионов в криобанке не изменяет их генетического статуса, и, следовательно, может являться вполне приемлемой формой сохранения генофонда животных на длительный срок. Это означает, что хранение эмбрионов в криобанке (-196 °С) вполне может быть рекомендовано в практику содержания мышей как наиболее экономичный способ их поддержания, в частности в коллекционном фонде.

Таблица 2

Чувствительность клеток костного мозга к тио-ТЭФ в дозе 3 мг/кг у потомков мышей C57BL/6, прошедших стресс замораживания-оттаивания и длительного хранения в криобанке, и их аналогов, разводимых в условиях коллекционного фонда ГУ НЦ БМТ РАМН

Группы животных	Просмотрено метафаз	Частота клеток (%), содержащих					Частота клеток (%) со структурными абберациями
		гены	фрагменты	кольца	обмены	множественные абберации	
После криоконсервации	500	12 (2,4)	55 (11,0)	9 (1,8)	8 (1,6)	0 (0,0)	14,4 ± 3,53
Из коллекционного фонда	500	10 (2,0)	64 (12,8)	7 (1,4)	6 (1,2)	1 (0,2)	15,6 ± 3,65
Спонтанный уровень абберации	1000	8	3	—	—	—	0,3 ± 0,05

Обсуждение результатов

Проведенные исследования были обусловлены необходимостью гарантии сохранения особо ценных медико-биологических моделей — инбредных линий лабораторных мышей, которые содержатся в коллекционном фонде НЦ БМТ РАМН.

Аналізу подверглись эмбрионы от инбредных линий C57BL/6Y, BALB/cY и неинбредной популяции NMRI на доимплантационной стадии развития (3,5 дня).

Полученные результаты подтвердили возможность рождения живых мышей из эмбрионов, прошедших вышеназванные процедуры. Хотя процент рождения живых мышей невысок (20%), однако он вполне гарантирует восстановление линии, так как для этого достаточно лишь одной репродуктивной пары мышей (самки и самца). Вместе с тем восстановление линии только тогда может считаться возможным, когда подтверждается ее генетический статус. Контроль гомозиготности мышей по генам гистосовместимости показал отсутствие каких-либо изменений в геноме линейных мышей, т. е. все они гомозиготны. В пользу сохранения генетического статуса линии свидетельствует также отсутствие достоверной разницы по чувствительности между животными опытной и контрольной групп к действию мутагена в дозе 3 мг/кг.

Следовательно, можно констатировать, что цель работы достигнута, а именно — в условиях НЦ БМТ РАМН возможно создание криобанка эмбрионов мышей коллекционного фонда, способного гарантировать сохранность любой линии в него заложенной, какие бы перемены не имели место (неблагоприятная для жизни экология или болезни).

Выводы

1. Получены положительные результаты по криоконсервации эмбрионов мышей на доимплантационной стадии развития.

2. На выживаемость эмбрионов в жидком азоте (-196°C) не оказали влияния ни срок хранения (от 1 до 4 лет), ни генотип животного.
3. Метод генетического контроля позволяет дать однозначный ответ на допустимость практического использования низкотемпературного замораживания эмбрионов, а именно возможность создания криобанка эмбрионов линий мышей коллекционного фонда НЦ БМТ РАМН.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И., Парашук Ю.С. Криоконсервация репродуктивных клеток. Киев: Наукова думка, 1986, с. 207-211.
2. Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф. Контроль гомозиготности инбредных линий мышей и крыс. В кн. *Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований*. М.: Наука, 1983, с. 143-156.
3. Дыбан А.П. Опыты на зародышах млекопитающих. Методы биологии развития. М.: Наука, 1974, с. 217-245.
4. Клинский Ю.Д., Алексеенко А.Н. Трансплантация зародышей сельскохозяйственных животных. *Итоги науки и техники. Животноводство и ветеринария*. М.: ВИНТИ, 1972, т. 12, с. 84-89.
5. Малащенко А.М., Косарев А.В. Выбор линий мышей для тестирования химических мутагенов. *Генетика*, 1984, т. XX, № 8, с. 128.
6. Межевикина Л.М., Игнатьева Т.В., Вепренцев Б.Н. Выживаемость эмбрионов крыс и мышей при низкотемпературной консервации. *Онтогенез*, 1988, т. 19, № 5, с. 491-494.
7. Мельникова Е.В., Карнаухов В.Н., Дриняев В.А., Яшин В.А., Утешев В.К. Экспресс-диагностика жизнеспособности яйцеклеток и зародышей млекопитающих. В кн. *Консервация генетических ресурсов*. Пущино, 1984, с. 1-21.
8. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. Киев: Наукова думка, 1975, с. 334-337.

9. Семенов Х.Х., Игнатьева Е.Л. Криоконсервация эмбрионов — гарантия сохранения генофонда млекопитающих. *Ланималогия*, 1993, № 1, с. 88.
10. Суркова Н.И., Малащенко А.М. Мутагенный эффект тио-ТЭФ у лабораторных мышей IV. Влияние генотипа и пола на частоту индуцированных хромосомных aberrаций в клетках костного мозга. *Генетика*, т. XI, № 1, 1975.
11. Шихов Н.Я., Сергеев М.И. Глубокое замораживание эмбрионов сельскохозяйственных животных. *Сельскохозяйственная биология*, 1982, т. XVII, № 3, с. 420-426.
12. Asahina E., Takahashi T. Survival of sea Urchin spermatozoa and embryos at very low temperatures. *Cruobiology*, 1977, v. 14, No. 6, 548-554.
13. Baust I.C., Lawrence A.L. Rapid freezing an assential criterion for the successful cryopreservation of immature larve shrimp. *Cryobiology*, 1977, v. 14, No. 6, 705-710.
14. Bernard A., Fuller I. Cryopreservation of *in vitro* fertilized cell mouse embryos using a low glycerol concentration and normothemic cryoprotectant equilibration: a comparison with *in vitro* to fertilized ova. *Crio-Lett.*, 1983, v. 4, No. 3, 171-178.
15. Betteriolge K.I. The importance of embryo or oocyte preservation in farm animal production and research. *Cryobiology*, 1979, v. 16, No. 6, 602-609.
16. Miyamoto H. Factors affecting the survival of mouse embryos during freezing and thawing. *I. Vitro Fertil and embryo transfer*, 1986, v. 3, No. 1, 28-32.
17. Miyamoto H., Ishiboshi T. Survival of frozen thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *I. Reprod and Fertil*, 1977, v. 50, No. 2, 373-375.
18. Miyamoto H., Okimasu E., Ishibashi T. Survival of mouse embryos after freezing to various low temperatures under different cryoprotective agents and cooling rates. *I. Zootechn. Sci.* 1979, v. 50, No. 5, 312-319.
19. Mobraaten Larry E. Mouse embriocryo-banking. *I. Vitro Fertil and embryo transfer*. 1986, v. 3, No. 1, 28-32.
20. Roll W.F., Meyer T. K. Fracture damage to the zonae of mammalian embryos during cryopreservation and its avoidance. *Cryobiology*, 1986, v. 23, No. 6, 437-439.
21. Sheiton K., Craft I. The successful cryopreservation of *in vitro* fertilized mouse embryos. *Cryo. Lett.*, 1982, v. 2, No. 6, 10, 305-310.
22. Trounson A. Comparative embryo transfer in Australia. *Theriogenology*, 1986, v. 19, No. 1, 13-29.
23. Willadsen S.M., Polge C., Rowson L.E., Moor R.M. Reservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 1974, v. 11, No. 6, 560-563.
24. Whittingham D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 1971, v. 233, No. 5314, 125-126.
25. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.*, 1972, v. 11, No. 6, 1071-1079.
26. Whittingham D.G., Whitten W.K. Long-term storage and areal transport to frozen mouse embryos. *I. Reprod. and Fertil*, 1974, v. 36, No. 4, 433-435.
27. Whittingham D.G. Low-temperature storage of mammalian embryos. *In: Basic aspects of freeze-preservation of mouse strains. Stuttgart*, 1976, 44-45.
28. Whittingham D.G. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 1972, v. 178, No. 4, 411-414.

CRYOPRESERVATION OF MAMMALIAN EMBRYOS

H.H. Semenov, E.L. Ignatieva, T.B. Beskova

Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Method of criopreservation of mouse embryos for conservation of mouse strains and their genomes has been studied. It was found that keeping C57BL/6 inbred strain mice embryos in criobank (-196°C) during 4 years did not affect viability and stability of genome.

Key words: cryopreservation, embryos, transplantation, chromosomes, aberrations.

Разработка технологии получения рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах в препаративных количествах

М.М. Шмаров, Д.Ю. Логунов, Л.В. Черенова, Е.Г. Пикер

НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Разработан метод получения препаративных количеств рекомбинантных векторов CELO в куриных эмбрионах, представляющий собой высокотехнологичный процесс с относительно низкой себестоимостью по сравнению с увеличением в культуре количества клеток векторов на основе аденовирусов млекопитающих.

Ключевые слова: рекомбинантные векторы CELO, куриные эмбрионы, технология.

Введение

В настоящее время аденовирусы широко применяются в качестве векторов для транзientной экспрессии генов в клетках млекопитающих *in vivo* и *in vitro* [3, 4, 12, 14, 18, 19]. Активно исследуется возможность применения векторов на основе Ад человека и животных в качестве живых рекомбинантных вакцин для ветеринарии и медицины, а также для генной терапии.

Особый интерес представляют векторы на основе аденовируса птиц CELO (FAV-1). Вирус CELO был охарактеризован как инфекционный агент в 1957 году [20]. До настоящего времени в литературе не были описаны патологии кур, связанные с их инфицированием вирусом CELO, т.е. инфекция протекает латентно и не имеет экономических последствий. Показано, что вирус CELO может быть выделен от здоровых кур, и не вызывает заболеваний при экспериментальном заражении [7]. Эффективное размножения аденовируса CELO происходит только в куриных эмбрионах в возрасте 9-14 дней.

Впервые возможность получения эукариотического вектора на основе аденовируса птиц CELO была показана в 1999 году группой исследователей под руководством М. Cotten [17]. На данный момент суще-

ствуют три способа получения рекомбинантных аденовирусов CELO: метод гомологической рекомбинации фрагментов вирусного генома в составе плазмид в клетках *E. Coli* [17], метод гомологичной рекомбинации между вирусной ДНК и челночным плазмидным вектором в культуре клеток LMH [2] и метод получения рекомбинантных аденовирусов CELO с использованием космидных векторов [9].

Показано, что участок генома протяженностью около 3600 пар нуклеотидов, находящийся на правом конце генома, является «несущественным» для репликации вируса CELO в культуре клеток LMH [17]. Пакаяющая емкость векторов на основе генома аденовируса CELO составляет более 5500 пар нуклеотидов.

Одним из важных преимуществ данной векторной системы является отсутствие предсуществующего иммунного ответа в организме человека против аденовируса птиц CELO. Иммунный ответ является одним из факторов, препятствующих успешному применению аденовирусных векторов на основе Ад5 и других серотипов аденовирусов человека. Кроме того, известно, что CELO не способен к полноценному циклу репликации в клетках человека или млекопитающих и является по отношению к данным хозяевам дефектным.

Особенностью аденовируса птиц CELO является способность размножаться не только в культуре таких клеток, как Ад млекопитающих, но и в куриных эмбрионах [6, 15].

Наработка препаративных количеств рекомбинантных векторов CELO в куриных эмбрионах является высокотехнологичным процессом с относительно низкой себестоимостью в сравнении с наращиванием в культуре клеток векторов на основе аденовирусов млекопитающих. Куриные эмбрионы являются хорошо изученной и безопасной системой для получения биологических препаратов в случае использования SPF-эмбрионов. Это является большим преимуществом векторов CELO при создании живых маркированных вакцин для птицеводства, в качестве субъединичных вакцин для применения в ветеринарии и медицине, а также для генной терапии.

Эффективность получения препаративного количества рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах возможно повысить за счет применения для концентрации и очистки аденовирусных препаратов методов колоночной анионообменной хроматографии и гель-фильтрации [13], которые позволяют уве-

личивать отношение количества инфекционных частиц к общему количеству вирионов. Это очень важно для снижения антигенной нагрузки капсидных вирусных белков в лекарственных и профилактических препаратах. Кроме того, применение колоночной хроматографии для очистки рекомбинантных аденовирусов повышает безопасность их использования в медицине и ветеринарии по сравнению с применением ультрацентрифугирования в градиенте хлористого цезия.

К настоящему времени имеется набор рекомбинантных аденовирусов CELO, экспрессирующих различные целевые гены (см. таблицу).

Нами отработана технология увеличения количества рекомбинантных частиц аденовирусов CELO в куриных эмбрионах, несущих как репортерные (GFP, SEAP), так и целевые гены.

Материалы и методы

В работе были использованы рекомбинантные аденовирусы птиц CELO-GFP [2] и CELO-SEAP [1], несущие репортерные гены зеленого флуоресцентного белка (GFP) и секретируемой щелочной фосфатазы (SEAP), а также рекомбинантные аде-

Перечень целевых гелей, которые были использованы для получения рекомбинантных аденовирусов

Целевой ген	Источник целевого гена	Авторы
VP2	Вирус инфекционного бурсита кур (IBDV)	A. Francois et al. [8]
Гликопротеин G	Вирус бешенства	М.М. Шмаров и др. [неопубликованные данные]
p53 Опухолевый супрессор	Геном человека	D.Y. Logunov et al. [16]
I1-2 Цитокин	Геном человека	L.V. Cherenova et al. [5]
Ангиогенин Фактор роста сосудов	Геном человека	С.В. Авдеева, В.З. Тарантул и др. [в печати]

новирусы CELO-gIRB, несущий ген гликопротеина G вируса бешенства, и CELO-p53, несущий ген белка p53 [16].

Клетки линии LMH (leghorn male hepatoma) были любезно предоставлены М. Cotten (Австрия). Клетки культивировались в среде DMEM с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки.

Наращивание рекомбинантных аденовирусов CELO проводили на SPF-эмбрионах 9, 10 и 11-суточного возраста.

Очистка и концентрирование аденовирусов

Очистку и концентрирование рекомбинантных аденовирусов CELO из аллантоисной жидкости куриных эмбрионов проводили по модифицированному методу Green [11], состоящему из двух этапов.

1) Аллантоисную жидкость осветляли низкоскоростным центрифугированием, затем проводили концентрирование вирионов путем их осаждения на поверхность раствора CsCl плотностью 1,45 г/см³.

Осаждение проводили на центрифуге Beckman L7-55 (США) в течение 1 часа при 23 тыс. об/мин и 15 °С в роторе SW27.

2) Очистка вируса центрифугированием в равновесном градиенте плотности CsCl ($\rho = 1,345 \text{ г/см}^3$) в течении 20 часов при 40 тыс. об/мин и 15 °С в роторе VT150 на центрифуге L7-55 Beckman (США).

Интактные вирионы собирали в зоне плотности CsCl $\rho = 1,35 \text{ г/см}^3$, дефектные частицы вируса – в зоне плотности CsCl $\rho = 1,31-1,33 \text{ г/см}^3$.

Титрование вирусов

Титрование рекомбинантных аденовирусов CELO проводили по бляшкообразованию, как описано Graham [10]. Монослой клеток линии LMH на 6 см чашках инфицировали разведениями вируса, приготовленными на бессывороточной среде DMEM. После адсорбции вируса на клетках в течение 1 ч на клеточный монослой наносили покрытие, содержащее 0.5% ага-

розы в среде DMEM с 10% FBS. Чашки инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 5-7 дней, после чего вносили вторую порцию покрытия с добавлением прижизненного красителя нейтрального красного в концентрации 33 мкг/мл покрытия. Учет результатов проводили на 8–12-й день после заражения. Титр аденовируса определяли в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на 1 мл вирусного препарата.

Определение концентрации вируса

Для определения концентрации рекомбинантных аденовирусов необходимо провести диализ препарата вируса после очистки в градиенте хлористого цезия против буфера 1 (10 mM Трис pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 10%-ный глицерин) в течение 16–18 ч при +4 °С. В этом буфере аденовирусы можно хранить при –80 °С, предварительно разлив препарат вируса на аликвоты. После диализа к 25 мкл вирусного препарата добавить 475 мкл буфера TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) с добавлением 0,1% SDS, встряхнуть на вортке (5 минут), центрифугировать при 14000 об/мин (5 минут) и измерить оптическое поглощение супернатанта при длине волны 260 нм. Расчет количества вируса проводить исходя из соотношения: $1 \text{ ОЕ}_{260} = 10^{12}$ физических частиц аденовируса.

Результаты и обсуждение

Для проведения предклинических и клинических испытаний, а тем более для производства вакцин и лечебных препаратов необходимо оптимизировать условия получения препаративных количеств рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах с целью увеличения количества вируса, выделяемого из одного эмбриона. Также очень важной характеристикой получаемых вирусных препаратов является соотношение титра вируса и количества вирусных частиц, которые определяются по измерению содержания белка в очи-

щенном препарате рекомбинантного аденовируса.

В нашей работе мы провели серию экспериментов по накоплению рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах, в которых варьировали возраст инфицируемых эмбрионов, дозу заражения и время инкубации эмбрионов после заражения. Возраст эмбрионов, используемых в экспериментах, составлял от 9 до 11 суток. Доза заражения рекомбинантными аденовирусами CELO была в диапазоне от 10^2 до 10^8 БОЕ/эмбрион. Время инкубации эмбрионов при 37 °С после заражения изменяли от 2 до 4 суток.

В результате проведенной работы была определена оптимальная методика получения препаративного количества рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах, при применении которой выход вируса составил более 3 ОЕ вируса (3×10^{12} вирусных частиц) из одного эмбриона. Соотношение инфекционных частиц и вирусных частиц при использовании приведенной ниже методики составляло 1:250. Применение данной схемы позволило повысить эффективность наращивания более чем в 10 раз.

Выводы

Выводы из данной работы сформулированы в виде технологической схемы получения препаративного количества рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах. Общая схема их получения представлена на рисунке (см. «Технология получения аденовирусов CELO в куриных эмбрионах» в рубрике «Практикум»).

Литература

1. Логунов Д.Ю., Черенова Л.В., Шмаров М.М., Шашкова Е.В., Верховская Л.В., Доронин К.К., Народицкий Б.С. *In vitro* и *in vivo* доставка гена секретируемой плацентарной щелочной фосфатазы (SEAP) в составе рекомбинантного аденовируса птиц CELO.
2. Шмаров М.М., Черенова Л.В., Шашкова Е.В., Логунов Д.Ю., Верховская Л.В., Капитунов А.В., Неугодова Г.Л., Доронин К.К., Народицкий Б.С. Эукариотические векторы на основе генома аденовируса птиц CELO, несущие гены GFP и IL-2 человека. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 2002 (4), с. 21-25.
3. Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1999, v. 10(5), 440-447.
4. Berkner K.L. Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques*, 1988, v. 6(7), 616-629.
5. Cherenova L.V., Logunov D.Y., Shashkova E.V., Shmarov M.M., Verkhovskaya L.V., Neugodova G.L., Kazansky D.B., Doronin K.K., Naroditsky B.S. Recombinant avian adenovirus CELO expressing the human interleukin-2: characterization *in vitro*, *in ovo* and *in vivo*. *Virus Res*, 2004, v. 100(2), 257-261.
6. Cotten M., Wagner E., Zatloukal K., Birnstiel M.L. Chicken adenovirus (CELO virus) particles augment receptor-mediated DNA delivery to mammalian cells and yield exceptional levels of stable transformants. *J. Virol.*, 1993, v. 67(7), 3777-3785.
7. Cowen B., Calnek B.W., Menendez N.A., Ball R.F. Avian adenoviruses: effect on egg production, shell quality, and feed consumption. *Avian Dis.*, 1978, v. 22(3), 459-470.
8. Francois A., Chevalier C., Delmas B., Etteradossi N., Toquin D., Rivallan G., Langlois P. Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine*, 2004, v. 22(17-18), 2351-2360.
9. Francois A., Etteradossi N., Delmas B., Payet V., Langlois P. Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmids. *J. Virol.*, 2001, v. 75, 5288-5301.
10. Graham F.L., Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. *Methods in Mol. Biol.*, 1994, v. 7, 109-127.
11. Green K.Y., Wold W.S.M. Human adenoviruses: growth, purification and transfection assay. *Methods of Enzymology*, 1980, v. 80, 425-431.

12. Grunhaus A., Horwitz M. Adenoviruses as cloning vectors. *Semin. virol.*, 1992; v. 3, 237-252.
13. Kamen A., Henry O. Development and optimization of an adenovirus production process. *J. Gene Med.*, 2004, v. 1, 184-192.
14. Kovesdi I., Brough D.E., Bruder J.T., Wickham T.J. Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997, v. 8(5), 583-589.
15. Laver W.G., Younghusband H.B., Wrigley N.G. Purification and properties of chick embryo lethal orphan virus (an avian adenovirus). *Virology*, 1971, v. 45(3), 598-614.
16. Logunov D.Y., Ilyinskaya G.V., Cherenova L.V., Verhovskaya L.V., Shmarov M.M., Chumakov P.M., Kopnin B.P., Naroditsky B.S. Restoration of p53 tumor-suppressor activity in human tumor cells in vitro and in their xenografts in vivo by recombinant avian adenovirus CELO-p53. *Gene Ther.*, 2004, v. 11(1), 79-84.
17. Michou A., Lehrmann H., Saltik M., Cotten M. Mutational analysis of the avian adenovirus CELO, which provides a basis for gene delivery vectors. *J. Virol.*, 1999, v. 73, 1399-1410.
18. Romano G., Micheli P., Pacilio C., Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells*, 2000, v. 18(1), 19-39.
19. Trapnell B.C., Gorziglia M. Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, v. 5(6), 617-625.
20. Yates V.J., Fry D.E. Observations on a chicken embryo lethal orphan (CELO) virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1957, v. 18, 657-660.

DEVELOPMENT OF PROCESS FOR PRODUCING THE PREPARATON AMOUNT OF ADENOVIRUS CELO RECOMBINANTS IN CHICKEN EMBRYOS

M.M. Shmarov, D.Yu. Logunov, L.V. Cherenova, E.G. Piker
Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Hi-tech process for escalating the number of recombinant vectors in chicken embryos characterized by low cost in comparison with producing vectors on a mammal adenoviruses basis.

Key words: recombinant vectors CELO, chicken embryos, technology.



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Сравнение кластогенного эффекта канцерогена бенз(а)пирена у мышей, выращенных в гнотобиологическом изоляторе и в открытой среде

Т.Б. Бескова, А.М. Малащенко, Л.А. Болотских

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Самкам мышей BALB/c в возрасте 6 месяцев был введен раствор бенз(а)пирена. Сопоставлен кластогенный эффект канцерогена у конвенциональных и SPF мышей. Различия в реакции на введение БаП между этими группами не обнаружены. Результаты предполагают возможность использования гнотобиологических изоляторов для выращивания и содержания животных, предназначенных для тестирования химических соединений.

Ключевые слова: гнотобиологический изолятор, инбредные мыши, канцероген, мутагенез.

Надежность и точность результатов исследований биологической активности химических соединений на лабораторных животных в существенной степени зависят от качества животных. При изучении эффекта химических соединений, подавляющих активность иммунной системы, особенно в длительных экспериментах, у конвенциональных животных активизируется патогенная и условно-патогенная микрофлора, что вызывает искажение реакции и даже гибель животных. Поэтому для подобных работ рекомендуется использовать животных, свободных от патогенной микрофлоры (SPF). Животные SPF производятся в помещениях барьерного типа, которые в питомниках РАМН (основных производителей животных) еще не функционируют. Второй способ производства SPF животных — разведение в гнотобиологических изоляторах. Однако в этом случае животные выращиваются в изолированном полихлорвиниловой пленкой пространстве, и возникает вопрос — не могут ли вещества, выделяемые из пленки во внутреннюю среду изолято-

ра, изменять реакции животных. Цель настоящей работы — проверить это предположение и оценить возможность использования мышей SPF, получаемых в гнотобиологическом изоляторе в исследованиях канцерогенеза.

Мы исследовали кластогенную активность бенз(а)пирена (БаП) в клетках костного мозга мышей. Этот метод рассматривается как один из краткосрочных тестов оценки канцерогенов [2].

Известно, что для БаП наблюдается корреляция мутагенной и канцерогенной активностей. БаП является типичным полициклическим углеводородом. Соединения этой группы проявляют канцерогенную активность после метаболической активации, и, следовательно, можно ожидать, что при наличии в окружающей среде или корме факторов, подавляющих или активизирующих энзимы, участвующие в метаболизации, эффект канцерогена будет изменен.

Известно, что чувствительность к индукции опухолей БаП у мышей детерминирована генетически, и линии мышей

различаются по частотам опухолей, индуцируемых БаП [5]. В цитируемой работе частота опухолей варьировала от 8 до 50% у мышей разных линий. У мышей линии BALB/c, использовавшихся в нашей работе, БаП (в дозе 0,004 мг/кг) индуцировал саркомы с частотой 23% у самцов и 21% у самок. Опубликованы данные о мутагенной активности БаП: индукции доминантных летальных мутаций в половых клетках самцов мышей [4], индукции хромосомных нарушений в клетках костного мозга [3]. Позднее БаП был использован в числе других соединений в программе ВОЗ, организованной для сравнения чувствительности тестов на мутагенность и определения их ценности как индикаторов канцерогенности [2, 3, 6].

Материалы и методы

Использованные в данной работе мыши инбредной линии BALB/cJPh, свободные от патогенной микрофлоры, были получены из Института молекулярной генетики Чешской Академии наук, где они содержались в барьерном помещении. Мышей размножали в гнотобиологических изоляторах с момента поступления в НИЛ биомоделей (ныне ГУ НЦБМТ РАМН). Для настоящего эксперимента рожденные в изоляторе самки BALB/c содержались в изоляторе «Анимед» до опыта в течение 6 месяцев. Вторую группу составили из самок того же возраста этой линии, полученных от конвенциональных мышей, размножающихся в открытом виварии.

Изолятор «Анимед», использующийся для разведения SPF мышей, имеет следующие размеры (мм): длина – 3200, высота – 1800, ширина – 1100. Камера изолятора изготовлена из поливинилхлоридной пленки толщиной 150 мкм. Система очистки и подачи воздуха содержит фильтр предварительной очистки, входной и выходной фильтры тонкой очистки, два вентилятора.

В камере размещается до 30 клеток типа T2. При обслуживании соблюдались все правила гнотобиотехнологии. Животные получали гранулированную диету ПК-120-10 Вороновского комбикормового завода. Размещали животных по 6 особей в клетке.

БаП был получен от фирмы Loncaster Synthesis Ltd. Соединение растворяли в оливковом масле и вводили внутривентриально в дозах 200 и 400 мг на 1 кг массы тела. В контроле использовали интактных самок аналогичного возраста (5–6 месяцев).

Хромосомные препараты клеток костного мозга готовили по принятой методике [1] через 24 часа после введения канцерогена. На каждую группу, состоящую из 6 самок, просмотрено по 600 метафаз. Учитывали пробелы и хромосомные аберрации. Статистическую обработку данных выполняли общепринятыми методами.

Результаты и обсуждение

В эксперименте зарегистрирован достаточно четкий эффект, зависящий от дозы БаП. Результаты хромосомного анализа представлены в таблице. БаП индуцирует сравнительно невысокие частоты хромосомных нарушений (по сравнению с алкилирующими соединениями), регистрируются пробелы и делеции (хроматидные и изохроматидные фрагменты), другие типы структурных аберраций отсутствуют.

Если избрать в качестве основного признака для оценки эффекта частоту клеток с нарушениями всех типов, то средние частоты клеток с хромосомными нарушениями отличаются от уровня контроля с достоверностью $p < 0.01$ (200 мг/кг) и $p < 0.001$ (400 мг/кг). Оценка разности проводилась по методу Фишера (см. таблицу).

Совершенно очевидно, что нет различий между группами конвенциональных и SPF мышей. Следовательно, если в среду гнотобиологического изолятора и выделяются какие-либо продукты из ПВХ-плен-

**Частота и спектр хромосомных нарушений в клетках костного мозга мышей BALB/c
после воздействия канцерогена бенз(а)пирена**

Группа животных	Доза, мг/кг	Проанализировано клеток	Количество клеток, содержащих:				
			пробелы	фрагменты		структурные aberrации (%)	нарушения хромосом, включая пробелы (%)
				хроматидные	изохроматидные		
1	0	600	3	3	—	3 (0.5)	6 (1.0±1.0)
2	0	600	1	2	—	2 (0.3)	3 (0.5±0.7)
1	200	600	5	9	—	9 (1.5)	14 (2.3±1.5)
2	200	600	4	12	1	13 (2.2)	17 (2.7±2.2)
1	400	600	5	14	5	19 (3.2)	24 (4.2±2.0)
2	400	600	9	12	4	16 (2.5)	25 (4.2±2.0)

В графе «Группа животных» использованы следующие условные обозначения:

1 — мыши BALB/c, выращенные в гнотобиотическом изоляторе;

2 — конвенциональные мыши BALB/c.

Различия между 1 и 2 при всех дозах недостоверны ($p > 0,05$).

ки, то при принятой интенсивности вентиляции они не оказывают заметного влияния на реакцию мыши на ксенобиотик.

Полученные данные хорошо согласуются с результатами работы [6]. В предыдущей работе эффект БаП (доза 252 мг/кг) был исследован у мышей линий TPS/Y, WR/Y, 101/H, C57BL/6J, CBA/CaLac. Линии приведены в порядке уменьшения чувствительности (максимум — 6.4%, минимум — 2.8%). Линия BALB/c была использована аналогично работе [3] при введении дозы 252 мг/кг, частота клеток с хромосомными нарушениями — 1.8%. Следовательно, линия BALB/c относительно устойчива и близка по чувствительности к CBA/Lac. Интересно, что распределение линий по чувствительности к БаП точно совпадает с найденными в опытах с алкилирующими мутагенами (тио-ТЭФ, ЭМС и др.) [1, 3].

Таким образом, данный эксперимент свидетельствует о возможности использования гнотобиологических изоляторов для выращивания и содержания мышей, предназначенных для исследования кластогенного эффекта химических соединений.

Литература

1. Суркова Н.И., Малащенко А.М. Мутагенный эффект тио-ТЭФ у лабораторных мышей. Сообщение 2. Цитогенетический анализ повреждений в клетках костного мозга мышей. *Генетика*, 1974, т. 10, с. 81-87.
2. Adler I.D. Summary report on the performance of the in vivo mammalian cell cytogenetics chromosome aberrations — metaphase analysis assays. In: *Evaluation of short-term tests for carcinogens*. Eds. Ashby J. et al. WHO, Cambridge Univ. Press, 1988, 1.91-1.97.
3. Coton C., Leonard A., Decat G. Induction of chromosome aberrations in BALB/c mouse bone marrow cells. In: *Evaluation of short-term tests for carcinogens*. Eds. Ashby J. et al. WHO, Cambridge Univ. Press, 1988, 1.08-1.111.
4. Generoso W.M., Cain K.T., Hellwig C.S., Cacheiro N.L. Lack of association between induction of dominant-lethal mutations and induction of heritable translocations with benzo(a)pyrene in postmeiotic germ cells of mice. *Mutat. Res.*, 1982, v. 94, 155-163.
5. Liebelt R.A., Suzuki S., Liebelt A.G., Lane M. Virus-like particles in chemically induced sarcomas in high- and low-leukemia strains of mice. *Cancer Res.*, 1970, v. 30, 2438.



6. *Malashenko A.M., Uvarova T.B.* A study of the ability of benzo(a)pyrene, pyrene, 2-acetylaminofluorene and 4-acetylaminofluorene to damage bone marrow cell chromosomes in fine inbred strains of mice. *In: Evaluation of short-term tests for carcinogens. Eds. Ashby J. et al. WHO, Cambridge Univ. Press, 1988, 1.115-1.118.*

COMPARISON OF BENZO(A)PYRENE CARCINOGEN CLASTOGENIC EFFECT IN MICE REARED IN GNOTOBIOTIC ISOLATOR AND IN CONVENTIONAL ENVIRONMENT

T.B. Beskova, A.M. Malashenko, L.A. Bolotskih

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Benzo(a)pyrene solution was injected into 6-month-old mice females BALB/cJPh. Clastogenic effect in conventional and SPF mice reared in gnotobiotic isolator was compared. There was no difference in reaction to BaP between these groups. The results suggest the possibility of gnotobiotic isolators use for breeding and keeping the animals for chemical compounds testing.

Key words: gnotobiological isolator, inbred mice, carcinogen, mutagenesis.



Технология получения рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах в препаративных количествах

М.М. Шмаров, Д.Ю. Логунов, Л.В. Черенова, Е.Г. Пикер

НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Описание технологии наращивания количества вирусных частиц рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах, позволяющее получать препараты вируса с концентрацией более 10^{13} частиц/мл и титром 10^{11} БОЕ/мл. Выход вируса составляет более 3×10^{12} частиц из одного эмбриона.

Ключевые слова: рекомбинантные аденовирусы птиц CELO, куриные эмбрионы, технология.

Вирусные векторы на основе генома аденовируса птиц CELO (FAV-1) CELO имеют хорошие перспективы использования в создании живых маркированных вакцин для птицеводства, в качестве субъединичных вакцин для применения в ветеринарии и медицине, а также в генной терапии. Рекомбинантные аденовирусы CELO способны к размножению в куриных эмбрионах, что позволяет сделать процесс получения препаративного количества вирусных векторов высокотехнологичным и экономически выгодным. Куриные эмбрионы являются хорошо изученной и безопасной (в случае использования SPF-эмбрионов) системой для получения биологических препаратов. Разработанная технология получения рекомбинантных аденовирусов CELO в куриных эмбрионах позволяет получать препараты вируса с концентрацией более 10^{13} частиц/мл и титром 10^{11} БОЕ/мл (БОЕ — бляшкообразующие единицы). Выход вируса составил более 3×10^{12} частиц из одного эмбриона.

Технологическая схема

1. Для заражения куриных эмбрионов необходимо приготовить вирусную «зат-

равку», которая представляет собой грубый лизат клеток LMH, зараженных рекомбинантным аденовирусом CELO, титр которого должен быть не менее 5×10^7 БОЕ/мл. Необходимо провести трехкратное замораживания/оттаивание этого препарата аденовируса и хранить до заражения эмбрионов при -70°C для предотвращения снижения титра вируса.

2. Эмбрионы 10-дневного возраста для заражения подготовить следующим образом:
 - А. Провести овоскопирование эмбрионов, отметить границы воздушной камеры и расположение эмбриона.
 - Б. Провести фломбирование поверхности скорлупы со стороны воздушной камеры эмбриона.
 - В. Сделать с помощью пробойника отверстие в скорлупе на расстоянии 2–3 мм выше границы воздушной камеры со стороны противоположной той стороне, с которой расположен эмбрион.
3. Заражение куриных эмбрионов проводить при помощи стерильного шприца объемом 5 мл. Иглу вводить в от-



Технология получения рекомбинантных аденовирусов

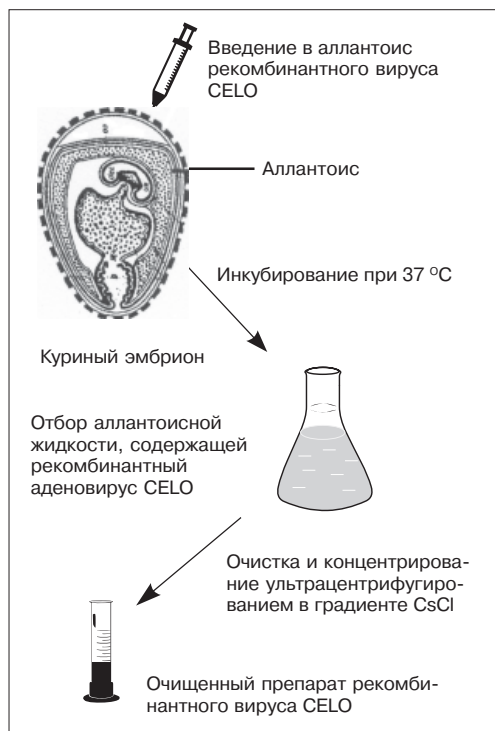


Схема получения препаратного количества рекомбинантного вируса CELO в куриных эмбрионах

4. После введения вирусосодержащей жидкости в эмбрион отверстие в скорлупе необходимо залить расплавленным парафином.
5. Инкубировать эмбрионы после заражения при 37 °С в течение 2 суток.
6. После инкубации поместить эмбрионы в холодильную камеру при +4 °С и охладить в течение 16–18 часов.
7. Вскрыть скорлупу эмбрионов со стороны воздушной камеры и отобрать аллантаисную жидкость (средний объем аллантаисной жидкости составляет около 10 мл из одного эмбриона). Аллантаисную жидкость осветлить центрифугированием при 4000 об/мин и +4 °С в течение 15 мин.
8. Рекомбинантный аденовирус из аллантаисной жидкости очистить двукратным ультрацентрифугированием в градиенте хлористого цезия.
9. Определить концентрацию и титр полученного очищенного препарата рекомбинантного аденовируса CELO.

верстие в скорлупе на 10–12 мм под углом 45° к центру эмбриона. Доза заражения должна быть не менее 2×10^7 БОЕ/эмбрион (объем заражающей дозы 400–500 мкл в зависимости от титра препарата вирусной «затравки»).

Предложенная нами технологическая схема накопления рекомбинантных аденовирусов CELO позволяет получать вирусные препараты в количествах, необходимых для проведения экспериментов на животных, в том числе доклинических и клинических испытаний.

THE PROCESS FOR PRODUCING THE ADENOVIRUS CELO RECOMBINANTS IN CHICKEN EMBRYOS

M.M. Shmarov, D.Yu. Logunov, L.V. Cherenova, E.G. Piker
Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Technology for escalating recombinant adenoviruses CELO in chicken embryos that allows getting virus preparations with concentration more than 10^{13} particles/ml and titer of 10^{11} PFC/ml is presented. The output of viruses exceeded 3×10^{12} particles per embryo.

Key words: recombinant adenoviruses CELO, chicken embryos, technology.

Усовершенствованный способ получения гнотобиотических животных

Л.А. Болотских, З.С. Лушникова

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Усовершенствован способ получения гнотобиотических животных различных видов для медико-биологических исследований. Разработанные методические приёмы могут успешно использоваться в лабораторном животноводстве для очистки конвенциональных животных от патогенной микрофлоры и перевода их в SPF-статус.

Ключевые слова: гнотобиологический изолятор, гнотобиотические животные, гистерэктомия.

Гнотобиотические животные являются уникальной моделью в медико-биологических исследованиях. Они могут быть использованы в физиологии, патологии, иммунологии, радиологии, токсикологии, биологии, фармакологии, онкологии и других областях. Интерес к этим видам животных вызван тем, что использование гнотобиотических животных, например, безмикробных, позволяет изучать различные физиологические и патологические процессы в чистом виде без влияния сопутствующего микробного фактора, а использование гнотобиотов с определенными ассоциациями позволяет точно установить влияние отдельных микроорганизмов на эти процессы [2,4]. Гнотобиотические животные представляют определенный интерес и в области лабораторного животноводства, так как являются основой получения животных, свободных от патогенных факторов (SPF – животных), крайне необходимых экспериментаторам [1, 3].

Разработанные методические приемы были успешно использованы для получения гнотобиологических животных различных видов, а также для создания коллекционного фонда лабораторных животных SPF-статуса.

Аппаратура. Для получения и содержания гнотобиотических животных исполь-

зуются гнотобиологические изоляторы различных типов: западно-германского (Haiyoka, Ehret), английского (Vickers, Jstotec), французского (La Colen) производства.

Автоклавы могут быть использованы как отечественного, так и зарубежного производства. Для стерилизации корма, воды, клеток, поилок и другого оборудования и материалов используется автоклавный контейнер, выполненный из нержавеющей стали. В задней стенке контейнера имеются отверстия для прохождения пара, которые герметично закрываются фильтровальным материалом.

Для стерилизации аэрозолем 2%-ной перуксусной кислоты внутренней поверхности камеры изолятора и шлюзов применяют распылитель. Для создания аэрозоля пульверизатор присоединяют к компрессору, нагнетающему воздух в распылительное устройство. Используют также распылители зарубежного производства типа STERIVAP (Франция), которые стерилизуют изоляторы газообразной концентрированной перуксусной кислотой.

Течеискатель присоединяют для проверки герметичности изолятора. Используют галоидный течеискатель ГТИ-3 и фреон-12.

Из дополнительных материалов необходимы переходники из ПВХ для соеди-

нения автоклавного контейнера со шлюзом изолятора, фильтрованная ткань типа УТВ для смены фильтров в автоклавных контейнерах, термостойкая пленка на лавсановой основе для закрытия автоклавного контейнера, клейкая лента типа Scotch; клейкая лента типа ПХЛ.

Получение перуксусной кислоты. Перуксусная кислота — основное дезинфицирующее средство в гнотобиологии. Перуксусная кислота производится за рубежом в виде 40%-ного раствора. Это бесцветная жидкость с очень сильным острым запахом, легковоспламеняемая, неустойчивая. В виду таких свойств в обязательном порядке при работе с ней надевают перчатки, очки и маску. В связи с тем, что перуксусная кислота неустойчивая, приготовленный 2%-ный раствор перуксусной кислоты должен использоваться в течении 3 часов. За день активность 1%-ного раствора перуксусной кислоты уменьшается на 13%.

Перуксусная кислота синтезируется в определенной последовательности из перекиси водорода (73,5 мл), серной кислоты (3,5 мл) и уксусного ангидрида (350 мл). Хранится в небольшом количестве в темной посуде в холодильнике. Перед употреблением необходимо проверить титр и установить концентрацию кислоты титрованием 0,1 N серноватисто-кислым натрием.

Подготовка гнотобиологических изоляторов к работе. Монтаж изолятора осуществляется согласно конструкции изолятора по схеме.

После монтажа камера изолятора проверяется на герметичность при помощи галлоидного течеискателя ГТИ-3. Камеру изолятора заполняют небольшим количеством фреона и при помощи чувствительного датчика проверяют герметичность.

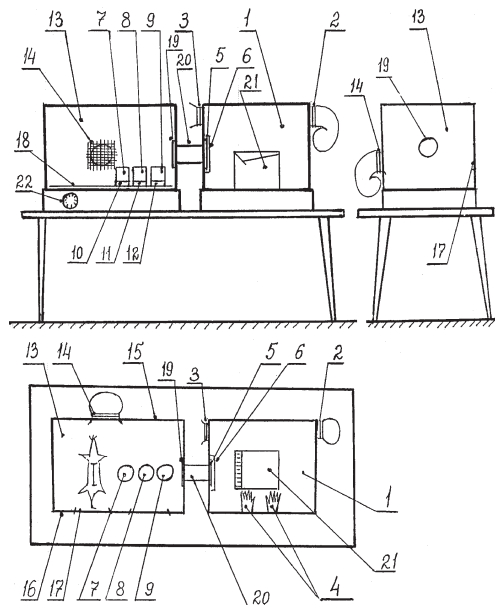
После установления целостности камеры и герметичности всех соединений и узлов изолятора, тщательно моют ее внутреннюю поверхность мыльным раствором с последующим ополаскиванием водопроводной, а затем дистиллированной водой.

Далее осуществляется стерилизация изолятора. Камеру изолятора стерилизуют с помощью распылителя 2%-ного раствора перуксусной кислоты (0,2–0,3 л раствора на 1 м³ камеры) в определенной последовательности: сначала стерилизуются фильтры и перчатки, затем внутренние крышки, шлюз, имеющиеся стеллажи, ванночки, стены, пол, потолок камеры. На следующий день осуществляют вентиляцию изолятора. Через 2–3 дня повторяют стерилизацию и проветривают изолятор до полного исчезновения запахов перуксусной кислоты из выходных фильтров, подключая изолятор в сеть.

Подготовка животных и проведение операции гистерэктомии. Для операции отбирают здоровых беременных самок на последних сроках беременности. Для точного планирования операции у крыс и мышей используют контролируемое спаривание. Для этого операцию у крыс проводят на 22-й, а у мышей на 21-й день беременности. Наиболее пригодными для операции (по результатам выживаемости плодов) являются самки со 2-й или 3-й беременностью.

На рисунке показан общий вид гнотобиологического изолятора в продольном разрезе.

Гнотобиологический изолятор содержит светопрозрачную гнотобиологическую камеру 1 с входным и выходным воздушными фильтрами 2 и 3 для подачи стерильного воздуха, манипуляционными перчатками 4 и аэрошлюзом 5 с крышкой 6. Установлены сосуды 7, 8, 9 с дезинфектантами и нагреватели соответственно 10, 11, 12 или их блок, отдельная изолированная светопрозрачная операционная камера 13 для проведения гистерэктомии с горизонтально расположенным входным воздушным фильтром 14 для подачи стерильного воздуха. Горизонтальный ламинарный поток от задней стенки 15 передается к передней 16 со свободным истечением через отверстие 17, площадку 18 для размещения на ней сосудов 7, 8, 9 с дезинфектан-



Гнотобиотический изолятор:

1 – камера изолятора; 2, 3 – входной и выходной фильтры; 4 – манипуляционные перчатки; 5 – аэрошлюз; 6 – крышка аэрошлюза; 7, 8, 9 – дезинфектанты; 10, 11, 12 – нагреватели; 13 – операционная камера; 14 – горизонтальный входной фильтр; 15, 16 – задняя и передняя стенки; 17 – отверстие; 18 – площадка; 19 – аэрошлюз; 20 – переходник; 21 – клетка; 22 – блок управления

тами и нагревателями 10, 11, 12 или их блоков.

При включенной вытяжной лабораторной вентиляции производят стерилизацию внутренних поверхностей камер 1 и 13 изолятора, манипуляционных перчаток 4, набора хирургических инструментов, аэрошлюзов 5 и 19, соединяющего их трубчатого переходника 20 и крышки 6, 2%-ным раствором перуксусной кислоты, готовой или синтезированной.

Подбирают самку-донора со второй или третьей беременностью, помещают ее в операционную камеру 13, удаляют шерсть с живота, обмывают кожу теплой водой, обрабатывают 10%-ным раствором йода, дают наркоз, приклеивают к поверхности кожи

анаэробную пленку, которую также обрабатывают 10%-ным раствором йода.

После этого разрезают пленку по срединной линии живота и склеенную с ней кожу с поперечными разрезами по концам, рассекают по этим линиям мышцы живота и брюшины, отворачивают лоскуты ткани в стороны, обкладывают рану стерильными марлевыми салфетками с разводом краев тупым ранорасширителем. Выводят рога беременной матки из брюшной полости, перевязывают матку в области шейки нитью или марлевым жгутиком, смоченным 10%-ным раствором йода, пересекают кровеносные сосуды и связки матки, ампутируют матку в области шейки дистальнее места перевязки. При этом операция гистерэктомии и дальнейшие операции по извлечению плодов проводят в одной операционной камере 13 при непрерывном горизонтально направленном в ней ламинарном потоке стерильного воздуха при температуре 37-38 °С от задней стенке 15 к передней 16 со свободным истечением через отверстие 17 с использованием входного воздушного фильтра 14.

Затем погружают ампутированную матку вместе с плодами на 1 минуту в сосуды 7, 8, 9 с дезинфектантами при температуре 38 °С (соответственно с 10%-ным раствором йода, 5%-ным раствором хлорамина и 1%-ным раствором Люголя), размещенные на площадке 18 операционной камеры 13. Разрезают стенки матки, извлекают плоды, освобождают их от плодовых оболочек, осушают с перевязкой и отсечением пуповины. Проводят микробиологический контроль околоплодных материалов, и осушенные плоды подают через аэрошлюзы 5 и 19, соединенные переходником 20, в гнотобиологическую камеру. Подсаживают к самкам-кормилицам (безмикробным или SPF-статуса), помещенным в индивидуальные клетки 21 в гнотобиологической камере 1, где происходит вскармливание полученного при-

плода с помощью специально разработанной молочной диеты.

Данным способом получено 30 линий мышей SPF-статуса.

Племенные ядра линейных мышей переводили из изоляторов и содержали в помещении обычного типа с соблюдением барьерных условий. Проводился регулярный микробиологический и патологический контроль.

Опыт показал, что животные, очищенные от патогенной микрофлоры и переведенные из гнотобиологического изолятора, могут в условиях обычного помещения при соответствующих барьерных условиях (защита от проникновения диких грызунов, стерилизация корма, подстилки и оборудования, дезинфекции и т.д.) сохранять нормальный микробиологический статус до 2 лет и более.

Следовательно, имеется реальная возможность в экспериментально-биологи-

ческих клиниках каждого института проводить эксперименты на здоровых животных. Усовершенствованный и отработанный способ позволяет переводить в SPF-статус животных других видов и линий.

Литература

1. Душкин В.А., Интизаров М.М., Петрачёв Д.А., Подопригора Г.И., Попов В.И., Сорокин В.В., Шишков В.П. Теоретические и практические основы гнотобиологии. М., Колос, 1983.
2. Чахава О.В. Гнотобиология. М., Медицина, 1972.
3. Подопригора Г.И., Душкин В.А., Болотских Л.А., Буцолит Э., Киши Э., Аюшхеди И., Надудвари И. Оперативные методы получения безмикробных мышей, крыс и морских свинок. *Вестник АМН*, 1981, № 12, с. 54-58.
4. Подопригора Г.И. Гнотобиология на рубеже двух столетий. 1996, № 14, с. 239-251.

AN IMPROVED METHOD FOR DEVELOPMENT OF GNOTOBIOTIC MODELS

L.A. Bolotskih, Z.S Lushnikova

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

To provide gnotobiotic animals of different species for biomedical investigations, an appropriate method was developed and tested. This method can be applied to the conventional laboratory animals for «cleaning» them of pathogenic microorganisms and converting into SPF-status.

Key words: gnotobiological isolation ward, gnotobiotic animals, hysterectomy.

Эктромелия лабораторных мышей и методы её диагностики

Э.Х. Абдрашитова, Л.А. Конопленко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Описаны клинические признаки эктромелии лабораторных мышей, патолого-анатомические изменения, методы выделения и идентификации вируса, диагностика заболевания.

Ключевые слова: эктромелия, лабораторные мыши, клинические признаки, диагностика, идентификация.

В настоящее время, несмотря на прогресс в технологии лабораторного животноводства, в питомниках у лабораторных животных можно обнаружить более 20 вирусов различных таксономических групп. Отсутствие патогенов, изначально установленное в вивариях при формировании колонии животных, не исключает последующего появления инфекции, даже при соблюдении всех мер предосторожности. Поэтому без проведения мероприятий по систематическому вирусологическому контролю невозможно обеспечить качество животных и предотвратить искажение результатов из-за невыявленных инфекций лабораторных животных.

Данная работа посвящена характеристике и методам диагностики эктромелии (оспы) мышей, вспышка которой может возникнуть в случае нарушения барьерной системы и проникновения диких грызунов в помещения лабораторных животных [1, 2, 3, 5].

Вирус эктромелии относится к роду *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Это крупный вирус, имеющий сложную структуру. Форма блочная, размер 250–300 × 150–200 нм. Вирус покрыт внешней оболочкой с ворсинками. Вирион содержит двухцепочечную ДНК и белок [4]. Вирус устойчив к эфиру и фенолу, долго сохраняется в глицерине. Но даже сравнительно невысокая температура (55 °С) убивает его в течение 30 мин.

К заболеванию чувствительны животные всех возрастов, однако, чувствительность разных линий мышей различна. Наиболее тяжело поражаются линии мышей СВА/Лас, DBA/2, BA1B/c, а линия C57BL/6 относительно резистентна и часто инфицирована латентно [1]. Инфекция передается алиментарным, аэрогенным, контактными путями, встречается также трансплацентарная передача вируса и трансмиссивная.

Заболевание может протекать латентно, остро и подостро. Животные с латентной формой не проявляют никаких признаков заболевания. Инфекция в этом случае может активизироваться с помощью различных факторов, например при облучении, транспортировке, заражении другими возбудителями, экспериментальной нагрузке.

При молниеносной форме клинические симптомы не успевают проявиться, и гибель мышей наступает неожиданно и быстро. Подострая форма представляет классическую форму эктромелии. В таких случаях у животных, преимущественно на голове, хвосте и лапах развиваются кожные поражения. Кожа отёчна, гиперемизирована, с мелко очаговыми гемorragиями, которые покрываются сухими корочками. В последующем на пальцах, ушах и хвосте образуются очаги некроза, покрытые тёмно-бурыми корочками, которые затем отпадают. Иногда происходит ампутация конечностей или фаланг пальцев и хвоста.

Острая форма заболевания сопровождается интенсивным поражением внутренних органов. На вскрытии печень бледно-жёлтая или серо-жёлтая, пёстрая из-за чередования некротических и геморрагических участков. Селезёнка иногда увеличена с очагами некрозов, В кишечнике — некротический энтерит, в ряде случаев тотально распространяющийся на всю стенку, с массивными фибринозными наложениями и кровоизлияниями. В очень тяжёлых случаях в лёгких развивается острая диффузная пневмония некротически-геморрагического характера.

При хронической форме заболевания поражения внутренних органов непостоянны и неспецифичны. Можно наблюдать только гиперплазию селезёнки и лимфатических узлов. В очагах поражения кожи, в дегенерирующих эпителиальных клетках могут встречаться крупные цитоплазматические тельца — тельца Маршала. Они наблюдаются и в поджелудочной железе. В клетках других тканей развиваются характерные цитоплазматические включения, часто многочисленные, так называемые включения Като типа А и В. Во включениях типа В с помощью флуоресцирующих антител обнаруживается вирусный антиген. Включения встречаются в эпителиальных клетках и фибробластах многих органов.

Лабораторная диагностика экстремелии основывается на использовании следующих методов исследования:

- 1) серологические тесты реакции диффузной преципитации и реакции торможения гемагглютинации;
- 2) метод иммунофлуоресценции;
- 3) метод иммуноферментного анализа;
- 4) выделение возбудителя на куриных эмбрионах;
- 5) электронная микроскопия.

Реакция диффузной преципитации в агаре (РДП) используется для обнаружения и идентификации антигена, а также обнаружения и титрования антител к вирусу оспы в исследуемых сыворотках. Суть этого ме-

тода заключается в том, что одноимённые специфические антиген и антитело, помещённые на определённом расстоянии друг от друга в агаровом геле, диффундируют и образуют при встрече друг с другом преципитат в виде белых полос. Каждая из этих линий соответствует только одной системе антиген-антитело. В случае несоответствия антигена и антитела, полосы преципитации не появляются.

Для постановки РДП необходима следующие ингредиенты: испытуемый вирусосодержащий материал (везикулярная, пустулёзная жидкости кожных элементов или корочки от больных животных с подозрением на оспу) или испытуемые сыворотки; стандартные специфические сыворотки и специфический антиген для диагностики вирусов оспенной группы; нормальные сыворотки мышей; 1%-ный агаровый гель, который должен быть прозрачным, достаточно плотным, стерильным, со слабощелочным рН.

Дно чашек Петри покрывают расплавленным агаром, в котором (после его затвердевания) вырезают лунки. Центральную лунку заполняют сывороткой, содержащей антитела к искомому антигену. В периферические лунки вносят испытуемый материал (искомый антиген) и нормальную контрольную сыворотку. Инкубируют во влажной камере в течение 24–48 часов. Появление линий преципитации указывает на наличие антигена.

Для определения наличия антител к вирусу оспы в сыворотке крови испытуемых мышей центральную лунку заполняют специфическим антигеном, а периферические — исследуемыми сыворотками. Контролем служат лунки с нормальной и специфической сывороткой. Реакция считается положительной, если между лунками с антигеном и испытуемыми сыворотками образуются линии преципитации.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) основана на способности антител подавлять гемагглютинирующую актив-

ность соответствующего вируса. К смеси **вирус оспенной группы + исследуемая сыворотка** добавляют эритроциты, которые при отсутствии специфических антител в сыворотке будут агглютинированы вирусом.

Для постановки РТГА при индикации вирусов экстремелии необходимы следующие составляющие: вирусосодержащий материал, специфические и исследуемые сыворотки, физиологический раствор, эритроциты петуха-донора из вивария.

Методика состоит из нескольких этапов и заключается в следующем.

Исследуемые сыворотки мышей, разведенные в физиологическом растворе в соотношении 1:5, инактивируют при 56 °С в течение 30 мин. Далее сыворотки разводят двукратно, начиная с 1:10 до 1:1280. С этой целью в лунки плашки вносят по 0,025 мл физиологического раствора. В первую лунку ряда вносят 0,025 мл исследуемой сыворотки и раститровывают (смешивают, переносят 0,025 мл предыдущего разведения в следующую лунку, перемешивают и т.д.).

В приготовленные разведения сыворотки добавляют 0,025 мл тест-антигена в рабочем разведении. Титр антигена определяют непосредственно перед постановкой РТГА. После встряхивания, в каждую лунку добавляют по 0,025 мл суспензии эритроцитов. Плашки вновь встряхивают и выдерживают в покое при комнатной температуре в течение 1 часа.

Учитывают опыт: титр данной сыворотки с использованием данного антигена — это максимальное её разведение, которое полностью ингибирует геагглютинацию.

Одновременно с постановкой основного опыта РТГА ставят контроль известной положительной сыворотки к вирусу оспы и контроль рабочей дозы тест-антигена.

Метод иммунофлуоресценции или метод флуоресцирующих антител (МФА) относится к экспресс-методам и позволяет быстро обнаружить вирус в патологическом материале. Основу метода составляет

реакция между антигеном и специфическим по отношению к нему антителом. Меченые флуорохромом противовирусные антитела при нанесении на исследуемый мазок прочно связываются с гомологичным антигеном, образуя светящийся комплекс антиген-антитело. Если антиген не соответствует антителу, находящемуся в данной сыворотке, то при промывании препарата такие антитела легко смываются.

Для постановки прямой реакции иммунофлуоресценции готовят на предметных стёклах мазки-отпечатки из содержимого кожных поражений и органов больных экстремелией мышей. Окрашивают фиксированные препараты флуоресцирующим иммуноглобулином, отмывают в двух порциях 0,01 М раствора фосфатного буфера с рН 7,2–7,4, помещают под покровное стекло и исследуют под люминесцентным микроскопом.

Результаты считают положительными, если в исследуемом препарате обнаруживаются клетки, имеющие ярко-зелёное свечение в цитоплазме. В качестве обязательного контроля берут препараты из материалов, не содержащих искомого вируса оспы, и препараты, обработанные мечеными антителами, гетерологичными по отношению к искомому вирусу. В контрольных препаратах специфическая флуоресценция не выявляется.

Метод иммуноферментного анализа (ЭЛИЗА) используют для выявления антигена ортопоксвирусов в везикулярной и пустулёзной жидкостях, суспензии корочек и других материалов, взятых от больных животных. Суть метода та же, что и у МФА, с той лишь разницей, что специфические антитела мечены ферментом (обычно пероксидазой).

Схема такова. Стенки лунок микротитратора из тест-набора с адсорбированным на них оспенным гамма-глобулином отмывают для удаления избытка специфических антител. Затем добавляют испыты-

емый материал, содержащий антиген, который связывается с антителами, адсорбированными в лунках. В лунки добавляют антитела, меченные ферментом, специфические для вирусного антигена. Они соединяются с ранее образовавшимся комплексом антиген-антитело. После инкубации избыток удаляют промыванием. Для выявления иммунного комплекса добавляют индикатор фермента, который гидролизует фиксированным ферментом с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна количеству антигена. Оптическая плотность, определяемая на спектрофотометре, прямо пропорциональна количеству фермента, фиксированному в лунке. Последнее соответствует количеству искомого антигена в опытной пробе.

Использование куриных эмбрионов для выделения и культивирования вируса эктромелии — наиболее доступный и удобный метод.

Используют развивающиеся куриные эмбрионы, которые в возрасте 11–13 дней заражают суспензией, приготовленной из патологического материала. Инокуляцию производят на хорионаллантоисную оболочку (ХАО). Очаги поражения на оболочке изучают на тёмном фоне. Для пассирования вируса из оболочки готовят суспензию. Обычно в серии пассажей выделенный вирус образует на ХАО характерные множественные очаги поражения с геморагическим центром.

Патологические очаги исследуют методом электронного микроскопирования. При-

готовленные препараты подвергают негативному контрастированию раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты и просматривают в электронном микроскопе. Диагноз считается положительным при наличии в препаратах одиночных или расположенных группами оспенных вирионов характерной блочной формы с закруглёнными краями, размером 250–300 x 150–200 нм, с белковой оболочкой, образованной трубчатыми филаментами диаметром 9 нм.

В заключение необходимо отметить, что систематическое проведение контроля вирусной контаминации лабораторных животных и тестирование их на носительство различных вирусов позволяет своевременно проводить коррекцию их статуса по соответствующему стандарту.

Литература

1. Ефимов В.И., Лаукайтис В.А. Серологический скрининг вирусных инфекций, методы и результаты. *Лаб. животные*, 1993. Т. 3. № 1, с. 15–21.
2. Майборода А.Д. Линейные мыши и свойственные им вирусы как объекты для моделирования в вирусологии. *Вестник АМН СССР*, 1983, № 9, с. 68–71.
3. Майборода А.Д. Вирусные инфекции лабораторных мышей и их распространение. *Вопр. вирусол.*, 1984, № 1, с. 8–13.
4. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. В кн. *Ветеринарная вирусология*. М.: Колос, 1984, с. 46–48.
5. Diniz S., Frindade J.S., Fonseca F.J., Kroon E.J. Surto de variola murina em camundongs suicos em bioterio: relato de caso. *Arg. Brasil. Med. Veter. Zootech.* 2001, v. 53, No. 2, 152–156.

ECTROMELIA VIMS OF LABORATORY MICE AND METHODS OF DIAGNOSIS

E.Kh. Abdrashitova. L.A. Konoplenko

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Clinical signs of the ectromelia of laboratory mice, pathological and anatomical changes, methods of virus isolation and identification, and diagnosis of disease are described.

Key words: ectromelia, laboratory mice, clinical signs, diagnosis, identification.



НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ

Введение в GLP

Е.В. Брайцева

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Разработка единых стандартов и требований по изучению лекарственных средств является чрезвычайно важным этапом на пути их внедрения в лечебную практику. Этому вопросу уделялось и уделяется большое внимание во многих странах мира. Как известно, прежде чем попасть на потребительский рынок, лекарственные средства (ЛС) проходят сложный путь разработки и исследования.

Ключевые слова: хорошая лабораторная практика, доклинические исследования, принципы GLP.

Процесс разработки лекарственных средств

В процессе разработки ЛС выделяют четыре фазы (стадии), которые иногда могут перекрываться. Например, первая фаза клинических испытаний может начинаться до завершения длительных токсикологических исследований, изучение канцерогенности может ещё и не начинаться к моменту начала первой фазы клинических испытаний. Однако во всех случаях изучение препаратов начинается с базовых исследований, результаты которых могут быть затем использованы для определения мишенной действия потенциальных лекарственных средств.

В странах с развитой фармацевтической промышленностью проводят скрининг тысячи и десятки тысяч веществ в поисках таких из них, которые обладали бы желаемыми фармакологическими эффектами. Из этих тысяч на эту роль подходят, как правило, 10–20 тестируемых веществ, которые в свою очередь изучаются для выявления у них токсикологических свойств. В результате, в число ЛС попадают единицы. В странах с недостаточно развитой фармацевти-

ческой промышленностью процесс разработки ЛС выглядит иначе. В этих случаях идентификация кандидатов в ЛС проводится на базе открытий и наработок в исследованиях в институтах, центрах, университетах.

Классический «жизненный» цикл разработки лекарств:

Фаза 1 — поиск активной субстанции. На этой стадии ведётся поиск потенциально новых препаратов. Для этой стадии не разработаны какие-либо стандарты изучения. Возможно, что они появятся в будущем.

Фаза 2 — доклинические исследования. Используются требования GLP (Good Laboratory Practice). Доклиническое изучение проводится не на людях. Основная цель — тестирование безопасности (токсикологической, фармакологической...), исследование фармакокинетики и биодоступности.

Фаза 3 — клинические исследования. Проведение клинических испытаний на людях, дальнейшее изучение безопасности фармакологического средства в соответствии с требованиями GCP (Good Clinical Practice). Принципы GCP могут быть использованы на всех фазах.



Фаза 4 — Пострегистрационные исследования. Изучение лекарственного средства после его регистрации и поступления на рынок. Применение препарата контролируется в соответствии с процедурами фармаконадзора.

На первые три фазы изучения уходит приблизительно 10 лет.

Всемирная организация здравоохранения подготовила специальные руководства по обеспечению качества производства лекарств GMP (Good Manufacturing Practice) и клинических испытаний GCP. Однако до недавнего времени не существовало таких рекомендаций в отношении изучения препаратов на доклинической фазе.

Что такое GLP?

По определению ВОЗ, «Хорошая лабораторная практика (GLP)» — это система, обеспечивающая качественную организацию и проведение доклинических исследований безопасности ЛС. Эти исследования должны соответствующим образом планироваться, контролироваться, документироваться и представляться.

Цель принципов GLP — внедрение в практику тестов по оценке качества и приёмов менеджмента, касающихся проведения исследований, предоставления полученной информации и её архивирования.

Принципы GLP — это, по существу, сбранные воедино критерии, которые обеспечивают получение достоверных данных о качестве, надёжности и воспроизводимости исследований, а также сделанных заключениях. Согласно принципам GLP необходимо распределение ролей и ответственности персонала для улучшения операционного менеджмента каждого исследования и фокусирования на тех аспектах исследования, которые имеют особую значимость.

Принципы GLP распространяются на исследования, которые проводятся:

- ✓ не в клинике, в большинстве случаев на животных или *in vitro* и включают аналитические аспекты;
- ✓ для получения данных о свойствах и/или безопасности тестируемых субстанций для человека и/или окружающей среды;
- ✓ для регистрации или лицензирования тестируемых субстанций или любых других продуктов, производных от этих субстанций.

В целом, требования GLP (с учётом национальных законодательств), предъявляемые к доклиническим испытаниям, проводимым с целью безопасности ЛС, включают определение:

- ✓ токсичности разовой дозы;
- ✓ токсичности повторных дозировок (подострой или хронической);
- ✓ токсичности в отношении репродуктивных функций (фертильность, эмбриотоксичность, пери-/постнатальная токсичность);
- ✓ мутагенного потенциала;
- ✓ канцерогенного потенциала;
- ✓ токсикокинетики;
- ✓ потенциальных побочных эффектов, выявленных в результате проведения фармакодинамических исследований;
- ✓ местной толерантности, включая фототоксичность, реакции раздражения и сенсибилизацию;
- ✓ выявление аддитивных эффектов или эффектов отмены.

История GLP

Формальная концепция «GLP» впервые была выдвинута в США в 70-е годы в связи с необходимостью иметь достоверные доклинические данные о безопасности ЛС, которые предоставлялись в Агентство по контролю пищевых продуктов и лекарств (FDA — Food and Drug Administration) для получения разрешения на применение новых лекарственных препаратов. Практика требовала проведения инспекции исследований и условий постановки

опытов, методов ведения документации и полученных результатов и поиска подлогов. Например, подмена погибших животных на новых (которых не лечили испытываемым средством) без внесения этих данных в документацию; взятие гематологических данных от животных контрольной группы, не связанных с испытанием; уничтожение результатов аутопсии; исправления в несоответствии первичных и финальных данных и т.д.

Перечисленные недочёты и реально существующие трудности в работе на этом этапе изучения ЛС явились основанием для подготовки в 1976 году FDA предложений по требованиям, предъявляемым к GLP, которые затем дополнялись и совершенствовались (1978, 1980 гг.).

В 1981 году Экспертная группа Агентства по экономической кооперации и развитию (ОЭКР) сформулировала первые предложенные принципы GLP, которые были одобрены комитетом ОЭКР. В последующем проводились дальнейшие согласования и доработки этих предложений и через 15 лет использования первого варианта руководства странами-участниками ОЭКР в ноябре 1997 года были подготовлены финальные документы GLP, одобренные международной группой экспертов.

В ноябре 1999 года в Женеве был поставлен вопрос о необходимости издания руководства ВОЗ по внедрению принципов и требований так называемой «хорошей лабораторной практики (GLP)». Вто-

рая подобная встреча экспертов состоялась в сентябре 2000 года. В результате были намечены планы и конкретные мероприятия, которые легли в основу создаваемого документа. Данный документ был подготовлен экспертной группой ВОЗ в 2001 г.

Руководство ВОЗ по GLP включало в себя представления о:

- фундаментальных основах GLP,
- необходимых ресурсах,
- правилах проведения исследований, включающих понятия «протокол», «стандартные рабочие процедуры»,
- тестовых характеристиках,
- ведении и хранении документации,
- страховании и инспекции,
- путях внедрения GLP.

Принципы GLP, в основном, применимы к планируемым исследованиям, которые проводятся в лабораториях фирм-производителей, институтов или правительственных лабораториях.

GLP напрямую не связана с научным дизайном исследований. Однако следование принципам GLP позволяет избежать многих систематических ошибок и неопределённостей. Требование GLP – планировать предстоящие исследования с определением научной цели, способствует профилактике некорректного начала и снижению числа незавершённых и нерезультативных исследований.

Применение принципов GLP, в конечном итоге, косвенным образом оптимизирует научную основу подобных исследований.

INTRODUCTION TO GLP

E.V. Braitseva

The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

The idea of fundamental basis and principals of GLP and the history of it's creation were described.

Key words: Good Laboratory Practice, preclinical trails, principals of GLP.



НАШ БЕСТИАРИЙ

Бестиариями (от латинского слова *bestia*, что означает «зверь») в Средние века и в эпоху Возрождения называли зоологические энциклопедии, описывавшие известных в те времена животных, как существующих, так и фантастических. Также именовались зверинцы, где демонстрировали экзотических тварей и монстров: мутантов (белых мышей, белых хорьков-фурос), особей с врождёнными или приобретёнными уродствами (двухголовых цыплят, бородатых женщин, жертв компрачикосов) и просто фальсификаты, вроде «женщины с рыбьим хвостом» или единорога.

Стихи, анекдоты, шутки и изюшки о животных, лабораторных, домашних, диких и прочих (к прочим принадлежит *Homo sapiens*, поскольку он является лабораторным видом для эволюции, домашним – так как обитает в домах, и диким, если судить по его отношению к природе и себе подобным). Приветствуется поэтическое, прозаическое и изобразительное творчество в лёгком жанре наших авторов и читателей (можно под псевдонимами).

Мыши

В нашем доме мыши поселились,
И живут, живут!
К нам привыкли, ходят, расхрабрились,
Видны там и тут.
То клубком катаются пред нами,
То сидят, глядят;
Возятся безжалостно ночами,
По углам пищат.
Утром выйдешь в зал – свечу объели,
Масло в кладовой,
Что поменьше – утащили в щели...
Караул! Разбой!
Свалят банку, след оставят в тесте,
Их проказ не счастье...
Но так мило знать, что с нами вместе
Жизнь другая есть.

Валерий Брюсов

В хранилище кинофильмов мышь без удовольствия грызёт киноплёнку. Другая мышь спрашивает:

- Хороший фильм?
- Книжный вариант был лучше...

Директор научного института видит, что сотрудники в рабочее время болтаются по коридорам, сплетничают в курилке. Стал думать, как с этим бороться. Думал-думал и придумал. Привезли из зоопарка двух тигров, стали на время работы выпускать их в коридоры. Сотрудники сидят по кабинетам, трудятся, не смеют высунуться, работа кипит. Но вскоре заметили, что в институте стало грязно. Хватились – нет уборщицы, тигры съели. Ничего не поделаешь, надо возвращать зверей обратно. Вот везут хищников в зоосад, а старый тигр говорит молодому: «Дурак ты, Васька, дурак! Дёрнула ж тебя нелёгкая сожрать уборщицу! Я, вот, трёх научных сотрудников съел, и никто не заметил!»

Крыса спрашивает хомяка: «Скажи, хомяк, мы с тобой оба грызуны, но тебя люди кормят, холят, покупают для тебя уютный домик, а меня травят крысиным ядом, за что такая несправедливость?» — Хомяк подумал и ответил: «Знаешь, крыса, пожалуй, тебе пора сменить имидж-мейкера».





ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» принимает к рассмотрению статьи обзорного, экспериментального и учебно-методического плана по всему спектру проблем, представляющих интерес для этой науки. Принимаются работы, имеющие методологическое значение, касающиеся доклинических и клинических испытаний лекарственных препаратов; работы по сравнительной репрезентативности экспериментов, выполненных на классических и альтернативных биологических объектах. В приоритетном порядке публикуются статьи, посвящённые биологическому, математическому и гибриднему моделированию, использованию лабораторных животных в биомедицинских исследованиях, включая вопросы систематики видов, истории их выведения, генетики, селекции, а также описания генетических и биологических коллекций. Рассматриваются проблемы выбора адекватного для целей эксперимента вида, числа, и генотипа животных; поддержания и контроля их здоровья. Особое внимание уделяется статьям, отражающим вопросы подготовки животных к экспериментам, проведению последних в соответствии с требованиями ВОЗ и российских нормативов.

Рубрикация журнала

1. Обзоры — обзоры научной литературы по темам, соответствующим профилю журнала, методологические статьи (максимальный объём рукописи — до 12 стр.).
2. Оригинальные статьи — труды, отражающие результаты завершённых исследований (до 10 стр.).
3. Краткие сообщения — завершённые фрагменты работ, представляющие самостоятельный интерес (до 4 стр.).
4. Практикум — учебно-методический раздел, где помещаются описания используемых в биомедицине методик, новых технологий (до 6 стр.).
5. Нормативные документы — отечественные и международные стандарты и законодательные акты, регламентирующие использование лабораторных животных в экспериментах (до 3 стр.).

Общие требования к оформлению

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала, 2) название статьи, 3) инициалы и фамилии авторов, 4) учреждение, в котором была проведена работа, город или населённый пункт. Статью следует представлять в двух экземплярах. К ней должна прилагаться дискета 3,5" с текстом, набранным в программе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, кегль 12, на одной стороне листа с интервалом 1 между строками и полями 2,5 см со всех сторон. Латинские названия видов должны быть выделены курсивом. В конце статьи должны быть собственноручные подписи всех авторов. Нумерация страниц — сверху по центру (на первой странице номер не проставляется). На отдельных листах печатаются реферат (не более 250 слов) и Summary (на англ. яз.) со списками ключевых слов (не более 6). Также на отдельном листе указывают фамилию, имя, отчество автора, осуществляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты. К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу. Статьи, написанные по результатам экспериментальных исследований, должны (если это возможно) строиться по схеме: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Литература». Для работ, предназначенных для рубрики «Краткие сообщения» раздел «Обсуждение результатов» необязателен, а количество литературных ссылок должно быть минимальным. Форма изложения обзорных и теоретических статей — свободная. В соответствии с требованиями Международного Комитета по исследованиям на лабораторных животных (ICLAS) представляемые статьи в разделе «Материалы и методы» должны содержать следующую информацию: 1. Биологический вид 2. Пол 3. Возраст 4. Генетический статус животных: инбредные, конгенно-резистентные линии, мутантные стоки; гибриды F1, F2, сложные гибриды; рандомбредные (генетически контролируемые популяции нелинейных, или аутбредных животных), популяции; генетически модифицированные организмы (трансгенные, нокаутные); источник разведения животных. 5. Микробиологический статус: гнотобиоты; SPF, конвенциональные. 6. Условия содержания животных во время эксперимента: изолятор, барьерная система, тип клеток (конструкция, размеры), подстилочный материал, количество животных в клетке, тип корма и качество воды, температура, влажность (при необходимости). 8. Выведение животных из эксперимента.



Статистическая обработка результатов и таблицы

Таблицы должны содержать только обобщённые и статистически обработанные материалы исследования. Следует указать метод обработки результатов и необходимые для расчётов исходные данные. Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Таблицы, пронумерованные и озаглавленные, печатаются на отдельных листах, а в тексте в круглых скобках дается ссылка на них, например: (см. табл. 1).

Иллюстративный материал

Рисунки и фотографии прилагаются к статье в двух экземплярах. Не следует приводить на них лишние обозначений и надписей. Иллюстрации не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них должны сопровождаться пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке их упоминания в тексте. На обороте каждого рисунка или фотографии должны быть указаны (карандашом) фамилии авторов, название статьи, номер рисунка, «верх». Подписи к рисункам даются общим списком на отдельной странице. Для микрофотографий следует указать способ фиксации образцов и увеличение. На полях рукописи должны быть проставлены (карандашом) номера таблиц и рисунков напротив тех мест в тексте, где желательно их поместить. Требования иллюстрациям на дискетах или компакт-дисках: а) черно-белая графика — разрешение: не менее 600 точек на дюйм, формат: EPS или TIFF; б) полутоновые и цветные изображения — разрешение не менее 300 точек на дюйм, формат EPS или TIFF; в) диаграммы и графики (векторные изображения) предоставляются в собственном формате программы Adobe Illustrator, FreeHand или CorelDraw или в формате EPS с приложением исходных (табличных) данных, по которым построены графики/диаграммы.

Сокращения

Помимо общепринятых, допускается использование не более 3 сокращений терминов, с обязательным указанием полного названия (в скобках) при первом упоминании в тексте.

Литература

Цитируемая в статье литература приводится общим списком в конце статьи в алфавитном порядке (вначале на русском, затем на иностранных языках). Ссылки на цитируемую литературу в тексте статьи отмечаются порядковым номером работы в списке литературы, заключённым в квадратные скобки. Фамилии иностранных авторов указываются (если это необходимо) в тексте на русском языке, при первом упоминании также приводится их написание на языке оригинала в круглых скобках. В списке литературы приводятся — для книг: фамилии и инициалы всех авторов, название, место издания, название издательства, год издания, цитируемые страницы, либо общее количество страниц в книге (если текст статьи содержит несколько ссылок на данную книгу). для главы (статьи) в книге: фамилии и инициалы всех авторов главы, название главы, название книги, фамилии и инициалы редакторов, место издания, название издательства, год издания, первая и последняя страницы главы; для статьи в журнале: фамилии и инициалы всех авторов, название статьи, наименование журнала, год, том (выпуск), номер, первая и последняя страницы статьи.

Корректурa

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право производить редакционные изменения и сокращения, а также переносить статьи в другие рубрики. Все рукописи направляются на внешнее рецензирование. За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается. После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

Рукописи направлять по адресу:
143332 Московская обл., Красногорский р-н,
п/о Отрадное, пос. Светлые Горы, ГУ НЦБМТ РАМН,
редакция журнала «Биомедицина».
Электронный адрес ГУ НЦБМТ РАМН: res.c.bmt@mail.ru
Телефоны редакции: 561-52-64; 917-32-17

Научный центр биомедицинских технологий Российской академии медицинских наук

В соответствии с Постановлением 11 (74) сессии Общего собрания РАМН «Медицинские проблемы биобезопасности», в целях развития биологической медицины, экспериментального биомоделирования, противодействия биотерроризму и создания новых средств биозащиты, постановлением Президиума РАМН от 29 мая 2002 года организовано Государственное учреждение Научный центр биомедицинских технологий РАМН (далее Центр). Директором Центра был назначен член-корреспондент РАМН, профессор Н.Н. Каркищенко. В состав Центра вошли филиал «Андреевка» (директор К.В. Афонин) и филиал «Столбовая» (директор С.В. Титов). В 2005 году в состав Центра вошел филиал «Клиническая фармакология» (директор академик РАМН В.Г. Кукес).

В качестве приоритетных направлений Центра Российской академией медицинских наук определено создание научно-методологических основ биомедицины и биологического моделирования, перспективных биосистем для обеспечения фундаментальных медико-биологических исследований, сертификации, контроля качества и оценки биобезопасности лекарств и различных ксенобиотиков, сохранение генетических ресурсов животных-биомоделей, клеточные технологии и репродукция тканей для биопротезирования. Важными направлениями деятельности Центра являются разработка принципов GLP на межвидовых и внутривидовых линиях инбредных животных, а также фармакогеномика человека и животных. Задачами Центра являются:

- ✓ проведение фундаментальных исследований в области биомедицины — междисциплинарного научного направления с целями конструирования генетических (природных) и экспериментальных биомоделей для выяснения молекулярных, клеточных и системных механизмов поддержания здоровья и формирования нездоровья как биологических категорий;
- ✓ исследование фундаментальных механизмов, обеспечивающих генетическую стабильность и аутентичность лабораторных животных по генам тканевой совместимости;
- ✓ выяснение механизмов инбридинга в целях скрининга высокочувствительных и оппозитных линий лабораторных животных-биомоделей патологий человека и для GLP;
- ✓ исследование фундаментальных механизмов создания трансгенных и нокаутных линий животных и получения на их основе биотрансплантатов и биопротезов;
- ✓ изучение молекулярных механизмов формирования биозащиты человека и создание биомоделей неблагоприятных воздействий для поиска протекторов в ряду пиримидинов, цитокинов, пептидов и иных биорегуляторов;
- ✓ разработка научных основ создания принципиально новых молекулярных генно-инженерных вакцин и иммуотропных препаратов;
- ✓ изучение физико-химических и биологических свойств бета-лизинов бактериофагов с целью конструирования новых средств защиты;
- ✓ разработка и внедрение методов и медицинских технологий, повышающих эффективность и безопасность терапии лекарственными средствами, включая экстраполяционные подходы в исследованиях фармакогеномики и биоэквивалентности.

Решение этих вопросов выходит за пределы чисто технологических проблем и ориентировано прежде всего на исследование фундаментальных процессов в области биомедицины как научного направления, интегрирующего различные аспекты биологической науки в интересах медицины и здравоохранения. В практическом плане эти работы требуют использования различных видов линейных животных и альтернативного биомоделирования.