Generium
Pharmaceutical

ГЕНЕРИУМ – российская компания, которая уверенно занимает лидирующие позиции в области биотехнологических разработок и производства. Мы являемся основным российским производителем биотехнологических препаратов для лечения гемофилии, туберкулеза, рассеянного склероза, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. ГЕНЕРИУМ - это единственный в России биотехнологический научный центр мирового уровня и инновационное производство полного цикла, организованное по международным стандартам GMP. Технопарк ГЕНЕРИУМ расположен во Владимирской области, где создана вся необходимая инфраструктура для работы и жизни учёных мирового уровня.

Научно-исследовательское подразделение технопарка – ООО «МБЦ «Генериум» разрабатывает биотехнологические лекарственные препараты и клеточные технологии до этапа промышленного применения. Оснащение компании и компетенции сотрудников позволяют получить практически любой рекомбинантный белок, моноклональное антитело и клеточный продукт, пригодные для промышленного производства, для проведения доклинических и клинических исследований.

generium.ru
ibcgenerium.ru



ОГЛАВЛЕНИЕ

I. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИМАТОВ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ. 20

I. PROSPECTIVE TRENDS IN THE USE OF PRIMATES IN BIOMEDICAL EXPERIMENTS 20

Вступительное слово 20
акад. РАН Лапин Б.А. 20
ФГБНУ «НИИ Медицинской приматологии», Сочи, Россия 20

opening of the conference 24
acad. RAS Lapin B.A. 24
FSBSI “Research Institute of Medical Primatology”, Sochi, Russia 24

International Importation and Use of Nonhuman Primates in Research in the United States 28
Pamela R. Ferguson 28
President, Paris nhp 28
Edmonds, Washington, USA 28

К ПОБЕДЕ НАД СПИД - СИНИЦА В РУКАХ ИЛИ ЖУРАВЛЬ В НЕБЕ? 34
Воеводин А.Ф. 34
Vir&Gen, Торонто, Канада 34

TOWARDS DEFEATING AIDS – A BIRD IN THE HAND OR TWO IN THE BUSH? 35
Voevodin A. 35
Vir&Gen, Toronto, Canada 35

ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ ОРИГИНАЛЬНОГО АНКСИОЛИТИКА НА ОСНОВЕ ЭНДОГЕННОГО ТЕТРАПЕПТИДА ХОЛЕЦИСТОКИНИНА НА ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИМАТАХ 37
Колик Л.Г., Середенин С.Б. 37
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова» 37
125315, Балтийская ул., 8, Москва, Россия 37
Список литературы 39

STUDY OF NOVEL ANXIOLYTIC DEVELOPED ON THE BASE OF ENDOGENOUS TETRAPEPTIDE CHOLECYSTOKININ: NEW PERSPECTIVES FOR LABORATORY PRIMATES 40
Kolik L.G., Seredenin S.B. 40
Federal State Budgetary Research Institution «Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov»,
8 Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russian Federation. 40
References 42

РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИИ АКАДЕМИКА Н.П. БОЧКОВА О МУТАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ У ЧЕЛОВЕКА 42
Воронина Е.С. 42
ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», г. Москва, Россия 42
Резюме 42

Development of academician N.P. Bochkov’s concept of the mutation process in human beings 43
Voronina E.S. 43
FSBSI “Research centre of medical genetics”, Moscow, Russia 43
Abstract 43

Список литературы 49

Формирование европейских регуляторных правил использования обезьян при изучении лекарственных кандидатов 51
Хамитов Р.А., Салимов Р.М. 51
ООО «МБЦ «Генериум», пос. Вольгинский, Владимирская обл., Россия 51
Резюме 51

Formation of European regulatory rules for the use of monkeys in studies of drug candidates 53
Khamitov R.A., Salimov R.M. 53
LLC "IBC" Generium ", Volginskiy, Vladimir region., Russia 53
Abstract 53

Организация и проведение неклиических исследований в соответствии с принципами GLP на приматах. 60
Мурашев А.Н. 60
ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (Филиал), Пущино, Россия 60
Резюме 60

ORGANIZATION AND CONDUCT OF NON-CLINICAL STUDIES IN ACCORDANCE WITH THE PRINCIPLES OF GLP ON PRIMATES 61
Murashev A.N. 61
Shemyakin&Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Branch) RAS, Pushchino, Russia 61
Abstract 61

О ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛИНИКО-ВЕТЕРИНАРНОГО ОТДЕЛЕНИЯ. ЗАБОЛЕВАНИЯ ОБЕЗЬЯН, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ ПРИ ИХ СОДЕРЖАНИИ В НЕВОЛЕ В УСЛОВИЯХ АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА ФГБНУ «НИИ МП» 69
Т.Е.Гвоздик, П.А.Капланян, Л.И.Холодилова, И.И.Чугуева, Е.В.Черкашина 69
ФГБНУ «НИИ Медицинской приматологии», Сочи, Россия 69
Резюме 69

THE PRACTICE OF VETERINARY CLINICAL DEPARTMENTS. DISEASES OF NONHUMAN PRIMATES THE MOST COMMON IN ADLER MONKEY COLONY OF THE FSBSI "RIMP" 69
T.E.Gvozdik, P.A.Kaplanyan, L.I.Kholodilova, I.I.Chugueva, and E.V.Cherkashina 69
FSBSI “RIMP”, Sochi-Adler, Russia 69
Abstract 69

СОВРЕМЕННЫЕ МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИНВОЛЮЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ ДЕРМЫ .. 76
Фридман Наталья Владимировна [1,2], д. м. н., профессор Трофимова Светлана Владиславовна [1], Деби Вински (Deby Vinski) [3] 76
1-АНО НИЦ « Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Россия, г. Санкт-Петербург 76
2-Клиника «АртМедиЯ», Россия, г. Санкт-Петербург 76
3-Клиника эстетической и антивозрастной медицины, Индонезия, Джакарта (Beauty aesthetic&anti - aging clinic,Indonesia, Jakarta) 77
Резюме 77

MODERN MEDICINE TECHNOLOGIES, INFLUENCING INVOLUTIONAL PROCESSES OF DERMA 77
Fridman Natalia Vladimirovna [1,2], M. D., professor Trofimova Svetlana Vladislavovna [1], Deby Vinski [3] 77
Abstract 77
Список литературы 80

ВОСПРОИЗВОДИМЫЕ ПИКИ НА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ КРИВЫХ СМЕРТНОСТИ МЫШЕЙ КАК ПЕРСПЕКТИВА ДЛЯ ПОИСКА АНАЛОГИЧНЫХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ У ПРИМАТОВ 81
Малыгин А. Г. 81
Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия 81
Резюме 81

THE REPRODUCIBILITY OF PEAKS ON DIFFERENTIAL CURVES OF MICE MORTALITY AS A PERSPECTIVE BASIS FOR THE SEARCH FOR A SIMILAR PHENOMENON IN PRIMATES 84
Malygin A.G. 84
A.N. Bach Institute of Biochemistry, FRC of Biotechnology, Moscow, Russia 84
Abstract 84
Список литературы 93

II. ИНФЕКЦИОННАЯ ПАТОЛОГИЯ. ИММУНОЛОГИЯ 94

***II. INFECTIOUS PATHOLOGY. IMMUNOLOGY* 94**

SPF RHESUS MACAQUE PRODUCTION AND REFINEMENT 94
Roberts JA (CNPRC, UC Davis, USA), Yee JL (CNPRC-Pathogen Detection Laboratory, UC Davis, USA), , Short JJ (CNPRC, UC Davis, USA), Kanthaswamy S (Arizona State University USA), Van Rompay KKA (CNPRC, UC Davis, USA), Hartigan-O’Connor D (CNPRC, UC Davis, USA), Ardeshir A (CNPRC, UC Davis, USA), Torres-Penedo C (Veterinary Genetics Laboratory, UC Davis, USA) Barry PA (Center for Comparative Medicine/CNPRC, UC Davis, USA) jaroberts@ucdavis.edu 94
Funding: This work was supported by NIH grants: CNPRC- P51 OD011107 and U42 OD010990 94
References/Literature Cited 99

CHAGAS DISEASE: VALUE OF NONHUMAN PRIMATES FOR DEVELOPING AND TESTING DRUGS AND VACCINES 100
VandeBerg, J.L. South Texas Diabetes and Obesity Institute and Department of Biomedical Sciences, School of Medicine, The University of Texas Rio Grande Valley, Brownsville/Harlingen/Edinburg, TX, U.S. 100
Contact details: John l. VandeBerg, Ph.D., One West University Blvd., UTRGV – STDOI Modular Bldg. Brownsville, TX 78520, U.S.; john.vandeberg@utrgv.edu; phone 1-210-859-3711. 100
References 102

ИММУНОГЕННОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ЖИВОЙ КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНЫ НА МОДЕЛИ ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАКА РЕЗУС 103
Медкова А.Ю.[*], Синяшина Л.Н.[*], Амичба А.А.[*], Шевцова З.В.[**], Матуа А.З.[**], Семин Е.Г.[*], Лядова И.В.[*], Цыганов Е.Н.[*], Конджария И.Г.[**], Баркая В.С.[**], Миквабиа З.Я.[**], Каратаев Г.И.[*] 103
[*]ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи Министерства здравоохранения России, Москва, Россия 103
[**]НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия 103
Резюме 103

IMMUNOGENICITY AND SAFETY OF LIVE PERTUSSIS VACCINE ON A MODEL OF RHESUS MONKEY SPECIES 104
Medkova A.Yu.*, Sinyashina L.N.*, Amichba A.A.**, Shevtsova Z.V.**, Matua A.Z.**, Semin E.G.*, Ljadova I.V.*, Cygankov E.N.*, Kondzariya I.G.**, Barkaya V.S.**, Mikvabia Z.Ya.**, Karataev G.I.* 104
* Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow 104
** Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum 104
Abstract 104
Список литературы 111

ИНСЕРЦИОННАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ОПЕРОНА ВИРУЛЕНТНОСТИ В ПОПУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОКЛЮША ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИМАТОВ 111

Г. И. Каратаев*[1], , Л. Н Синяшина[1], А. Ю. Медкова[1], Е.Г. Сёмин[1], З.В. Шевцова[2], А.З. Матуа[2], И.Г. Конджария[2], А.А. Амичба[2], Д.Т. Кубрава[2], З.Я. Миквабиа [2] 111

[1]Федеральное Государственное Бюджетное учреждение научно – исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098, e.mail: info@gamaleya.org 111

[2]Научно исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Академии Наук Абхазии, Абхазия, Сухум, e.mail: niiepit@rambler.ru 111

Резюме 112

INSERTIONAL INACTIVATION OF BVG VIRULENT OPERON IN PERSISTENCE BACTERIA POPULATION IN NON – HUMAN PRIMATES EXPERIMENTAL INFECTION 112

G. I. Karataev[1*], L. N. Sinyashina[1], A. Yu. Medkova[1], E. G. Semin[1], Z. V. Shevtsova[2], A. Z. Matua[2], I. G. Kondzariya[2], A. A. Amichba[2], D. T. Kubrava[2], Z. Ya. Mikvabia[2] 112

[1] Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation 112

[2] Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum 112

Abstract 113

Список литературы 119

О СПОНТАННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ КОКЛЮША ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ 120

Матуа А.З.[*], Шевцова З.В.,[*] Амичба А.А.[*], Кубрава Д.Т.*, Конджария И.Г.*, Медкова А.Ю.**, Семин Е.Г**, Синяшина Л.Н.**, Баркая В.С.*, Миквабия З.Я.*, Каратаев Г.И.** 120

* НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии Наук Абхазии, Сухум, Абхазия 120

[**]ФГБУ«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. 120

Резюме 120

ON SPONTANEOUS INFECTION OF HAMADRYAS BABOONS WITH BORDETELLA PERTUSSIS 121

Matua A.Z.[*], Shevtsova Z.V.[*], Amichba A.A.[*], Kubrava D.T.*, Kondzariya I.G.*, Medkova A.Yu.**, Semin E.G.**, Sinyashina L.N.**, Barkaya V.S.*, Mikvabia Z.Ya.*, Karataev G.I.** 121

[*] Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the 121

Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia 121

[**] FSBI «N.F. Gamaleya Federal Scientific Research Center for Epidemiology and Microbiology» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia. 121

Abstract 121

Список литературы 127

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА МАКАК КАК МОДЕЛЬ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК ЧЕЛОВЕКА 127

Лапин Б.А.*, Шевцова З.В.** 127

*НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия 127

** НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия 128

Резюме 128

EXPERIMENTAL hemorrhagic fever OF MACAQUES AS A MODEL OF HUMAN hemorrhagic fever 129

Lapin B.A.*, Shevtsova Z.V.** 129

* FSBSI “Research Institute of Medical Primatology”, Sochi-Adler, Russia 129

** Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia 129

Abstract 129

Список литературы 136

ПОЛИМОРФИЗМ ОНКОГЕНА *LMP1* В ШТАММАХ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР, ПЕРСИСТИРУЮЩИХ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ 139

Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. 139

ФГБУ «РОНЦ им Н.Н.Блохина» Минздрава России, Москва, РФ 139

Резюме 139

LMP1 ONCOGENE POLYMORPHISM IN EPSTEIN-BARR VIRUS STRAINS PERSISTING AMONG THE POPULATION OF THE RUSSIAN FAR EAST 141

Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevitch V.E. 141

FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia 141

Abstract 141

Список литературы 149

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОБЕЗЬЯНАХ 149

Давыдкин В.Ю.*, Лапин Б.А.**, Мелихова А.В.*, Джикидзе Э.К.**, Давыдкин И.Ю.*, Кебу Т.И.**, Климова Э.В.* **, Холодилова Л.И.** 149

* ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия 150

** ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия 150

*** МИРЕА (институт МИТХТ), Москва, Россия 150

Резюме 150

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFICACY OF THE DRUG COMBINATIONS ON MONKEYS 152

Davydkin VU *, Lapin BA **, Melikhova AV *, Dzhikidze EK **, Davydkin IU *, Kebu TI **, Klimova EV***, Holodilova LI. ** 152

* FBRI Gabrichevskiy’ MRIEM, Moscow, Russia 152

** FSBSI Institute of Medical Primatology (RIMP), Sochi, Russia 152

*** The Institute of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia 152

Abstract 152

Список литературы 158

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОКЛЮША на ОБЕЗЬЯНах СТАРОГО СВЕТА. 159

Кубрава Дж.Т.[*], Синяшина Л.Н.[**], Матуа А.З.[*], Амичба А.А.[*], Шевцова З.В.[**], Семин Е.Г.[**], Медкова А.Ю.[**], Конджария И.Г.[*], Елистратова Ж.В.[*], Баркая В.С.[*], Миквабия З.Я.[*], Каратаев Г.И.[**] 159

[*]НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия 159

[**]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. 159

Резюме 159

MODELING PERTUSSIS ON THE OLD WORLD MONKEYS 160

Kubrava D.T.[*], Sinyashina L.N.[**], Matua A.Z.[*], Amichba A.A.[*], Shevtsova Z.V.[**], Semin E.G.[**], Medkova A.Yu.[**], Kondzariya I.G.[*],Elistratova Zh.V.[*], Barkaya V.S.[*], Mikvabia Z.Ya.[*], Karataev G.I.[**] 160

[*] Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia 160

[**] FSBI «N.F. Gamaleya Federal Scientific Research Center for Epidemiology and Microbiology» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia. 161

Abstract 161

Список литературы 165

ДЕТЕКЦИЯ ЭНТЕРОВИРУСА И НОРОВИРУСА У ОБЕЗЬЯН АДЛЕРСКОГО ПРИМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА... 166
Кебурия В.В., Корзая Л.И., Агумава А.А., Догадов Д.И., Гончаренко А.М. ... 166
ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия ... 166
Резюме ... 166

DETECTION OF ENTEROVIRUS AND NOROVIRUS IN ADLER PRIMARE CENTER MONKEYS ... 167
Keburiya V.V., Korzaya L.I., Agumava A.A., Dogadov D.I., Goncharenko A.M. ... 167
FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia ... 168
Abstract ... 168
Список литературы ... 172

ОЦЕНКА НАЛИЧИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ОБЕЗЬЯН, ЗАВОЗИМЫХ В РОССИЮ ... 174
Алексеев А.Ю.*'***, Баранов А.В.**, Рихтер В.А.***, Шестопалов А.М.* ... 174
* ФГБНУ Научно исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск, Россия ... 174
** Общество с ограниченной ответственностью «Амазония Зоо», Москва, Россия ... 174
*** ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия ... 174
Резюме ... 174

ASSESSMENT OF THE PRESENCE OF INFECTIOUS DISEASES IN MONKEYS IMPORTED TO RUSSIA ... 175
Alekseev A. Yu.*,***, A.V. Baranov**, Richter V. A.***, Shestopalov A. M.* ... 175
* Federal State Budget Scientific Organization Research Institute of experimental and clinical medicine, Novosibirsk, Russia ... 175
** The limited liability company "Amazonia Zoo, Moscow, Russia ... 175
*** Institute of chemical biology and fundamental medicine, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia ... 175
Abstract ... 175
Список литературы ... 180

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МИКОПЛАЗМ У ОБЕЗЬЯН, ПРИВЕЗЕННЫХ ИЗ МЕСТ ЕСТЕСТВЕННОГО ОБИТАНИЯ. 182
Аршба И.М [*], Раковская И.В [**]., Бархатова О.И.**, Левина Г.А. [**], Горина Л.Г. **, Гамова Н.А.**, Гончарова С.А. [**] ... 182
[*]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», г. Сочи ... 182
[**]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», г. Москва ... 182
Резюме ... 182

INCIDENCE OF MYCOPLASMA INFECTION AMONG MONKEYS INPORTED FROM THE WILD ... 183
I.M. Arshba[1], I.V. Rakovskaya[2], O.I. Barkhatova[2], G.A. Levina[2], L.G. Gorina[2], N.A. Gamova[2], S.A. Goncharova[2] 183
[1]FSBSI "Institute of Medical Primatology," Sochi, Russia ... 183
[2]FSBRI "N.F. Gamalei Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Moscow, Russia ... 183
Abstract ... 183

III. ИНФЕКЦИОННАЯ ПАТОЛОГИЯ, ИММУНОЛОГИЯ. ... 190

***III. INFECTIOUS PATHOLOGY. IMMUNOLOGY* ... 190**

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИМАТОВ. ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ. ... 190
Корзая Л.И., Догадов Д.И., Нарышкина А.А., Кебурия В.В., Лапин Б.А. ... 190
ФГБНУ НИИ медицинской приматологии. Россия. Сочи. ... 190
Резюме ... 190

THE ETIOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF LABORATORY PRIMATES VIRAL INFECTIONS. ... 191
Korzaya L.I., Dogadov D.I., Naryshkina A.A., Keburiya V.V., Lapin B.A. ... 191
FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia. ... 191
Abstract ... 191
Список литературы ... 199

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГЕРМАНИЯ В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТА. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПРИМАТАХ ... 200
Лаврентьева И.Н[1]., Семенов А.В[1]., Агрба В.З., [2,] Карал-оглы Д.Д., [2] Амбросов И.В. [3] Чугуева И.И., Гварамия И.А., Чугуев, Тотолян А.А.[1] ... 200
[1] ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия ... 200
[2] ФГБНУ «НИИ МП», Адлер-Сочи, Россия ... 200
[3] ООО «ВДС Фарма», Москва, Россия ... 200
Резюме ... 200

THE USE OF GERMANIUM-BASED FORMULATION AS AN ADJUVANT. THE EXPERIMENTAL STUDY ON PRIMATES. ... 202
Lavrent'eva I.N[1]., Semenov A.V[1]., Agrba VZ[2], Karal-ogly DD[2], Ambrosov IV[3] Chugueva II[2], Gvaramia IA[2], Chuguev UP[2], Totolian AA[1] ... 202
1 FSBI Institute of Epidemiology and Microbiology, Pasteur, Saint-Petersburg, Russia ... 202
2 FSBSI "RIMP" Adler-Sochi, Russia ... 202
3 "VDS Pharma" company, Moscow, Russia ... 202
Abstract ... 202
Список литературы ... 208

КОМПЛЕКСНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ КАК СРЕДСТВА ТЕРАПИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ... 208
Новикова Л.И., Алешкин В.А., Волков А.В., Лютов А.Г., Матвеевская Н.С., Панурина Р.Л., Зуева М.М., Бочкарева С.С., Синчугова Т.В. ... 208
ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского, Москва, Россия ... 208
Резюме ... 209

COMPLEX IMMUNOGLOBULIN PREPARATIONS FOR TOPICAL APPLICATION AS A MEAN OF THERAPY OF BACTERIAL AND VIRAL INFECTIONS ... 209
Novikova L. I., Aleshkin V. A., Volkov A. V., Lyutov A. G., Matveevskaya N. S., Panurina R. L., Zueva M. M., Bochkareva S. S., Synchugova T. V. ... 209
G.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia ... 209
Abstract ... 209

Иммунные и патофизиологические процессы у бабуинов экспериментально зараженных вирусом Эбола (ВЭ), адаптированным к морским свинкам ... 214
А.А.Чепурнов*, А.М.Шестопалов**, Г.М.Игнатьев** ... 214
* ФГБНУ "НИИ фундаментальной и клинической иммунологии" СО РАН, Новосибирск, Россия ... 214
** ФГБНУ "Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины", Новосибирск, Россия ... 214
Резюме ... 214

Immune and pathophysiological processes in baboons experimentally infected with Ebola virus (VE) adapted to guinea pigs ... 215
Chepurnov A.A.*, Shestopalov A.M.**, Ignat'ev G.M.** ... 215

* FSBSI “Institute of Clinical Immunology”, Siberian Branch, Academy of Sciences of Russia, Novosibirsk, Russia 215
** FSBSI “ Institue of Experimental and Clinical Medicine”, Novosibirsk, Russia 215
Abstract 215

ПЦР КАК ИНФОРМАТИВНЫЙ ТЕСТ В ДОКЛИНИЧЕСКОМ ИЗУЧЕНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВЫХ ВАКЦИН В ОПЫТЕ НА ОБЕЗЬЯНАХ МАКАКА-РЕЗУС 216
Шамсутдинова О.А.*, Лаврентьева И.Н.**, Агрба В.З.* 216
* ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия 216
** ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия 216
Резюме 216

PCR is an informative test in safety preclinical study of specific live vaccines in macaque rhesus 216
O.A.Shamsutdinova[1], I.N.Lavrent’eva[2], V.Z.Agrba[1] 216
[1]FSBSI Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia 216
[2] FBUN Institute of Epidemiology and Microbiology, Pasteur, Saint-Petersburg, Russia 217
Abstract 217
Список литературы 220

МИКОПЛАЗМЕННЫЕ ИНФЕКЦИИ И ИХ РОЛЬ В СПОНТАННОЙ ПАТОЛОГИИ ОБЕЗЬЯН 221
Аршба И.М.*, Раковская И.В.**, Горина Л.Г.**, Бархатова О.И.**, Левина Г.А.**, Гамова Н.А.**, Гончарова С.А.**, Агумава А.А.* 221
*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», г. Сочи 221
**ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», г. Москва 221
Резюме 221

MYCOPLASMA INFECTIONS AND THEIR ROLE IN SPONTANEOUS PATHOLOGY OF MONKEYS 222
I.M. Arshba[1], I.V. Rakovskaya[2], O.I. Barkhatova[2] , G.A. Levina[2], L.G. Gorina[2], N.A. Gamova[2], S.A. Goncharova[2] , A.A. Agumava[1] 222
[1]FSBSI "Institute of Medical Primatology," Sochi, Russia 222
[2]FSBI "N.F. Gamalei Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Moscow, Russia 222
Abstract 222

МАРКЕРЫ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ОБЕЗЬЯН, ИМПОРТИРОВАННЫХ В АДЛЕРСКИЙ ПРИМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР 228
Д. И. Догадов*, Л. И. Корзая*, К.К. Кюрегян**, А.А. Карлсен**, А.М. Гончаренко* 228
*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт Медицинской приматологии», Сочи 228
ФГБНУ **«Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова», Москва 228
Резюме 228

THE PRESENCE OF ENTERIC VIRUS INFECTION MARKES IN IMPORTED IN ADLER PRIMATE CENTER MONKEYS .. 229
D.I. Dogadov *, L.I. Korzaya *, K.K. Kyureghyan **, A.A. Carlsen **, A.M.Goncharenko * 229
* FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia 229
**FSBRI "M.P.Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis", Moscow, Russia 229
Abstract 229
Список литературы 234

ЛЯМБЛИОЗНАЯ ИНВАЗИЯ У НИЗШИХ ОБЕЗЬЯН В УСЛОВИЯХ НЕВОЛИ 235
Т.П. Егорова, Т.И. Кебу 235
ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, г. Сочи, Россия 235
Резюме 235

LAMBLIA INFESTATION OF MONKEYS LIVING IN THE ADLER COLONY 235
T.P. Egorova, T.I.Kebu 235
FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia 235
Abstract 235
Список литературы 240

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ COA- ГЕНА STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВЫДЕЛЕННЫХ У ОБЕЗЬЯН 241
Калашникова В.А. 241
ФГБУ «НИИ медицинской приматологии», Сочи, Россия 241
Резюме 241

COA-GENE GENETIC DIVERSITY OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ISOLATED FROM MONKEYS 242
V.A. Kalashnikova 242
FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia 242
Abstract 242

РАСШИФРОВКА ВСПЫШКИ ОСТРОГО ИНФЕКЦИОННОГО МИОКАРДИТА СРЕДИ ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА ОБЕЗЬЯН 246
Калайджян А.А.*, Агумава А.А.*, Альховский С.В.**, Щетинин А.М.**, Вишневская Т.В.**, Лапин Б.А.*, Вышемирский О.И.* 246
*ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии», Сочи, Россия. 246
**НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава Российской Федерации, Москва, Россия. 246
Резюме 246

DETECTION OF ACUTE INFECTIOUS MYOCARDITIS IN HAMADRYAS BABOO OF ADLER MONKEY COLONY 247
Kalaydzhyan A.A.*, Agumava A.A.*, Alkhovsky S.V.**, Shchetinin A.M.**, Vishnevskaya T.V.**, Lapin B.A.*, Vyshemirsky O.I.* 247
* FSBSI “Scientific Research Institute of Medical Primatology”, Sochi, Russia 247
** Institute of Virology, N.F. Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia 247
Abstract 247
Список литературы 252

4. КЛЕТОЧНАЯ МЕДИЦИНА. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ. 254

IV. CELL MEDICINE. CELL TECHNOLOGIES. STEMM CELLS. TRANSPLANTOLOGY AND ARTIFICIAL ORGANS 254

Induced pluripotent stem (iPS) cells for heart repair: Need for preclinical Primate Studies? 254
Ulrich Martin 254
Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO), Department for Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery, REBIRTH Cluster of Excellence, Hannover Medical School, Germany ... 254
Contact: Ulrich Martin, Hannover Medical School, Clinic for Cardiac, Thoracic, Transplantation and Vascular Surgery, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover 254
Phone: +49 511 532 8820, Fax: +49 511 532 8819 254
Email: martin.ulrich@mh-hannover.de 254
Abstract 254
Conclusions 258
References 258

Отработка транслокации мягкотканного васкуляризованного лицевого лоскута на приматах..... 259
Порханов В.А., Дикарев А.С., Богданов С.Б., Виноградов Р.А., Иващук Ю.В., Кочергина Е.В., Парамонова О.А., Павлов И.В., Савосин Ю.В..... 259
НИИ- Краевая клиническая больница №1, г. Краснодар, Россия..... 259
Резюме..... 259

Translocation of the soft-tissue vascularized facial flap on primates 260
Porkhanov V.A., Dikarev A.S., Bogdanov S.B., Vinogradov R.A., Ivashchuk Yu.V., Kochergina E.V., Paramonova O.A., Pavlov I.V., Savosin Yu.V. 260
The regional clinical hospital №1, Krasnodar, Russia..... 260
Abstract 260

Показатели функционирования физиологических систем организма обезьян после введения ДРЦ (Доксорубицина) и трансплантации стволовых клеток. 263
В.З.Агрба[1], Д.Д. Карал-оглы[1], С.Ш.Кальсина[2], Т.Е Гвоздик[1], П.А. Капланян [1], И.А.Гварамия[1], Е.И. Мухаметзянова[1], Ю.П.Чугуев[1], О.А.Шамсутдинова[1], И.Н.Клоц[1], В.А.Порханов[3], Д.Э. Аравиашвили[1] ,Б.А.Лапин[1] 263
[1] ФГБНУ «НИИ МП», г.Сочи, РФ..... 263
[2] МНРЦ им. А.Ф.Цыба МЗиСР , Обнинск,РФ 263
[3] Краевая клиническая больница им. Очаповского, Краснодар, РФ 263
Резюме..... 263

Parameters of monkey organism physiological system functioning after doxorubicin administration and stem cell transplantation 264
V.Z.Agrba[1], D.D. Karal-ogly[1], S.Sh. Kalsina[2], T.E. Gvozdik[1], P.A. Kaplanyan[1], I.A. Gvaramia[1], E.I. Muchametzianova[1], Y.P. Chuguev[1], O.A. Shamsutdinova[1], I.N. Klots[1], V.A. Porkhanov[3], D.E.Araviashvili[1], B.A. Lapin[1]..... 264
[1] FSBSI “RIMP”,Sochi, Russia 264
[2] A. Tsyb Medical Radiological Research Centre - branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia..... 264
[3] The regional clinical hospital №1, Krasnodar, Russia 264
Abstract 264
Список литературы 273

ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА МИОКАРДА МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ, ТКАНЕВОЙ И ОРГАННОЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ И ПРИМАТАХ 274
Петрова Е.С.[*], Агрба В.З.[**], Карал-оглы Д.Д.[**], Русия А.Г.[*], Тямбина А.С.[*], Лубяко А.А.[*] 274
[*]Научно-исследовательский центр курортологии и реабилитации Филиал ФГБУ «Северокавказский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства в г.Сочи», г. Сочи, Россия 274
[**]ФГБНУ Научно-исследовательский институт медицинской приматологии ФАН России, г. Сочи, Россия 274
Резюме..... 274

ANTI-ISCHEMIC MYOCARDIAL PROTECTION USING IMPROVED METHODS OF CELLULAR, TISSUE AND ORGAN REHABILITATION THERAPY IN EXPERIMENTS ON SMALL LABORATORY ANIMALS AND PRIMATES 276
Petrova E.S.*, Agrba V.Z.**, Karal-ogly D.D.**, Rusiya A.G.*, Tyambina A.S.*, Lubyako A.A* 276
[*]Research Center of balneology and rehabilitation, Branch of FSBI "North Caucasian State Research Clinical Center of the Federal Medical-Biological Agency”, Sochi, Russia 276
[**]FSBSI “Research Institute of Medical Primatology”, Sochi, Russia 276
Abstract 276
Список литературы 289

ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ, ИММУННОГО СТАТУСА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАКА РЕЗУС (MACACA MULATTA) АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА. 290
Карал-оглы Д.Д., Игнатова И.Е. , Деменкова Н.П., Мухаметзянова Е.И., Гварамия И.А., Агрба В.З..... 290
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (ФГБНУ «НИИ МП»), Россия, Сочи Адрес: Сочи-А, Веселое -1, ФГБНУ «НИИМП» Тел/факс.:8 (8622) 43-20-28 290
Резюме..... 291

THE EVALUATION OF RHESUS MONKEY (*MACACA MULATTA*) CYTOKINE PROFILE, IMMUNE STATUS, AND HEMATOLOGY IN THE ADLER MONKEY COLONY. 292
Karal-ogly DD, Ignatova IE , Demenkova NP, Mukhametzyanova EI, Gvaramia IA, Agrba VZ..... 292
Federal State Budgetary Research Scientific Institution "Research Institute of Medical Primatology" (FSBSI "RIMP"), Sochi, Russia 292
Abstract 292
Введение..... 292
Материалы и методы 293

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ, ТКАНЕВОЙ И ОРГАННОЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ 298
Русия А.Г.[1], Петрова Е.С.[1], Карал-оглы Д.Д.[2], Аравиашвили Д.Э.[2], Игнатова И.Е.[2], Сергеева Н.В.[2], ГварамияИ.А.[2], Агрба В.З.[2] 298
1 Научно-исследовательский центр курортологии и реабилитации Филиал ФГБУ «Северокавказский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» в г. Сочи, г. Сочи, Россия 299
2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии Федерального агентства науки», г. Сочи, Россия 299
Резюме..... 299

BIOLOGICAL SECURITY OF METHODS OF CELLULAR, TISSUE AND ORGAN REGENERATIVE THERAPY..... 300
Rusia AG[1], Petrova E.S.[1], Karal-ogly D.D.[2], Araviashvili D.E.[2], Ignatova I.E.[2], SergeevaN.V.[2], Gvaramiya I.A.[2], Agrba V.Z.[2] 300
1 Scientific Research Center of Balneology and Rehabilitation of the Federal Medical and Biological Agency in Sochi", Sochi, Russia..... 300
2 FSBSI “Research Institute of Medical Primatology”, Sochi, Russia..... 300
Abstract 300
Список литературы 307

5. КОСМИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА. РАДИОБИОЛОГИЯ. ФИЗИОЛОГИЯ 309

***V. SPACE MEDICINE. RADIOBIOLOGY. PHYSIOLOGY*..... 309**

«ПРИМАТЫ» - УНИКАЛЬНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ В КОСМОСЕ 309
Григорьев А.И.*, Лапин Б.А.**, Козловская И.Б.*, Ильин Е.А.*..... 309
* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН (ГНЦ РФ-ИМБП РАН), Москва, Россия..... 309
** ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия 309

«Primates» - the Unique International Experiment in Space..... 309
Grigoriev A.I.*, Lapin B.A.**, Kozlovskaya I.B.*, Ilyin E.A.* 309
* State Scientific Center of Russian Federation Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 309

** Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia ... 309
Abstract ... 309

Вестибулярные исследования в космосе. Эксперимент «приматы» Что рассказали приматы о работе вестибулирного аппарата в невесомости 315
Козловская И.Б.*, Ильин Е.А.*, Лапин Б.А.**, Григорьев А.И.* ... 315
* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН (ГНЦ РФ-ИМБП РАН), Москва, Россия ... 315
** ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия ... 315

Vestibular studies in Space. Experiment "Primates" ... 315
Abstract ... 315
Список литературы ... 319

Особенности разработки конструкции КА «Бион» с приматами на борту ... 320
В.И Абрашкин, Н.Р.Стратилатов, С.М. Шатохин ... 320
АО «РАКЕТНО-КОСМИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «ПРОГРЕСС» (АО РКЦ «ПРОГРЕСС») ... 320
443009, г.Самара, ул.Земеца д.18,E-mail csdb@samspace.ru ... 320
Резюме ... 320

CHARACTERISTICS OF SPASESHIP "BION" CONSTRUCTION DEVELOPMENT WITH PRIMATES ON BOARD ... 321
В.Абрашкин, Н.Стратилатов, С.Шатохин / V.Abrashkin, N.Stratilatov, S.Shatokhin ... **Ошибка! Закладка не определена.**
V.Abrashkin, N.Stratilatov, S.Shatokhin ... 321
JSC «Rocket-space center "Progress"» (JSC RSC "Progress") ... 321
18 Zemetsa st, Samara, 443009, Russia E-mail csdb@samspace.ru ... 321

ПРОБЛЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ РАДИАЦИОННЫХ И НЕРАДИАЦИОННЫХ ФАКТОРОВ МЕЖПЛАНЕТНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В НАЗЕМНЫХ МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА ПРИМАТАХ ... 326
А.С.Штемберг, А.Г.Беляева, О.В.Васильева, Ю.В.Гордеев ... 326
ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия ... 326
Резюме ... 326

THE PROBLEMS OF THE INVESTIGATION OF RADIATION AND NONRADIATION INTERPLANETARY SPACEFLIGHTS FACTORS INFLUENCE ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM FUNCTIONAL REACTIONS IN GROUND MODEL EXPERIMENTS IN PRIMATES ... 327
A.S.Shtemberg, A.G.Belyaeva, O.V.Vasilyeva, Yu.V.Gordeev ... 327
Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia ... 327
Abstract ... 327
Список литературы ... 335

Влияние опорной разгрузки на установку взора у обезьян ... 335
Миллер Н.В., Зобова Л.Н., Гордеев Ю.В., Бадаква А.М. ... 335
Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН. ... 335

THE EFFECT OF SUPPORT DISCHARGE ON GAZE FIXATION IN MONKEYS ... 335
N.V. Miller, L.N. Zobova, Y.V. Gordeev, A.M. Badakva ... 335
State Research Center of the Russian Federation - Institute for Biomedical Problems ... 335
Abstract ... 335
Список литературы ... 341

ОЦЕНКА ХАРАКТЕРА ФОРМИРОВАНИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ МОТИВАЦИИ У ОБЕЗЬЯН (*MACACA MULATTA*) ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ СОДЕРЖАНИИ ... 342
Шмалий А.В.[1], Павлова Л.Е.[1], Колик Л.Г.[2], Коваленко В.В.[3], Середенин С.Б.[2], Лапин Б.А.[1] ... 342
[1]ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии», г. Сочи, Россия; ... 342
[2]ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва, Россия; ... 342
[3]ФГБОУ ВО «Сочинский государственный университет», г. Сочи, Россия; ... 342
Резюме ... 342

ASSESSMENT OF ALCOHOL-SEEKING BEHAVIOR DEVELOPMENT IN INDIVIDUALLY HOUSED RHESUS MACAQUES ... 343
Shmaliy A.V.[1], Pavlova L.E.[1], Kolik L.G.[2], Kovalenko V.V.[3], Seredenin S.B.[2], Lapin B.A.[1] ... 343
[1]FSBSI "Research Institute of Medical Primatology", Sochi; Russia ... 343
[2]FSBI "V.V.Zakusov Research Institute of Pharmacology", Moscow, Russia ... 343
[3]FSBEI HE "Sochi State University", Sochi, Russia ... 343
Abstract ... 343
Список литературы ... 352

НАРУШЕНИЯ ГЛАЗОДВИГАТЕЛЬНОЙ И МАНИПУЛЯТИВНОЙ ФУНКЦИЙ У ОБЕЗЬЯН ПРИ РАЗВИТИИ МФТП-ИНДУЦИРОВАННОГО ПАРКИНСОНПОДОБНОГО СИНДРОМА ... 354
Терещенко Л.В., Шульговский В.В., Латанов А.В. ... 354
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия ... 354
Резюме ... 354

OCULOMOTOR AND MANIPULATION SKILLS DISORDERS IN HEMIPARKINSONIAN MPTP-TREATED MONKEYS ... 354
Tereshchenko L.V., Shulgovsky V.V., Latanov A.V. ... 354
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia ... 354
Abstract ... 354
Список литературы ... 360

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АСИММЕТРИЯ ДВИЖЕНИЙ ГЛАЗ И РУК У ОБЕЗЬЯН В ЗРИТЕЛЬНО-МОТОРНОЙ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЙ ЗАДАЧЕ ... 362
Латанов А.В., Терещенко Л.В., Шульговский В.В. ... 362
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия ... 362
Резюме ... 362

FUNCTIONAL ASYMMETRY OF MONKEY EYE AND HAND MOVEMENTS IN VISUAL-MOTOR INSTRUMENTAL TASK ... 363
A.Latanov, L.Tereshchenko, V.Shul'govskiy ... 363
M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia ... 363
Abstract ... 363
Список литературы ... 368

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНА ЗРЕНИЯ И ЗРИТЕЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ У ПРИМАТОВ ... 369
Туманова А.Л., Агрба В.З., Нестер Е.Н., Кондрашова Н.А., Шамсутдинова О.В. ... 369
Сочинский институт РУДН, Сочи, Россия ... 369
НИЦКиР ФФГБУ СКФНКЦ ФМБА России в Сочи ... 369
Резюме ... 369

FEATURES OF EYE AND VISUAL FUNCTION IN PRIMATES ... 370
A.Tumanova, V.Agrba, E.Nester, N.Kondrashova, O.Shamsutdinova, T. Gvozdik ... 370
Peoples' Friendship University of Russia, Sochi branch,Sochi, Russia ... 370
Research centre of balneology and rehabilitation, Sochi, Russia ... 370
Abstract ... 370

Список литературы ... 375

КОРРЕКЦИЯ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ПОЖИЛЫХ МАКАК С ПОМОЩЬЮ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ 376
Беляков А.В., Семенов Д.Г., Рыбникова Е.А., Самойлов М.О. ... 376
ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия ... 376
Резюме ... 376

COGNITIVE FUNCTION CORRECTION OF ELDERLY MACAQUES USING HYPOBARIC HYPOXIA ... 377
Belyakov A.V., Semenov D.G., Rybnikov E.A., Samoylov M.O. ... 377
FSBRI "I.P. Pavlov Institute of Physiology", Saint-Petersburg, Russia ... 377
Abstract ... 377
Список литературы ... 381

АГРЕГАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭРИТРОЦИТОЗАХ. ... 381
Ахуба Л.О.*, Ершова Л.И.**, Баркая В.С.*, Сабекия Ж.Дж.* ... 381
* Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии ... 381
** ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ ... 381
Резюме ... 381

AGGREGATION POTENTIAL OF ERYTHROCYTES AT ERYTHROCYTOSIS ... 383
Akhuba L.O.*, Ershova L.I.**, Barkaya V.S.*, Sabekia Zh. Dzh.* ... 383
* Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences ... 383
** FSBI Hematological research center of Ministry of Healthcare of the Russian Federation ... 383
Abstract ... 383
Список литературы ... 387

РОЛЬ ЯДРЫШКОВОГО БЕЛКА НУКЛЕОФОЗМИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ALK -ПОЗИТИВНОЙ АНАПЛАСТИЧЕСКОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ ... 388
Букаева И.А.,Райхлин Н.Т., Пробатова Н.А., Поддубная И.В., Семенова А.А.,Смирнова Е.А., Шабанов М.А. ... 388
НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им.Н.Н.Блохина», Минздрава России , Москва , РФ ... 388

ROLE OF NUCLEOPHOSMIN IN THE PATHOGENESIS OF ALK-POSITIVE ANAPLASTIC LARGE-CELL LYMPHOMA ... 388
Bukaeva I., Raikhlin N., Probatova N., Poddubnaya I., Semenova A.,Smirnova E.,Shabanov M. ... 388
Blokhin Russian Cancer Research Center,Moscov, Russia ... 388
Abstract ... 389

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ... 397
Райхлин Н.Т., Букаева И. А., Карселадзе А. И. ... 397
НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва, РФ ... 397
Резюме ... 397

PROGNOSTIC MARKERS IN PROSTATE CANCER ... 399
Raikhlin N., Bukaeva I., Karceladze A. ... 399
Blokhin Russian Cancer Research Center , Moscow , Russia ... 399
Abstract ... 399

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО НАРКОЗА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДЛИТЕЛЬНЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА ОБЕЗЬЯНАХ МАКАК РЕЗУС НА ОСНОВЕ КЕТАМИНА И ЗОЛЕТИЛА. ... 407
Гордеев Ю.В., Стогова К.С. ... 407
ГНЦ - РФ ИМБП РАН, Москва, Россия ... 407
Резюме ... 407

THE KETAMINE AND ZOLETILE COMBINATION-BASED ANESTHESIA FOR RHESUS MONKEY LONG-TERM SURGERY. ... 407
Y. V. Gordeev, K.S. Stogova ... 407
SRC RF - IMBP of RAS, Moscow, Russia ... 407
Список литературы ... 415

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ ЧАСТИЦ НА КОРУ И ПОДКОРКОВЫЕ ОБРАЗОВАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАК РЕЗУС ... 415
Гордеев Ю.В., Штемберг А.С., Беляева А.Г. ... 415
ГНЦ РФ-ИМБП РАН, Москва, Россия ... 415
Резюме ... 416

SOME PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF HEAVY PARTICLES RADIATION ON RHESUS MONKEY CORTEX AND SUBCORTICAL CEREBRAL BRAIN FORMATIONS. ... 416
Y. V. Gordeev, A.S. Shtemberg, A.G. Belyaeva ... 416
SRC RF - IMBP of RAS, Moscow, Russia ... 416
Abstract ... 416
Список литературы ... 421

ВЛИЯНИЕ ФЕНИЛГИДРАЗИНА НА НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ОБЕЗЬЯНАХ ... 422
Ж. Д. Сабекия, В. С. Баркая, Л. И. Ершова, Ж. В. Елистратова, Л. О. Ахуба, В. Н. Фоменко. ... 422
НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия. ... 422
Резюме ... 422

INFLUENCE OF PHENYLHYDRAZINE ON SOME HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN EXPERIMENT ON MONKEYS 424
Sabekia Zh. D, Barkaya V.S., Ershova L.I., Elistratova Zh.V., Akhuba L.O., Fomenko V.N. ... 424
Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the ... 424
Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia ... 424
Abstract ... 424
Список литературы ... 430

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ МЕДИЦИНСКИХ НАУК РАН
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
НИИ МЕДИЦИНСКОЙ ПРИМАТОЛОГИИ
АДМИНИСТРАЦИЯ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
АДМИНИСТРАЦИЯ Г. СОЧИ

Материалы Сочинской третьей международной научной конференции

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ МЕДИЦИНСКОЙ ПРИМАТОЛОГИИ

(8-10 августа 2016 г., Сочи-Адлер)

Том 1

Мне сейчас трудно сказать, как и когда возникла идея разместить в Сочи филиал всемирно известного в то время Сухумского питомника обезьян, носившего тогда название Институт экспериментальной патологии и терапии Академии медицинских наук СССР. Питомник (впоследствии биостанция, а затем Институт) был создан решением Правительства страны для того, чтобы предоставить отечественным ученым-медикам и биологам возможность исследовать наиболее острые в тот момент проблемы в экспериментах на обезьянах, животных, объединяемых с людьми в одном эволюционном отряде, результаты экспериментов, на которых можно было бы с минимальной коррекцией перенести на людей. В числе различных «острых» проблем ученые Института занимались онкологическими исследованиями и в начале семидесятых годов концентрировали свои исследования на злокачественных заболеваниях системы крови – лимфомах и лейкемиях. Экспериментальные данные, получаемые в экспериментах на обезьянах, нужно было сопоставлять с аналогичными данными у больных людей. В это время, в Сочи, на базе онкологического диспансера было гематологическое отделение, возглавляемое кандидатом медицинских наук, заслуженным врачом – Вениамином Николаевичем Лебедевым, как говорится доктором «от Бога».

В.Н. Лебедев и воспитанные им сотрудники (М. Спектор, Н. Данилова, В. Бологов, Н. Косухина) послужили основой созданной на базе отделения, академической клиники гемобластозов с регистром (через несколько лет приказом Министра здравоохранения СССР клиника с регистром была названа лучшим учреждением этого профиля).

По-видимому, создание клиники и стимулировало создание филиала Сухумского института в Сочи. Идея создания филиала в Сочи нашла понимание и одобрение в Президиуме Академии медицинских наук и, что не менее важно, в руководстве г. Сочи и Краснодарского края. В течение длительного времени, нам, совместно с представителем руководства Академии, пришлось рассматривать различные участки Большого Сочи, рекомендованные руководством г. Сочи и Краснодарского края для создания филиала Института (Дагомыс, Бытха). Однако, мы остановились на Адлерском районе (Гумария), что, как оказалось впоследствии, было не оптимальным решением. Однако, именно там в 1980 году, на территории 93 га был построен филиал Института, питомник обезьян которого насчитывает в настоящее время свыше 4500 животных.

Сочи в тот период был типичным курортным городом, в котором все было ориентировано и подчинено большому количеству здравниц, принадлежавшим профсоюзам и различным ведомствам. Соответственно, в

Сочи был создан Институт курортологии, разрабатывавший методические и практические аспекты функционирования курорта Сочи. По-видимому, основное направление исследований было связано с Мацестой, сероводородные источники которой превращали Сочи в климато-бальнеологический курорт.

В 1992 году, в период грузино-абхазского военного конфликта, большая группа ведущих научных сотрудников Института экспериментальной патологии и терапии переехала в Адлер, на базу филиала Сухумского Института и решением Президиума Академии медицинских наук СССР, Адлерский филиал был преобразован в Институт медицинской приматологии АМН СССР.

Создание Института медицинской приматологии по-видимому совпало с существенным преобразованием Сочи, строительством жилых домов, гостиниц, совершенствованием вокзала и морпорта. Огромную роль в развитии Сочи сыграла Олимпиада 2014 года. Были построены уникальные спортивные объекты, проложены великолепные дороги, реконструированы вокзалы. Город превратился в курорт мирового уровня – уникальную «жемчужину» Причерноморья. Сочи очень похорошел. Он действительно стал «летней столицей» России. Эти преобразования совпали с появлением в Сочи нескольких учебных заведений – филиалов московских Университетов или же самостоятельных учреждений. Одним из наиболее значимых институтов был филиал РУДН, в настоящее время приобретший самостоятельность. По инициативе Института медицинской приматологии, на его базе была создана кафедра физиологии, которой стала руководить сотрудница Института А.В. Шмалий, кафедра, на которой преподавание ведут научные сотрудники Института медицинской приматологии.

Наиболее способные выпускники РУДН поступают в аспирантуру Института и пополняют кадры научных сотрудников.

На базе Института располагается также вторая кафедра РУДН – кафедра ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарной экспертизы, в которой часть преподавателей также являются сотрудниками Института медицинской приматологии.

Настоящая конференция является третьей, первая и вторая конференции с той же проблематикой и тем же названием проходили в 2007 и 2011 гг. соответственно.

В организации данной конференции большую помощь Оргкомитету оказала администрация г. Сочи.

Предполагается, что эти конференции, суммирующие наиболее важные результаты экспериментов на приматах, будут проводиться в Сочи каждые 4 года.

Академик РАН Лапин Б.А.

I. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИМАТОВ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ.
I. PROSPECTIVE TRENDS IN THE USE OF PRIMATES IN BIOMEDICAL EXPERIMENTS

ВСТУПИТЕЛЬНОЕ СЛОВО

акад. РАН Лапин Б.А.

ФГБНУ «НИИ Медицинской приматологии», Сочи, Россия

Уважаемые коллеги, участники и гости конференции!

Позвольте мне открыть конференцию небольшим вступительным словом, которое мои коллеги рекомендовали построить в значительной степени в историческом плане. Организатор этой конференции Институт медицинской приматологии является производным Сухумского питомника обезьян (в настоящее время – Института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии), которому в следующем году исполняется 90 лет и говоря об Институте медицинской приматологии в Адлере, мы всегда начинаем с Сухумского питомника обезьян. Сухумский питомник проделал сложные преобразования. Будучи создан в 1927 году в качестве научного питомника Всесоюзного Института эндокринологии, он был преобразован в 1932 году в Субтропический филиал Всесоюзного Института экспериментальной медицины, а в 1944 году, при создании Академии Медицинских Наук СССР – в медико-биологическую станцию (МБС) Академии. В этом качестве медико-биологическая станция просуществовала до 1958 года, когда ее преобразовали в Институт экспериментальной патологии и терапии АМН СССР.

Основной идеей создания Сухумского питомника обезьян было предоставление возможности отечественным ученым медикам и биологам проводить экспериментальные исследования на животных, объединенных вместе с людьми в одном эволюционном отряде приматов в котором основные анатомо-физиологические характеристики людей и обезьян были несравненно более сходными, нежели у других животных. Это позволяло предполагать, что полученные в экспериментах на обезьянах результаты более полно отражают человеческие закономерности и могут с

незначительной коррекцией или непосредственно быть перенесены на человека.

В Сухумском питомнике (Субтропическом филиале ВИЭМ медико-биологической станции, Институте экспериментальной патологии и терапии АМН СССР) было проведено очень большое количество первоклассных экспериментальных исследований, однако, я остановлюсь лишь на одном – экспериментальное воспроизведение у павианов и м. резусов неврозов, осложнявшихся возникновением у подопытных животных гипертонической болезни, коронарной недостаточности и инфаркта миокарда. Эти исследования Д.И. Миминошвили, Е.М. Черкович и Г.И. Магакяна вызвали буквально ажиотаж. Они же послужили основанием многолетних советско-американских исследований.

В 1992 году во время грузино-абхазского военного конфликта, ряд ведущих научных сотрудников Института покинул Сухуми и перебрались в Адлер, на базу ранее созданного производственного филиала Сухумского Института.

Президиум Академии медицинских наук, по ходатайству дирекции Института, принял решение о преобразовании Адлерского филиала в Институт медицинской приматологии АМН СССР. Во вновь организованном Институте были созданы 7 лабораторий. В настоящий момент, после ряда реорганизаций, структура научных подразделений Института выглядит следующим образом: лаборатория иммунологии и биологии клетки (зав. д.м.н. В.З. Агрба), лаборатория инфекционных вирусов (зав. д.м.н. Л.И. Корзая), лаборатория экспериментальной эндокринологии (зав. д.б.н. Н.Д. Гончарова), лаборатория молекулярной биологии (вед. научный сотрудник А.А. Агумава), зоотехническая лаборатория (зав. д.б.н. В.Г. Чалян), лаборатория инфекционной патологии (зав. к.б.н. И.М. Аршба, вед. научный сотрудник В. Калашникова), лаборатория патологической анатомии зав. – (без оплаты) профессор Б.А. Лапин.

В лаборатории иммунологии и биологии клетки основным направлением стали стволовые клетки, был создан банк криоконсервированных мезенхимальных стволовых клеток. В экспериментах с воспроизведением экспериментального инфаркта миокарда было показано четкое восстановление функции поврежденного миокарда при капельном введении мезенхимальных стволовых клеток.

В совместных исследованиях, лабораторией патологической анатомии с лабораторией молекулярной биологии, была показана инфицированность здоровых людей обезьяньим онкогенным вирусом SV-40 различной интенсивности в различных регионах страны, а также было обнаружено в

оперативно удаленных опухолях головного мозга значительное количество ДНК копий SV-40.

На павианах гамадрилах была воспроизведена вирусиндуцированная злокачественная лимфома, приведшая к энзоотической вспышке в стаде павианов.

Анализируя материалы эпизоотии злокачественных лимфом в стаде павианов гамадрилов Сухумского питомника, Л.А. Яковлева пришла к заключению, что развитию лимфомы, как правило, предшествует обратимый клинико-морфологический комплекс, который она обозначила как предлимфома. Эти исследования были отмечены в 2002 году Государственной премией по науке.

Представляет интерес совместное исследование лаборатории патологической анатомии с лабораторией молекулярной биологии и ветеринарной клиникой энзоотической вспышки заболевания, ассоциированного с патогенной E-coli.

Лаборатория инфекционной патологии и лаборатория вирусологии осуществляют мониторинг инфекционных заболеваний в стаде питомника, а также инвазированность обезьян гельминтами и простейшими. Представляет интерес исследования В. Калашниковой, показавшую высокую инфицированность стада обезьян H. pylari. Различие количества генов «островков патогенности» у обезьян и людей возможно объясняет практическое отсутствие у обезьян язвенных поражений и рака желудка, что принято считать характерным при инфицировании людей H. pylari.

Лаборатория эндокринологии (рук. – д.б.н. Н.Д. Гончарова) проводит исследования функциональных изменений эндокринной системы в процессе старения и перспектив коррекции на модели возрастных заболеваний и преждевременного ускорения старения. В результате исследований на павианах гамадрилах получены приоритетные данные закономерного снижения в процессе старения секреции дегидроэпиандростерона и его сульфата – важнейших биомаркеров старения. Были выявлены возрастные нарушения регуляции функции коры надпочечников и гонад, снижение при старении секреции пинеальной железой мелатонина, повреждения в циркадных ритмах секреции кортикостероидов и мелатонина, сходных у обезьян и людей.

Были разработаны методы коррекции возрастных эндокринных дисфункций у лиц пожилого возраста с помощью суперактивных аналогов люлиберина и пептидных препаратов эпиталомина и его синтетического аналога эпиталона и панкрогена.

Одним из наиболее важных научных подразделений Института является зоотехническая лаборатория, осуществляющая методическое и практическое руководство питомника, разрабатывает основные правила содержания и размножения обезьян, нормативов и рационов кормления.

Основным научным направлением лаборатории является изучение стадного поведения двух видов обезьян содержащихся в питомнике – павианов гамадрилов и м. резусов. Научные материалы лаборатории публикуются в отечественных изданиях. Заведующий лабораторией – д.б.н. В.Г. Чалян.

И, наконец, ветеринарная клиника обезьян, осуществляющая контроль за состоянием здоровья обезьян, лечение заболевших животных. В составе клиники имеется рентгеновский кабинет, группа ультразвуковой диагностики, кабинет гематологических и биохимических исследований. Руководит клиникой ветеринарный врач Т.А. Гвоздик.

Серьезным недостатком Института является отсутствие в нем исследований в области нейробиологии, в области высшей нервной деятельности. Необходимо приложить максимум усилий для создания структурного подразделения, в котором будут проводится эти исследования. Это направление исследований по существу должно быть основным в приматологическом учреждении. Ведь именно высокая организация центральной нервной системы, высшая нервная деятельность являются основными факторами, объединяющими людей и обезьян в одном эволюционном отряде Primatov.

В заключение я хочу определить основные задачи Института.

Задачами Института медицинской приматологии являются:

а) проведение научных исследований в соответствии с планом, согласованным с медицинским отделением РАН;

б) крупномасштабное разведение обезьян, наиболее часто используемых в медицинских экспериментах;

в) предоставление рабочих мест научным сотрудникам учреждений Минздрава и РАН при необходимости проведения экспериментов на обезьянах;

г) реализация обезьян научным учреждениям медицинского профиля;

д) проведение испытаний (по договорам) новых лекарственных средств, отдавая предпочтение препаратам, предназначенным для детей и беременных женщин;

е) осуществление консультативной помощи ученым (научным учреждениям) работающим с приматами.

И, завершая свое краткое выступление, я хочу привести основные требования, стоящие перед экспериментаторами, намеревающимися вовлечь в эксперимент обезьян, эти исследования достаточно дороги и поэтому:

1. Обезьяны могут использоваться в эксперименте, как правило, для решения особо важных, я бы сказал, глобальных проблем в частности для разработки методов профилактики и лечения социально значимых болезней.
2. Обезьяны могут быть вовлечены в эксперимент, когда невозможно использование других лабораторных животных или же существуют сомнения в корректности полученных результатов.
3. Не должны быть использованы в экспериментах обезьяны, отловленные в местах их естественного обитания или же когда их количество сведено к минимуму.
4. Недопустимо использование обезьян того вида, которому угрожает исчезновение и, наконец, используемые методы должны быть «гуманными».

OPENING OF THE CONFERENCE

acad. RAS Lapin B.A.

FSBSI "Research Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia

Dear colleagues, participants and guests of the conference!

Let me open the Conference with introductory remarks which will be presented largely in historical perspective as my colleagues advised me. The Organizer of this conference – the Institute of Medical Primatology is a derivative of Sukhumi monkey colony (now it is The Institute of Experimental Pathology and Therapy, Academy of Sciences of Abkhazia) which will celebrate its 90 year existence next year , and speaking about the Institute of Medical Primatology in Adler we always begin with Sukhumi monkey colony. Sukhumi monkey colony underwent complicated transformations. Being founded in the year 1927 as a scientific colony of all-Union Institute of Endocrinology it was transformed in 1932 as a Subtropical Branch of the all-Union Institute of Experimental Medicine and later – in the year 1944 when an Academy of Medical Sciences of the USSR was founded it was named as Biomedical Station (BMS) . In this status it existed till the year 1958 after which it was again transformed, and since that time had been existing as The Institute of Experimental Pathology and therapy AMS USSR.

The main idea of establishing the Sukhumi monkey colony was to provide the Russian medical and biological scientists with the possibility to carry out the experimental research using the animals belonging to the same evolutionary Order whose anatomical and physiological characteristics are much more similar than those in other animals. It gave rise to a suggestion that the data obtained in the experiments on monkeys more adequately reflect the human characteristics and may be extrapolated to human beings with some corrections.

In Sukhumi monkey colony (Subtropical Branch of all-Union Institute of Experimental Medicine, Institute of Experimental Pathology and Therapy AMS USSR) a great number of extra-class experimental research has been carried out , but I will focus just on one of them - experimental development of neurosis in baboons and rhesus monkeys with such complications of disease as hypertension, coronary insufficiency and myocardial infarction. The investigations of D.I.Miminoshvili, E.M.Cherkovich and G.I.Magakyan just caused a stir. And they served as a basis for long term Russian-American investigations.

In 1992 during the military conflict between the Georgians and Abkhazians a number of leading scientists of the Institute left Sukhumy for Adler to work at a previously created branch of the Sukhumy Institute.

The Presidium of the Academy of Medical Sciences at the request of the director of the Institute made the decision on transformation of the Branch into the Institute of Medical Primatology AMS USSR. Seven laboratories were `established. At the moment after a number of reorganizations the structure of the scientific subdivisions of the Institute is the following one: the laboratory of immunology and cell biology (headed by Dr.V.Z. Agrba , MD), the laboratory of infectious viruses (headed by L.I.Korzaya , MD), the laboratory of experimental endocrinology (headed by N.D.Goncharova, MD) the laboratory of molecular biology (headed by a leading scientist.A.A.Agumava) , zootechnical laboratory (headed by V.G.Chalyan, Dr.of biology), the laboratory of in infectious pathology I.M.Arshba, PhD., leading scientist – V.Kalashnikova), the laboratory of pathological anatomy (headed by Prof.B.A.Lapin, without charge).

The main research direction at the laboratory of immunology and cell biology was focused on stem cells, and the bank of cryopreserved mesenchymal stem cells was created. In the experiments with development of myocardial infarction a full recovery of the damaged myocardium was shown after the infusion of mesenchymal stem cells.

The results of joint research of the laboratory of pathological anatomy and the laboratory of molecular biology showed the infection of healthy people with a monkey oncogeniic SV-40 virus of different intensity depending on geographical

region. Analysis of surgically removed brain tumors showed a significant number of SV-40 DNA copies.

In the experiments on hamadryas baboons the virus-induced malignant lymphoma was shown that resulted in enzootic outbreak in the troop of hamadryas baboons.

Analyzing the materials of malignant lymphoma epizooty in the troop of hamadryas baboons of Sukhumy colony Dr. L.A.Yakovleva made a conclusion that the development of lymphoma is as a rule proceeded by a reversible clinical-morphological complex that was called by her as “prelymphoma”. In 2002 the investigations were awarded the State Prize for Science.

A joint research of the laboratory of pathological anatomy and the laboratory of molecular biology together with the veterinary clinics on the enzootic outbreak of the disease associated with a pathogenic E-coli is of significant interest.

The laboratory of infectious pathology and the laboratory of virology carry out monitoring of infectious diseases in the colony troop, as well as the invasion of helmints and protozoa in monkeys. The investigations of V.Kalashnikova showing a high frequency of H.pylori infection in a monkey troop are of interest, and may be they explain the actual absence of ulcerative lesions and stomach cancer in monkeys that are considered to be characteristic for infection of H.pylori in human beings.

Laboratory of endocrinology (headed by N.D Goncharova, MD) carries out the investigations of endocrine system changes during the aging as well as the prospects of their correction in the models of age related diseases and early aging. As a result of investigations in hamadryas baboons the priority data were obtained showing a reasonable age related decrease of dehydroepiandrosterone and its sulfate – the important biomarkers of aging. Age related disorders in the regulation of the function of adrenal cortex and gonads, the decrease in melatonin secreted by pineal gland, the disorders in circadian rhythms of corticosteroid and melatonin secretion that was similar in monkeys and men were found.

New methods of correction of age related endocrine disfunctions with the use of superactive luliberin analogs and the peptide drugs of epitalomin and its synthetic analogs – epitalon and pancrogen were developed.

One of the most significant scientific divisions of the institute is a zoo technical laboratory that performs practical and theoretical control of the colony, develops the main rules of monkey maintenance and breeding, regulations and diet.

The main scientific directions of the laboratory is study of social behavior of two monkey species kept in the colony – hamadryas baboons and rhesus monkeys. The scientific materials of the laboratory are published in different editions. The laboratory is headed by V.G. Chalyan, Dr. of Biology.

Now about the veterinary monkey clinics performing health control and curing of sick animals. It also includes an X-ray facility, a group of ultrasound diagnostics and a division of hematological and biochemical investigations. The veterinary clinics is headed by T.A. Gvozdic.

Unfortunately, the Institute does not perform investigations in the field of neurobiology and higher nervous activity. We should do our best to establish a division in which such kinds of investigation will be carried out. This research direction must actually be the main one in the primatological organization. It is a high central nervous system and its activity that is the main factor allowing to combine human beings and monkeys in the same evolutionary order of Primates.

As a conclusion I would like to underline some main tasks of the Institute of Medical Primatology.

They are:

a) carrying out of scientific investigations according to the plan coordinated with a medical division of RAS;

b) large scale breeding of monkeys most frequently used in the experiments;

c) providing a job for scientists of health Ministry and RAS organizations in the case of the necessity to carry out the experiments on monkeys;

d) providing the research institutions of medical profile with monkeys;

e) testing of new drugs (under the contracts) giving preference to the drugs intended for children and pregnant women;

f) advisory assistance to scientists (scientific institutions) working with primates.

Concluding my brief speech I would like to underline the requirements facing the scientists engaged in experimental research on monkeys. The experiments of such kind are rather expensive, so:

1) Monkeys must be used mainly for solving the most important, I would say global problems , specifically for the development of preventive and curing methods in the case of socially significant diseases;
2) Monkeys may be used in the experiment in the case of impossibility of using the other laboratory animals or if there are some doubts in the correctness of the results obtained.
3) Monkeys captured in their natural habitat or those whose number is rendered to minimum must not be used in the experiment.
4) It is unacceptable to use the endangered species, and the methods used must be the humane ones.

INTERNATIONAL IMPORTATION AND USE OF NONHUMAN PRIMATES IN RESEARCH IN THE UNITED STATES

Pamela R. Ferguson

President, Paris nhp

Edmonds, Washington, USA

This presentation will focus on (1) USA concerns on availability of international airline carriers for nonhuman primates (NHP) for biomedical research, (2) International importation and Use of nonhuman primates in the USA and (3) current issues in transportation of Macaca nemestrina from Indonesia to the USA for reproductive and infectious disease research.

International Airline Transportation of Nonhuman Primates for Biomedical Research

In the USA, nonhuman primates used in research are derived from a combination of domestic and international breeding colonies. These breeding colonies continually evolve to meet the biological requirements of USA research scientists in pharmaceutical, pre-clinical, or academic settings. The biological specifications for NHPs used in research go beyond a simple specification of "species" and may include the age, sex, weight, "specific pathogen free" status, country of origin, genetics or even parentage definitions.

In the USA, the Macaca fascicularis species are used in large numbers by the pharmaceutical industries or CROs for toxicology, efficacy, safety, and pharmacodynamics. Academic researchers in the USA rely more heavily on Macaca mulatta and use fewer numbers. Research scientists may also require species that are less commonly used, more difficult to import by international airline, but are a proven model with significant impact on human health advancement (Macaca nemestrina species example).

In 1981, data collected by the CDC shows 14,701 NHPs arriving to the USA in 133 shipments from around the world (ILAR International Meeting Workshop 2002). In 2015, there were 22,299 animals imported in 100 shipments from around the world, but predominately Asia (CDC, Division of Global migration and Quarantine). Therefore, there is a long history of the use of imported research animals to advance biomedical research in the USA. There is also a rise in the number of animals arriving in each shipment.

Unfortunately, events have intervened and there has been declining availability of international airline transportation options for NHPs over the last 10-15 years. This impacts the cost of transportation and the availability of NHP

species overall. Presently, there is only one foreign commercial airline (Air France) carrying NHP to the USA as all other international and domestic commercial airlines have implemented a ban on international transportation of nonhuman primates. Many factors may have contributed to this decline, including concerns about zoonoses, the high cost of training personnel and acquiring protective equipment, the negative reactions of airline passengers, pressure from animal rights activists, and the unprofitable nature of live-animal transportation (ILAR International Meeting Workshop 2002).

The USA Foundation for Biomedical Research has been advocating for the need for additional international airline carriers in an effort entitled: NO CARGO NO CURE. On their website, they publish:

Without the ability to transport laboratory animals, research would be restricted to fewer locations, and would lose the contributions of many talented scientists. Further, scientists would not always be able to use the most appropriate model to study a disease or response to a medication, delaying or stopping much needed medical advances. The development of new medicines would slow, or even stop, denying cures and treatments to the people who need them. Research institutions would have to divert precious funding, manpower, and laboratory space to breeding animals, taking resources away from important research. Scientific collaboration across the world would be hampered by inconsistency in their research animals and make it difficult to interpret data. Without the ability to transport laboratory animals by air, the research community would be unable to provide the best possible conditions for shipping animals quickly and safely. Without air transportation options, animals would often be subject to longer and more stressful transportation by land or sea.

Importation of Nonhuman Primates in the USA

The US Center for Disease Control (CDC) implements the US NHP quarantine requirements to prevent introduction of human disease. The CDC inspects facilities, reviews import plans, monitors arriving shipments, assesses disease control measures, conducts periodic site visits and investigates illness reports. Importers must:

(1) Register with the CDC;

(2) Certify imported NHPs will be used only for bona fide science, education or exhibit;

(3) Implement disease control measures to minimize exposure to the animals during transportation isolation and quarantine;

(4) Isolate each shipment of Imported NHPs for 31 days, monitor the animals for illness, test them for tuberculosis, test them for filovirus infection (if necessary), and maintain records regarding illness and death;

(5) Report suspected illnesses to CDC; and

(6) Maintain records regarding the distribution of each shipment

Before registration and periodically thereafter, the CDC inspects importer facilities and reviews their procedures and record keeping systems. In addition, the CDC

(1) Reviews proposed plans for each shipment itinerary;

(2) Monitors handling of arriving shipments at the ports of entry and at quarantine facilities;

(3) Assesses transportation and disease control measures;

(4) Reviews animal health records and;

(5) Investigates reports of zoonotic illness.

There are 24 different CDC registered NHP importers in the United States:

1. 11 commercial importers;
2. 9 zoos;
3. 3 National Primate Research Centers;
4. 1 University.

In the early days of this field, there were over 100 importers of NHP, suggesting that greater regulation has resulted in fewer entities are able to import. It is interesting to note that 83% of these importers are commercial importers and zoos, with only 17% as academic institutions.

The CDC has requirements for licensing an importing facility. All NHP are required to stay in a federally registered quarantine for at least 31 days before they can be transferred to another institution. Most institutions quarantine them for a longer period of time.

One of the CDC regulations is the requirement for records on these primates as they are moved from the initial importing institution to other institutions. The importing institution has to document whether the animals are being held for scientific, exhibition, research, or educational use and that wherever they send the animals will likewise register in the same category. The intent is to keep these animals out of the pet trade.

NHP imports into the US are restricted to CDC Ports of Entry. There are twenty CDC Ports of Entry into the US, but in 2015, just 5 stations accounted for

all of the international air shipments: New York (43.7%), Houston (30.7%), Chicago (21.1%), Washington DC (2.9%), and Miami (1.6%).

USA Importation Data 1994-2015:

The data on NHP importation from 1994 to 2015 shows an increase in numbers imported until 2008 with a decrease in 2011 and 2012 and increasing number through 2014 when there was a high number import of 27,824 and then most recently 22,300 in 2015. The decline in 2011 and 2012 occurred when the two dominant airline carriers from China ceased carrying NHPs and grew in number once again when commercial importers responded by chartering aircraft for importation to the US.

USA Importation Data 2015 Species, Country of Origin, Importer:

Imported Species for 2015 finds that over 97% were Macaques: Macaca fascicularis (89.9%) and Macaca mulatta, or rhesus (7.2%).

Imports by Country for 2015 account China (71.1%), Mauritius (16.4%) Cambodia (5.4%) and Vietnam (3.6%).

Imports described by Importer in 2015 show that each of the 24 importers brought in from zero to over 8,000 animals, with the number of shipments per importer ranging from zero to 26 a year.

A significant statistic to note is the percentage of dead-on-arrivals: zero to 0.1%, which is very low. This is a huge improvement from many years ago when a 10% to 15% mortality rate was considered good. Reportable illnesses are very low now as well.

Indonesia: International Transportation and the Macaca nemestrina in the USA

In the last part of my presentation, I would like to highlight Indonesia. Most people in the United States are unaware of Indonesia, yet it is the fourth-most populous country in the world, made up of 13,000-plus islands, and home to numerous species of nonhuman primates, including vast numbers of Macaca fascicularis and the Macaca nemestrina. The Macaca nemestrina is a proven research model for infectious disease, vaccine and microbicide development, HIV, reproductive and contraceptive research conducted in the USA.

As early as 1992, The Primate Research Center at Bogor Agricultural University in collaboration with several national and international institutions

established an SRV-free Macaca nemestrina captive-breeding facility in Bogor for distribution to international markets including the US. Over time, the Macaca nemestrina monkey has become an irreplaceable animal model for certain research efforts. I will highlight one USA research entity:

CDC Division of HIV/AIDS Prevention Laboratory Branch Research.

The CDC Laboratory Branch supports the Division's goals in HIV prevention as they pertain to clinical studies, viral transmission, diagnosis, and intervention with microbicides, vaccines, and chemoprophylaxis as well as investigates human and zoonotic retroviruses.

In part, their research reflects the importance of the Macaca nemestrina model to human health advances. "The preferred nonhuman primate model for vaginal infection studies is the Macaca nemestrina pigtailed macaque for several reasons. They are slightly larger than rhesus macaques which reduce size constraints for vaginal ring design and other drug delivery devices. Unlike rhesus macaques that are seasonal breeders, female pigtailed macaques have a continuous lunar menstrual cycle (25-30 days) and vaginal anatomy more similar to women, and thus are a more relevant model to study absorption of drugs in vaginal tissues during different phases of the menstrual cycle, and in the evaluation of the safety, pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of antiretroviral-based products for vaginal topical prophylaxis. This is important when evaluating products that will be used in women. In addition, pigtailed macaques can be treated with hormonal contraceptives at physiological doses (e.g. Depo-Provera) and show similar effects to what has been observed in women. Although the role of hormonal contraceptives in increasing the level of risk to HIV infection in women has not been clearly resolved, there is enough evidence to warrant further modeling in macaques. When testing the efficacy of a candidate antiretroviral drug delivery system, repeated-low dose viral exposures are used to mimic multiple exposures in women having heterosexual sex with infected partners. Recent developments in this model also enable us to conduct co-infection experiments with a SIV/HIV recombinant virus, and common sexually transmitted such as trichomonas and chlamydia. With this model we can evaluate intermittent adherence to products and define correlates of protection and potential increases in risk that are simply not possible in small clinical trials in women."

The Macaca nemestrina model is proven to be useful to the advancement of human health, available from Indonesia with the right specifications but the economics of international air transportation makes their availability in the USA difficult. The cost of transporting this animal from Indonesia by a dedicated air cargo shipment is very expensive. Indonesia is able to breed the Macaca

nemestrina monkey at an efficiency rate not possible in the USA, greater than 90 percent. Therefore, this is an excellent example of the natural habitat country as best option for breeding for research for export. If the cost of transportation of this cargo is too great, then biomedical research community loses the opportunity for a valuable model.

Predicted outcomes of NO Cargo No Cure:

"…Scientists would not always be able to use the most appropriate model to study a disease or response to a medication, delaying or stopping much needed medical advances. The development of new medicines would slow, or even stop, denying cures and treatments to the people who need them. Research institutions would have to divert precious funding, manpower, and laboratory space to breeding animals, taking resources away from important research"

Resources for this presentation provided by:

National Association for Biomedical Research
Washington, DC

William R. Morton, VMD
Paris nhp, Edmonds, Washington

"SUPPLY AND USE OF NHP AROUND THE WORLD." National Research Council. Animal Research in a Global Environment: Meeting the Challenges: Proceedings of the November 2008 International Workshop. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.

Robert Mullan, MD
Animal Importation and Contact Team,
Quarantine and Border Health Services Branch,
Division of Global Migration and Quarantine,
National Center for Emerging Zoonoses and Infectious Diseases, US Center for Disease Control
Atlanta, Georgia

Joko Pamungkas DVM, PhD
Director, Primate Research Center, Bogor Agricultural University
Bogor, Indonesia

Dondin Sajuthi, DVM, PhD

Director, Bogor Life Sciences Technology
Bogor, Indonesia

James Smith, PhD
Preclinical Evaluations Team
CDC/Division of HIV/AIDS Prevention/ Laboratory Branch
Atlanta, Georgia

К ПОБЕДЕ НАД СПИД - СИНИЦА В РУКАХ ИЛИ ЖУРАВЛЬ В НЕБЕ?

Воеводин А.Ф.

Vir&Gen, Торонто, Канада

Вакцины безусловно являются наиболее эффективным средством борьбы с инфекционными болезнями. Вскоре после открытия ВИЧ перспективы быстрой разработки вакцины против ВИЧ/СПИД казались вполне реальными. Однако, сейчас, более чем три десятилетия спустя, несмотря на интенсивные исследования в этой области, профилактическая вакцина против ВИЧ остаётся мечтой далёкой от осуществления. Пожалуй, основной урок, который может быть вынесен из знаний, накопленных в данной области, состоит в том, что задача чрезвычайно сложна и не поддаётся решению «кавалерийской атакой». В обшем виде ясно, что протективный иммунный ответ против ВИЧ должен иметь широкую специфичность, действовать как на системном, так и на местном уровнях. В нём должны быть задействованы как антительные так и клеточные механизмы адаптивного иммунитета. Но как конкретно достичь этого путем вакцинации, особенно при условии когда использование живой вакцины на основе ВИЧ исключено, а результаты, полученные на моделях, далеко не всегда хорошо предсказывают то, что произойдет в аналогичной ситуации на людях? Хотя модели ВИЧ инфекции/СПИД на обезьянах были и остаются важнейшим полигоном для поиска перспективных подходов к вакцинации против ВИЧ, к сожалению, они не позволяют достоверно приоритизировать ВИЧ вакцины-кандидаты для испытаний на людях. Из-за этого выбор вакцин-кандидатов для клинических испытаний является достаточно субъективным. При этом «пропускная способность» фазы 3 клинических испытаний профилактических ВИЧ вакцин-кандидатов, т.е. испытание их протективной активности, крайне мала. Такие испытания требуют рекрутирования очень большого количества ВИЧ-отрицательных участников

(измеряемого в тысячах), что делает их стоимость чрезвычайно высокой, а логистику сложной. На каждое испытание уходят годы. Пока подобные испытания давали отрицательные результаты, за одним исключением. Но даже в этом случае зафиксированный протективный эффект был чрезвычайно мал и его реальность многими подвергается сомнению. Таким образом, увы, профилактическая ВИЧ вакцина остаётся «журавлём в небе».

Есть ли осуществимый альтернативный подход, который позволил бы «сокрушить» эпидемию ВИЧ/СПИД? Да, по крайней мере в теории, это возможно с использованием уже доступных средств. «Синицей в руках» являются широкомасштабные химиотерапевтические вмешательства, направленные на снижение способности ВИЧ-инфицированных индивидуумов распространять вирус. Имеющийся арсенал анти-ВИЧ препаратов, в принципе, достаточен для достижения этой цели. Однако, реализация подобной терапии в масштабе, охватывающем большинство ВИЧ-инфицированных, это крайне сложная задача, для решения которой требуется существенная интенсификация и модернизации программ ранней диагностики ВИЧ инфекции. Серьёзные проблемы просматриваются и в обеспечении долгосрочного выполнения ВИЧ-инфицированными предписаний по приёму назначенного лечения. Простых рецептов достижения этой цели нет, как нет и оснований считать эту задачу не решаемой. Множественные мотивирующие стимулы, направленные как на конечных пользователей, так и на исполнителей программ, должны быть задействованы в сочетании с работой по упрощению протоколов лечения. Дополнительное снижение распространения ВИЧ может быть достигнуто путём химиопрофилактики ВИЧ у максимального количества лиц, имевших потенциальную возможность заражения (post-exposure prophylaxis). Всё это требует огромных материальных средств и организационных усилий. Однако, такие программы, в отличие от пока еще гипотетической вакцинации против ВИЧ, могут реализовываться уже сегодня.

TOWARDS DEFEATING AIDS – A BIRD IN THE HAND OR TWO IN THE BUSH?

Voevodin A.

Vir&Gen, Toronto, Canada

Vaccines have proved to be the most effective weapon against infectious diseases. Shortly after HIV discovery quick development of a vaccine against HIV/AIDS seemed to be within reach. However, despite more than three decades

of extensive research, a prophylactic HIV vaccine remains a dream. Perhaps, the best lesson to be learned is that: the HIV vaccine development task is extremely complex and cannot be solved by a “cavalry attack”. In general terms, it is clear that the protective immune response against HIV must be broadly specific, both systemic and mucosal, and involve antibody- and cell- mediated adaptive immunity. What are the concrete ways to achieve this by vaccination, particularly when use of a live HIV-based vaccine is out of the question and animal models are not sufficiently predictive of what happens in humans? Although nonhuman primate models of HIV infection/AIDS have been and remain to be the major “testing ground” in the HIV vaccine development field, unfortunately, these models do not allow reliable prioritization of candidate HIV vaccines for entry into human trials. As a result, HIV vaccines for clinical trials are being chosen quite arbitrarily. At the same time “throughput capacity” of clinical Phase 3 trials (when protective efficacy is tested) is very low. Phase 3 clinical trials require recruitment of very large number of HIV-free participants (measured in thousands) which makes them extremely expensive and logistically complicated. It takes years to complete such trials. Up to now, all but one of the human trials of HIV candidate vaccines have produced negative results. A very small protective effect observed in an exceptional trial was marginally significant, and the reliability of this effect was questioned. Thus, an HIV vaccine is still very far from being “a bird in the hand”.

Is there a doable alternative for knocking-out the HIV/AIDS epidemic? At least in theory, yes, it is possible by already available means. “A bird in the hand” is a large-scale chemotherapeutic intervention aiming at reducing the capacity of HIV-infected individuals to spread the virus. The available armamentarium of anti-HIV drugs, in principle, is sufficient for achieving this goal. However, delivering such treatment to a majority of HIV-infected individuals is a very complex task that requires substantial intensification and modernization of programs aiming at early diagnosis. Serious problems are anticipated in achieving long-term compliance of HIV-infected individuals with the prescribed treatment. There is no simple recipe for dealing with that. At the same time this task does not seem to be unsolvable. Multiple incentives for end-users and service providers should be used in combination with simplification of treatment protocols. Further reduction of HIV spread can be achieved by making post-exposure HIV prophylaxis (PEP) available for as many HIV-exposed individuals as possible. All these interventions would be extremely costly and organizationally challenging, but, in contrast to a yet hypothetical HIV vaccine, these programs can be implemented right now.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ ОРИГИНАЛЬНОГО АНКСИОЛИТИКА НА ОСНОВЕ ЭНДОГЕННОГО ТЕТРАПЕПТИДА ХОЛЕЦИСТОКИНИНА НА ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИМАТАХ

Колик Л.Г., Середенин С.Б.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова»

125315, Балтийская ул., 8, Москва, Россия

Фундаментальными исследованиями доказано, что алкоголизм является гетерогенным заболеванием и имеет высокую коморбидность с тревожными расстройствами. Часто инициация потребления алкоголя обусловлена стремлением справиться с негативными эмоционально-стрессовыми переживаниями [1]. Фармакологические стратегии при лечении алкоголизма в большинстве случаев включают анксиолитический компонент [2]. Бензодиазепиновые транквилизаторы успешно устраняют симптомы абстиненции, однако, сами могут вызывать лекарственную зависимость и обладают нежелательными побочными эффектами.

В наших исследованиях сделаны попытки разработать безопасный препарат на основе анксиогенного тетрапептида холецистокинина (ХЦК-4), идея которого состоит в достижении анксиолитического действия без прямого влияния на $ГАМК_A$-рецепторы. С использованием топохимического принципа конструирования новых соединений Шемякина-Овчинникова-Иванова (1969) осуществлен виртуальный переход от природного тетрапептида L-Trp-L-Met-L-Asp-L-Phe-NH_2 к его ретро-аналогу L-Phe-L-Asp-L-Met-L-Trp-NH_2. В результате дальнейших химических модификаций получены трипептоидные аналоги ХЦК-4 с общей формулой $Ph(CH_2)nC(O)$-$NH(CH_2)mC(O)$-L-Trp-NH_2.

При исследовании структурно-функциональной зависимости в ряду синтезированных аналогов ХЦК-4 было отобрано наиболее перспективное соединение под шифром ГБ-115 ($Ph(CH_2)_5CO$-Gly-*L*-Trp-NH_2) [3]. Взаимодействие ГБ-115 со 109 рекомбинантными рецепторами изучено в опытах *in vitro* на клетках CHO и HEK-293. Выявлены первичные рецепторные мишени аналога ХЦК-4, который при клеточном функциональном анализе в микромолярных концентрациях проявлял свойства антагониста холецистокининовых $ХЦК_1$-и бомбезиновых BB_3 рецепторов и агониста каппа-опиоидных рецепторов. В опытах *in vivo* на мелких лабораторных животных анксиолитический эффект ГБ-115 не проявлялся на фоне действия агониста ХЦК-рецепторов, суммировался при

совместном введении с агонистом бомбезиновых рецепторов и не изменялся при блокаде опиоидных рецепторов [4].

Очевидно, что фармакотерапия тревожных расстройств требует разработки лекарственных форм для перорального использования. Соединение ГБ-115 принадлежит к труднорастворимым лекарственным веществам, поэтому с помощью физических и технологических методов повышения биодоступности лекарственных веществ был разработан ряд фармацевтических композиций ГБ-115, изучение фармакокинетических характеристик которых позволило выявить оптимальную композицию с целью создания на ее основе твердой лекарственной формы для дальнейшего фармакологического изучения и продвижения в медицинскую практику.

Анксиолитические свойства аналога ХЦК-4 в таблетках 0.001г изучены в стандартных тестах для оценки тревожного поведения у грызунов. Фармакогенетический анализ поведения мышей BALB/c и C57Bl/6 с «высоким» и «низким» уровнем тревожности в тесте «открытое поле» показал у дипептида действие, направленное на мышей BALB/c, т.е. особей с «пассивной» реакцией на эмоционально-стрессовое воздействие. В тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» анксиолитическое действие ГБ-115 установлено у мышей BALB/c, у беспородных крыс, а также у «старых» беспородных крыс, потреблявших 10% раствор этанола в течение 33-х недель, на фоне 48-часовой алкогольной депривации. Эффективность ГБ-115 в отношении тревожной реакции, индуцированной отменой этанола, подтверждена в тесте «социальное взаимодействие». Основной эффект ГБ-115 развивался через 45 мин и наблюдался через 90 мин после однократного введения дипептида. При 14-ти дневном введении анксиолитическое действие ГБ-115 сохранялось. При сопоставлении сопутствующих эффектов пептидных и бензодиазепиновых анксиолитиков установлено, что в отличие от феназепама ГБ-115 в диапазоне эффективных доз (1) не угнетает спонтанную двигательную активность, (2) при субхроническом введении не обладает способностью к формированию аддиктивного состояния [5] и (3) относится к низко токсическим веществам [6].

В популяции аутбредных крыс выявлены корреляции тревожного поведения с уровнем добровольного потребления этанола, что позволяет предполагать вклад наследственно контролируемого фенотипа тревожности в формирование алкогольной мотивации. У инбредных крыс MR/MNRA с противоположной реакцией на эмоциональный стресс проведена оценка влияния пептидного анксиолитика ГБ-115 на сформированную в течение 12-ти месяцев алкогольную мотивацию. При предоставлении животным свободного выбора между 15% раствором этанола и водой «низко-эмоциональные» крысы

MNRA потребляли больше алкоголя, по сравнению с «высоко-эмоциональными» крысами MR, однако, в условиях продолжительного неограниченного доступа к этанолу поведение крыс MR трансформировалось за счет резкого усиления алкогольной мотивации, начиная с 5-го месяца. Обладающий селективным действием у «высоко-эмоциональных» крыс ГБ-115 (0.025 мг/кг, в/б, 14 дней) значительно снижал среднесуточное потребление и алкоголь-депривационный эффект у крыс MR, не влияя на влечение к этанолу у крыс MNRA.

Таким образом, уникальный рецепторный профиль, оригинальный спектр фармакологической активности ГБ-115, включающий анксиолитическое, антидепрессивное и антиаддиктивное действие, открывают перспективы для дальнейшего изучения пептидного анксиолитика на трансляционных моделях алкогольной зависимости у лабораторных приматов.

Список литературы

1. Pohorecky LA (1981). The interaction of alcohol and stress. A review. Neurosci Biobehav Rev 5: 209–229.
2. Lesch OM, Walter H, Wetschka CH, et. al. Alcohol and Tobacco, Medical and Sociological Aspects of Use, Abuse and Addiction. Springer Wien New York; 2010.
3. Гудашева Т.А., Лезина В.П., Кирьянова Е.П. и соавт. (2013). Исследование биологически активной конформации ГБ-115, дипептидного аналога холецистокинина-4. Биоорганическая химия. Т. 39. № 3: С. 293-302.
4. Колик Л.Г., Жуков В.Н., Середенин С.Б. (2007). Характер проявления антиноцицептивных и анксиолитических свойств соединения ГБ-115 в аспекте взаимодействия холецистокининовой и опиоидергической систем. Экспериментальная и клиническая фармакология. Т.70, № 2:8-11.
5. Колик Л.Г., Гарибова Т.Л., Литвинова С.А. и соавт. (2011). Отсутствие толерантности и синдрома отмены у нового l-триптофансодержащего дипептидного анксиолитика ГБ-115. Вестник РАМН. № 7:37-42.
6. Сорокина А.В., Алексеева С.В., Немова Е.П. и соавт. (2010). Доклиническое исследование безопасности дипептидного соединения ГБ-115. Экспериментальная и клиническая фармакология. Т.73, № 6: 29-32.

STUDY OF NOVEL ANXIOLYTIC DEVELOPED ON THE BASE OF ENDOGENOUS TETRAPEPTIDE CHOLECYSTOKININ: NEW PERSPECTIVES FOR LABORATORY PRIMATES

Kolik L.G., Seredenin S.B.

Federal State Budgetary Research Institution «Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov», 8 Baltiyskaya, Moscow, 125315, Russian Federation.

Nowadays, the heterogeneity of the disease alcohol dependence is without any doubt an accepted certainty. Genetically determined nonspecific susceptibility factors that substantially increase the risk to develop alcohol addiction include concomitant psychiatric disorders, such as anxiety. Subsequently, alcohol drinking might be initiated to counteract some effects of stress [1]. For alcohol withdrawal treatment most authors recommend benzodiazepines [2]. However, in patients who use alcohol as a self-medication and conflict solution strategy benzodiazepines ($GABA_A$ receptors agonists) are contraindicated because many of these patients later on abuse not only alcohol but also benzodiazepines.

In this study we have tried to develop a safe drug with the idea to cope anxiety without direct effect on $GABA_A$ receptors. We used the chemical structure of endogenous tetrapeptide cholecystokinin (CCK-4) with panic-like action in humans and the topochemical principle formulated by Shemyakin, Ovchinnikov, and Ivanov (1969) for the peptide design. In accord with this principle, the peptide consisting of D-amino acids and having an inverse sequence may be as active as the natural L-amino acid–based peptide due to the same spatial location of its side radicals. The reason is that the change in the direction of the peptide chain is stereochemically equivalent to the change in the chirality of all amino acid residues. As the replacement of pharmacophoric residue by its stereomer often leads to the inverse activity, the same effect can be expected from the equivalent procedure of changing the direction of the peptide chain. Thus, the antagonistic effect can be obtained using L-amino acids with the reversed peptide chain direction. So, virtual transition from natural tetrapeptide L-Trp-L-Met-L-Asp-L-Phe-NH_2 to retro-analogue L-Phe-L-Asp-L-Met-L-Trp-NH_2 was made and after following chemical modifications series short peptide analogues with common formula $Ph(CH_2)nC(O)$-$NH(CH_2)mC(O)$-L-Trp-NH_2 was produced.

A new potential anxiolytic agent GB-115 ($Ph(CH_2)_5CO$-Gly-*L*-Trp-NH_2) with anxiolytic-like effects in outbred rats was selected as leader compound for further investigation [3]. GB-115 interaction with 109 human and rat recombinant receptors was studied in CHO and HEK-293 cells. Finally, three primary receptor targets were determined for GB-115: low affinity to CCK_1 receptor, kappa-opioid

receptors and bombesin receptor subtype-3 (BB_3). In cellular functional assays GB-115 agonistic properties were revealed for KOP receptors, GB-115 blocked the effects of BB_3 receptor agonist and CCK_1 receptor agonist. In behavioral tests in rodents GB-115 anxiolytic effect was antagonized by CCK-4, agonist of CCK receptors, summarized after co-administration with BB_3 receptor agonist and did not change after naloxone pretreatment [4].

Obviously, oral drug formulations are more favorable for anxiety disorders pharmacological treatment. Dipeptide GB-115 is a sparingly soluble substance, so, four new pharmaceutical compositions for oral administration were described. It was shown that different excipients and preparation technology significantly affect the pharmacokinetic parameters of the developed dipeptide. According to the main pharmacokinetic characteristics demonstrating the substance bioavailability optimal pharmaceutical composition GB-115 was selected for development of solid modified-release oral drug formulation and pharmacological study in animal models.

Anxiolytic properties of GB-115 (tablets 0.001g) were studied in standard tests for anxiety in rodents. In “open field” test GB-115 dose-dependently reduced high level of anxiety in rodents with genetically determined “freezing” reaction to emotional stress BALB/c mice with no effects on the behavior of C57Bl/6 mice with active response to stress. In the «elevated plus-maze» test anxiolytic properties were revealed in BALB/c mice, outbred rats and in aged long-term alcohol-experienced (33 weeks) outbred rats with withdrawal-induced anxiety. GB-115 anxiolytic efficacy was confirmed in aged long-term alcohol-experienced rats in “social interaction” test. The dipeptide GB-1115 anti-anxiety activity developed in 45 min, was observed in 90 min after acute oral administration and retained after 14-days administration in rats. In comparison with benzodiazepines it was shown that dipeptide GB-115 at the range of effective doses: (1) had no depression on locomotor activity, (2) devoided of addictive potential after long-term administration [5] and (3) had very low toxicity [6]

Strong correlation between inherent anxiety and alcohol-seeking behavior was revealed in outbred rats. Dipeptide anxiolytic GB-115 effects on alcohol seeking behavior were studied in male MR/MNRA rats with opposite response to emotional stress after long-term (12th months) ethanol experience. At the beginning of two-bottle test with 15% (v/v) ethanol solution and tap water “low-emotional” MNRA rats consumed much more than “high-emotional” MR rats, however the alcohol-drinking behavior of MR rats transformed due to dramatic increase in ethanol intake after 5th months of alcohol exposure. Targeted to “high-emotional” rats selective anxiolytic GB-115 (0.025 mg/kg, i.p., 14 days) significantly decreased

average daily ethanol intake and alcohol-deprivation effect in MR rats without effects on alcohol-seeking behavior of MNRA rats.

Thus, unique receptor profile, original GB-115 pharmacological spectrum including anxiolytic, antidepressant and antiaddictive effects, hold out great promises for further investigations of dipeptide anxiolytic GB-115 in novel translational models of alcohol dependence in non-human primates.

References

1. Pohorecky LA (1981). The interaction of alcohol and stress. A review. Neurosci Biobehav Rev 5: 209–229.
2. Lesch OM, Walter H, Wetschka CH, Hesselbrock M, Hesselbrock V. Alcohol and Tobacco, Medical and Sociological Aspects of Use, Abuse and Addiction. Springer Wien New York; 2010.
3. Gudasheva T.A., Lezina V.P., KirYanova E.P. et al. (2013). A study of the biologically active conformation of the cholecystokinin-4 dipeptide analogue GB-115. Russian Journal of Bioorganic Chemistry. T. 39, № 3: 259-267.
4. Kolik LG, Zhukov VN, Seredenin SB. (2007). Manifestations of the antinociceptive and anxiolytic properties of the compound GB-115: interactions of cholecystokinin and opioid systems. Eksp Klin Farmakol. 70(2):8-11.
5. Kolik LG, Garibova TL, Litvinova SA, et al. (2011). The absence of tolerance and withdrawal syndrome after the treatment with the new L-tryptophane-containing dipeptide anxiolytic GB-115. Vestn Ross Akad Med Nauk. (7):37-42.
6. Sorokina AV, Alekseeva SV, Nemova EP et al. (2010). Preclinical safety investigation of GB-115 dipeptide. Eksp Klin Farmakol. 73(6):29-32.

РАЗВИТИЕ КОНЦЕПЦИИ АКАДЕМИКА Н.П. БОЧКОВА О МУТАЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ У ЧЕЛОВЕКА

Воронина Е.С.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», г. Москва, Россия

Резюме

В статье описан вклад академика Н.П. Бочкова в формирование и развитие концепции мутагенеза у человека, обсуждаются его последние работы в области генетической безопасности стволовых клеток и влияния витаминной обеспеченности на чувствительность клеток человека к мутагенным воздействиям. Рассмотрены актуальные направления исследований в области изучения мутагенеза.

DEVELOPMENT OF ACADEMICIAN N.P. BOCHKOV'S CONCEPT OF THE MUTATION PROCESS IN HUMAN BEINGS

Voronina E.S.

FSBSI "Research centre of medical genetics", Moscow, Russia

Abstract

The article describes the contribution of the academician N.P. Bochkov to the formation and development of the concept of mutagenesis in humans. His latest works in the field of genetic safety of stem cells and influence of vitamin consumption on sensitivity of human cells to mutagens are discussed. The actual directions of researches in the field of mutagenesis are discussed.

Концепция академика Н.П. Бочкова о мутационном процессе у человека

Мутационная изменчивость является видовой биологической характеристикой человека, которая поддерживается на протяжении всей эволюции и усиливается под влиянием неблагоприятных факторов среды. В результате мутационного процесса возникают новые случаи наследственных болезней, врожденных пороков развития и злокачественных новообразований, что определяет важность изучения данного раздела генетики человека.

Основная концепция работ Николая Павловича Бочкова и его коллег – это комплексный подход к изучению мутационного процесса у человека. Генетический аспект состоял в выявлении фундаментальных закономерностей мутагенеза у человека, медицинский – в создании на их основе методов оценки мутагенности факторов среды и генетического риска, способов профилактики индуцированных мутаций, гигиенический и популяционный аспекты – в разработке мер санитарно-эпидемиологического контроля.

Спонтанный мутагенез. Впервые в мире в начале 70-х годов под руководством Н.П. Бочкова были изучены закономерности и количественные характеристики спонтанного уровня хромосомных аберраций в культурах периферической крови. Определен спектр спонтанных хромосомных мутаций. Установлена средняя частота аберрантных метафаз - 1,16 %, с индивидуальными колебаниями от 0 до 3 %, независимо от пола и возраста.

Показано, что распределение индивидуальных частот клеток с аберрациями соответствует биномиальному или пуассоновскому. Выше перечисленные закономерности использованы для решения практических задач оценки частоты хромосомных аберраций у лиц, подвергающихся воздействию мутагенных факторов внешней среды [1].

Химический мутагенез. Н.П. Бочковым и коллегами проведено всестороннее изучение хромосомных аберраций и сестринских хроматидных обменов при воздействии более 20 мутагенов. Научно обосновано положение о возможности математического моделирования закономерностей химического мутагенеза. Предложена концепция «мутагенных центров», на основании которой химические мутагены подразделены на 2 класса: одноцентровые с расположением активных групп в одном месте молекулы мутагена и многоцентровые с расположением активных групп в разных местах молекулы.

Построены математические модели, описывающие концентрационные и экспозиционные зависимости химически индуцированных аберраций для каждого из двух классов мутагенов. Оба класса химических мутагенов характеризуются беспороговостью действия. Сформулировано и экспериментально обосновано понятие дозы химического мутагена. При этом доказана возможность прямой экстраполяции результатов оценки действия испытуемых соединений in vitro на их эффекты in vivo. Установлено, что комбинированное влияние химических мутагенов синергично.

Совокупность этих данных легла в основу принципов количественной оценки мутагенных воздействий и экстраполяции результатов, полученных на экспериментальных моделях, на человека.

Установленные закономерности спонтанной хромосомной изменчивости в лимфоцитах периферической крови человека и химически индуцированного мутагенеза позволили провести цитогенетическое обследование рабочих, подвергающихся воздействию вредных факторов в условиях производства. Аналогичная работа проведена при обследовании больных, получавших в терапевтических целях фармакологические средства [1,2,3].

Радиационный мутагенез. Работы по радиационно индуцированным хромосомным мутациям в клетках человека были посвящены: 1) количественным закономерностям цитогенетических эффектов облучения, 2) разработке метода биологической индикации или дозиметрии облучения, 3) реальной проверке цитогенетических эффектов облучения у рабочих, профессионально контактирующих с излучениями, населения,

проживающего на радиоактивно загрязненных территориях после аварии на Чернобыльской АЭС.

Закономерности радиационного мутагенеза на хромосомном уровне существенно отличаются от таковых при химическом мутагенезе. В частности, впервые было доказано, что важным параметром для оценки эффектов облучения является не только общее количество индуцированных аберраций, но и число разрывов, а также распределение аберраций по клеткам, т.е. «нагруженность» клеток аберрациями [1,4].

Генетический мониторинг популяций в связи с загрязнением окружающей среды. Закономерности возникновения хромосомных мутаций в зародышевых клетках изучались тремя подходами: созданием регистра хромосомных аномалий, организацией мониторинга врожденных пороков развития, математическим моделированием [5,6].

Антимутагенная защита наследственности. Отсутствие возможности полного исключения контакта человека с мутагенами среды его обитания определило целесообразность разработки средств защиты наследственности. В 1991-1998 году Н.П. Бочков принял деятельное участие в разработке методических подходов к поиску соединений с антимутагенными свойствами, перспективных для применения человеком [7].

В содружестве с сотрудниками НИИ фармакологии им. В.В. Закусова были определены основные биохимические механизмы, экзогенная регуляция которых имеет следствием предотвращение мутаций, группы синтетических и природных соединений с возможным антимутагенным действием, разработана методология изучения и оценки их эффективности. Сформулированы основные требования к безвредности антимутагенов, определены необходимые экспериментальные этапы их доклинического исследования, методы клинической оценки и способы практического применения. На основании предложенной методологии впервые установлены и всесторонне охарактеризованы антимутагенные свойства ряда фармакологически активных соединений, пищевых и лекарственных средств. Впервые в мировой практике были разработаны фармакологические корректоры мутагенеза, которые использованы в клинике в качестве лекарственных средств защиты наследственности человека от мутагенных воздействий (бемитил, рутин, глицирам) [8,9,10].

Медико-генетическое консультирование при мутагенных и тератогенных воздействиях. На основе установленных закономерностей и количественной оценки индуцированного мутагенеза у человека Н.П. Бочковым были предложены принципы медико-генетического консультирования по поводу мутагенных и тератогенных воздействий как во

время беременности, так и при ее планировании. Главный принцип в таких случаях – это оценка индивидуального риска [11].

В целом, разработанные методы проверки химических веществ на мутагенность, количественной оценки генетического риска и коррекции мутагенеза внедрены в системах санитарно-эпидемиологического надзора, доклинического испытания лекарств, медико-генетического консультирования и лечебной практики [12].

Различные направления изучения мутационного процесса.

Мутагенез в зародышевых клетках представляет особый интерес, поскольку является основой наследуемого генетического груза. Он имеет ряд принципиальных особенностей по сравнению с мутагенезом в соматических клетках: наличие гематотестикулярного и гематофолликулярного барьеров; различная чувствительность зародышевых клеток на разных стадиях гаметогенеза; наличие существенных различий между сперматозоидами и яйцеклетками (по репарационной способности, темпу спонтанного мутирования и др.). Таким образом, мутагенез в зародышевых клетках можно рассматривать как самостоятельное научное направление.

Проблема изучения мутагенеза в зародышевых клетках заключается в сложности их анализа у человека, особенно яйцеклеток, и отсутствии адекватной методической базы для этого. Однако развитие современных молекулярно-цитогенетических и молекулярно-генетических методов (FISH, SKY, CGH, ДНК-комет, аллельспецифичной ПЦР и др.) открывает перспективу для более глубокого изучения мутагенеза в зародышевых клетках [13].

Генотоксичность соединений растительного происхождения. Несмотря на широко распространенное мнение о безусловной полезности всего природного, существуют доказанные примеры вредных для человека соединений растительного происхождения. Многие из уже изученных веществ (аристолохиевые кислоты, некоторые алкалоиды и флавоноиды, вещества пропенилбензоловой и гидразиновой природы, а также микотоксины) обладают мутагенным, канцерогенным, тератогенным действием. Результаты исследований ряда других растительных соединений, в том числе, фитопрепаратов, использующихся человеком неоднозначны, что определяет важность их дальнейшего изучения в соответствии с принципами, принятыми в современных системах оценки генотоксичности [14].

Роль генотоксических повреждений в возникновении различных заболеваний человека. Роль генотоксических повреждений в возникновении и развитии наследственных, врожденных и многофакторных заболеваний у

человека не вызывает сомнений и давно привлекает внимание исследователей. Еще в XX веке сформирована концепция генетического груза. Выявлена ведущая роль генных, хромосомных и геномных мутаций в накоплении генетического груза. Что касается мутаций в соматических клетках, наибольшую патогенетическую значимость имеют генные мутации и стабильные хромосомные аберрации. Основное внимание в этой области сосредоточено на выявлении роли соматических мутаций в возникновении злокачественных новообразований и в старении. Мутации в соматических клетках влияют на здоровье конкретного индивида и не представляют угрозы для его потенциального потомства, тогда как мутации в зародышевых и эмбриональных клетках могут приводить к бесплодию, невынашиванию беременности, врожденным порокам развития, развитию наследственных заболеваний у потомства [15].

В последние годы, с развитием новых методов генетического анализа, в частности метода ДНК-комет, все больше подтверждений находит точка зрения о том, что повреждения ДНК следует рассматривать как самостоятельный патогенетический фактор. Несмотря на то, что о генотоксикологии митохондрий на сегодняшнем этапе известно крайне мало, патогенетическая значимость мутаций митохондриальной ДНК не вызывает сомнений [16,17].

Хромосомная и геномная изменчивость стволовых клеток человека. Клеточная терапия относится в настоящее время к актуальным направлениям клинической медицины. Биология стволовых клеток хорошо изучена в вопросах их размножения и дифференцировки. Значительно меньше уделяется внимания мутационной изменчивости, особенно ее количественной стороны. Между тем, одним из возможных отдаленных осложнений клеточной терапии является спонтанный и индуцированный мутагенез. В связи с этим в лаборатории мутагенеза Медико-генетического научного центра под руководством Н.П. Бочкова было проведено изучение хромосомной и геномной изменчивости мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК), полученных из костного мозга и жировой ткани взрослых индивидов, на разных этапах культивирования. Нами впервые было проведено комплексное исследование МСК, включающее кариотипирование и оценку уровня анеуплоидии с помощью FISH.

При стандартном кариотипировании в ряде культур были обнаружены как количественные (моносомии, трисомии), так и структурные (транслокация) нарушения. Методом FISH интерфазных клеток был выявлен высокий уровень анеуплоидии в культурах МСК, было обнаружено клонообразование. Аномальные клоны, попав в организм реципиента, могут

явиться причиной развития опухоли или изменения иммунного статуса, связанного с элиминацией генетически измененных клеток.

Полученные нашим коллективом результаты свидетельствуют о необходимости более глубокого изучения генетики стволовых клеток и создания системы контроля их качества при использовании их в клеточной терапии. На основе наших результатов были разработаны методические рекомендации по тестированию стволовых клеток на генетическую безопасность перед трансплантацией [18,19].

Защитное действие витаминов при индуцированном мутагенезе. Хорошо известно, что дополнительный прием витаминов и других микронутриентов в виде различных комплексов и пищевых добавок оправдан не только с точки зрения предупреждения витаминной недостаточности и связанных патологических проявлений, но также как мера профилактики сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, патогенез которых связан с окислительным повреждением ДНК и мутагенезом. Вместе с этим, экспериментальные данные, полученные при генотоксикологических исследованиях витаминов, указывают на наличие у них как позитивных антимутагенных, так и негативных комутагенных и даже мутагенных эффектов. В связи с этим коллективами лаборатории мутагенеза Медико-генетического научного центра и НИИ фармакологии им. В.В. Закусова была проведена работа, посвященная сравнительной цитогенетической оценке спонтанного и индуцированного химическими мутагенами in vitro мутагенеза в лимфоцитах периферической крови здоровых доноров до, после и во время приема трех разных витаминно-минеральных комплексов.

Здоровые доноры принимали один из трех комплексов витаминов или витаминов и минералов с различным качественным и количественным составом, в том числе в дозировке, существенно превышающей рекомендованное суточное потребление. В работе использовались мутагены с различными механизмами действия (хлористый кадмий, диоксидин, блеомицин), их вносили в культуры крови доноров. Уровень хромосомных аберраций оценивали до начала, во время и после окончания приема комплексов.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что прием комплексов, содержащих витамины в суммарных дозах, превышающих суточные потребности, не увеличивает спонтанного мутирования и уменьшает чувствительность клеток человека к цитогенетическому действию химических мутагенов. Одновременно, очевидно, что витаминные комплексы определенного количественного и качественного состава могут вызывать комутагенную модификацию чувствительности клеток к действию

отдельных мутагенов в определенных концентрациях in vitro. Выявленные эффекты модификации зависят от длительности приема, количественного и качественного состава используемых витаминных комплексов, природы мутагенов и уровней индуцируемых цитогенетических повреждений [20].

Генотоксичность нанопроизводных. Вместе с коллегами Н.П. Бочков был всерьез обеспокоен планируемым широким внедрением наночастиц без должной оценки их генетической безопасности при отсутствии научно обоснованных методических подходов, учитывающих особенности токсикокинетики этих соединений. Сегодня генотоксичность разных групп нанопроизводных продемонстрирована многими исследователями, однако в целом, результаты исследований в этой области неоднозначны. До сих пор не сложилось методологии оценки генотоксических эффектов наноматериалов и связанного с ними риска для здоровья человека [21].

Заключение

Сегодня трудно представить, каким был бы уровень развития исследований в области мутагенеза и сопряженной сфере генотоксикологических исследований в отсутствие вклада Н.П. Бочкова. Его фундаментальные труды, посвященные методическим аспектам цитогенетических исследований, количественной цитогенетике, концепция мутационного процесса у человека создали надежную базу для успешного развития исследований в России в области мутагенеза и антимутагенеза, гигиенического нормирования генотоксикантов, медико-генетической оценки риска последствий мутагенных воздействий, явились триггером для подавляющего большинства генотоксикологических исследований, проводимых в современной России.

Академик Н.П. Бочков оставил большое научное наследие, оно выражается не только в монографиях, учебниках, циклах лекций, но также в воспитании и подготовке учеников, последователей и соратников по мутагенным исследованиям. Он способствовал научному становлению таких известных исследователей как члены-корреспонденты Чеботарев А.Н., Дурнев А.Д., профессора Арутюнян Р.М., Пилинская М.А., Журков В.С., Кулешов Н.П., Ревазова Ю.А., Назаренко С.А. и др., многие из которых продолжают исследования академика Н.П. Бочкова по настоящее время.

Список литературы

1. Н.П. Бочков, А.Н. Чеботарев. Наследственность человека и мутагены внешней среды. М.: Медицина, 1989. 270 с.

2. Н.П. Бочков, Л.Д. Катосова, В.И. Платонова и др. Влияние профессиональных контактов с химическими веществами на возникновение хромосомных повреждений в лимфоцитах крови человека В кн.: Теоретические и прикладные проблемы медицинской генетики. Моск. об-во исп. Природы, Москва, 1993. С. 101-105.
3. Бочков Н.П., Ревазова Ю.А., Дурнев А.Д. Генетическая токсикология: прошлое, настоящее. Будущее // Третий съезд токсикологов России. Тезисы докладов. Пленарные доклады. Москва, 2008, С. 5-7.
4. Н.П. Бочков. Аналитический обзор цитогенетических исследований после Чернобыльской аварии // Вестник РАМН, 1993, №6. С.51-56.
5. Н.П. Бочков, Л.Д. Катосова. Генетический мониторинг популяций человека при реальных химических и радиационных нагрузках // Вестник РАМН, 1992, №4. С.10-14.
6. Н.П. Бочков, Н.А. Жученко, Е.А. Кириллова и др. Мониторинг врожденных пороков развития // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1996, №2. С.20-26.
7. Бочков Н.П., Дурнев А.Д., Журков В.С., Малашенко А.М., Ревазова Ю.А., Середенин С.Б. Система поиска и изучения соединений с антимутагенными свойствами. (Методические рекомендации) // Химико-фармацевтический журнал, 1992, т.26, №9-10, С.42-46.
8. Дурнев А.Д., С.Б. Середенин. Фармакологические аспекты антимутагенеза. // "Мутагены и канцерогены окружающей среды и наследственность человека." Международный симпозиум, Москва 18-21 октября 1994 года. Сборник статей. Часть 2. Москва. 1994, стр. 147-177.
9. Дурнев А.Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания // Генетика.-1997.-т.33.-2.-стр. 165-176.
10. Durnev A.D., A.K. Zhanataev, E.S. Voronina, L.A. Oganesyantz, S.B. Seredenin. Modification of Chemical Mutagenesis. In: «Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction», Editors: Andor Kocsis and Hajna Molnar, Nova Science Publishers, NY, 2009; Inc, pp. 157-187.
11. Бочков Н.П., Рослова Т.А., Якушина И.И. Медико-генетическое консультирование по поводу мутагенных и тератогенных воздействий // Медицинская генетика, 2009, №1. С. 3-8.
12. Бочков Н.П., Дурнев А.Д. Очевидное и невероятное в представлениях о мутационном процессе у человека // Гигиена и санитария. 2011, № 5, С.9-10.
13. Дурнев А.Д. Анализ и значение мутаций в зародышевых клетках // Медицинская генетика, 2011, № 2, С. 3-11.

14. Дурнев А.Д., Лапицкая А.С. Генотоксикология соединений растительного происхождения // Экологическая генетика, 2012, № 3, С. 41-52.
15. Бочков Н.П., Дурнев А.Д. Мутационный процесс у человека // В кн.: Наследственные болезни. Национальное руководство. М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2012, С. 176-198.
16. Жанатаев А.К., Никитина В.А., Воронина Е.С., Дурнев А.Д. Методические аспекты оценки ДНК-повреждений методом ДНК-комет // Прикладная токсикология, 2011, № 2(4), С. 28-37.
17. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенина В.С. Генотоксические поражения и болезни // Молекулярная медицина, 2013, № 3, С. 3-19.
18. Бочков Н.П., Воронина Е.С., Катосова Л.Д., Никитина В.А. Цитогенетическое исследование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека в процессе культивирования // Медицинская генетика. – 2009. – Т. 8. - № 12. С. 3-6.
19. Чаушева А.И., В.А. Никитина, А.К. Жанатаев, А.Д. Дурнев, Н.П. Бочков. ДНК-повреждения в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках человека при разных сроках культивирования // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2011, № 4, С.1-3.
20. А.Д. Дурнев, Е.С. Сиднева, А.К. Жанатаев, В.А. Никитина, Н.П. Бочков. Защитное действие витаминов при индуцированном мутагенезе // Вестник РАМН. – 2007. - №7. – С. 6-13.
21. Дурнев А.Д. Оценка генотоксичности наночастиц при использовании в медицине // Санитария и гигиена, 2014, № 2. С. 76-83.

ФОРМИРОВАНИЕ ЕВРОПЕЙСКИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПРАВИЛ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОБЕЗЬЯН ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ КАНДИДАТОВ

Хамитов Р.А., Салимов Р.М.

ООО «МБЦ «Генериум», пос. Вольгинский, Владимирская обл., Россия

Резюме

Хельсинкская Декларация всемирной медицинской ассоциации 1964 года впервые ввела требование, согласно которому биомедицинские исследования на людях должны базироваться на результатах надлежащим образом выполненных экспериментов на животных и данных научной

литературы. Доклинические исследования стали краеугольным камнем безопасности при клинических исследованиях лекарственного кандидата.

Впоследствии, в 1986 году, в Европейском Союзе была принята Директива 86/609/EEC1, которая содержит необходимые стандарты и правила контроля использования лабораторных животных в экспериментальных и других научных целях.

Основополагающий принцип Правил - гуманное обращение с животными и их рациональное использование. Статья 7 Директивы предусматривает, что:1) Эксперимент не должен проводиться, если существует другой научно приемлемый способ получения искомого результата без использования животных, 2) В случае необходимости экспериментов на животных, приоритет следует отдавать тем исследованиям, которые используют минимальное количество животных, использовать животных с более низкой степенью нейрофизиологической чувствительности и применять процедуры, которые причиняют наименьшую боль, страдания или иной вред организму и которые с наибольшей вероятностью обеспечивают получение удовлетворительных результатов. 3) Не допускаются эксперименты на отловленных диких животных, если для этой цели возможно использование животных, которые разводятся для лабораторных исследований.

Европейское Агентство по Лекарственным Средствам (EMEA, ныне EMA) и Комитет ЕС по лекарственным препаратам для человека (CHMP) определили критерии релевантности видов животных при исследовании безопасности ЛК у человека, которые включают в себя: наличие фармакодинамически необходимого сайта связывания и соответствующего фармакодинамического ответа; сходство с человеком по токсичности и фармакокинетике *invitro* или по результатам изучения структурных аналогов того же класса соединений; сходство с человеком по анатомии или физиологии соответствующих органов и систем.

В частности, не-человекообразные приматы (НЧП) могут быть предпочтительными по отношению к другим млекопитающим по следующим причинам: из-за сходства менструального цикла и анатомии и физиологии молочной железы и репродуктивной системы в целом при изучении соединений, влияющих на женскую репродуктивную систему; из-за сходства органа зрения по некоторым уникальным особенностям (например, наличие желтого пятна), которые отсутствуют у других млекопитающих; из-за сходства системы свертывания крови при оценке эффектов факторов, влияющих на свертывание крови; из-за сходства особенностей иммунной системы при оценке безопасности многих биотехнологических препаратов.

Вместе с тем, все большее развитие получает стратегия проведения токсикологических исследований без использования обезьян, которая включает применение для моделирования болезней человека генетически модифицированных мышей или использование суррогатных молекул рекомбинантных белков, моделирующих лекарственный исследуемый лекарственный препарат. Таким образом, в настоящее время позиция Европейских регуляторных органов состоит в том, что использование НЧПнеобходимо и имеет важное значение в следующих областях биологии и медицины: фармакология, в частности оценка безопасности ЛК. Для некоторых типов биотехнологических ЛК, включая терапевтические антитела, НЧП может являться единственной релевантной *invivo* моделью; исследование патофизиологии некоторых инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ; при изучении строения и функции мозга приматов и человека; при разработке и тестировании методов ксенотрансплантации.

С целью минимизации использования НЧП регуляторные органы развитых стран рекомендуют применение в доклинических исследованиях гомологичных модельных животных и суррогатных моделей испытываемых лекарственных препаратов.

FORMATION OF EUROPEAN REGULATORY RULES FOR THE USE OF MONKEYS IN STUDIES OF DRUG CANDIDATES

Khamitov R.A., Salimov R.M.

LLC "IBC" Generium ", Volginskiy, Vladimir region., Russia

Abstract

Helsinki Declaration of the World Medical Association in 1964 first introduced the requirement according to which biomedical research on human beings should be based on the results of properly performed animal experiments and scientific literature data. Preclinical studies have become a corner stone of the safety in clinical trials of the drug candidates.

Subsequently, in 1986, the European Union adopted the Directive 86/609 / EEC1, which contains the necessary standards and control rules for the use of laboratory animals for experimental and other scientific purposes.

The fundamental principle of the Directive is the humane treatment of animals and their rational use. The Article 7 of the Directive provides for: 1) The experiment should not be performed if there is another scientifically acceptable method of obtaining the desired results without using animals, 2) In case of necessity of animal experiments, priority should be given to the studies that use a

minimum number of animals, use of animals with a lower degree of neurophysiological sensitivity, and use of procedures which cause the least pain, suffering or other harm to a body and are most likely to provide satisfactory results. 3) The experiments are not allowed on captured wild animals, if it is possible to use animals that are bred for laboratory tests.

The European Medicines Agency (EMEA now EMA) and the EU's Committee for Medicinal Products for Human Use (The CHMP) defined the criteria for relevance of animal species in safety studies of drug candidates in humans, which include: the availability of the pharmacodynamical binding site and corresponding pharmacodynamic response; similarity with human in toxicity and in vitro pharmacokinetics data for structural analogs of the same class compounds; similarity to human anatomy or physiology of the organs and systems. In particular, non-human primates (NHP) may be preferred to the other mammals for the following reasons: due to the similarity of the menstrual cycle and the anatomy and physiology of the breast and reproductive system taken in all in the study of compounds that affect the female reproductive system; because of the similarity of the body eye in some unique features (for example, the presence of the macula), which are absent in other mammals; because of the similarity of coagulation system when assessing the effects of the factors influencing blood clotting; because of the similarity of the immune system features when assessing the safety of many biotechnological drugs.

The current tendency is switching to running toxicology research without the use of monkeys, that involves the use of genetically modified mice or use of surrogate molecules of recombinant proteins that simulate the studied drug candidate.

Thus, the present position of European regulators stresses that the use of NHP is necessary and important in the following areas of biology and medicine: pharmacology with the safety assessment of DC. For some types of biotechnology DC, including therapeutic antibodies, NHP may be the only relevant model in vivo; in studying the pathophysiology of some infectious diseases, such as HIV; in studying the structure and function of the human and primates' brain in; the development and testing of xenotransplantation techniques.

In order to minimize the use of NHP, regulatory authorities of developed countries recommend to apply the homologous animal models and surrogate molecules of the studied drugs.

Одним из первых регуляторных документов, касающихся принципов изучения лекарственных средств стала Хельсинкская Декларация всемирной медицинской ассоциации 1964 года [1]. В ней введено требование, согласно которому биомедицинские исследования на людях должны базироваться на результатах надлежащим образом выполненных экспериментов на животных и данных научной литературы. На основании данного принципа многими странами были приняты соответствующие регуляторные документы, благодаря которым доклинические исследования стали краеугольным камнем безопасности при клинических исследованиях лекарственного кандидата (ЛК).

Впоследствии, в 1986 году, в Европейском Союзе была принята Директива 86/609/EEC1 [2], которая содержит необходимые стандарты и правила контроля использования лабораторных животных в экспериментальных и других научных целях.

Основополагающий принцип Правил - гуманное обращение с животными и их рациональное использование.

Статья 7 Директивы предусматривает, что:

1) Эксперимент не должен проводиться, если существует другой научно приемлемый способ получения искомого результата без использования животных.

2) В случае необходимости экспериментов на животных, приоритет следует отдавать тем исследованиям, которые используют минимальное количество животных, использовать животных с более низкой степенью нейрофизиологической чувствительности и применять процедуры, которые причиняют наименьшую боль, страдания или иной вред организму и которые с наибольшей вероятностью обеспечивают получение удовлетворительных результатов.

3) Не допускаются эксперименты на отловленных диких животных, если для этой цели возможно использование животных, которые разводятся для лабораторных исследований.

Объем необходимых доклинических исследований в дальнейшем был регламентирован Директивой Совета ЕС 2001/83/EEC и поправками к ней [3]. При этом в 2002 году Научный Руководящий Комитет (Scientific Steering Committee) ЕС подчеркнул сохраняющуюся необходимость использования приматов в медико-биологических исследованиях в тех случаях, когда приматы являются единственным видом животных релевантным человеку. В 2007 году Европейский парламент дополнительно принял декларацию (0040/2007) [4], которая запрещает использование в научных экспериментах человекообразных обезьян и призывает разработать график замены всех приматов в научных экспериментах альтернативными исследованиями.

Вид животных, необходимых для выполнения научно-исследовательской работы, должен быть адекватен целям эксперимента. Всегда должна рассматриваться альтернатива использования животных, стоящих на менее высокой ступени эволюционного развития.

В связи с этим Европейское Агентство по Лекарственным Средствам (EMEA, ныне EMA) и Комитет ЕС по лекарственным препаратам для человека (CHMP) определили критерии релевантности видов животных при исследовании безопасности ЛК у человека [5], которые включают в себя:

- Наличие фармакодинамически необходимого сайта связывания и соответствующего фармакодинамического ответа;
- Сходство с человеком по токсичности и фармакокинетике *in vitro* или по результатам изучения структурных аналогов того же класса соединений;
- Сходство с человеком по анатомии или физиологии соответствующих органов и систем;

В частности, не-человекообразные приматы (НЧП) могут быть предпочтительными по отношению к другим млекопитающим по следующим причинам:

- Из-за сходства менструального цикла и анатомии и физиологии молочной железы и репродуктивной системы в целом при изучении соединений, влияющих на женскую репродуктивную систему;
- Из-за сходства органа зрения по некоторым уникальным особенностям (например, наличие желтого пятна), которые отсутствуют у других млекопитающих;
- Из-за сходства системы свертывания крови при оценке эффектов факторов, влияющих на свертывание крови;
- Из-за сходства особенностей иммунной системы при оценке безопасности многих биотехнологических препаратов.

В 2009 году Научный комитет ЕС по здоровью и рискам, связанным с окружающей средой (Scientific Committee on Health and Environmental Risks, SCHER) опубликовал специальный документ, содержащий констатацию о невозможности полного отказа от участия НЧП в биомедицинских исследованиях [6]. В связи с этим SCHER сформулировал дополнительные правила, которые необходимо соблюдать при экспериментах с НЧП:

- использование НЧП должно быть обосновано до начала любого исследования, тщательно контролироваться и подвергаться ретроспективной оценке после окончания проекта;
- при исследовании должны применяться наилучшие из имеющихся исследовательские стратегии, включая неинвазивные методы, которые используются при исследованиях человека;
- прогнозируемую степень ущерба для организма НЧП следует ограничить до умеренной. Обоснование тяжелого ущерба для здоровья должно быть подтверждено местной организацией, ответственной за контроль за исследованиями;
- следует отдавать приоритет использованию вместо приматов других видов, таких как мини-свиньи или генетически модифицированные грызуны;
- не следует допускать использования в экспериментах пойманных диких представителей НЧП по соображениям гуманного отношения к животным. Допустимо использование в указанных целях их потомков, начиная со 2-го поколения;
- следует создавать улучшенные и разрабатывать новые in vitro и in silico модели позволяющих прогнозировать фармакодинамику и токсичность ЛК;
- следует углублять изучение сравнительной физиологии иммунной системы у человека, представителей НЧП и других видов (не-грызунов) для разработки усовершенствованных моделей, имеющих высокую предиктивную способность;
- следует развивать исследования в области применения стволовых клеток для восстановления функций органов, что может заменить необходимость использования НЧП в ксенотрансплантации.

Наконец, в директиве Европейского парламента от 2010 года 2010/63/EU [7], в Статье 8, дано общее определение возможности использования НЧП в научных исследованиях. Констатируется, что НЧП не должны использоваться в экспериментах, за исключением разработки, производства или испытания качества, эффективности и безопасности лекарств, пищевых продуктов и кормов и других веществ или продуктов при наличии научного обоснования того, что цель процедуры не может быть достигнута путем использования других видов животных.

Вместе с тем, все большее развитие получает стратегия проведения токсикологических исследований без использования обезьян, которая включает применение для моделирования болезней человека генетически модифицированных мышей или использование суррогатных молекул рекомбинантных белков, моделирующих лекарственный исследуемый

лекарственный препарат. Требования ICH S6 определяют фармакологически релевантный вид животных, у которых экспрессируется или рецептор, или эпитоп, служащие мишенью исследуемого лекарственного кандидата. В ряде случаев это можно достичь только с использованием шимпанзе или людей. Поэтому в ICH S6 предусмотрена возможность использования альтернативной стратегии, изложенной в таблице 1.

Таблица 1

Альтернативная стратегия проведения доклинических исследований по ICH S6

Стратегия	Преимущества	Ограничения
Модель обезьяна	Схожие эффекты с человеком	Искаженные эффекты заболевания, отсутствие кросс-реактивности
Генетически модифицированные мелкие животные (мыши)	Дает дополнительно данные, где нет кросс-реактивности с тканями человека. Является стандартной токсикологической моделью	Ограниченное количество животных, ограниченная длительность жизни, технические проблемы.
Суррогатные модели лекарственного препарата для любых животных	Можно использовать в опытах, где нет кросс-реактивности с тканями человека. Является стандартной токсикологической моделью	Различные продукты (процессы, производство, механизмы), технические проблемы, фармакологические отличия (потенциальные отличия в реакции мишени при связывании суррогатной модели).

В таблице 2 представлены примеры использования суррогатных моделей лекарственных препаратов на основе моноклональных антител в токсикологических исследованиях, которые были приняты регуляторными органами.

Таблица 2

Использование суррогатных моделей ЛП в доклинических испытаниях без привлечения обезьян [8]

МНН/показание	Специфичность	Суррогатная модель	Объем выполненных исследований
Efalizumab/ хронический бляшечный псориаз	Гуманизированное МкАТ IgG1, специфичное для CD11a человека	Мышиное МкАТ IgG2a, специфичное к мышиным CD11a	Мыши muM17 -тканевая кросс-реактивность -острая токсичность -влияние на фертильность -эмбриотоксичность -иммунотоксичность
Infliximab/ болезнь крона	Химерные МкАТ IgG1, связывающееся с человеческим TNF	Мышиное МкАТ IgG2a, специфичное к TNF	Мыши CD -1 -эмбриотоксичность; -хроническая токсичность; -иммуногенность; -фармакокинетика

Таким образом, в настоящее время позиция Европейских регуляторных органов состоит в том, что использование НЧП необходимо и имеет важное значение в следующих областях биологии и медицины:

- фармакология, в частности оценка безопасности ЛК. Для некоторых типов биотехнологических ЛК, включая терапевтические антитела, НЧП может являться единственной релевантной *in vivo* моделью;
- исследование патофизиологии некоторых инфекционных заболеваний, таких как ВИЧ;
- при изучении строения и функции мозга приматов и человека;
- при разработке и тестировании методов ксенотрансплантации.

С целью минимизации использования НЧП регуляторные органы развитых стран рекомендуют применение в доклинических исследованиях гомологичных модельных животных и суррогатных моделей испытываемых лекарственных препаратов.

Список литературы

1. Declaration of Helsinki. Adopted by the 18th WMA General Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, and amended by the: 29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975.

2. The European Council Directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes.
3. The European Parliament and of the Council Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use.
4. The European Parliament Written declaration 004/2007 on primates in scientific experiments.
5. European Medicines Agency. Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-inhuman clinical trials with investigational medicinal products. EMEA/CHMP/SWP/28367/07.
6. The European Commission, SCHER, The need for non-human primates in biomedical research, production and testing of products and devices. 13 January 2009.
7. The European Parliament and of the Council Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.
8. Alternative strategies for toxicity testing of species-specific biopharmaceuticals//Bussiere J.L, Martin P., Horner M. et all/ Intern. J. of Toxicology, 2009, v.28, N.3-230-253.

ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ НЕКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В СООТВЕТСТВИИ С ПРИНЦИПАМИ GLP НА ПРИМАТАХ

Мурашев А.Н.

ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (Филиал), Пущино, Россия

Резюме

Организация и проведение неклинических исследований по медицинской и экологической безопасности регулируются принципами надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) и методическими руководствами, например, организации экономического сотрудничества и развития (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) и международной конференции по гармонизации (International Conference for Harmonization, ICH) по оценке безопасности лекарственных средств, которые в РФ представлены в виде ГОСТ. GLP – это система обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю неклинических

исследований в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих исследований. В соответствии с принципами GLP испытательный центр (test facility) – это фактическое место проведения неклинических исследований, где расположены коллектив специалистов, помещения и оборудование, необходимые для их выполнения. Ключевыми специалистами испытательного центра являются: руководство испытательного центра (test facility management), служба обеспечения качества (quality assurance unit), руководитель исследования (study director) и архивариус (archivist). Руководство испытательного центра несет ответственность за все аспекты, связанные с обеспечением соблюдения принципов GLP. Программа обеспечения качества – это программа работ, выполняемых независимым от проведения исследований персоналом и направленных на обеспечение руководством испытательного центра соблюдения принципов GLP. Руководитель исследования – это лицо, ответственное за проведение неклинического исследования от начала до конца, за все технические аспекты выполнения исследования в соответствии с принципами GLP, планом исследования и СОП, за интерпретацию и анализ результатов, отраженных в конечном отчете. Архивариус – это лицо, назначенное руководством испытательного центра или испытательной площадки, которое несет ответственность за управление архивом, операциями и процедурами по архивированию. Принципы GLP устанавливают требования не только к стандартизации оборудования, процедур, документации, подготовки персонала, но и к тест-системам (лабораторным животным) и условиям их содержания. Некоммерческим Партнерством «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными» (Rus-LASA) разработаны ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными» и ГОСТ 33218-2014 «Правила работы с нечеловекообразными приматами».

ORGANIZATION AND CONDUCT OF NON-CLINICAL STUDIES IN ACCORDANCE WITH THE PRINCIPLES OF GLP ON PRIMATES

Murashev A.N.

Shemyakin&Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Branch) RAS, Pushchino, Russia

Abstract

Organization and conduct of non-clinical studies on health and environmental safety are regulated by the Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and methodological guides, for example, the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and the International Conference for Harmonization (ICH) to evaluate the safety of medicines, which in Russia is presented by GOST. GLP is a quality system concerned with the organizational process and the conditions under which non-clinical health and environmental safety studies are planned, performed, monitored, recorded, archived and reported. Test facility means the persons, premises and operational unit(s) that are necessary for conducting the non-clinical health and environmental safety study. Key persons of the test facility are test facility management, quality assurance unit, study Director and archivist. Test facility management means the person(s) who has the authority and formal responsibility for the organization and functioning of the test facility according to Principles of GLP. Quality Assurance Programme means a defined system, including personnel, which is independent of study conduct and is designed to assure test facility management of compliance with Principles of GLP. Study Director means the individual responsible for the overall conduct of the nonclinical health and environmental safety study. Archivist means an individual designated by test facility or test site management to be responsible for the management of the archive, i.e. for the operations and procedures for archiving. Proper conditions should be established and maintained for the storage, housing, handling and care of biological test systems (animals), in order to ensure the quality of the data. Newly received animal test systems should be isolated until their health status has been evaluated. If any unusual mortality or morbidity occurs, this lot should not be used in studies and, when appropriate, should be humanely destroyed. At the experimental starting date of a study, test systems should be free of any disease or condition that might interfere with the purpose or conduct of the study. Test systems that become diseased or injured during the course of a study should be isolated and treated, if necessary to maintain the integrity of the study. Any diagnosis and treatment of any disease before or during a study should be recorded. GOST 33215-2014 "Rules for the equipment of the premises and the organization procedures when working with laboratory animals" and GOST 33218-2014 "Rules of work with nonhuman primates" are developed by Russian Laboratory Animals Science Association (Rus-LASA).

Организация и проведение неклинических исследований по медицинской и экологической безопасности регулируются принципами надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) и методическими руководствами, например, организации экономического

сотрудничества и развития (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) и международной конференции по гармонизации (International Conference for Harmonization, ICH) по оценке безопасности лекарственных средств, которые в РФ представлены в виде ГОСТ. Неклинические исследования в странах, входящих в OECD, выполняются в соответствии с GLP в обязательном порядке, а в РФ, например, Минздрав осуществляет регистрацию лекарственных средств, неклинические исследования которых были выполнены как в соответствии с принципами GLP, так и не в соответствии с ними. Хотя, в пункте 2 статьи 11 Федерального закона от 22.12.2014 №429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств» записано: «Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти». Очевидно, что такое положение в РФ обусловлено тем, что Национальная система GLP начала функционировать только в 2014 году, когда в соответствии с Постановлением Правительства РФ от 17.12.2013 №1172 «О признании и об оценке соответствия испытательных лабораторий (центров) принципам надлежащей лабораторной практики…» Федеральная служба по аккредитации, как орган по мониторингу испытательных лабораторий на предмет их соответствия принципам GLP, стала осуществлять инспекции и вести соответствующий реестр.

GLP – это система обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю неклинических исследований в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих исследований. Основные положения GLP изложены в следующих ГОСТ, которые являются аутентичными переводами на русский язык соответствующих GLP руководств OECD:

ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;

ГОСТ 31881-2012 «Роль и обязанности руководителя исследований в соответствии с Принципами GLP»;

ГОСТ 31882-2012 «Организация и контроль архивов»;

ГОСТ 31883-2012 «Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP»;

ГОСТ 31884-2012 «Соответствие поставщиков испытательного центра Принципам GLP»;

ГОСТ 31887-2012 «Применение Принципов GLP к

компьютеризированным системам»;
ГОСТ 31888-2012 «Роль и обязанности спонсора в соответствии с Принципами GLP».

В соответствии с принципами GLP испытательный центр (test facility) – это фактическое место проведения неклинических исследований, где расположены коллектив специалистов, помещения и оборудование, необходимые для их выполнения. Ключевыми специалистами испытательного центра являются: руководство испытательного центра (test facility management), служба обеспечения качества (quality assurance unit), руководитель исследования (study director) и архивариус (archivist). Руководство испытательного центра несет ответственность за все аспекты, связанные с обеспечением соблюдения принципов GLP:

обеспечивает наличие в достаточном количестве компетентного персонала, соответствующих помещений, оборудования и материалов, необходимого для своевременного и надлежащего проведения исследования;

обеспечивает поддержание в актуальном состоянии документации об уровне квалификации, образовании, опыте работы и должностных обязанностях специалистов и технического персонала;

гарантирует, что сотрудники четко понимают свои обязанности, и обеспечивает им соответствующее обучение и подготовку;

утверждает стандартные операционные процедуры (СОП) и поправки к ним и несет ответственность за то, чтобы работы выполнялись в соответствии с ними;

несет ответственность за организацию и реализацию программы обеспечения качества;

назначает для каждого исследования до его начала руководителя, имеющего соответствующее образование, квалификацию и опыт работы, а также осуществляет его замену в соответствии с установленным порядком;

назначает, в случае необходимости, при проведении исследования на нескольких испытательных площадках ответственного исследователя, который обладает соответствующим образованием, квалификацией и опытом работы, чтобы осуществлять проведение определенного этапа исследования;

гарантирует, что план исследования будет документально утвержден руководителем исследования и будет предоставлен службе обеспечения качества;

обеспечивает сохранность исторических файлов всех СОП;

назначает ответственного за управление архивом;

гарантирует выполнение основного плана-графика;

гарантирует, что ресурсы испытательного центра соответствуют требованиям, предъявляемым к их использованию в исследовании;

при проведении исследований на нескольких испытательных площадках обеспечивает четкое и согласованное взаимодействие между руководителем исследования, ответственными исследователями, службой обеспечения качества и специалистами, выполняющими данное исследование;

гарантирует, что объекты испытаний и стандартные объекты описаны должным образом;

устанавливает процедуры для подтверждения того, что компьютеризированные системы соответствуют своему назначению, а также, что они валидируются.

Программа обеспечения качества – это программа работ, выполняемых независимым от проведения исследований персоналом и направленных на обеспечение руководством испытательного центра соблюдения принципов GLP. Руководство испытательного центра, создавая службу обеспечения качества, передает ей некоторые задачи, относящиеся к управлению. Эта передача не должна ставить под угрозу независимость службы и не должна повлечь за собой причастность персонала по обеспечению качества к проведению исследования, кроме как в роли лиц, осуществляющих контроль. Персонал по обеспечению качества должен иметь соответствующую подготовку, специальные знания и опыт на уровне, необходимом для выполнения своих обязанностей. Сотрудники службы должны знать принципы GLP, быть знакомы с процедурами испытаний, понимать основные концепции, лежащие в основе подвергающейся контролю деятельности. Сотрудники службы проводят инспекционные проверки испытательного центра, отдельных исследований и отдельных процессов. При проведении инспекций испытательного центра служба докладывает руководству испытательного центра о соблюдении принципов GLP в отношении помещений, оборудования, методов работы, ведения документации. При проведении инспекций отдельных исследований и процессов служба представляет руководству испытательного центра и руководителю исследования отчет о проведении исследования, особо отмечая отклонения от плана, а также проверяет итоговый отчет, чтобы результаты соответствовали первичным данным.

В соответствии с принципами GLP руководитель исследования – это лицо, ответственное за проведение неклинического исследования от начала до конца. за все технические аспекты выполнения исследования в

соответствии с принципами GLP, планом исследования и СОП, за интерпретацию и анализ результатов, отраженных в конечном отчете. Квалификация руководителя исследования должна быть предписана на основании требований к каждому отдельному исследованию. Квалификационные критерии для руководителя исследования устанавливает руководство испытательного центра. Требования к квалификации должны быть отражены в персональных документах кадрового учета сотрудника. Руководитель исследования в силу своей подписи в заключительном отчете берет на себя ответственность за проведение исследования в соответствии с принципами GLP и за достоверное представление первичных данных. Юридическая ответственность руководителя исследования устанавливается национальным законодательством и судопроизводством, а не GLP.

В соответствии с принципами GLP архивариус – это лицо, назначенное руководством испытательного центра или испытательной площадки, которое несет ответственность за управление архивом, операциями и процедурами по архивированию. Архивариус должен обеспечить, чтобы доступ в архив контролировался; обеспечить, чтобы для упорядоченного хранения и поиска документов и материалов была организована система индексирования; обеспечить, чтобы передача документов и материалов в архив и из архива должным образом контролировалась и документировалась.

Принципы GLP устанавливают требования не только к стандартизации оборудования, процедур, документации, подготовки персонала, но и к тест-системам (лабораторным животным) и условиям их содержания. Данные, накопленные в результате многолетнего использования лабораторных животных в качестве экспериментального объекта биомедицинских исследований, однозначно свидетельствуют о том, что существует множество факторов, способных искажать результаты таких исследований. Среди этих факторов основное место занимают параметры микроклимата (температура, влажность, освещение и т. д.), зараженность животных патогенной или оппортунистической инфекцией, а также вещества, поступающие в организм с кормом, водой или из подстила. Не в последнюю очередь результаты эксперимента могут быть искажены факторами, оказывающими стрессирующие воздействия, например, отсутствие адекватного обезболивания, или неверно подобранного социального окружения. Именно поэтому в законодательство всех стран, входящих в состав Евросоюза (ЕС), а также США и других государств, внедрены нормативные акты, регламентирующие порядок содержания и использования животных в научных целях. Для стран, входящих в ЕС, таким документом является Директива Совета Европы 2010/63/EU, которая с 1 января 2013 года

стала обязательным документом, регламентирующим все эксперименты с использованием животных на территории ЕС. Контроль за соблюдением требований нормативных актов возлагается как на государственные органы, так и институтские биоэтические комиссии.

В последние годы в российских научных учреждениях также создаются биоэтические комиссии, однако, деятельность этих комиссий осуществляется в условиях отсутствия единого регламента и общих представлений о базовых принципах экспертизы проектов, что вызвано отсутствием в РФ необходимой нормативной базы. В странах OECD выработкой норм и стандартов в области экспериментальной работы с животными традиционно занимаются некоммерческие объединения ученых и других специалистов, непосредственно работающих с животными. Европейские ассоциации специалистов объединены в Федерацию европейских ассоциаций специалистов в области науки о лабораторных животных (Federation of European Laboratory Animal Science Associations, FELASA). В настоящее время документы, публикуемые FELASA, хотя и носят рекомендательный характер, в европейских странах признаются общим стандартом в области работы с лабораторными животными. FELASA разрабатывает также требования к образовательным программам разного уровня для специалистов работающих с лабораторными животными, программам мониторинга здоровья животных, процедурам этической оценки проектов.

В 2011 году группой российских специалистов было создано Некоммерческое Партнерство «Объединение специалистов по работе с лабораторными животными» (Rus-LASA). Это российская ассоциация, уставными целями которой является распространение современных стандартов в работе с лабораторными животными и их внедрение в практику российских виварием. Rus-LASA проводит обучающие и дискуссионные семинары, организует ежегодные конференции специалистов по работе с лабораторными животными, принимает активное участие в разработке нормативных документов. Были разработаны следующие ГОСТ:

ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными»;

ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами»;

ГОСТ 33217-2014 «Правила работы с лабораторными хищными млекопитающими»;

ГОСТ 33218-2014 «Правила работы с нечеловекообразными приматами»;

ГОСТ 33219-2014 «Правила работы с рыбами, амфибиями и рептилиями».

В 2014 году Rus-LASA была принята полноправным членом FELASA, что указывает на международное признание России, а также дает возможность российским специалистам, работающим с лабораторными животными, принимать активное участие в разработке международных образовательных программам, программам мониторинга здоровья животных, процедур этической оценки проектов, а также осуществлять международную аккредитацию своих собственных образовательных программ.

Вопрос о правовых нормах использования лабораторных животных в неклинических исследованиях в РФ остается открытым. В РФ отсутствует закон об использовании лабораторных животных в научных целях. Актуальность и важность такого закона для РФ очевидна. Этот закон должен быть гармонизирован с современными международными требованиями. В качестве основополагающего документа для разработки такого закона может быть использована Европейская Конвенция об охране позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях. Конвенция устанавливает правила содержания и ухода за лабораторными животными, соблюдение которых обеспечит благополучие животных, необходимое для выполнения надежных верифицируемых исследований.

Методические рекомендации проведения неклинических исследований на приматах отражены в следующих нормативных документах и руководствах: ГОСТ Р 56699-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические исследования безопасности биотехнологических лекарственных препаратов. Общие рекомендации»; Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Москва, 2012); Руководство ICH по оценке безопасности лекарственных средств (S6, Biotechnological products); Руководство Всемирной организации здравоохранения (Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products).

О ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛИНИКО-ВЕТЕРИНАРНОГО ОТДЕЛЕНИЯ. ЗАБОЛЕВАНИЯ ОБЕЗЬЯН, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ ПРИ ИХ СОДЕРЖАНИИ В НЕВОЛЕ В УСЛОВИЯХ АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА ФГБНУ «НИИ МП»

Т.Е.Гвоздик, П.А.Капланян, Л.И.Холодилова, И.И.Чугуева, Е.В.Черкашина

ФГБНУ «НИИ Медицинской приматологии», Сочи, Россия

Резюме

О деятельности клинико-ветеринарного отделения, цели и задачи. Диагностические кабинеты в составе клинико-ветеринарного отделения. Пересадка больных животных в изоляторы, оснащенных клетками для индивидуального содержания. Проведение профилактических осмотров и основные ветеринарные процедуры, осуществляемые при осмотре животных (забор материала для бактериологического исследования на патогенную кишечную микрофлору, для паразитологического обследовании, забор крови для биохимического исследования, общий анализ крови, проведение туберкулинового теста. Заболевания наиболее часто встречающиеся при содержании обезьян в неволе в условиях Адлерского питомника (энтероколиты, глистные инвазии, травматические повреждения, пневмония, патология беременности и методы их лечения).

THE PRACTICE OF VETERINARY CLINICAL DEPARTMENTS. DISEASES OF NONHUMAN PRIMATES THE MOST COMMON IN ADLER MONKEY COLONY OF THE FSBSI "RIMP"

T.E.Gvozdik, P.A.Kaplanyan, L.I.Kholodilova, I.I.Chugueva, and E.V.Cherkashina

FSBSI “RIMP”, Sochi-Adler, Russia

Abstract

The practice of clinical-veterinary department, goals and objectives. Diagnostic facilities as part of the clinical-veterinary department. Transfer of sick animals into the isolation rooms equipped with individual cages. Carrying out prophylactic examinations of monkeys and basic veterinary procedures performed during the inspection of animals: sample collection for bacteriological screening on pathogenic intestinal microflora, parasitological examination, blood biochemical studies, hematology, and tuberculin tests. The following diseases are the most common among monkeys in Adler colony: enterocolitis, worm infestation, traumatic injuries, pneumonia, and pregnancy pathology. The report describes also the treatment methods of these diseases.

Институт медицинской приматологии обладает крупным питомником, в котором содержаться около 4500 обезьян, рода: макак (макак резус, макак яванский, макак лапундер), павиан (павианы гамадрилы, павианы анубисы), мартышки (мартышки зеленые). Кроме этих довольно крупных групп обезьян, наиболее часто используемых в медико-биологических экспериментах, в питомнике содержаться обезьяны различных видов (единичные экземпляры) с целью демонстрации посетителям питомника.

Клинико-ветеринарное отделение является структурным подразделением института. Основными задачами клинико-ветеринарного отделения является: лечение больных животных, профилактика заболевания обезьян и контроль за ветеринарно-санитарным состоянием. Специалисты клинико-ветеринарного отделения проводят ежедневный осмотр обезьян содержащихся в вольерах и клетках. Слабые обезьяны, нуждающиеся в лечении, отсаживаются в изоляторы для уточнения диагноза и проведения соответствующего лечения. Ежегодно, весной, а также при необходимости связанной с неблагополучной, эпизоотической ситуацией, или при подготовке животных к экспериментам, а также при передаче их в другие организации совместно с зоотехнической лабораторией проводятся профилактические осмотры обезьян. Во время проведения профилактических осмотров, производится отлов всех животных группы (вольер, больших клеток). Обезьяны отлавливаются нетравматическим способом, с помощью коридоров-уловителей, после чего пересаживаются в индивидуальные прижимные клетки и осматриваются специалистами. Оценивается: их вес, общее состояние, активность, состояние кожных покровов, видимых слизистых оболочек, периферических лимфатических узлов, наличие внешних повреждений, характер стула. Проводится пальпация брюшной стенки, аускультация легких, забор материала для бактериологического обследования на обнаружение патогенной кишечной микрофлоры, паразитологическое обследование, забор крови. Проводится туберкулиновый тест с использованием аллергена туберкулезного, очищенного в стандартном разведении, содержащем убитые культуры микобактерий человечьего и бычьего вида. Туберкулин водится внутрикожно, в области верхнего века, реакция учитывается через 24, 48, 72 часа. Учитывая широкое распространение среди обезьян паразитарных заболеваний всем животным за исключением беременных самок и детей до года вводится Ивермек 1 % в дозе 0,02 мл/кг внутримышечно, однократно. Препарат обладает широким спектром действия против желудочно-кишечных и легочных нематодозов. В случае неблагополучной эпизоотической ситуации проводится комплекс

мероприятий направленный на выявление природы заболеваний с использованием всех доступных методов исследования (бактериологических, эпидемиологических, вирусологических, серологических и т.д.).

Клинико-ветеринарное отделение располагает:

1) кабинетом гематологических исследований крови, где проводятся лабораторные исследования по определению общего анализа крови, клинического анализа мочи, определению в толстой капле крови и тонких мазках простейших кровопаразитов;

2) кабинетом биохимических исследований крови;

3) кабинетом УЗИ диагностики;

4) кабинетом рентгенодиагностики.

В своей работе тесно взаимодействует с лабораторией инфекционной патологии, лабораторией патологической анатомии (которая помогает анализировать чистоту и характер заболеваний обезьян приводящих их к гибели), лабораторией иммунологии и биологии клетки, лабораторией инфекционных вирусов.

Обезьяны содержатся как в крупных вольерах площадью 200-400-600 $м^2$ с гравийным покрытием, так и в крупных клетках площадью 9 $м^2$, для содержания небольших групп – 5-6 голов обезьян, отдельные вольеры площадью 200 $м^2$ имеют бетонное покрытие. Вольеры и клетки снабжены: автоматической системой поения, системой отопления (для холодного времени года) и вентиляционной системой. В случаях заболевания животных возникает необходимость их размещения в изоляторы, в которых смонтированы индивидуальные прижимные клетки, с подводом к каждой клетке водопроводной питьевой воды и индивидуальным металлическим поддоном.

Наиболее частыми заболеваниями обезьян питомника являются энтероколиты. Представляет несомненный интерес то, что раннее диагностированные заболевания желудочно-кишечного тракта шигеллёзы, сальманеллёз в настоящее время встречаются значительно реже и регистрируются как бессимптомное носительство. Вместе с тем у погибших от желудочно-кишечных заболеваний обезьян нередко обнаруживается инфицирование компилобактериями (C.jejuni), эширихиями коли (E.Coli), а также хеликобактер пилори (H.Pylori). Изредка в виде энзотических вспышек возникают заболевания связанные с патогенными штаммами кишечной палочки. При бактериологическом обследовании кишечного содержимого также обнаруживаются и представители условно-патогенной микрофлоры: рода Proteus, Citrobacter, Klebsiella, Morganella и Enterobakter.

Достоверно говорить об их этиологической связи с острыми кишечными инфекциями затруднительно, однако количественное их возрастание в кишечном содержимом позволяет рассматривать их как возбудителей заболевания. Рассматривая острые кишечные инфекции, следует отметить что, среди обезьян вида – мартышки зеленые Адлерского питомника преимущественно в весенний период отмечены случаи иерсиниоза, кишечная форма. Поражаются преимущественно молодые обезьяны в возрасте от 3 месяцев до 1,5-2 лет. В подобных случаях, самки с детенышами или подростки высаживаются в изоляторы, где с учетом чувствительности возбудителя проводится их лечение.

Для купирования острых кишечных заболеваний в качестве этиотропной терапии с учетом чувствительности возбудителя применяются антибактериальные препараты используемые как в медицинской, так и в ветеринарной практике: (гентамицина сульфат 2-4 мг/кг в/м 7 дней, цефтриаксон – 20-50 мг/кг 7 дней, байтрил 2,5%-0,2 мл/кг в/м 5-7 дней, энроксил 5%-0,1мл/кг в/м 5 дней, офлоксацин и (для взрослых обезьян) 200 мг 5 дней внутрь, препарат дитрим (1мл которого содержит сульфадимезин 200 мг + триметоприм 40 мг) 0,1-0,2 мл/кг 7 дней, бетамокс (1мл содержит 150 мг амоксициллина) по 0,1 мл/кг в/м с интервалом в 48 часов. В случае выделения из фекалий больных диареей обезьян C.jejuni также используются антибиотики и химиопрепараты. Особенно эффективны препараты нитрофуранового ряда энтерофурил по 100-200 мг 3 раза в день внутрь 5-7 дней. Для симптоматического лечения диареи применяем препарат лоперамид, доза 2 мг 4 раза в день 3 дня подряд.

Хорошие результаты при лечении острых кишечных заболеваний получаем от применения бактериофагов: интести бактериофаг 10-20 мл внутрь 7 дней, колипротейный бактериофаг 10-15 мл внутрь 7 дней, бактериофаг дизентерийный поливалентный 3 таб. внутрь 7-10 дн., бактериофаг клебсиеллёзный поливалентный очищенный 15-20 мл внутрь 7-10 дн. Этиотропная терапия дополняется симптоматическим лечением, основным из которых является внутривенное капельное введение солевых растворов, при дегидратации, для восстановления баланса электролитов и снятия симптомов интоксикации (0,9% физ. р-р, внутривенно-капельно, 5% р-р глюкозы внутривенно-капельно, р-р Рингера внутривенно-капельно, р-р Регидрона внутрь).

Терапевтические мероприятия дополняются парентеральным введением витаминных препаратов: вит. В1 (тиамина хлорид 5%-25-50мг в/м 5-10 инъекций, вит. В6 (пиридоксин) 5% -25-50мг 5дней, вит. В12 (цианокобаламин) 250 мг – 10-20мг/кг, 10 дней, по схеме, аскорбиновая

кислота 5% -5-10мг/кг, 10 дней. Применяются иммуномодуляторы полиоксидоний вет. раствор 0,3 мг/кг в/м – 2 раза в неделю. В случаях, когда острые кишечные заболевания сопровождаются выраженной анемией используются препараты железа: феррум лек -0,1, 0,2мг/кг в/м через день 5-7 дней, гемобаланс 0,25 мг/кг 3 раза в неделю 7-10 дней, гамавит 0,3 мл/кг 5 дней в/м. Все обезьяны поступившие на лечение в изолированные помещения неоднократно обследуются бактериологически как до проведения лечебных мероприятий, так и в процессе лечения и по его окончанию. Для восстановления нормальной жизнедеятельности кишечной микрофлоры обезьянам назначаются пробиотики (линекс, лактобактерин, бифидобактерин, бификол, ветом-3, бактистатин), а так же ферменты (мезим форте).

Нередко заболевания желудочно-кишечного тракта с диарейным симптомом обусловлены паразитарными заболеваниями:

Гельминтозы – трихоцефалез, который при слабой степени инвазии клинически не проявляется, а при интенсивных инвазиях наблюдается истощение, отказ от корма, анемия, диарея, которые могут привести к гибели обезьяны. Тяжелые формы трихоцефалеза, наиболее часто встречаются у павианов гамадрил. Для лечения трихоцефалеза применяются препараты мебендазолового ряда (вермокс, вормин в дозировках 50-100 мг, 2 раза в день 3 дня, через 14 дней, курс лечения повторяется), а также Ивермек 1% в дозировке 0,02 мл/кг в/м однократно, который широко используется в практике при проведении профилактических осмотров, и массовой дегельминтизации.

Стронгилоидоз – для лечения применяются препараты мебендазола 50-100мг 2 раза в день 3 дня, тиабендазола 100 мг 1 раз 5-10 дней, Ивермек 1%.

Балантидии иногда сочетаются с бластоцистами, довольно часто встречаются у обезьян и являются этиологическим фактором диарейных симптомов: протозойные энтероколиты. Обычно балантидии при низкой степени инвазии не сопровождаются признаками заболевания, однако нередко особенно в дождливое, холодное время года при диарейных симптомах в мазках из кишечного содержимого балантидии обнаруживаются в довольно больших количествах, > 10 в поле зрения, иногда на всём поле зрения. Для лечения таких обезьян применяем в качестве этиотронной терапии применяется трихопол (метронидозол в форме таблеток) по 0,5 гр растертых в порошок, 1 раз в день, 7 дней, или же ветеринарный препарат метронид-50 (1 мл – 50 мг метронидазола) инъекционный в дозе 0,2 мл/кг в/м 2 дня, с интервалом 48 часов, а также проводится симптоматическое лечение.

Лямблии также довольно часто встречаются при обследовании обезьян с диарейным симптомом, для лечения используется тот же метронид-50, но краткость введения 4 инъекции с интервалом 48 часов. Заболевания желудочно-кишечного тракта могут быть связаны с погрешностями питания, дисбактериозами и стресс факторами.

Травматические повреждения обезьян

Травматические повреждения довольно частая патология обезьян. В процессе содержания обезьяны нередко вступают в конфликты, нанося при этом довольно значительные повреждения друг другу. Чаще всего это рваные раны, ушибленные, размозжённые, скальпированные, некротические поражения в области хвоста и др. повреждения различной локализации которые нередко бывают довольно значительными по площади поражения, и осложнены патогенной микрофлорой. Обезьяны отсаживаются в изоляторы, где содержатся индивидуально, и там же проводится их лечение. Предварительно раневая поверхность очищается от раневого экссудата некротизированных тканей, гноя. Производится хирургическая обработка с использованием 3% р-ра перекиси водорода, 1% р-ра диоксидина, 1% бриллиантовой зелени, 5% спиртовой настойки йода. При обильном кровотечении назначаются кровоостанавливающие средства: дицинон (этамзилат) 12,5% - 0,5-1,0 мл на введение в/м, викасол 1% - 0,5-1 мл в/м 2 раза в день. При необходимости обработанные раны ушиваются, наружно применяется террамицин спрей, алюминиум спрей, которые являются эффективными противовоспалительными ранозаживляющими средствами. Широко применяются антисептические мази: левомеколь, линимент синтомицина, линимент бальзамический по Вишневскому. Для стимуляции процессов регенерации применяются 20% гель актовегина, 5% мазь актовегина, травматин раствор для инъекций. При лечении неосложнённых ран, хорошие результаты получаются от применения культуральной жидкости мезенхимальных стволовых клеток приготовленную специалистами лаборатории иммунологии и биологии клетки. При этом процессы регенерации тканей значительно ускоряются, происходит более быстрое заживление. При необходимости проводится антибиотикотерапия, назначаются растворы для инфузий: реополигликин 10% - 10-20 мл/кг, 0,9% раствор натрия хлорида 25-50 мл/кг, 5% раствор глюкозы 25-50 мл/кг, инфукол 10-30 мл/кг, проводится витаминотерапия.

Респираторные заболевания болезни обезьян занимают 4-е место по частоте распространения. Патология органов дыхания регистрируется среди всех видов обезьян, особенно молодняка, и носит зачастую сезонный характер. В большинстве случаев респираторные болезни –

полиэтиологические и возникают в результате комбинированного воздействия на организм неблагоприятных факторов. Наибольшее значение имеют: резкая смена температуры воздуха в течение суток, повышенная влажность, сквозняки в помещении, плохая вентиляция.

Клинические симптомы при болезнях органов дыхания.

У больных обезьян отмечается: понижение аппетита, снижение массы тела, отставание в росте, снижение эластичности кожных покровов, напряженное дыхание, повышение температуры тела, одышка, игра крыльев носа, цианоз вокруг рта, чихание, кашель, при аускультации выслушиваются мелкопузырчатые хрипы, изменение перкуторного звука легких. При гематологическом обследовании – ускоренное СОЭ, нейтрофильный лейкоцитоз. Для более объективной и точной диагностики проводится рентгенографическое исследование. Лечение больных обезьян проводится комплексно с использованием антибиотиков широкого спектра действия, сульфаниламидов, общеукрепляющих средств, витаминотерапия. Наиболее часто используемые антибиотики при лечении пневмонии это: цефтриаксон 20-50 мг/кг веса 1 раз в сутки – 7-10 дней, цефазолин – 20-40 мг/кг веса 2 раза в сутки – 7-10 дней, бисептол – 120 мг 2 раза в день – 7дней, сульфадиметоксин – 0,25 мг/кг – 2 раза в день – 7 дней. Хорошие результаты полученные от применения сумамед 10 мг/кг внутрь 3 дня, кальция глюконат 10% - 1-5 мл в/м 3 раза в неделю. Для поддержания работы сердечно-сосудистой системы применяем сульфокамфокаин 10% р-р для инъекций по 0,5-1,0 мл 2 раза в день – 7-10 дней.

В случае выраженной анемии применяются препараты железа: феррум лек – 0,1-0,2 мл/кг веса в/м через день 5 инъекций, гемобаланс – 0,25-0,1 мл/кг в/м 2 раза в неделю. При своевременном лечении практически все обезьяны выздоравливают.

Патология беременности. Практически все обезьяны живущие в настоящее время в питомнике рождены в клетках и вольерах. Не каждая беременность протекает и заканчивается благополучно. Чаще всего специалистам клинико-ветеринарного отделения приходится встречаться с такими формами патологии как маточные кровотечения, которые могут быть следствием перенесенной травмы, следствием патогенного влияния возбудителей различных заболеваний, инвазий, нарушения минерального обмена, гиповитаминоза и т.д. При сильном кровотечении появляются признаки общей анемии, угнетения. Такие животные отсаживаются в изоляторы где и получают соответствующее лечение. Для лечения применяем кровоостанавливающие средства, дицинон – 0,5-1 мл в/м – 2 раза в день, викасол 1% - 0,5-1,0 – 2-3 раза в день, вводим раствор

Реополиглюкин, 10 мл/кг в/в медленно, 10% растворы кальция глюконата в/м, в/м инъекции аскорбиновой кислоты, применяем противоанемичные препараты (феррум-лек, гемобаланс).

Аборты.

Чаще встречаются у обезьян с повышенной массой тела и в результате травм. При лечении чрезвычайно важно освободить матку от остатков плаценты. Предотвратить риск потери крови, не допустить попадания в организм инфекции. В подобных случаях применяются антибиотики широкого спектра действия цефтриаксон, цефазолин, аминогликозидов (гентамицин 4%), окситоцин 5 Е.Д v / 7-10 дней в/м, по показаниям в/в введения 0,9% раствора натрия хлорид, или раствора для инфузий метрогил – 5 мг/мл-50,0 витаминотерапию и т.д.

Мертворождение.

Чаще встречается у первородящих обезьян, снижается по мере наступления следующих беременностей и снова нарастает у старых самок. Роды в вольерах протекают более благополучно, чем в клетках. Основную массу мертворождений составляет гибель доношенного плода в самый момент родов. Чаще всего гибель плода происходит вследствие неправильного предлежания плода (ягодичного или лицевого предлежания). Если возникает необходимость извлечения плода через родовые пути, контролируется полное отделение плаценты, отсутствие кровотечения. Однако если извлечение через родовые пути не представляется возможным, проводится кесарево сечение и дальнейшие терапевтические мероприятия по общепринятой схеме.

Проведение различных терапевтических мероприятий с животными проводится с использованием транквилизации препаратами Ксила (в одном мл которого содержится ксилозина гидрохлорид 20 мг) доза 0,1 мл/кг веса в комбинации с Золетилом доза 0,05 мл/кг веса внутримышечно.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИНВОЛЮЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ ДЕРМЫ

Фридман Наталья Владимировна [1,2], д. м. н., профессор Трофимова Светлана Владиславовна [1], Деби Вински (Deby Vinski) [3]

1-АНО НИЦ « Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Россия, г. Санкт-Петербург

2-Клиника «АртМедиЯ», Россия, г. Санкт-Петербург

3-Клиника эстетической и антивозрастной медицины, Индонезия, Джакарта (Beauty aesthetic&anti - aging clinic,Indonesia, Jakarta)

Резюме

В настоящее время активно изучаются средства, способные противостоять процессам старения организма человека в целом и кожи в частности. В связи с этим, актуальным является разработка эффективных и безопасных современных медицинских технологий, влияющих на инволюционные процессы дермы. Способность низкомолекулярных пептидов проникать внутрь клетки, влияя на клеточный метаболизм с последующим изменением архитектоники дермы, делает перспективным изучение пептидных биорегуляторов с целью восстановления инволюционных процессов кожных покровов человека. Задачей нашего исследования является изучение влияния низкомолекулярных пептидов на возрастные изменения кожи.

MODERN MEDICINE TECHNOLOGIES, INFLUENCING INVOLUTIONAL PROCESSES OF DERMA

Fridman Natalia Vladimirovna [1,2], M. D., professor Trofimova Svetlana Vladislavovna [1], Deby Vinski [3]

1. Autonomous noncommercial organization Research centre (St' Petersburg institute of bio-regulation and gerontology) Russia, St' Petersburg
2. "ArtMediA" Clinic, Russia, St' Petersburg
3. Beauty aesthetic&anti - aging clinic, Indonesia, Jakarta

Abstract

Currently the ways which will resist aging of the human organism in general and the skin in particular are actively studied. Therefore, creating effective and safe medical technologies, influencing involutional processes of derma is actual. Ability of low-molecular peptides to get into the cell, affecting cell metabolism with further change of architectonics of derma makes studying peptide bioregulators to restore involutional processes of human skin prospect. The aim of our research is studying of low-molecular peptides influence on age skin changes.

Важнейшая задача современной медицины - поиск безопасных и эффективных средств таргетного воздействия на инволюционные изменения в организме человека с целью предупреждения развития возраст-ассоциированных заболеваний, ускоренного старения организма в целом и

кожи в частности. Морфофункциональным эквивалентом старения является инволюция органов и тканей, в основе которой лежат патологические изменения на клеточном уровне[1]. Согласно схеме В.В. Фролькиса, болезни старения возникают в результате действия на организм эндо- и экзогенных факторов прямого и опосредованного через изменение экспрессии генов. Что в свою очередь ведет к изменению метаболизма клетки. Расположенные практически во всех органах и продуцирующие биологически активные вещества, клетки диффузной нейроиммуноэндокринной системы играют роль местных регуляторов гомеостаза, действуя, через нейрокринные, эндокринные и паракринные механизмы. Современное представление о диффузной нейроиммуноэндокринной системе заставляет рассматривать кожу как часть данной системы. [1]. В коже, являющейся метаболически активным биологическим барьером, тесные молекулярные и клеточные нейроиммуноэндокринные взаимодействия, которые играют ключевую роль в обеспечении локальных и общерегуляторных процессов, выражены весьма ярко [2].

В последние годы предпринимаются огромные усилия для разработки трансдермальных форм лекарственных препаратов и косметических средств, способных осуществить внутриклеточную доставку биологически активных макромолекул, таких как белки, ДНК, гиалуроновая кислота, коллаген [10]. Оказалось, что способностью преодолевать клеточные мембраны и доставлять макромолекулы через биологические мембраны и тканевые барьеры способны так называемые клеточно-проникающие пептиды (cell-penetrating peptides - CPP3). Местное применение пептидов, осуществляющих доставку веществ, может использоваться для лечения кожных заболеваний и улучшения качества кожи в косметологии [10].

Огромную роль в изучении пептидов сыграли исследования ученых Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии. В 1971 г В.Х. Хавинсон и В.Г. Морозов выделили пептиды из эпифиза, сосудистой стенки и тимуса животных. Была разработана технология выделения из органов и тканей животных пептидов, на основе которых были созданы лекарственные препараты и биологически активные добавки, которые успешно применяются для профилактики и лечения патологических состояний, обусловленных возрастными изменениями. Была сформирована концепция пептидной биорегуляции, заключающаяся в обеспечении пептидами структурного и функционального гомеостаза клеточных популяций [4]. Было установлено, что по мере старения происходит инволюция центрального органа иммунной системы-тимуса и нейроэндокринной системы-эпифиза. Также было выявлено достоверное

снижение синтеза белка в клетках различных тканей организма. Пептидные молекулы регулируют экспрессию генов и синтез белка. Нарушение пептидной биорегуляции снижает устойчивость организма к дестабилизирующим факторам внешней и внутренней среды, что является одной из причин ускоренного старения и развития патологии, ассоциированной с возрастом [5]. Было доказано, что короткие пептиды увеличивают среднюю и максимальную продолжительность жизни, снижают частоту образования злокачественных опухолей, способствуют увеличению длины теломер и преодолению лимита деления клеток Хейфлика, восстанавливают функциональную активность клеток иммунной системы и нейроэндокринной системы [3].

В этом свете перспективным является изучение влияния пептидных биорегуляторов на инволюционные процессы в коже. Ранее было установлено, что при трансдермальном введении пептидные геропротекторы способствуют восстановлению синтеза пигмента, секреции и метаболическому преобразованию гормонов и прогормонов, активации иммунных клеток, улучшению сосудистого фактора терморегуляции, улучшают работу антиоксидантной системы. В результате восстановление работы нейроиммуноэндокринной системы кожи приводит к восстановлению ее функции и улучшению структуры [3].

Известно, что благодаря хорошей способности проникать в клетку, пептиды оказывают эффект при местном применении [11]. Ведется активный поиск средств для топического применения пептидов с целью устранения признаков старения кожи [7]. Чтобы пептиды реализовывали свой потенциал без потери эффективности, важно обеспечить стабильность пептидной молекулы, способность преодолевать эпидермальный барьер и оценить последующие клинические изменения [9]. В связи с этим, актуальным является поиск методик оптимизирующих трансдермальную доставку пептидных молекул [6]. Известно, что применение метода ионофореза повышает доставку пептидных молекул более чем в 30 раз [8].

Целью нашего исследования является изучение влияния пептидных биорегуляторов на возрастные изменения кожи, являющиеся следствием дегенеративных процессов и нарушения архитектоники в дерме, развивающихся на фоне изменения метаболизма клеток дермального матрикса. Что проявляется в частности снижением механической прочности и эластических свойств кожи.

В исследовании приняли участие 16 женщин, которые распределены по трем группам: I-я группа от 35 до 50 лет, II-я группа- 50-60 лет, III-я группа 60-80 лет. Все пациенты получали курс сертифицированного

препарата «Visolingual», состоящего из комплекса пептидных биорегуляторов: АС-2 (Lys, Glu, Asp), АС-5 (Arg, Glu, Asp), АС-6 (Pro, Glu, Asp), АС-7 (Gly, Glu, Asp) методом лекарственного электрофореза на область лица. Всем участникам исследования до и после терапии проводилось ультразвуковое сканирование кожи лица с применением режимов В-сканирования и эластография ультразвуковым сканером GE Logic E9, США. Использовались линейные датчики 15 и 18 МГц. Также все пациенты заполняли анкету-опросник, оценивающую выраженность признаков старения кожи лица, таких как тонус, цвет, текстура, морщины, гиперпигментация, расширенные капилляры, субъективное ощущение сухости и общую эстетическую привлекательность кожи лица. Трактовка результатов опроса заключается в оценке сумме баллов – чем больше, тем более выражены признаки старения.

При сравнении данных ультразвуковых сканограмм до и после воздействия пептидных биорегуляторов, на снимках пациентов после терапии определяется улучшение эхоструктуры дермы – усиление эхогенности, а также более равномерное распределение гиперэхогенных структур в дерме во всех возрастных группах исследования. Данные эластографии демонстрируют уменьшение среднего коэффициента жесткости в I группе с 2,75±1,17 до 1,37±0,15; во II группе с 3,32±0,65 до 2,06±0,87; в III группе с 3,81±0,48 до 1,43±0,10, $p<0,05$. По результатам опросника во всех группах определяется уменьшение проявлений признаков старения в среднем на 5 баллов после воздействия коротких пептидов.

Результаты нашего исследования демонстрируют клиническую эффективность данной методики. Низкомолекулярные пептиды нормализуют метаболизм клеток дермы, способствуя стимуляции выработки компонентов межклеточного матрикса и восстановления его архитектоники, что делает перспективным применение этой инновационной методики с целью восстановления инволюционных процессов кожных покровов.

Список литературы

1. М. А. Пальцев, И. М. Кветной, В. О. Полякова, Г. И. Гурко, С. У. Мурсалов. Нейроиммуноэндокринные механизмы старения и возрастной патологии. Санкт-Петербург « Наука», 2012 г.
2. И. О. Смирнова, И. М. Кветной, И. В. Князькин, С. И. Данилов. Нейроиммуноэндокринология кожи и молекулярные маркеры старения. Санкт- Петербург, 2005 г.
3. Трофимова С.В., Хавинсон В.Х., Трофимов А.В. Регуляторные пептиды: молекулярные основы регуляции гомеостаза и замедления процессов старения организма//Научно-практическое общество врачей косметологов Санкт-Петербурга. Сборник статей. – 2014. – Вып. 15. – С. 38-43
4. Хавинсон В.Х. Пептидная регуляция старения. Санкт-Петербург. Наука, 2010. Изд.2
5. Хавинсон В.Х., Кузник Б.И., Рыжак Г.А. Пептидные геропротекторы-эпигенетические регуляторы физиологических функций организма. Санкт-Петербург: Издательство РГПУ им. А.И.Герцина, 2014.
6. Badenhorst T., Svirskis D., Wu Z. Physiochemical characterization of native glycyl-l-histidyl-l-lysine tripeptide for wound healing and anti-aging: a preformulation study for dermal delivery. Pharm Dev Technol. 2014 Nov 11:1-9.
7. F. Gorouhi and H. L. Maibach. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. International Journal of Cosmetic Science, 2009, 31, 327-345.
8. Krishnan G., Roberts M. S., Grice J., Anissimov Y.G., Moghimi H.R., Benson H.A. Iontophoretic skin permeation of peptides: an investigation into the influence of molecular properties, iontophoretic conditions and formulation parameters. Drug Deliv Trasl Res. 2014 Jun; 4(3):222-32. doi: 10. 1007/s 13346-013-0181-8.
9. Lupo M.P. Cosmeceutical peptides// Dermatol Surg. 2005. Vol. 31. P. 832-836
10. Saman A. Nasrollahi, Changiz Taghibiglou, Ebrahim Azizi and Effat S. Farboud. Cell-penetrating Peptides as a Novel Transdermal Drug Delivery System. Chem Biol Drug Des 2012, 80:639-648.
11. Wang Y., Wang M., Xiao X.S., Pan P., Li P., Huo J. The anti wrinkle efficacy of synthetic hexapeptide (Argireline) in Chinese Subjects. J Cosmet Laser Ther. 2013 Apr 22.

ВОСПРОИЗВОДИМЫЕ ПИКИ НА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ КРИВЫХ СМЕРТНОСТИ МЫШЕЙ КАК ПЕРСПЕКТИВА ДЛЯ ПОИСКА АНАЛОГИЧНЫХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ У ПРИМАТОВ.

Малыгин А. Г.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Резюме

Цель настоящего исследования – детальное изучение закономерностей естественного вымирания мышей в процессе онтогенеза с тем, чтобы использовать полученные результаты при изучении смертности приматов.

В работе использовали нормальных лабораторных мышей и мышей мутантов, отстававших в росте от своих собратьев. Ввиду повреждения у самок-мутантов репродуктивной функции, размножение мутантов осуществляли скрещиванием самцов-мутантов с нормальными самками. Часть мутантов умирала в возрасте 30±5 суток. Оставшиеся в живых - в течение последующих месяцев догоняли в росте нормальных сородичей и внешне ничем не отличались от них. Для анализа закономерностей продолжительности жизни всех мышей разделили на четыре группы: самцы-мутанты, самки-мутанты, нормальные самцы и нормальные самки.

На графике ранговых кривых смертности самцов-мутантов и самок-мутантов (см. **Рис.1** в русском тексте), где по оси абсцисс отложен номер особей в ряду возрастания продолжительности жизни, а по оси ординат - продолжительность жизни в сутках, явно видны ступени вымирания в возрасте ≈30 суток. Наряду с ними просматриваются дополнительные менее выраженные ступени. Чтобы точнее оценить воспроизводимость положения ступеней на оси продолжительности жизни, ось порядкового номера и продолжительности жизни на графике ранговых кривых (**рис.1)** обменяли местами, а полученные кривые смертности подвергли численному дифференцированию. При этом, как видно из **рис. 2а** и **Рис. 2б (**см. в русском тексте) после дифференцирования ступени превратились в пики скоростей вымирания соответственно самцов и самок. Положение пиков на оси продолжительности жизни указывало на критические периоды в онтогенезе мышей, когда скорости вымирания достигают максимальных величин.

Группы самцов-мутантов и самок-мутантов включали соответственно 142 и 132 особи. Сравнение **рис. 2а** и **2б** показывает видно, что из 12 пиков на дифференциальной кривой смертности самцов-мутантов и 10 пиков на аналогичной кривой смертности самок-мутантов 7 пиков совпадают по положению на оси продолжительности жизни. Доля совпадения пиков составила в первом случае 58%, а во втором - 70%. Независимость положения 7 пиков на дифференциальной кривой смертности от пола указывает на то, что их наличие в онтогенезе мышей-мутантов закономерно.

Далее группы самцов-мутантов и самок-мутантов были разделены пополам на независимые подгруппы с тем, чтобы подтвердить воспроизводимость положения пиков на соответствующих дифференциальных кривых смертности.

Из 4 пиков на дифференциальной кривой смертности самцов-мутантов первой подгруппы и 6 пиков - второй подгруппы 3 пика совпало по их положению на оси продолжительности жизни. То есть, доля совпадений пиков в первом случае составила 70%, а во втором - 50%.

Из 5 пиков на дифференциальной кривой смертности самок-мутантов первой подгруппы и 7 пиков - второй подгруппы 4 пика совпало по их положению на оси продолжительности жизни. То есть, доля совпадений пиков в первом случае составила 80%, а во втором - 57%.

Аналогичный анализ был проведен в отношении группы нормальных самцов, включающей 209 особей, и группы нормальных самок, включающей 249 особей. Положения пиков на дифференциальных кривых смертности для групп самцов и самок существенно различались.

Между пиками на дифференциальных кривых смертности в подгруппах нормальных самцов была получена высокая степень совпадений. Из 16 пиков на кривой первой подгруппы и 16 пиков на кривой второй подгруппы по положению на оси продолжительности жизни совпало 13 пиков. То есть, доля совпадения пиков в обоих случаях составляла 81%.

Заметно меньше совпадений пиков наблюдалось между независимыми подгруппами самок.

На кривых первой и второй подгрупп, составленных из всей группы нормальных самок, насчитывалось соответственно 22 и 21 пика. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 12 пиков. Доля совпадений пиков в первом случае составила 55% , а во втором - 57% .

После удаления рожавших самок из исходной группы, ее численность составила 173 особей. На дифференциальных кривых смертности первой и второй подгрупп осталось соответственно 12 и 15 пиков. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 9 пиков. Доля совпадений пиков в первом случае составила 75% , а во втором – 60%

После удаления из исходной группы самок с опухолями, ее численность составила 181 особь. На дифференциальных кривых смертности первой и второй подгрупп осталось соответственно 18 и 15 пиков. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 6 пиков. Доля совпадения пиков в первом случае составила 33% , во втором - 40%.

После удаления рожавших самок и самок с опухолями из исходной группы, ее численность составила 127 особей, а на кривых первой и второй подгрупп осталось по 11 пиков. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 7 пиков. Доля совпадения пиков в обоих случаях составила 64% .

Наконец, после удаления из исходной группы не рожавших самок и самок без опухолей, ее численность составила 122 особей, а на кривых первой и второй подгрупп осталось по 10 пиков. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 6 пиков. То есть, доля совпадения пиков в обоих случаях составила 60%.

Полученные для нормальных самок результаты можно объяснить смещением части пиков на оси продолжительности жизни при выполнении самками репродуктивных функций и отсутствием влияния опухолей на их смещение.

Обнаруженная ранее воспроизводимость положения ступеней на ранговых кривых смертности в независимых группах генетически однородных мышей [1-4] ограничивает применение общепринятой модели Гомперца для описания смертности млекопитающих. Последние сравнительные исследования экспериментальных кривых смертности дрозофил, проведенные другими авторами, убедительно показали, что форма этих кривых также не соответствует модели Гомперца [5].

Наблюдаемые в настоящем исследовании совпадения положения пиков вымирания на дифференциальных кривых смертности мышей подтвердили сделанный ранее вывод о недостаточности модели Гомперца для описания смертности животных.

Неоднородность по величине пиков, совпадающих по положению на осях продолжительности жизни, свидетельствует об их чувствительности к воздействиям среды. Короткая жизнь мутантов до достижения первого пика вымирания (30±5 дней) позволяет сжать сроки выявления этих воздействий и разработки способов их нейтрализации. Полученные результаты могли бы ускорить поиск способов преодоления других пиков вымирания.

Обнаружение воспроизводимых пиков вымирания в популяциях людей, разработка диагностики приближения критических возрастов для каждого индивида и способов их успешного преодоления открывает перспективу увеличения продолжительности жизни людей до возрастного барьера в сто пять лет. Анализ накопленных статистических данных о смертности обезьян способствовал бы ускорению решения этих задач.

THE REPRODUCIBILITY OF PEAKS ON DIFFERENTIAL CURVES OF MICE MORTALITY AS A PERSPECTIVE BASIS FOR THE SEARCH FOR A SIMILAR PHENOMENON IN PRIMATES

Malygin A.G.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, FRC of Biotechnology, Moscow, Russia

Abstract

The purpose of this work is a detailed analysis of natural mice mortality laws during ontogeny in order to use the results obtained for the study on primate mortality.

The normal laboratory mice and mutant mice with a retard in growth were used. Since a reproductive function of the female mutants was impaired, reproduction was performed by a crossbreeding between mutant males and normal females. Part of the derived mutants died at the age of 30 ± 5 days, but the survivors later caught up the normal mice in growth and did not differ from them visually. For the analysis of survival graphs, the mice were divided into four groups: mutant males, mutant females, normal males and normal females. The ranked mortality graph curves of mutant males and females showed a pronounced step of mortality at ≈30 days of age. Along with this, there were additional less pronounced mortality steps. To better assess the reproducibility of the steps positions on the life expectancy axis, the axes were reversed and the turned over mortality curves were subjected to numerical differentiation. After the differentiation, the steps turned into peaks of mortality speed. The position of the peaks on the life expectancy axis indicates critical periods in the mice ontogeny when the mortality speed reaches the maximum values. Groups of male and female mutants contained 142 and 132 animals, respectively. The comparison of data for male and female mutants revealed that 7 peaks of 12 peaks (for males) and of 10 peaks (for females) coincided in positions on the life expectancy axis (58% and 70%, respectively). No dependence on gender of the position of these 7 peaks on the differential mortality curves indicates their naturalness in the ontogeny of mutant mice.

Then every group (of male mutants and female mutants) was divided into two equal subgroups in order to confirm the reproducibility of the peak positions on respective differential mortality curves. For the male mutants 3 peaks of 4 peaks in the first subgroup and of 6 peaks in the second subgroup coincided (70% and 50%, respectively). In the case of the female mutants 4 peaks of 5 peaks in the first subgroup and of 7 peaks in the second subgroup coincided (80% and 57%, respectively).

A similar analysis was carried out for a normal male group (of 209 animals) and a normal female group (of 249 animals). The peak positions on the differential mortality curves for male and female groups considerably differed.

High degree of coincidence was obtained between the peaks on the differential mortality curves for the subgroups of normal males. 13 of 16 peaks in both subgroups coincided on life expectancy axis. The proportion of peaks coincidence in both cases was 81%.

The coincidence of peaks between independent female subgroups was noticeably fewer. The curves for the first and the second subgroups, made up from the entire group of normal females, contained 22 and 21 peaks, respectively. 12 peaks coincided on the life expectancy axis (55% and 57%, respectively).

After that the parous females were excluded from the original group (173 animals remained). There were 12 and 15 peaks on the differential mortality curves for the first and second subgroups, respectively. 9 peaks coincided on life expectancy axis (75% and 60%, respectively).

In the next calculation the females suffering from tumors were excluded from the original group (181 animals remained). There were 18 and 15 peaks on the differential mortality curves for the first and second subgroups. 6 peaks on the life expectancy axis coincided (33% and 40%, respectively).

If the parous females and suffering from tumors ones (22 females were parous and at the same time, suffered from tumors) were excluded from the original group (127 animals remained), there were 11 peaks in each subgroup and 7 of them coincided on life expectancy axis. The proportion of peaks coincidence in both cases was 64 %.

Finally, after the exclusion of the nulliparous and tumor-free females (122 animals remained), there were 10 peaks in each subgroup and 6 of them coincided on the life expectancy axis. The proportion of peaks coincidence in both cases was 60%.

The results obtained for the normal female group may be explained by a shift of the peaks on the life expectancy axis after completing reproductive functions and by the absence of tumor effect on their displacement.

The reproducibility of steps of mortality in independent groups of genetically homogeneous mice described in our previous publications, limits the application of Gompertz standard model for description of mammalian mortality. Recent comparative studies on Drosophila mortality also have convincingly shown that the shape of these curves did not correspond to the Gompertz model. The coincidence of mortality peaks positions on the differential curves of mice mortality observed in this study, confirmed the conclusion that the Gompertz model does not satisfy a description of animal mortality.

The heterogeneity of peak sizes on the life expectancy axis indicates their susceptibility to the environment effects. Short life periods before the mutants achieve the first mortality peak (30 ± 5 days) make it possible to reduce the timeline for identifying of these effects and to develop methods to neutralize them. These results should accelerate the search for ways to overcome the other mortality peaks.

Detection of reproducibility of mortality peaks in human populations, the development of diagnostic methods of each individual critical age and the ways to overcome it, open the prospect to increase the human life expectancy up to one hundred and five years. The statistical analysis of the data on monkeys mortality would help to accelerate the solution of these problems.

Биологические и медицинские исследования проводятся в разных направлениях, но так или иначе, в конечном счете, все они, за малым исключением, нацелены на продление жизни человека. Очевидно, что эффективность продвижения к цели зависит от правильного выбора стратегии исследований. Исходя из принципа «от простого к сложному» многие биологи полагают, что отправной точкой правильной стратегии должен быть поиск условий образования сложных органических молекул из простых углеродсодержащих соединений и возникновения на этой основе примитивных форм жизни. Однако на этом пути имеются два труднопреодолимых препятствия. Первое - состоит в том, что поиски, в течение столетий условий образования примитивных форм жизни, ведущих к распутыванию клубка процессов, протекающих в современных организмах, оказались бесплодными. Второе - в том, что не ясно, как открытие условий происхождения жизни помогло бы решить проблему ее продления. Отсюда следует, что более перспективной может оказаться обратная стратегия, то есть при изучении жизни следует руководствоваться обращенным принципом - «от сложного к простому» и концентрировать усилия на исследовании процессов превращения живого организма в неживую материю. Клубок проще разматывать с конца. При этом главной целью стратегии исследований становится раскрытие механизмов умирания человека. Однако, из-за ограниченных возможностей постановки опытов на людях, работать приходится с их ближайшими родственниками – обезьянами, а в случае исследований продолжительности жизни - с короткоживущими грызунами. Сходство генома грызунов и приматов позволяет со значительной степенью достоверности экстраполировать результаты этих опытов на приматов.

Цель настоящего исследования – детальное изучение закономерностей естественного вымирания мышей в процессе онтогенеза с тем, чтобы в последующем использовать полученные результаты при изучении смертности приматов.

Исследование началось со случайного обнаружения в выводке лабораторных мышей самца, отставшего в росте от своих собратьев. Мутация оказалась наследуемой. Ввиду повреждения у самок-мутантов репродуктивной функции, размножение мутантов осуществляли скрещиванием самцов-мутантов с нормальными самками. Выяснилось, что часть мутантов умирала в возрасте 30±5 суток. В то же время, оставшиеся в живых мутанты в течение последующих месяцев догоняли в росте своих нормальных сородичей и внешне ничем не отличались от них. Для анализа

закономерностей продолжительности жизни всех мышей разделили на четыре группы: самцы-мутанты, самки-мутанты, нормальные самцы и нормальные самки.

На графике ранговых кривых смертности самцов-мутантов и самок-мутантов (**Рис.1**), где на оси абсцисс отложены номера особей в ряду возрастания продолжительности жизни, а по оси ординат - продолжительность жизни в сутках, явно видна ступень вымирания в возрасте ≈30 суток.

Обнаружение этой ступени навело на мысль о существовании других ступеней, соответствующих более поздним возрастам мышей. Действительно, на ранговых кривых смертности просматриваются дополнительные менее выраженные ступени. Возникает вопрос о закономерности или случайности их присутствия. Надежным критерием закономерности наличия ступеней может служить их воспроизводимость.

Чтобы точнее оценить воспроизводимость положения ступеней, оси порядкового номера и продолжительности жизни на графике ранговых кривых смертности (**рис.1)** поменяли местами, а кривые подвергли численному дифференцированию. При этом, как видно из **рис.2а** и **Рис.2б**, на полученных кривых ступени смертности превратились в пики скоростей вымирания соответственно самцов и самок. Положение этих пиков на оси продолжительности жизни указывало на критические периоды в онтогенезе мышей, когда скорости вымирания достигают максимальных величин.

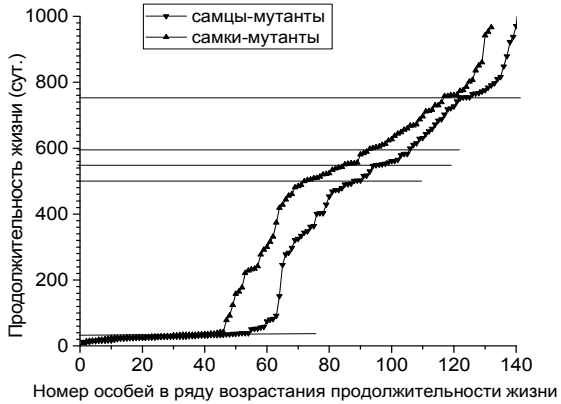


Рис. 1. Ранговые кривые смертности 142 самцов-мутантов и 132 самок-мутантов. На ось продолжительности жизни горизонтальными линиями спроецированы главная ступень вымирания (≈30 суток) и некоторые менее выраженные ступени.

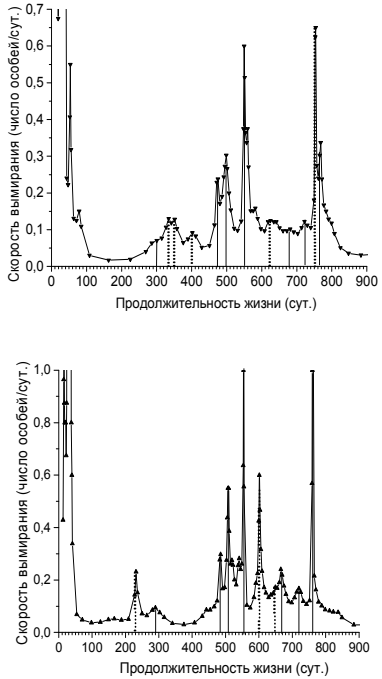


Рис. 2 Дифференциальные кривые смертности для групп: **а** – самцов-мутантов и **б** - самок-мутантов. Совпадающие по положению пики, обнаруживаемые на обоих графиках, отмечены непрерывными вертикальными линиями. Несовпадающие пики – пунктирными линиями.

Группы самцов-мутантов и самок-мутантов включали соответственно 142 и 132 особи. Из сравнения **рис. 2а** и **2б** видно, что из 12 пиков на дифференциальной кривой смертности самцов-мутантов и 10 пиков на аналогичной кривой смертности самок-мутантов 7 пиков совпадают по положению на оси продолжительности жизни. Доля совпадения пиков в первом случае составила 58%, а во втором - 70%. Это значит, что положение 7 пиков на дифференциальной кривой смертности не зависит от пола и что их наличие в онтогенезе мышей-мутантов закономерно.

Далее группы самцов-мутантов и самок-мутантов были разделены на две равные независимые подгруппы, чтобы подтвердить воспроизводимость положения пиков на соответствующих дифференциальных кривых

смертности. Подгруппы формировали из первой и второй половины ряда мышей, выстроенного в порядке возрастания даты половины их жизни. Поскольку требования к оформлению тезисов допускают лишь два рисунка, представление этих и последующих данных ограничено текстовой формой.

Из 4 пиков на дифференциальной кривой смертности самцов-мутантов первой подгруппы и 6 пиков - второй подгруппы 3 пика совпало по их положению на оси продолжительности жизни. То есть, доля совпадений пиков в первом случае составила 70%, а во втором - 50%.

Из 5 пиков на дифференциальной кривой смертности самок-мутантов первой подгруппы и 7 пиков - второй подгруппы 4 пика совпало по их положению на оси продолжительности жизни. Следовательно, доля совпадений пиков в первом случае составила 80%, а во втором - 57%.

Аналогичный анализ был проведен в отношении группы нормальных самцов, включающей 209 особей, и группы нормальных самок, включающей 249 особей. Положения пиков на дифференциальных кривых смертности для групп самцов и самок существенно различались.

Между пиками на дифференциальных кривых смертности в подгруппах нормальных самцов была получена высокая степень совпадений. Из 16 пиков на кривой первой подгруппы и 16 пиков на кривой второй подгруппы по положению на оси продолжительности жизни совпало 13 пиков. То есть, доля совпадения пиков в обоих случаях составляла 81%.

Заметно меньше совпадений пиков наблюдалось между независимыми подгруппами самок.

На кривых первой и второй подгрупп, составленных из всей группы нормальных самок, насчитывалось соответственно 22 и 21 пика. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 12 пиков. Доля совпадений пиков в первом случае составила 55% , а во втором - 57% .

После исключения рожавших самок из исходной группы, ее численность составила 173 особей. На дифференциальных кривых смертности первой и второй подгрупп осталось соответственно 12 и 15 пиков. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 9 пиков. Доля совпадений пиков в первом случае составила 75% , а во втором – 60%

После исключения из исходной группы самок с опухолями, ее численность составила 181 особь. На дифференциальных кривых смертности первой и второй подгрупп осталось соответственно 18 и 15 пиков. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 6 пиков. Доля совпадения пиков в первом случае составила 33% , во втором - 40%.

После исключения рожавших самок и самок с опухолями из исходной группы, ее численность составила 127 особей, а на кривых первой и второй подгрупп осталось по 11 пиков. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 7 пиков. Доля совпадения пиков в обоих случаях составила 64% .

Наконец, после исключения из исходной группы не рожавших самок и самок без опухолей, ее численность составила 122 особей, а на кривых первой и второй подгрупп осталось по 10 пиков. Из них по положению на оси продолжительности жизни совпало 6 пиков. При этом доля совпадения пиков в обоих случаях составила 60%.

Полученные для нормальных самок результаты можно объяснить смещением части пиков на оси продолжительности жизни при выполнении самками репродуктивных функций, приводящем к уменьшению процента их совпадения в независимых группах самок и отсутствием влияния опухолей на их смещение.

На первый взгляд, обнаружение пиков на дифференциальной кривой смертности противоречит классической модели Гомперца, которая первоначально использовалась для описания смертности людей, а затем была распространена и на животных. Согласно этой модели, интенсивность смертности вычисляется как частное от деления значений дифференциальной кривой смертности на количество доживающих особей в изучаемой популяции. Полученную кривую аппроксимируют экспонентой, или прямой, получаемой логарифмированием экспоненты.

Поскольку в основе модели лежали данные статистики смертности больших генетически неоднородных популяций людей, сильно сглаженные посредством их усреднения, то отклонения от теоретической кривой интенсивности смертности человека были незначительны и не принимались во внимание. Напротив, форма экспериментальных кривых интенсивности смертности животных, ввиду ограниченных объемов статистических данных, обычно была далека от теоретической. Ранее, обнаружение нами воспроизводящихся ступеней на ранговых кривых смертности в независимых группах генетически однородных мышей показало недостаточность применения модели Гомперца для описания смертности млекопитающих [1-4]. Последние сравнительные исследования экспериментальных кривых смертности дрозофил, опубликованные другими авторами, также продемонстрировали, что форма этих кривых не соответствует модели Гомперца [5].

Обнаружение в настоящей работе совпадения положения пиков на дифференциальных кривых смертности при минимальном сглаживании

статистических данных подтвердило сделанный ранее вывод о недостаточности модели Гомперца для детального описания смертности животных.

Особенностью пиков скорости вымирания, совпадающих по положению на осях продолжительности жизни в независимых группах мышей, является их выраженная неоднородность по величине. Однако это не подвергает сомнению существование пиков, а лишь свидетельствует об их чувствительности к воздействиям среды. Различия по высоте, но не по положению, одинаковых пиков на дифференциальных кривых смертности в параллельных группах животных открывает перспективу поиска простых мер, нейтрализующих опасные для жизни воздействия среды при достижении критических возрастов. После прохождения опасных периодов организм переходит к стадиям устойчивого развития, нечувствительным к отрицательным воздействиям среды.

Главным препятствием в подобных исследованиях являются большие промежутки времени, необходимые для достижения индивидами возрастов естественной смерти. Даже для мышей эти сроки превышают год. Поэтому многие работы по геронтологии проводятся на короткоживущих насекомых, жизненный цикл которых не превышает нескольких недель. Однако результаты, полученные на насекомых трудно экстраполировать на млекопитающих.

Особенность изучаемых нами мышей-мутантов состоит в том, что первый пик смертности у них приходится на срок 30±5 дней. То есть первый период устойчивого развития сопоставим у них по времени с жизненным циклом короткоживущих насекомых. Это делает мышей-мутантов удобной моделью для исследований смертности млекопитающих. В частности, короткая жизнь мутантов до достижения первого пика вымирания позволяет проводить в сжатые сроки исследования ведущих к смерти процессов и осуществлять поиск воздействий, способных ее предотвратить. Полученные результаты могли бы быть использованы для решения проблемы преодоления остальных пиков вымирания.

Обнаружение воспроизводимых пиков вымирания в популяциях людей, разработка диагностики приближения критических возрастов для каждого индивида и способов их успешного преодоления открывает перспективу увеличения продолжительности жизни людей до возрастного барьера в сто пять лет. Анализ накопленных статистических данных о смертности обезьян способствовал бы ускорению решения этих задач.

Список литературы

1. Малыгин А.Г. Вариации продолжительности жизни мышей в процессе их роста и старения. Доклады МОИП Секция Геронтологии. Т. 50, 2012, сс. 56-65.
2. Малыгин А.Г. Осцилляции жизнеспособности мышей в процессе их роста и старения. В книге: "Проблемы зарождения и эволюции биосферы" ч.2.под ред. Э.М.Галимова. М.: КРАСАНД, 2012, сс. 635-639.
3. Малыгин А.Г. Ступенчатое изменение продолжительности жизни мышей в онтогенезе. Онтогенез. Т.44, №1, 2013, сс. 57-65.
   Malygin A.G. Graduated Change of Life Expectancy in Mice Ontogenesis. Rus. J. Dev. Biol. V. 44, No 1, 2013, pp. 48-55.
4. Малыгин А.Г. Возрастные колебания смертности у мышей с мутацией задержки роста. Биохимия. Т.78, № 9, 2013, сс. 1318-1330.
5. Мыльников С. В., Опарина Т. И., Бычковская И. Б. О дискретности кривых дожития. Сообщение 1. Отклонения от закона Гомперца у линии *Canton-S Drosophila melogaster*. Успехи геронтол. 2015. Т. 28. № 4. С. 624–628.

II. ИНФЕКЦИОННАЯ ПАТОЛОГИЯ. ИММУНОЛОГИЯ
II. INFECTIOUS PATHOLOGY. IMMUNOLOGY

SPF RHESUS MACAQUE PRODUCTION AND REFINEMENT

Roberts JA (CNPRC, UC Davis, USA), Yee JL (CNPRC-Pathogen Detection Laboratory, UC Davis, USA), , Short JJ (CNPRC, UC Davis, USA), Kanthaswamy S (Arizona State University USA), Van Rompay KKA (CNPRC, UC Davis, USA), Hartigan-O'Connor D (CNPRC, UC Davis, USA), Ardeshir A (CNPRC, UC Davis, USA), Torres-Penedo C (Veterinary Genetics Laboratory, UC Davis, USA) Barry PA (Center for Comparative Medicine/CNPRC, UC Davis, USA)
jaroberts@ucdavis.edu

Funding: This work was supported by NIH grants: CNPRC- P51 OD011107 and U42 OD010990

The California National Primate Research Center (CNPRC) began production of Specific Pathogen Free (SPF) rhesus macaques in 1993 in response to occupational health concerns with Herpes B virus and the recognition that other viral agents could interfere both in AIDs research as well as studies in other disciplines [1]. Starting in 2001 the CNPRC was successful in obtaining an NIH grant to develop and maintain a breeding colony of SPF, Indian-origin rhesus macaques. The CNPRC has two different levels of SPF Indian rhesus. Level 1 animals are negative for 4 persistent viruses, (SIV, SRV, STLV, and B virus) and Level 2 animals are negative for 7 persistent viruses (SIV, SRV, STLV, B virus, SFV, RRV, and RhCMV). In addition to producing rhesus macaques free of the selected viruses, the CNPRC also utilized its experience in genetic management to determine both the pedigree of colony animals as well as the MHC I haplotype of offspring. The goal of the program is to produce SPF Indian rhesus for investigators conducting AIDS research, and to also improve our understanding of the animal model. To maximize colony production the CNPRC has utilized three separate ½-acre corrals in the CNPRC outdoor housing area. Each corral is composed of anywhere from 80 to 130 animals maintained in large multimale/multifemale social groups. The live birth rate in these corrals averages approximately 80% and represents a very efficient means of animal production. The overall annual mortality rate based on "days at risk" is 6.44%. During the sixteen year history of the colony, the CNPRC provided over 600 SPF Indian rhesus to investigators, with the overwhelming majority going to PI's funded for AIDS research.

Methods of SPF Colony Derivation from Conventional Animals

The derivation of any species of laboratory animal to be free of specific pathogens depends upon separation of the offspring from the dam or other cage mates prior to the opportunity for transmission of the agents to occur. The most stringent method of derivation includes caesarian section with the infant being fostered onto an SPF foster dam or being raised in a nursery. In the case of the viral agents of concern, previous epidemiological studies had demonstrated that c-section was not necessary and that transmission from the dam to the infant did not occur at birth. The separation of the infant and dam at a later date would successfully prevent transmission of the agent [2]. Previous CNPRC epidemiologic studies as well as several years' worth of previous SPF derivation data documented that the prevalence of infection with each of 5 targeted agents (B virus, STLV, SIV, SRV, SFV) is very low in animals less than 6 months of age [2]. The SPF derivation strategy at the CNPRC was based on an infant's removal in the first week after birth from non-SPF dams and placement of the infants into an indoor SPF nursery. During the next four months in the nursery the infants are paired with another candidate SPF infant in individual cages for social enrichment. At four months of age they are housed in a dedicated indoor animal room. Previous experience with derivation of SPF rhesus of Chinese origin had demonstrated that animals born to non-SPF dams nursery-reared from birth remain negative for 7 persistent viruses, including RhCMV and RRV. The removal of the infants from dams shortly after birth facilitated their adaptation to nursery care. Paired animals underwent 4 rounds of testing during the first year, and infected animals are removed along with their cage contact. Animals remaining test-negative over the first year are combined in larger groups for socialization. This process of separation of weanlings has proven effective in re-derivation, and expanded both animal numbers as well as the two additional viral agents RhCMV and RRV. Once breeding groups were established in corrals with SPF animals the frequency of viral testing was reduced to once every six months.

Colony Production

Outdoor Housing and Production. The CNPRC rhesus population is housed under three different paradigms: indoor housing, group housing in corn-cribs (which accommodate approximately 10-15 individuals), and half-acre outdoor field corrals, each of which can house up to approximately 130 animals. The advantage of this corral is that it can cost-effectively provide sufficient numbers of healthy animals for research with known life histories and demographic profiles. The long-term SPF production colony is housed in three field corrals with a current population of 402 animals. These enclosures provide

infants, juveniles, adults, and aging animals. The field corrals have been the cornerstone of the production colony for over 50 years.

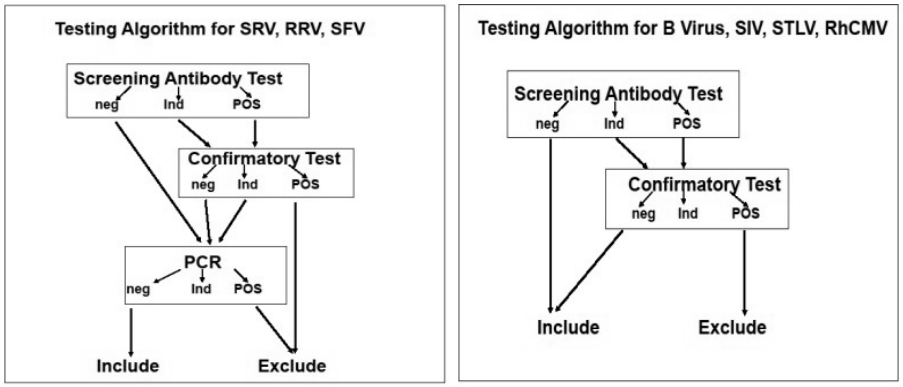
The outdoor corrals at the CNPRC are the most cost-efficient caging system, housing an average of 20 adult males and 40 adult females with the remainder of the population composed of subadults, juveniles and infants. Genetic diversity is maintained in each corral by transfer of day-old male infants between enclosures as directed by the Genetic Management Service. The corrals typically have an 80% live birth rate, and overall mortality is low (yearly average = 6.44%) for the three SPF corrals. The corrals also provide a naturalistic social environment for rhesus macaques with the development of the social hierarchies typically observed in both male and female populations [3]. The adult females are particularly important since rhesus are a matrilineal species with high-ranking females and their offspring having a dominant role in social interaction and group stability. While the outdoor corrals are desirable for social and efficiency reasons, they present a challenge in two respects. The removal of animals from a corral for sale or assignment to an investigator can often be complicated by considerations of the potential negative impact on the established social hierarchy and potential disruption of the cage social stability [4]. This consideration can limit harvest of specific animals that may be identified because of specific genotypes or phenotypes. Overall colony production is a balance of retaining adequate numbers of adult males and females to maintain stability in the corral enclosure, provide replacement females, and produce adequate numbers of animals for use by investigators. Figure 1 below shows the population distribution for the three SPF corrals for a four year period from 2012 – 2015. During that time the animals available for assignment each year varied between 67 and 98 but there was still a slight growth of the colony from 348 to 386. The SPF Indian rhesus colony is currently at 402 animals.

Figure1

Colony Statistics		2012	2013	2014	2015
Colony size		348	364	362	386
Juvenile Replacements		106	103	117	130
Offspring < 1 yr		66	63	63	67
Breeding Males		52	61	63	65
Breeding Females		124	136	114	121
Adult Breeders		176	197	177	186
Colony Production		66	64	68	70
Seronegative Animals Produced		47	45	51	60
Animals Available for Sale/Assignment		74	67	82	98
Animals Sold/Assigned		61	35	69	73

SPF Viral Testing The testing frequency for the colony is twice a year for all animals greater than 6 months of age. The Level 1 animals are tested for 4 persistent viruses, (SIV, SRV, STLV, and B virus) while the Level 2 animals are negative for 7 persistent viruses (SIV, SRV, STLV, SFV, RRV, RhCMV, and B virus. Both antibody and virus detection are part of the standard algorithm for SPF surveillance (Figure 2) [2, 5]. The CNPRC Pathogen Detection Laboratory (PDL) performs routine serological testing using commercially available multiplex array reagents (Charles River Laboratories, Wilmington, MA; Intuitive Biosciences, Madison, WI) for screening. Any samples yielding non-negative screening results are subjected to confirmatory testing using Immunofluorescence or Immunoblot assays using assays developed by PDL [2, 6]. Polymerase Chain Reaction is also routinely performed to ensure that any virus positive and antibody negative monkeys are also detected [7]. All these assays have been validated and are continuously monitored to meet strict quality control standards.

Figure 2. Testing Algorithms for SPF Viruses



Genetic Management of the Colony

The genetic management of the colony has two components: genetic characterization and genetic management. The genetic testing of the colony allows unique genetic characterization of the SPF Indian-origin rhesus macaques produced to determine differences in the Major Histocompatibility Complex (MHC) haplotypes that provide information about haplotype sharing among experimental animals. The SPF colony has been typed by the Veterinary Genetics Laboratory by STR analysis to identify specific MHC Class I variants (Mamu-A*01, Mamu-A*08, Mamu-B*01). It is increasingly important to characterize MHC haplotypes of monkeys that are used in studies of the pathogenesis of the

HIV-related simian immunodeficiency virus (SIV) or for vaccine development to understand the significance of variation in the macaque immune response [8]. The availability of pedigree records and defined MHC haplotypes provide the means for the selective production of SPF monkeys that are critically needed for AIDS-related and other research.

The second goal is genetic management of the SPF colony. The main goal of genetic management is to characterize, preserve and maximize genetic heterogeneity among the rhesus macaques in the CNPRC SPF colony [9]. By increasing heterozygosity and, consequently, reducing homozygosity, including that for deleterious alleles, the genetic management strategies ensure the entire colony's continued genetic health and productivity. The advantage of a genetically characterized and well-managed colony, such as that operated by the CNPRC, is its capability to supply sufficient numbers of healthy animals for research that have known life histories, pedigree affiliation, and demographic and genetic profiles. The CNPRC is currently undertaking the conversion from short tandem repeat (STR) to single nucleotide polymorphism (SNP) for genetic management. The SNP panel will be used for pedigree development and ancestry testing. The proposed levels of genetic characterization and genetic management will enable colony managers to develop pedigree relationships among animals and researchers to select appropriate experimental animals, and allows for uninterrupted transition to new genotyping platforms.

The Microbiome and Biological Characterization

The CNPRC provides research animals to numerous investigators doing AIDs research as well as studies with other infectious agents. Based upon data provided from investigators using macaques from the SPF colony, it became evident that the elimination of the targeted viruses had the potential to impact both the microbiome and immune response in SPF animals. The program was modified to establish a biorepository for biological specimens for future microbiome profiling while at the same time performing matching lymphoid subset analysis. This biorepository has been extremely successful in providing AIDS funded investigators with samples for analysis of the impact of the exclusion of the SPF viruses on the host microbiome and lymphoid cell subsets. These changes have the potential to impact the results of AIDS treatment and vaccine studies. The CNPRC SPF program includes a Biorepository Core that collects and stores fecal samples and lymphoid cell subsets for future analysis in investigator initiated projects. The Biorepository Core will also analyze a subset of infants born at each SPF level and compare the intestinal microbiome and lymphoid population seen in each level

with those observed in conventional animals. This work will provide investigators with a unique biological characterization of the microbiome and immune system of their research subjects, which will assist in proper study design and power calculations.

The characterization and documentation of these physiological changes has stimulated new areas of investigation into host-virus interaction. Recent studies conducted by AIDS-funded investigators at the CNPRC have compared and contrasted age-matched, outdoor-housed SPF 2 and conventional (non-SPF) animals in terms of gut-microbial homeostasis, systemic immune profiles, and host cell signaling/activation pathways. Notably, these studies have shown that the two cohorts of animals have significantly different (i) gut microbiomes, (ii) Toll-Like Receptor (TLR) signaling patterns in gut epithelial cells, and (iii) lymphoid subsets. The plan is that as SPF animals age, it will be possible for AIDS-funded investigators to layer the temporal effect of an aging primate immune system onto studies assessing animals that differ in viral co-infections, microbiome, and TLR signaling in the context of vaccination and/or challenge. The inclusion of the biorepository into the SPF production colony will expand the biological information available on SPF animals and hopefully facilitate study design and create new opportunities for research.

References/Literature Cited

1. Lerche NW, Osborn KG, *Simian Retrovirus Infections: Potential Confounding Variables in Primate Toxicology Studies.* Toxicologic Pathology 2003, **31**(Suppl.), p. 103–110.
2. Lerche NW, Yee JL, Jennings MB, *Establishing specific retrovirus-free breeding colonies of macaques: an approach to primary screening and surveillance.* Lab Anim Sci 1994; **44(3)**: p. 217-221.
3 Brent LJ, Heilbronner SR, Horvath JE, Gonzalez-Martinez J, Ruiz-Lambides A, Robinson AG, Skene JH, Platt ML, *Genetic origins of social networks in rhesus macaques*. Sci Rep. 2013; 3: 1042.
4. Oates-O'Brien RS, Farver TB, Anderson-Vicino KC, McCowan B, Lerche NW, *Predictors of matrilineal overthrows in large captive breeding groups of rhesus macaques (Macaca mulatta)*. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2010 Mar;**49**(2):196-201.
5. Morton WR, Agy MB, Capuano SV, Grant RF, *Specific pathogen-free macaques: definition, history, and current production*. ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources 2008; **49**(2): p. 137-144.

6 Gerstman BB, *Epidemiology kept simple: an introduction to classic and modern epidemiology*. New York: Wiley, 1998.
7 White JA, Todd PA, Rosenthal AN, Yee JL, Grant R, Lerche NW, *Development of a generic real-time PCR assay for simultaneous detection of proviral DNA of simian Betaretrovirus serotypes 1, 2, 3, 4 and 5 and secondary uniplex assays for specific serotype identification*. J Virol Methods 2009; **162**(1-2): p. 148-154.
8 Bontrop RE, Watkins DI, *MHC polymorphism: AIDS susceptibility in non-human primates.* Trends Immunol, 2005. **26**(4): p. 227-33.
9 Kanthaswamy S, von Dollen A, Kurushima JD, Alminas O, Rogers J, Ferguson B, Lerche NW, Allen PC, Smith DG, *Microsatellite markers for standardized genetic management of captive colonies of rhesus macaques (Macaca mulatta).* Am J Primatol, 2006. **68**(1): p. 73-95.

CHAGAS DISEASE: VALUE OF NONHUMAN PRIMATES FOR DEVELOPING AND TESTING DRUGS AND VACCINES

VandeBerg, J.L. South Texas Diabetes and Obesity Institute and Department of Biomedical Sciences, School of Medicine, The University of Texas Rio Grande Valley, Brownsville/Harlingen/Edinburg, TX, U.S.

Contact details: John l. VandeBerg, Ph.D., One West University Blvd., UTRGV – STDOI Modular Bldg. Brownsville, TX 78520, U.S.; john.vandeberg@utrgv.edu; phone 1-210-859-3711.

Chagas disease (American trypanosomiasis) is caused by *Trypanosoma cruzi*, which is a flagellate parasite that is transmitted to humans by a blood sucking triatomine bugs. The parasite also can be transmitted orally, congenitally, or by blood transfusion or organ transplantation. Chagas disease is manifested as cardiomyopathy in 20-30% of infected people. An estimated 6-9 million people are infected with the parasite, and an estimated 200,000 of them will die of complications related to Chagas disease in the next 5 years (see 1 for references). While the parasite and its vector are found in nature only in Central and South America and in southern United States, the disease is becoming a global health concern as large numbers of people emigrate from Latin America to other countries. There is no vaccine or prophylactic drug available to prevent *T. cruzi* infection, and the only drugs available to treat chronically infected patients have major side effects and limited efficacy. With rare exceptions, the parasite is not

eradicated from the body by the immune system; i.e., once a person is infected, he or she is infected for life.

Nonhuman primates in Latin America have long been known to be among the many mammalian species that naturally serve as reservoirs for *T. cruzi*. During the last several decades, it has been discovered that nonhuman primate colonies housed in outdoor enclosures in some of the southern United States have natural endemic infections of *T. cruzi*. Hence, these primates can serve as a natural model for investigating the epidemiology of *T. cruzi* infection, the complex immunological and other biological sequelae of infection, and the pathological characteristics of the disease process, which are remarkably similar to those in humans.

Moreover, nonhuman primates can serve as experimental subjects for research in developing vaccines for preventing Chagas disease and new drugs for treating it, and they have some important advantages over mice for late-stage preclinical studies of this nature. In addition, they enable the resolution of some critical questions about drug or vaccine efficacy that cannot be resolved by clinical trials or by experiments with mice.

One of the questions is, to what extent can novel drugs eradicate the parasite from the heart and other tissues of infected people? In the chronic phase of infection, the immune system is remarkably good at keeping the level of blood parasitemia at such low levels that parasite DNA often cannot be detected by PCR. Detection of parasite DNA in blood is even more difficult after drug treatment, presumably because the immune system is even more efficient at clearing parasites that enter the bloodstream from the tissues after most or all parasites in the blood have been killed by the therapeutic drug. Certain experimental drug treatments can be demonstrated to clear all of the parasites from experimentally infected mice as determined by extensive PCR of tissues, but these drugs are less effective at clearing parasites from the blood of humans, and it is not known whether people who have undetectable levels of parasite DNA in blood post-treatment still have parasites in their tissues. The capability of conducting terminal experiments with nonhuman primates allows the rigorous assessment via extensive PCR of tissue samples of the capacity of new drugs to eradicate all parasites from the body.

Another critical question is whether a reduction in the level of parasitemia, but not total elimination of parasites, after therapeutic treatment results in improved clinical prognosis of patients. Recent data from a 10-year clinical trial that involved almost 3,000 patients suggested that clinical prognosis is not improved by treatment (2), but the data were derived from patients who already had clinical evidence of Chagas cardiac myopathy at the time of drug treatment, rather than from infected people whose hearts are healthy. Therefore, the question

remains as to whether a reduction in parasitema after therapy is clinically beneficial to patients who have not yet developed clinical evidence of cardiomyopathy.

For those patients, the question is difficult to answer because clinical manifestations of Chagas disease may take decades to become evident, and may never become evident despite some degree of cardiac inflammation that is not manifested clinically. Mice are not a valid model for answering this question, because the immune system of mice has important differences from that of primates and because Chagas disease pathology in mice differs considerably from that in humans. However, just as Old World monkeys age at about three times the rate of humans, so also Chagas disease progresses about three times as fast in Old World Monkeys as in humans. For example, a group of 10-year-old monkeys infected with *T. cruzi* as infants may have much the same distribution of Chagas disease characteristics as a group of 30-year-old humans infected as infants. Therefore, the time frame required for monitoring clinical progression of the disease in Old World monkeys is a third of that in humans; a 10-year follow-up after treatment of humans would be equivalent to a 3.33-year follow-up of monkeys. Moreover, heart tissues can be assessed for myocarditis in terminal experiments with monkeys so the extent of disease at the level of inflammation (which precedes clinical manifestations) can be quantified in every monkey in such an experiment. This concept is equally applicable to the development and testing of therapeutic vaccines for Chagas disease as it is for the development and testing of therapeutic drugs.

While the mouse model continues to be vital to pre-clinical research on Chagas disease, including research on drug and vaccine development, nonhuman primates can and should serve as the "step to man" in translating the results to humans **before** expensive (and often long-term) clinical trials are initiated and people are subjected to experimental drugs and vaccines which might have been much more quickly and less expensively proven in nonhuman primates to be lacking in efficacy.

References

1. Pecoul B., Batista C., Stobbaerts E., et al. The BENEFIT Trial: Where do we go from here? PloS Negl Trop Dis 10: e0004343, 2016.
2. Morillo C.A., Marin-Neto J.A., Avezum A., et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. New Engl J Med 373: 1295-1306, 2015.

ИММУНОГЕННОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ЖИВОЙ КОКЛЮШНОЙ ВАКЦИНЫ НА МОДЕЛИ ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАКА РЕЗУС

Медкова А.Ю.[*], Синяшина Л.Н.[*], Амичба А.А.[*], Шевцова З.В.[**], Матуа А.З.[**], Семин Е.Г.[*], Лядова И.В.[*], Цыганов Е.Н.[*], Конджария И.Г.[**], Баркая В.С.[**], Миквабиа З.Я.[**], Каратаев Г.И.[*]

[*]*ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи Министерства здравоохранения России, Москва, Россия*

[**]*НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия*

Резюме

Длительность поствакцинального иммунитета играет ключевую роль в эпидемиологии и распространении управляемых инфекций. Подъем заболеваемости коклюшем в последние десятилетия объясняется снижением коллективного иммунитета, созданного в результате использования существующих противококлюшных вакцин (цельноклеточных и бесклеточных). Нами разработана генетически аттенуированная живая коклюшная вакцина – Гам ЖКВ, высокая иммуногенность и безопасность которой ранее была доказана в экспериментах на мышах. Целью настоящего исследования было изучение иммуногенности и безопасности Гам ЖКВ на экспериментальной модели обезьян вида макака резус. Ранее нами описано моделирование коклюшной инфекции у низших обезьян, сопровождавшееся характерными клинико-лабораторными изменениями.

Интраназальная иммунизация Гам ЖКВ и инфицирование вирулентными бактериями *B.pertussis* обезьян вида макака резус приводит к формированию однотипной иммунной реакции у обезьян. Наблюдается развитие долгосрочного клеточного иммунного ответа к бактериям *B.pertussis,* скорее всего, по типу Th1/Th17, ускорение темпов эрадикации возбудителя из носоглотки обезьян, сокращение сроков его персистенции и, в конечном итоге, развитию абортивной инфекции. Защитный иммунный ответ при повторном инфицировании вирулентными бактериями *B.pertussis* макак резусов сопровождался выраженным бустерным эффектом. Полученные нами результаты указывают на общие механизмы формирования защитного иммунного ответа от возбудителя коклюша у обезьян вида макака резус после интраназальной иммунизации Гам ЖКВ и после экспериментального коклюша. Полученные данные также подтверждают безопасность вакцины Гам ЖВК для интраназального применения.

IMMUNOGENICITY AND SAFETY OF LIVE PERTUSSIS VACCINE ON A MODEL OF RHESUS MONKEY SPECIES

Medkova A.Yu., Sinyashina L.N.*, Amichba A.A.**, Shevtsova Z.V.**, Matua A.Z.**, Semin E.G.*, Ljadova I.V.*, Cygankov E.N.*, Kondzariya I.G.**, Barkaya V.S.**, Mikvabia Z.Ya.**, Karataev G.I.**

** Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow*

*** Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum*

Abstract

Duration of vaccine-induced immunity plays a key role in the epidemiology and in the pattern of transmission of a vaccine-preventable disease. In the case of whooping cough, its re-emergence has been attributed, at least partly, to the waning of immunity conferred by current pertussis vaccines. We have developed a highly attenuated live vaccine, named Gam LPV, which has been shown to be safe and to induce strong protective immunity against *Bordetella pertussis* infection in mice. In this study, we evaluated the long-term immunogenicity and protective efficacy induced by intranasal dose of Gam LPV in non-human primates – rhesus-monkeys. Earlier we have reported about experimental whooping cough in non-human primates of the Old World, which was accompanied by specific clinical and laboratory marks.

Intranasal immunization by Gam LPV and contamination by virulent *B.pertussis* bacteria of rhesus monkeys provide the same type of immune response in monkeys' organism. We observed the development of long-term cell-mediated immunity to pertussis infection, most likely, Th1 and Th17 types of immune response. Also the stepped-up pace of *B.pertussis* eradicating from primates' nasal pharynx, reduction of *B.pertussis* persistence terms and, as a result, developing of abortive infection were showed. The protective immune response against occasional challenge by virulent *B.pertussis* bacteria of rhesus monkeys was accompanied by evident booster effect. These results demonstrate total mechanisms of immune response against whooping cough in rhesus monkeys after intranasal immunization by Gam LPV and after experimental challenge by virulent *B.pertussis* bacteria. They also confirm safety of live Gam LPV vaccine for intranasal use.

ВВЕДЕНИЕ

Коклюш – антропонозное инфекционное заболевание респираторного тракта, вызываемое бактериями *Bordetella pertussis.* До появления вакцин во второй половине двадцатого века коклюш сопровождался высокой детской смертностью. Первоначальный успех от проведения специфической профилактики коклюша привел к мнению, что заболевание находится под сдерживающим контролем. Однако до сих пор во всем мире ежегодно регистрируют не менее 400 тысяч смертельных случаев связанных с коклюшем, который остается шестой по частоте причиной смертности от инфекций (1). Заболеваемость коклюшем даже в развитых странах за последние двадцать лет возросла почти в 10 раз. Иммунитет при коклюше не является пожизненным и сохраняется после перенесенного заболевания не более 10-15 лет. Эпидемиология коклюша неожиданно изменилась, особенно в странах с широким охватом детей вакцинацией. Все чаще случаи коклюша в атипичных формах наблюдаются у подростков и взрослых и во многих случаях остаются не диагностированными. Инфицированные взрослые представляют резервуар для передачи возбудителя коклюша новорожденным и неиммунным детям, составляющим основную группу риска для развития тяжелых форм коклюша (2). Это явление исследователи объясняют прогрессирующим затуханием вакцинального иммунитета. В настоящее время применяют цельноклеточные (ЦКВ) и бесклеточные (БКВ) коклюшные вакцины в составе АКДС или АаКДС соответственно, которые вводят подкожно или внутримышечно, начиная с 2-3-х месячного возраста, троекратно с последующей двукратной ревакцинацией. Изучение профилактической эффективности применяемых коклюшных вакцин показало, что ЦКВ формируют более продолжительный поствакцинальный иммунитетпо сравнению с БКВ, тем не менее, ни одна из вакцин не обеспечивает поствакцинального иммунитета, сопоставимого с постинфекционным.

Возбудитель коклюша – селективный патоген в отношении цилиарного эпителия респираторного тракта, и ни одна из современных вакцин не индуцирует иммунной реакции слизистой дыхательных путей, поскольку вводится парентеральным путем. Теоретической основой для создания более совершенных инновационных коклюшных вакцин является понимание механизмов противококлюшного иммунитета. Животные коклюшем не болеют. Тем не менее, необходимые данные о формировании иммунного ответа к отдельным факторам вирулентности бактерий *B.pertussis* получены с помощью экспериментов на лабораторных животных (5). Для купирования инфекции *B. pertussis*, по-видимому, необходим первичный иммунный

барьер непосредственно на уровне верхних дыхательных путей респираторного тракта и активация местного клеточного иммунного ответа, хотя до недавнего времени большинство исследований было сосредоточено на серологических критериях, связанных с выработкой антител (2). Изучение клеточного иммунного ответа к бактериям *B.pertussis* показало, что выздоровление от коклюша у детей связано с индукцией Т-хелперных клеток типа 1 (Th1), секретирующих гамма-интерферон (ИФНγ). Дополнительные исследования на мышах выявили, что ИФНγ участвует в процессе подавления распространения инфекции *B.pertussis* в респираторном тракте; у мышей при отсутствии этого цитокина или его рецепторов развивалась распространённая и смертельная инфекция. Эксперименты, включающие истощение популяции клеток или адаптивный перенос, убедительно доказали роль клеток типа Th1 в подавлении первичной инфекции, что наблюдали также после иммунизации ЦКВ. В отличие от этого, после иммунизации мышей БКВ наблюдается индукция клеточных реакций типа Th2, поддерживающих гуморальный иммунитет, менее эффективный, по сравнению с клеточными реакциями Th1, защищающего организм хозяина от проникновения возбудителя. Клинические исследования подтвердили эти выводы и продемонстрировали выборочную индукцию клеток Th1 у детей после вакцинации ЦКВ и выраженную реакцию клеток Th2 с активной выработкой антител у детей, вакцинированных БКВ (4).

Новая стратегия создания напряженного длительного защитного поствакцинального иммунитета от коклюша заключается в максимальной имитации природной инфекции. Живая коклюшная вакцина (ЖКВ) интраназального применения является наиболее привлекательной альтернативой современным вакцинам. Для создания ЖКВ интраназального применения в НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи были сконструированы рекомбинантные аттенуированные бактерии *B.pertussis4M*KS. Искусственно аттенуированные бактерии *B.pertussis4M*KScодержат три мутации в опероне *ptx* и нокаутную мутацию в гене *dnt*. Бактерии *B.pertussis4M*KS продуцируют коклюшный токсин (КТ) в иммуногенной нетоксичной форме (рКТ) и не проявляют активности дермонекротического токсина. Рекомбинантный рКТ в отличие от нативного КТ не обладает лейкоцитоз стимулирующей и гистамин сенсибилизирующей активностями и не вызывает эффекта кластер образования на культуре клеток СНО. Живые и разрушенные ультразвуком аттенуированные бактерии *B.pertussis4M*KS не вызывали образования некроза при внутрикожном введении мышам сосункам, кроликам и морским свинкам, гибели мышей не было и при внутрибрюшинном введении. Интраназальное введение лабораторным животным живых бактерий

*B.pertussis4M*KS обеспечивало защитный эффект, сравнимый с введением отраслевого стандартного образца корпускулярной коклюшной вакцины(3). На основе рекомбинантных аттенуированных бактерий *B.pertussis4M*KS сконструирована живая коклюшная вакцина – Гам ЖКВ интраназального применения.

Целью настоящей работы было изучение иммуногенности и безопасности живой коклюшной вакцины – Гам ЖКВ – на экспериментальной модели обезьян вида макак резус.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что обезьяны вида макаки резус являются наиболее адекватной моделью для изучения иммунобиологических свойств и защитной активности коклюшных вакцин для переноса результатов экспериментов на людей перед клиническими испытаниями (5). Особый интерес при изучении иммунобиологических характеристик вакцин представляет информация о защитной активности. Защитная активность и иммунобиологические свойства Гам ЖКВ на модели обезьян макака резус были охарактеризованы по изменению бактериальной нагрузки в носоглотке иммунизированных животных (с помощью ПЦР РВ) и титров специфических противококлюшных антител. Заражение иммунизированных ЖКВ Гам и интактных макак резусов проводили изогенными вирулентными бактериями *B.pertussis475* через 12 месяцев после ревакцинации.

Экспериментальная группа макак резусов включала 9 половозрелых особей мужского пола в возрасте 3-4-х лет, пять из них были иммунизированы Гам ЖКВ Гам в дозе 10^9 бактерий интраназально (по 0,5 мл в каждую ноздрю) и 4 обезьяны были инфицированы вирулентными бактериями *B.pertussis475* также интраназально. Через 6 месяцев после первичной вакцинации или инфицирования была проведена ревакцинация или повторное инфицирование вирулентными бактериями. После этого через 12 месяцев все обезьяны экспериментальной группы были заражены вирулентными бактериями *B.pertussis*. Контрольная группа интактных обезьян включала три особи.

Анализ крови вакцинированных обезьян, в отличие от инфицированных вирулентными бактериями, так же как и наблюдение за состоянием здоровья животных, не выявил отклонений от нормы. Отмечено некоторое снижение количества IgE в сыворотке крови вакцинированных животных. Эти результаты подтверждают безопасность препаратов Гам ЖВК, продемонстрированную нами в экспериментах с сосунками мышей и крыс.

Специфические антитела против протективных антигенов возбудителя коклюша играют значительную роль в противококлюшном иммунитете. В нашей работе, как после первичного инфицирования так и вакцинирования обезьян количество специфического IgG в сыворотке крови достигало максимума к 21-28 дням. После повторного инфицирования или ревакцинации иммунизированных Гам ЖКВ обезьян динамика нарастания титра специфического IgG резко изменялась. Количество антител быстро нарастало и достигало максимума уже к 10-14 дням. Абсолютные значения IgG у обезьян, повторно инфицированных, также как и у ревакцинированных Гам ЖКВ, были значительно выше, чем в ответ на первичную инфекцию (вакцинацию) и практически не отличались между собой. Эти результаты показали наличие выраженного бустерного эффекта при гуморальном ответе как у обезьян, перенесших экспериментальный коклюш, так и у обезьян, иммунизированных Гам ЖКВ. Зарегистрировано быстрое подавление размножения вирулентных бактерий *B.pertussis 475* и ускорение их эрадикации из носоглотки обезьян.

На следующем этапе работы была проанализирована продукция цитокинов в крови обезьян через 12 месяцев после ревакцинации Гам ЖВК, после их экспериментальной инфекции вирулентными бактериями, в сравнении с нативными животными и обезьянами после их однократной экспериментальной инфекции вирулентными бактериями. Оценку продукции цитокинов проводили методом мультиплексного анализа. Определяли уровень антиген-индуцированного ответа путем вычитания концентрации исследуемого фактора в образцах крови, культивированных без антигена и в образцах, стимулированных антигеном. У обезьян, иммунизированных Гам ЖКВ, через 12 месяцев после вакцинации отмечалась более высокая (по сравнению с контрольными животными) индуцированная продукция ИФНγ, TNF-α и GM-CSF – цитокинов, продуцируемых клетками Th1, а также более высокий уровень продукции провоспалительного цитокина ИЛ-1β, продуцируемого моноцитами и другими клетками и т ассоциированного с ответом по типу Th1.

Уровень антиген-индуцированной продукции цитокинов у обезьян иммунизированных Гам ЖКВ и нативных животных определяли на 3, 7, 14 и 28 дни после экспериментальной инфекции вирулентными бактериями *B.pertussis*475. Наиболее достоверные отличия в содержании ИЛ-1β между иммунизированными и не иммунизированными обезьянами были выявлены на 3-7-й дни после инфицирования *B.pertussis 475*. Кроме того, у иммунизированных обезьян было выявлено достоверное увеличение содержания цитокинов, ассоциированных с нейтрофильным ответом –

увеличение содержания G-CSF, фактора, стимулирующего дифференцировку гранулоцитов, и ИЛ-8 – хемокина, стимулирующего миграцию нейтрофилов (хемокин CXCL8). Эти результаты косвенно указывают на формирование ответа по типу Th17 на вакцинацию ЖКВ. Анализ уровня продукции цитокина IL-17 также ассоциированного с ответом нейтрофилов, провести не удалось в связи с невысокой чувствительностью и невозможностью его определения с помощью Milliplex MAP nonhuman primate kit (Millipore). Интересно отметить, что разница в значениях индуцированных концентраций почти всех цитокинов у не иммунизированных и иммунизированных Гам ЖКВ обезьян была выявлена уже на 3-й день после инфицирования. Максимальная разница была отмечена в значениях концентраций ИФНγ и ИЛ-1β. Полученные результаты можно рассматривать как результат формирования иммунного ответа по типу Th1/Th17 и иммунологической памяти у макак резусов после иммунизации Гам ЖКВ в течение срока наблюдения (12 месяцев).

Уровень антиген-индуцированной продукции цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ассоциированных с иммунным ответом по типу Th2, достоверно не отличался у иммунизированных Гам ЖКВ и интактных животных после их экспериментальной инфекции вирулентными бактериями. Однако содержание ИЛ-13 в культурах крови иммунизированных Гам ЖКВ животных было достоверно выше, чем у интактных. Содержание ИЛ-6, провоспалительного цитокина, продуцируемого моноцитами и другими клетками, но в отличие от ИЛ-1β, ассоциированного с ответом по типу Th2, у иммунизированных Гам ЖКВ обезьян было достоверно ниже, чем у интактных. Интересно, что, несмотря на отсутствие достоверных различий в значениях концентраций цитокинов, продуцируемых клетками Th2, у иммунизированных Гам ЖКВ и у экспериментально инфицированных вирулентными бактериями *B.pertussis* макак резусов, две из пяти иммунизированных обезьяны, сохранили диагностический значимый уровень специфических противококлюшных антител IgG даже через 12 месяцев.

По сравнению с не иммунизированными обезьянами, у иммунизированных Гам ЖКВ обезьян после экспериментального инфицирования вирулентными бактериями *B.pertussis475* наблюдали сниженную индукцию ИЛ-6 и более высокую продукцию ИЛ-1β. Оба цитокина являются провоспалительными и продуцируются моноцитами и другими клетками в ответ на активацию паттерн-распознающих рецепторов. Различия в их продукции так же могут отражать сдвиг иммунного ответа в сторону Th1. Однако механизмы, обусловливающие такой сдвиг, пока остаются непонятными. Подытоживая данные об уровнях продукции

цитокинов, ассоциированных с ответом по типу Th1 и Th2, можно сделать предположение о суммарном превалировании ответа по типу Th1 над ответом по типу Th2 у вакцинированных животных

При изучении уровня индуцированной продукции хемокинов Mip-1α (хемоаттрактант нейтрофилов и Т-лимфоцитов), MIP-1β (хемоаттрактант моноцитов и Т-лимфоцитов, преимущественно – наивных) не было выявлено достоверных различий у иммунизированных Гам ЖКВ и интактных обезьян. Отмечено достоверное увеличение содержания MCP-1 (хемокин CCL2, хемоаттрактант моноцитов и других клеток) и снижение продукции ИЛ-1ra – антагониста рецептора ИЛ-1r и отсутствие значимых различий в продукции иммунорегуляторного цитокина TGF-β.

При культивировании мононуклеаров крови (МНК) in vitro абсолютное количество продуцируемых цитокинов было выше, но качественная картина соответствовала описанной для препаратов крови. Американские исследователи при экспериментальном инфицировании павианов анубис, иммунизированных ЦКВ также зарегистрировали рост ИФНγ, ИЛ-1β и ИЛ-23 и, в отличие от наших экспериментов, увеличение количества ИЛ-6 (6) .

Помимо оценки продукции цитокинов, методом проточной цитометрии, нами проведено определение популяций лимфоцитов CD4+, CD4+CD45RA-, CD8+, CD8+CD45RA+ и моноцитов CD8- CD14+, а также популяции лимфоцитов продуцирующих внутриклеточные цитокины TNF-a: CD4+CD45RA+, CD4+CD45RA-, CD4+, CD8+, CD8+CD45RA+, CD8+CD45RA-. Не было зарегистрировано значимых различий в популяционном составе клеток крови вакцинированных и контрольных обезьян. Эти результаты согласуются с полученным нами ранее на этапе выбора экспериментальной модели коклюша у обезьян для характеристики популяций Т и В клеток (5). У обезьян инфицированных вирулентными бактериями *B.pertussis* было выявлено некоторое изменение количества естественных киллеров (клеток CD16+) с 3-го по 7-ой дни (от 20 до 26%). На протяжении всего периода наблюдения (30 дней) не было отмечено выраженной направленности к изменению количественного содержания Т-клеток и их субпопуляций. Процент Т-лимфоцитов $CD3^+$варьировал от 45 до 51; $CD4^+$Т-хелперов - от 25 до 29, $CD8^+$Т-цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) - от 19 до 23%. В то же время количество В-лимфоцитов $CD19^+$ умеренно увеличивалось к 7-14-ому дням в среднем от 22 до 27 и сохранялось на этом уровне до конца срока наблюдения.

Таким образом, на модели коклюшной инфекции у обезьян вида макака резус, показано, что интраназальная иммунизация Гам ЖКВ и инфицирование вирулентными бактериями *B.pertussis* приводит к

формированию однотипной иммунной реакции в ответ на проникновение возбудителя коклюша в макроорганизм. Наблюдается развитие долгосрочного клеточного иммунного ответа к бактериям *B.pertussis,* скорее всего, по типу Th1/Th17, ускорение темпов эрадикации возбудителя из носоглотки обезьян, сокращение сроков его персистенции и в конечном итоге развитию абортивной инфекции. Защитный иммунный ответ при повторном инфицировании вирулентными бактериями *B.pertussis* обеих экспериментальных групп обезьян сопровождался выраженным бустерным эффектом. Полученные нами результаты указывают на общие механизмы формирования защитного иммунного ответа от возбудителя коклюша у обезьян вида макака резус после интраназальной иммунизации Гам ЖКВ и после экспериментального коклюша. Получены данные, подтверждающие безопасность вакцины Гам ЖВК интраназального применения.

Список литературы

1. World Health Organization [WHO] (2004). The world health repot 2004 – Changing history. Geneva: WHO.
2. Hallander, H. et al.J.Clinic. Microbiol. 45 (10), 3257 – 3262, 2007.
3. СиняшинаЛ.Н., СиняшинаЛ.С., СеминЕ.Г., АмелинаИ.П., КаратаевГ.И., Мол.генетика, микробиология и вирусология, 2010, 3, 31-36.
4. Mascart, F. et al. J.Immunol. 170, 1504 - 1509, 2003.
5. КубравaД.Т., МедковаА.Ю., СиняшинаЛ.Н. идр. // ВестникРАМН.2013. № 8. С. 4-8.
6. Warfel J.M. et al. Infect. Immun. 2012, 80, 4, 1530 – 153.

ИНСЕРЦИОННАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ОПЕРОНА ВИРУЛЕНТНОСТИ В ПОПУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОКЛЮША ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИМАТОВ

Г. И. Каратаев[*1], , Л. Н Синяшина[1], А. Ю. Медкова[1], Е.Г. Сёмин[1], З.В. Шевцова[2], А.З. Матуа[2], И.Г. Конджария[2], А.А. Амичба[2], Д.Т. Кубрава[2], З.Я. Миквабиа [2]*

[1]Федеральное Государственное Бюджетное учреждение научно – исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098, e.mail: info@gamaleya.org

[2]Научно исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Академии Наук Абхазии, Абхазия, Сухум, e.mail: niiepit@rambler.ru

Резюме

На фоне массовой вакцинации против коклюша, наблюдается рост заболеваемости во многих странах мира. Изменилась эпидемиология коклюша, чаще болеют подростки и взрослые. Установлено бессимптомное носительство возбудителя у «практически здоровых» людей. При обследовании больных коклюшем и бактерионосителей выявлены авирулентные бактерии *B.pertussi*s, содержащие IS-элементы в опероне *bvgAS.* Показана персистенция возбудителя коклюша и накопление авирулентных инсерционных мутантов в легких лабораторных мышей после интаразального заражения.

Настоящая работа посвящена изучению динамики накопления и механизмов образования персистирующих форм бактерий *B.pertussis* у низших обезьян, как наиболее адекватной модели для экстраполяции результатов эксперимента на человека. С помощью метода ПЦР РВ установлено, что после однократного интраназального инфицирования обезьян бактерии *B.pertussi*s переживали в верхних дыхательных путях более трёх месяцев. Зарегистрировано увеличение доли Bvg^- мутантов *B.pertussis* в популяции до десятков процентов от общего числа регистрируемых бактерий. Получено экспериментальное подтверждение формирования и накопления авирулентных Bvg мутантов *B.pertussis* при развитии инфекционного процесса. Дальнейшее изучение состава популяции персистирующих бактерий *B.pertussis* на разных стадиях заболевания позволит сформулировать новые подходы для диагностики и профилактики коклюша и создания принципиально новых лекарственных препаратов.

INSERTIONAL INACTIVATION OF BVG VIRULENT OPERON IN PERSISTENCE BACTERIA POPULATION IN NON – HUMAN PRIMATES EXPERIMENTAL INFECTION

G. I. Karataev[1], L. N. Sinyashina[1], A. Yu. Medkova[1], E. G. Semin[1], Z. V. Shevtsova[2], A. Z. Matua[2], I. G. Kondzariya[2], A. A. Amichba[2], D. T. Kubrava[2], Z. Ya. Mikvabia[2]*

[1] Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of the Russian Federation

[2] Research Institute of Experimental Pathology and Therapy, Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum

Abstract

Despite mass immunization against whooping cough conducted worldwide the incidence rate of pertussis is observed. The epidemiology of pertussis has changed: whooping cough is spread now in adolescents and adults. Carrier state of *B. pertussis* in apparently healthy people is established. During examination of patients with whooping cough and *B. pertussis* bacteria carriers avirulent *B.pertussis* bacteria containing integration of IS-elements (inserted sequences) *to bvg AS* virulence operon were detected. The persistence of *B. pertussis* bacteria and accumulation of avirulent inserted mutants of *B. pertussis* in mice lungs after intranasal challenge is revealed.

The present study is devoted to investigation of accumulation dynamics and mechanisms of persistent forms of *B. pertussis* bacteria formation in non-human primates of the Old World, as more adequate model for extrapolation of experiment results on human being. After single intranasal challenge of primates by *B. pertussis* strains the persistence of microbes in upper respiratory airways was registered by real-time PCR during three months. The percentage of avirulent inserted Bvg^- mutants of *B. pertussis* increased in bacterial population, and gradually amounted tens of percent of total number of bacteria detected. It is experimentally proved that formation and accumulation of avirulent inserted mutants of *B. pertussis* take place during infection evolvement. Follow-up studies of persistent *B. pertussis* composition on different stages of whooping cough would allow us to find new strategies for diagnostics, preventive measures and development of principally new medicines for pertussis.

List of acronyms: RT-PCR – real-time PCR, CCA – casein-charcoal agar, GE – genome equivalent, PBS – phosphate buffered saline

---

Коклюш – респираторное инфекционное антропонозное заболевание, вызываемое грамнегативными бактериями *B.pertussis,* характеризующееся приступообразным судорожным кашлем и высокой летальностью у детей раннего возраста. Ежегодно в мире регистрируется до 50 миллионов случаев заболевания коклюшем, из которых около 300 000 заканчиваются летальным исходом [1]. В последние годы отмечается значительный рост числа лабораторно подтвержденных случаев коклюша среди подростков и взрослых. Взрослые и подростки, в том числе, и «практически здоровые», являются резервуаром возбудителя коклюша и источником инфекции для детей младшего возраста и не иммунных детей старшего возраста [2]. До 85% младенцев заражаются от членов семьи – часто от бессимптомных носителей инфекции. Длительное носительство возбудителя коклюша распространено и после клинического выздоровления. Эпидемиологические наблюдения

подтверждают актуальность вопроса о роли «практически здоровых» бактерионосителей в распространении инфекции.

В ранее опубликованных работах нами показано, что у больных типичными формами коклюша на ранней стадии заболевания бактерии *B.pertussis* содержат нативный ген вирулентности, тогда как у бактерионосителей значительная часть популяции несёт инсерцию IS-элемента в специфическом сайте оперона вирулентности *bvg AS* [3,4]. Прямые доказательства накопления инсерционных мутантов в организме могут быть получены при молекулярном анализе популяций бактерий *B. pertussis* при экспериментальной инфекции лабораторных животных. Наиболее близкой к человеку экспериментальной моделью являются обезьяны. Воспроизведение ряда признаков коклюша у низших приматов наблюдали у тайваньских макак, макак резус, павианов анубис, павианах гамадрила при экспериментальном заражении вирулентными бактериями *B. pertussis* [5-7]. Описана вспышка спонтанного коклюша у шимпанзе в открытом зоологическом парке в Швеции [8].

Целью настоящего исследования было изучение формирования и динамики накопления инсерционных Bvg^- мутантов в популяции бактерий при экспериментальном коклюше у низших обезьян.

Для работы использовали обезьян макак резус, макак японский, макак яванский, павиан гамадрила в возрасте 3 - 6 лет. Исследования проводили на базе Сухумского питомника НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии наук Республики Абхазия.

Материал для выявления колонизации верхних дыхательных путей обезьян бактериями *B.pertussis* получали с задней стенки глотки с помощью назофарингеальных тампонов. Подготовку материала для микробиологического исследования и выделения ДНК проводили в соответствии с описанными ранее процедурами. Для выявления ДНК *B. pertussis* в образцах и определения фазового состава популяции *B.pertussis* использована разработанная нами тест-система ПЦР в реальном времени (ПЦР РВ) и нестед-ПЦР [3,4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Бактерии возбудителя коклюша могут находиться в разных фазовых состояниях, крайними из которых являются вирулентная фаза (Bvg^+, I фаза) и авирулентная (Bvg^- , IV фаза). Вирулентные бактерии характеризуются наличием функционирующего оперона *bvg AS,* кодирующего регуляторы транскрипции генов вирулентности возбудителя. Переход бактерий из фазы I в фазу IV происходит в результате нарушения транскрипции оперона *bvg AS,*

наблюдающегося при изменении условий культивирования бактерий (фазовые модуляции) или нарушении структуры оперона вирулентности. До недавнего времени был описан только один тип структурных нарушений оперона *bvgAS* - точечные мутации. В наших исследованиях, показана возможность перемещения IS-элементов (IS481 и IS1002) в специфический сайт оперона *bvg AS* хромосомы *B. pertussis* в экспериментах *in vitro*[9]. Бактерии возбудителя, содержащие инсерцию IS-элемента в опероне *bvg AS,* не способны синтезировать факторы вирулентности и находятся в авирулентном, непатогенном для человека состоянии.

Для инфицирования обезьян использовали вирулентные бактерии *B.pertussis* 18323, 475 и аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4M изогенные бактериям *B. pertussis* 475. Штамм *B. pertussis* 475 входит в состав изготовляемой в России цельноклеточной убитой коклюшной вакцины, бактерии *B.pertussis* 18323, используется для контроля защитной активности коклюшных вакцин. Аттенуированные бактерии *B. pertussis* 4M в настоящее время проходят доклинические исследования в качестве живой вакцины для профилактики коклюша. Динамика снижения бактериальной нагрузки и изменения фазового состава популяции бактерий при экспериментальной инфекции макак резусов, павианов гамадрила, макак яванских и макак японских качественно не отличалась у разных видов обезьян. Поэтому, в настоящей работе обсуждаются только результаты изучения персистенции бактерий *B.pertussis* при экспериментальном коклюше у макак резусов.

В каждой точке наблюдения (через 3-10 дней), определяли количество геном эквивалентов ДНК и фазовый состав популяции бактерий *B.pertussis* в носоглотке обезьян. В препаратах, выделенных из смывов с назофарингеальных тампонов через час после введения животным бактериальной суспензии, было обнаружено от $10^4 – 10^5$ ГЭ *B.pertussis* в 5 мкл образца. Интеграции IS481 в оперон *bvg AS*, определённые с помощью ПЦР РВ, не превышали нескольких копий или не регистрировались совсем. Таким образом, сразу после экспериментального инфицирования, так же как и культивирования *in vitro,* популяция бактерий содержит не более 10^{-5} - 10^{-4} инсерционных Bvg^- мутантов.

Число регистрируемых ГЭ *B. pertussis* снижается к 28 дню до десятков или единиц при первичном инфицировании животных и единичных копий или не регистрируется совсем при повторной инфекции. В ряде случаев ГЭ удавалось регистрировать до 3-х месяцев. Чувствительность определения событий интеграции с помощью разработанной нами тест-системы, не превышает нескольких копий в 5 мкл образца [3,4]. Таким образом, измерение значений n_{481} [3,4] с приемлемой ошибкой, методом ПЦР РВ,

возможно только в течение первых двух – трёх недель. Для регистрации событий интеграции в образцах, содержащих одну или менее копий искомой мишени, нами использован метод нестед - ПЦР.

Нестед ПЦР проводили с использованием двух последовательных реакций амплификации с праймерами S_F - Bp2 и S_{2F} - Bp111. Праймеры второй пары расположены внутри последовательности, фланкированной праймерами S_F - Bp2, по обе стороны от сайта CCTAGG - предполагаемой интеграции IS481 в оперон *bvg AS* (рис. 1). Продукт второй ПЦР идентифицировали с помощью электрофореза. Использование нестед -ПЦР позволило зарегистрировать положительный сигнал амплификации в препарате, содержащем 1 копию генома контрольной плазмиды pK481[3,4] в 5 мкл образца и 10^5 копий ДНК *B. pertussis* 475, выращенных *in vitro*.

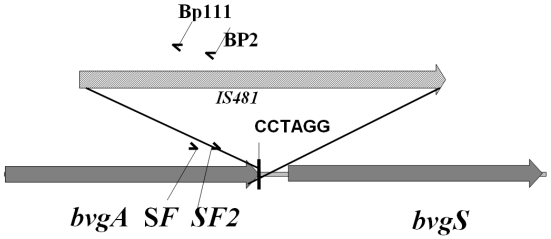


Рис 1. Структура фрагмента хромосомы *B.pertussis*, содержащего инсерцию IS481 в CCTAGG сайт оперона *bvgAS*

Заштрихованные прямоугольные стрелки показывают положение интегрированного элемента IS481 в CCTAGG сайт оперона *bvgAS B.pertussis* (обозначен залитыми прямоугольными стрелками). Маленькими угловыми стрелками обозначено положение праймеров.

В таблице 1 представлены результаты определения значений n_{481} в популяциях бактерий *B.pertussis,* обнаруженных в смывах с назофарингеальных тампонов, в динамике развития экспериментальной инфекции обезьян. Из таблицы видно, что с течением времени наблюдается увеличение доли инсерционных мутантов в популяции бактерий *B.pertussis,* переживающих в носоглотке обезьян. Результаты определения числа инсерционных мутантов у изогенных аттенуированных и вирулентных бактерий *B. pertussis* 4М и 475 практически не отличались и объединены в одну графу.

Таблица 1

Динамика накопления инсерционных мутантов в популяции бактерий *B.pertussis* в носоглотке обезьян макак резус

Штамм	инфицирование	n_{481} /день					
		1*	7	10	14	28 - 35**	65 - 95**
475, 4М	первое	10^{-5} - 10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	н.о.	+(3 из 9)
	повторное	10^{-5} -10^{-4}	Н.о.	10^{-2}	10^{-2}	+(5 из 9)	+(6 из 9)
18323	первое	10^{-4}- 10^{-3}	~ 10^{-2}	~10^{-2}	(1-5)x10^{-1}	+(4 из 4)	+(4 из 4)
	повторное	10^{-5} - 10^{-3}	~10^{-2}	н.о	+(5 из 7)**	+(5 из 7)	+(4 из 7)

*измерения проведены через 1 час после интраназального введения бактерий экспериментальным животным;** приведены положительные результаты анализа популяции с помощью нестед – ПЦР. В скобках указано количество животных из общего числа обезьян в эксперименте, у которых интеграция зарегистрирована в нестед – ПЦР; n_{481}- относительное количество бактерий, содержащих инсерцию IS481 в оперон *bvg AS*

При первом инфицировании животных бактериями *B.pertussis* 4М и 475 интеграции зарегистрировали с помощью нестед- ПЦР на 65 день у трёх обезьян; при повторном инфицировании, $n_{481} \geq 10^{-2}$ в популяции бактерий выявляли уже на 10 день. При инфицировании обезьян бактериями *B.pertussis* 18323 $n_{481} \geq 10^{-2}$ зарегистрировали на 7 день при первом и втором заражениях. В доказательство того, что регистрируемые нами продукты ПЦР действительно представляют собой структуры, сформированные в результате интеграции IS – элементов в CCTAGG сайт оперона *bvgAS,* проведено секвенированиие продуктов второй ПЦР трёх образцов. Определение последовательности фрагментов показало идентичность продуктов амплификации друг другу и ожидаемой последовательности, сформированной в результате интеграции IS481 в CCTAGG сайт оперона *bvg AS B.pertussis* [9,10].

При изучении динамики накопления инсерционных мутантов *B. pertussis* в легких лабораторных мышей нами были получены схожие данные. Относительное число авирулентных бактерий *B.pertussis* значительно нарастало, начиная с 7 дня после заражения мышей, и достигало 50% от общего объёма популяции к концу срока наблюдения [10].

Результаты, полученные на двух экспериментальных моделях, согласуются с единичными наблюдениями, которые удалось провести при диагностике коклюша на разных стадиях заболевания у людей [3,4], а также с результатами изучения инсерционных мутантов в процессе развития коклюша у детей и взрослых, полученных нами совместно с сотрудниками ФГБУ НИИДИ ФМБА России (не опубликованы). Они подтверждают предположение о накоплении авирулентных мутантов, формирующихся в

результате специфического перемещения IS-элементов в CCTAGG сайт оперона *bvg AS* у персистирующих бактерий *B.pertussis*.

Анализ последовательностей хромосом разных штаммов *B. pertussis* показывает, что последовательности CCTAGG присутствуют не только в опероне *bvg AS,* но и распределены по всему геному, в том числе обнаруживаются во многих генах вирулентности и представляют собой потенциальные сайты для перемещения IS-элементов. Следовательно, эти гены также являются потенциальными мишенями для IS – индуцированной инактивации, закрепление которой может быть выгодно для выживания бактерий или для их сохранения в условиях внешней среды. Бактерии, содержащие инсерцию IS481 в гене *prn*, кодирующем пертактин - один из адгезинов возбудителя коклюша, были выявлены среди 753 изолятов *B. pertussis*, выделенных в США после начала использования бесклеточных коклюшных вакцин [11]. Их появление так же, как и появление возбудителей коклюша, обладающих другими «новыми» генотипами, многие исследователи связывают с применением бесклеточных коклюшных вакцин.

Полученные результаты подтверждают значение IS-элементов в эволюции бактерий рода *Bordetella,* формировании генома *B.pertussis* из большего по размеру генома *B. bronchiseptica,* образовании новых генотипов *B.pertussis.* Последние формируются, скорее всего, под влиянием изменившейся среды обитания в условиях массового применения вакцин. Перемещение IS-элементов по хромосоме *B.pertussis* способствует образованию псевдогенов, увеличивает экспрессию других генов и может привести к изменению вирулентности у части популяции возбудителя. Бактерии с изменённой (сниженной) вирулентностью могут оказаться более приспособленными к длительной персистенции в организме хозяина. Применение некоторых лекарственных препаратов и вакцин (например, бесклеточных вакцин) может привести не к элиминации, а к персистенции и распространению возбудителя «практически здоровыми» бактерионосителями.

Если предлагаемая схема верна, то эффективность профилактики коклюша будет зависеть от возможности предотвращения персистенции возбудителя. Одним из подходов к решению этой задачи может быть создание специфических препаратов для подавления активности транспозазы IS-элементов *B. pertussis.* Решением подобных задач широко занимается современная фармацевтическая наука.

Таким образом, нами установлено, что бактерии *B.pertussis* персистировали в верхних дыхательных путях экспериментально инфицированных обезьян более трёх месяцев. Скорость элиминации

бактерий значительно выше при повторном инфицировании животных. В носоглотке обезьян в первые часы после инфицирования подавляющее большинство бактерий *B.pertussis* независимо от штамма находились в вирулентном состоянии с нативной структурой оперона *bvg AS.* В процессе развития инфекции, особенно после повторного инфицирования, гетерогенность популяции бактерий *B.pertussis* возрастает за счет увеличения доли авирулентных мутантов, несущих инсерцию IS481 в опероне *bvg AS.*

Выявление возбудителя коклюша у «практически здоровых» людей, регистрация ДНК *B. pertussis* в носоглотке реконвалесцентов и у экспериментально инфицированных животных в течение двух и более месяцев подтверждают возможность длительной персистенции бактерий *B.pertussis* в организме человека. Снижение вирулентности возбудителя в результате инсерционной инактивации одного или нескольких генов вирулентности, вероятно, обеспечивает длительное переживание и формирование «практически здоровых» носителей инфекции. Дальнейшие исследования механизмов формирования персистирующих бактерий, изучение факторов, влияющих на частоту транспозиции IS-элементов, наблюдение за «практически здоровыми» детьми и взрослыми, находящимися в контакте с больными, помогут сформулировать новые подходы к профилактике коклюша и приведут к созданию принципиально новых лекарственных препаратов, предотвращающих возможность развития персистенции возбудителя коклюша.

Список литературы

1. *Mattoo S., Cherry J.D.* // Clin. Microbiol. Rev. 2005. V. 18. № 2. P. 326-382
2. *Wiley K.E., Zuo Y., Macartney K.K., Mc Intyre .P.B.* // Vaccine.2013. V. 31. №4. P. 618-625.
3. *Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н.* и др. // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 2010. № 4. С. 9-13.
4. *Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н.* и др. // Детские инфекции. 2010. № 4. С. 19-22.
5. *Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н. и др.* // Вестник РАМН.2013. № 8. С. 4-8
6. *Elahi S., Holmstrom J., Gerdts V.* // Trends. Microbiol.2007. V. 15. № 10. P. 462-468.
7. *Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K. et al.* // Infect. Immun.2012. V. 80. № 4. P. 1530-1536.
8. *Gustavsson O.E., Röken B.O., Serrander R.* // Folia Primatol (Basel).1990. V. 55. № 1. P. 45-50.

9. *Синяшина Л.Н., Воронцов В.В, Сёмин Е.Г.,* и др. // Генетика. 2005. Т 41. № 12. С. 1608-1616.
10. *Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н., Румянцева Ю.П., и др*. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.2013. № 4. С. 22-25
11. *Pawloski L.C., Queenan A.M., Cassiday P.K et al.* // Clin.Vaccine Immunol. 2014. V. 21. № 2. P. 119–125

О СПОНТАННОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ КОКЛЮША ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ

Матуа А.З.[*], Шевцова З.В.,[*] Амичба А.А.[*], Кубрава Д.Т., Конджария И.Г.*, Медкова А.Ю.**, Семин Е.Г**, Синяшина Л.Н.**, Баркая В.С.*, Миквабия З.Я.*, Каратаев Г.И.***

** НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии Наук Абхазии, Сухум, Абхазия*

[**]ФГБУ«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия.

Резюме

В связи с отсутствием адекватной экспериментальной модели многие важные вопросы пато- и иммуногенеза при коклюше остаются неизученными. Ранее нами на половозрелых обезьянах Старого Света был воспроизведён экспериментальный коклюш с развитием ряда клинико-лабораторных признаков без пароксизмального кашля. Следующий эксперимент было запланировано провести на неполовозрелых павианах гамадрилах. При исследовании сывороток 3х отобранных в опыт внешне здоровых обезьян (возраст 7-9 месяцев) были выявлены специфические противококлюшные антитела. Целью данной работы было обследование серопозитивных павианов гамадрилов на наличие лабораторных признаков коклюша и выявление источника инфекции. Помимо антител у этих павианов в слизистой носоглотки было обнаружено в небольшом количестве ДНК возбудителя коклюша. При обследовании обезьян, содержащихся с этими павианами в одних клетках (15 особей разного пола и возраста) в их сыворотках были выявлены противококлюшные антитела класса IgG, а у некоторых и IgM. У рабочей обслуживающей этих обезьян, противококлюшные антитела IgG были в высоких концентрациях, а в носоглоточных смывах обнаружены единичные геном-эквиваленты ДНК B.pertussis.

Проведенный анализ позволил придти к выводу, что источником инфекции была рабочая по уходу за обезьянами и что контакт ее с возбудителем инфекции произошел примерно 1,5-2 месяца до нашего эксперимента. Проведенное экспериментальное заражение 3х серопозитивных неполовозрелых павианов гамадрилов выявило, что у них после перенесенной спонтанной инфекции сформировался иммунитет. Это выражалось в отсутствии характерных клинико-лабораторных признаков, которые мы наблюдали при экспериментальном заражении контрольных серонегативных павианов. При этом ДНК бактерии в носоглоточных смывах обнаруживались в меньших количествах и полное освобождение от них происходило намного быстрее. Следует подчеркнуть, что наблюдался и бустерный эффект – более высокие концентрации антител и в более ранние сроки по сравнению с наблюдавшимися при первичном экспериментальном заражении контрольных животных. Таким образом, нами впервые обнаружена естественная чувствительность к возбудителю коклюша одного из видов низших обезьян Старого Света – павианов гамадрилов. Описан очаг спонтанного коклюша возникшего при передаче инфекции от человека к обезьянам.

ON SPONTANEOUS INFECTION OF HAMADRYAS BABOONS WITH BORDETELLA PERTUSSIS

Matua A.Z.[*], Shevtsova Z.V.[*], Amichba A.A.[*], Kubrava D.T., Kondzariya I.G.*, Medkova A.Yu.**, Semin E.G.**, Sinyashina L.N.**, Barkaya V.S.*, Mikvabia Z.Ya.*, Karataev G.I.***

[*] Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia

[**] FSBI «N.F. Gamaleya Federal Scientific Research Center for Epidemiology and Microbiology» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia.

Abstract

Because of the absence of the adequate experimental model, many important questions of patho- and immugenesis of pertussis are still unstudied. Earlier we reproduced experimental pertussis in sexually mature the Old World monkeys. The progress of disease included a number of clinico-laboratory signs except paroxysmal cough. The next experiment was performed at sexually immature hamadryas baboons. Specific anti-pertussis antibodies were found in serum of 3

seemingly healthy monkeys (7-9 month aged) selected for the experiment. The goal of this work was the examination of seropositive hamadryas baboons for the presence of clinic-laboratory signs of pertussis and revelation of the infection source. In nasopharyngeal mucosa of these baboons, B.pertussis DNA was found in low quantity, as well as antibodies. Examination of monkeys housed with these baboons in same cages (15 animals of various gender and age) revealed in their blood serum anti-pertussis antibodies IgG, and sometimes IgM. Anti-pertussis IgG antibodies in higher concentrations and single genome-equivalents of B.pertussis DNA were found in nasopharyngeal swabs of the keeper of these monkeys.

The performed analysis showed that the infection source was the animal keeper, and that her contact with infectious agent occurred approximately 1.5-2 months before our experiment. The carried out experimental infection of 3 seronegative sexually immature hamadryas baboons revealed their immunity arisen after spontaneous infection. There were no clinico-laboratory signs usually observed at experimental infection of control seronegative baboons. At that, in nasopharyngeal swabs bacterial DNA was found in lower quantities and its full disappearance occurred much faster. It should be emphasized that the booster response was observed –higher concentrations of antibodies appeared earlier compared to the primary experimental infection of control animals. Thus, for the first time the natural sensitivity of one of species of the Old World monkeys to pertussis – hamadryas baboons – was found by us. The focus of spontaneous pertussis resulting from the human-to-monkey disease transmission is described.

Введение

Коклюш – антропонозное заболевание, вызываемое грамотрицательными бактериями *Bordetella pertussis.* Ранее описанные типичные формы коклюша с пароксизмальным кашлем встречаются все реже. Атипичные формы протекают без характерных для этого заболевания симптомов. Сведения о роли бессимптомных носителей ограничены. Остаются неизученными важные вопросы пато- и иммуногенеза, что объясняется отсутствием адекватной коклюшу человека экспериментальной модели. Животные коклюшем не болеют, попытки их использования для моделирования коклюша успехом не увенчались [1]. Воспроизведение характерных признаков заболевания наблюдали у тайваньских макак и мармозет [2], однако эти виды обезьян недоступны для экспериментов. Чувствительны к возбудителю коклюша человекообразные обезьяны (шимпанзе и гориллы), у которых заболевание протекало в типичной для человека форме во время спонтанной вспышки этой инфекции в зоопарке Швеции [3]. Сведения о естественной инфицированности низших обезьян в

литературе нами не были найдены. Продолжаются исследования по моделированию коклюша на низших обезьянах Старого Света. На половозрелых макаках и павианах были воспроизведены характерные клинико-лабораторные признаки без пароксизмального кашля [4]. На неполовозрелых павианах анубисах наблюдался и пароксизмальный кашель [5]. В связи с этим, нами был запланирован эксперимент на неполовозрелых павианах гамадрилах. При исследовании сывороток выделенных в опыт 3 обезьян, были обнаружены специфические противококлюшные антитела класса IgG, что свидетельствовало об их контакте с возбудителем коклюша.

Целью работы являлось обследование неполовозрелых серопозитивных павианов гамадрилов и контактировавших с ними обезьян разного пола и возраста на наличие клинико-лабораторных признаков коклюша. В задачи входило выяснение источника их инфицирования.

Материалы и методы

Было обследовано 18 павианов гамадрилов в возрасте от 7 месяцев до 18 лет. Особи проживали в 2х соседних вольерных клетках. В каждой клетке сидели павианы из двух разных семей. Также было проведено обследование и сбор анамнеза у рабочих по уходу за животными. *Материал для выявления колонизации* бактериями *B.pertussis* носоглотки получали с задней стенки глотки с помощью назофарингеальных тампонов. *Для выделения ДНК* смывы с назофарингеальных тампонов центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин (центрифуга «Eppendorf», Германия), осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора фосфатного буфера. Суспензию обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей сорбцией ДНК на магнитном сорбенте фирмы «Promega» США [6]. Выявление ДНК бактерий *B.pertussis* проводили методом ПЦР РВ с помощью разработанной в Гамалеи тест-системы [6]. *Общий анализ крови и содержание глюкозы* определяли на анализаторах – ParticleCounterModel PCE -21 и BiochemSA (Германия). *Специфические антитела* IgG и IgM к коклюшному токсину (КТ) и филаментозному гемагглютинину (ФГА) определяли в реакции ИФА с помощью набора Ridascreen (Германия). Для общей анестезии обезьян применяли Золетил 50/100 в концентрации 10 мг/мл. Каждому животному проводили премедикацию ксилазингидрохлоридом дозе 20 мг/мл и вводили 0,03-0,04 мл золетила. Павианам интратрахеально вводили вирулентные бактерии *B.pertussis* 475 в количестве 10^9 в 1 мл раствора фосфатного буфера (pH7,0-7,2). *Наблюдение за* обезьянами проводили с помощью видеорегистратора Datakam (Тайвань) и Вэб-камеры круглосуточно. *Статистическую обработку результатов* проводили с использованием программы

MicrosoftExcel 2007 и методов статистического анализа, принятых в биологии и медицине [7].

Результаты

При обследовании 3 неполовозрелых павианов гамадрилов (7- 9 месяцев) в сыворотке которых были выявлении специфические противококлюшные антитела класса IgG, в смывах носоглотки были обнаружены ДНК бактерии *B. pertussis* в незначительном количестве (2-3 ГЭ). При этом у них не было выявлено других характерных для коклюшной инфекции клинико-лабораторных признаков: катаральных явлений в верхних дыхательных путях и образования мокроты, повышение температура тела, пароксизмального кашля, лейкоцитоза и гипогликемии.

Для выяснения источника инфекции нами были обследованы сотрудники питомника находившиеся в контакте с обезьянами и 15 особей разного пола и возраста (с 7 месяцев до 18 лет) содержащихся в соседних клетках, в которых размещались оказавшиеся серопозитивными 3 неполовозрелых павиана. Обезьяны находились в состоянии соматического здоровья, у всех были выявлены специфические антитела к возбудителю коклюша класса IgG или IgM, у некоторых и IgG и IgM в разных концентрациях. Максимальное количество иммуноглобулинов класса IgG было выявлено у матери 9 месячного серопозитивного неполовозрелого павиана гамадрила, а класса IgM у 2 обезьян в возрасте 4 и 16 лет. Следует отметить, что при обследовании половозрелых павианов гамадрилов пересаженных из этих же клеток за 6 месяцев до нашего эксперимента не было выявлено ни одного из признаков коклюшной инфекции, что указывает на то, что контакт с возбудителем 3 серопозитивных обезьян произошел после этого. Перед обследованием рабочих за уходом обезьян, был собран анамнез, так на протяжении двух предшествующих месяцев респираторных инфекций, длительного кашля и контактов с больными коклюшем у них не было. При этом у одной из рабочих в носоглоточных смывах была обнаружена ДНК *B.pertussis,* а в ее сыворотке –высокая концентрация противококлюшных антитела класса IgG при отсутствии иммуноглобулинов класса IgM. Это позволяет предположить, что она и была источником инфекции для обезьян, а далее инфекция передавалась от обезьяны к обезьяне.

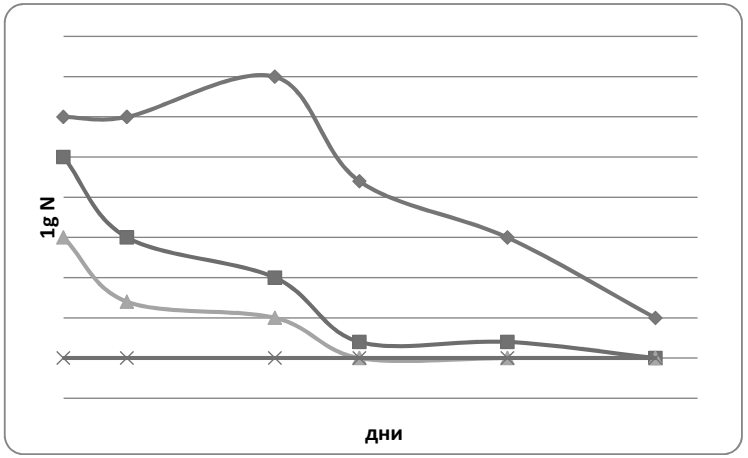


Рис. 1 Динамика изменения количества геном – эквивалентов B.pertussis в носоглотке после первичного и повторного заражения у спонтанно инфицированных и контрольных павианов гамадрилов

Ромбы - показатель первой экспериментальной инфекции контрольных павианов гамадрилов, квадраты – показатель повторной инфекция контрольных павианов, треугольники – показатель экспериментального заражения спонтанно инфицированных павианов гамадрилов. По оси абсцисс – сроки (дни), на оси ординат – lg N. N- количество геном – эквивалентов B.pertussis в 5 мкл раствора ДНК, выделенной из назофарингеальных смывов.

Для выяснения вопроса о том, произошла ли у 3 серопозитивных павианов после естественного их инфицирования иммунологическая перестройка, они были заражены интратрахеально вирулентными бактериями B.pertussis, штамм 475. Контролем служили 3 серонеготивных павиана гамадрила, перенесшие экспериментальный коклюш и зараженные повторно. При первичном экспериментальном заражении у контрольных павианов наблюдали катаральные явления верхних дыхательных путей и образование вязкой слизи. Как видно из рисунка 1, по данным ПЦР-РВ в назофарингеальных смывах в течение 7-14 дней наблюдалось размножение бактерий. Единичные геном эквиваленты регистрировали в носоглотке обезьян и через 3 месяца. С 7 по 14 дни после заражения регистрировался выраженный лейкоцитоз и гипогликемия. Специфические противококлюшные антитела класса IgG к КТ и ФГА обнаруживались на 14-30 сутки, максимально возрастали на 60 сутки (рис. 2). В течение последующих месяцев наблюдалось постепенное снижение антител, на этом фоне контрольные обезьян были заражены вторично.

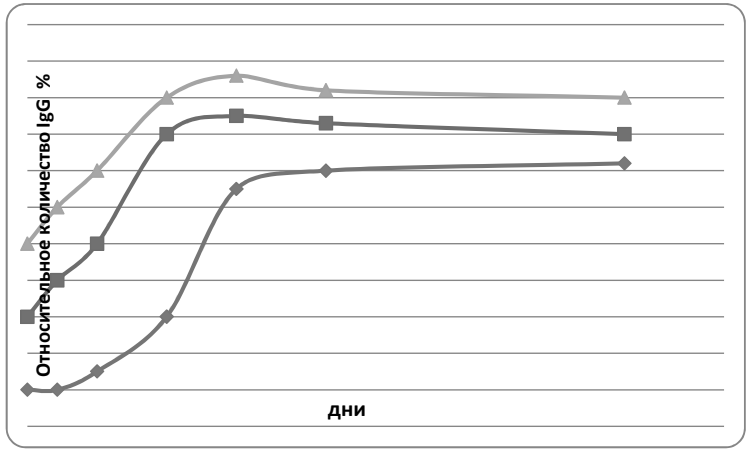


Рис. 2 Динамика относительного количества IgG в сыворотке крови после первичного и повторного заражения у спонтанно инфицированных и контрольных павианов гамадрилов.

Ромбы - показатель первой экспериментальной инфекции контрольных павианов гамадрилов, квадраты – показатель повторной инфекция контрольных павианов, треугольники – показатель экспериментального заражения спонтанно инфицированных павианов гамадрилов. По оси абсцисс – сроки (дни), на оси ординат – относительное количество IgG в %.

При вторичном заражении контрольных обезьян и первичном экспериментальном заражении спонтанно инфицированных обезьян, ни у тех ни у других не было выявлено внешних признаков нарушения общего состояния здоровья и характерных для коклюша клинико-лабораторных изменений: катаральных явлений в носоглотке и образования слизи, повышения температуры тела, лейкоцитоза и гипогликемии. Сокращались сроки обнаружения бактерий в носоглотке, происходила практически полная их элиминация не позднее 28 дня (рис.1). Специфические противококлюшные антител класса IgG нарастали, начиная с 3-го дня достигая пика к 14 – 21 дню (рис 2).

При сопоставлении ответной реакции на повторное экспериментальное заражение обезьян, перенесших ранее спонтанную и экспериментальную инфекцию, не наблюдалось существенных отличий. Было выявлено ускоренное освобождение носоглотки от бактерий B. pertussis и ранее и более выраженное образование специфических противококлюшных антител (бустерный эффект). Это свидетельствует о том, что в результате естественного инфицирования обезьяны, по-видимому, перенесли инфекцию

в атипичной форме с последующим формированием иммунитета, который не отличался от такового у обезьян перенесших экспериментальный коклюш.

Проведённые нами исследования выявили возможность передачи бактерий *B. pertussis* павианам гамадрилам от человека, перенесшего коклюш в атипичной форме (без кашля) или (и) являющегося бессимптомным носителем возбудителя инфекции. В процессе распространения заболевания произошла передача бактерий *B. pertussis* от обезьяны к обезьяне, в результате чего значительная часть животных в клетках была инфицирована – образовался эпизоотический очаг коклюша у павианов гамадрилов.

Таким образом, нами впервые обнаружена естественная чувствительность к возбудителю коклюша одного из видов низших обезьян Старого Света – павианов гамадрилов. Описан очаг спонтанного коклюша возникшего при передаче инфекции от человека к обезьянам.

Список литературы

1. Elahi Sh., Holmstrom J., Gerdts V. The benefits of using diverse animal models for studying pertussis // TRENDS in Microbiology, 2007; 15(10): 462-468.
2. Huang C.C., Chen P.M., Kuo J.K. et.al. Experimental whooping cough //The new England J. Medicin, 1962; 266(18):107-111.
3. Gustavsson O.E.A., Roken B.O., Serrander R. An epizootic of whooping cough among chimpanzees in zoo // Folia Primatol (Basel), 1990; 55(1): 45-50.
4. Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н. и др. Экспериментальный коклюш у обезьян //Вестник РАМН, 2013, №8. С.28-33.
5. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K. et.al. Nonhuman primate model of Bordetella pertussis // Inf.Immun. 2012; 80(4):1530-1536.
6. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С., Синяшина Л.Н., Амелина И.П., Алексеев Я.И., Боковой А.Г., Каратаев Г.И. Выявление инсерционных мутантова вирулентных bvg-мутантов *Bordetella pertussis*у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией ипрактически здоровых люде // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2010;4:9-13.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. *М.: Практика*. 1999. 459 с.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА МАКАК КАК МОДЕЛЬ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК ЧЕЛОВЕКА

Лапин Б.А., Шевцова З.В.***

**НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия*

** *НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия*

Резюме

Подведены итоги изучения геморрагической лихорадки обезьян (ГЛО) и вируса ГЛО за полувековой период со времени их открытия. Установлено, что источником этой смертельной для азиатских макак инфекции являются африканские обезьяны. В эндемичных районах Африки обнаружен комплекс природных вариантов вируса ГЛО, в циркуляции которого участвуют внешне здоровые обезьяны. Сохраняется угроза возникновения эпизоотий при завозе таких обезьян в колонии приматологических учреждений. В настоящее время 10 изолятов вируса изучены и включены как самостоятельные виды в род *Simarterivirus* семейства *Arteriviridae.* С помощью одного из них – *Sukhumi/SHEV* – воспроизведена экспериментальная ГЛ макак и использована нами для изучения основных вопросов патогенеза, таких как тропность вируса, нарушения системы гемостаза и функции коры надпочечников. С помощью МФА показана вазотропность вируса. Специфический антиген обнаруживался в эндотелии капилляров и в ретикулярных клетках различной локализации наряду с распространённым повреждением эндотелия сосудов, выявляемом при морфологическом исследовании. В результате гибели этих клеток повышается уровень факторов свёртывания крови. Сдвигу в сторону гиперкоагуляции способствуют повышение уровня гидрокортизона и снижение противосвёртывающей функции РЭС – реализуется первая стадия тромбогеморрагического синдрома (ТГС). Нарушаются вазомоторная и трофическая функции сосудов, повышается проницаемость их систем, происходит пропотевание богатой фибриногеном плазмы во все её слои и в околососудистое пространство. Это ведёт к развитию диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови (ДВС). В результате повышенной проходимости сосудистой стенки происходят диапедезные кровоизлияния и кровотечения. Развитию расстройств кровообращения в микрорусле способствуют падение уровня гидрокортизона, снижение фибринолитической активности и способности крови к свёртыванию. Всё это ведёт к развитию геморрагий (вторая стадия ТГС), падению сосудистого тонуса, необратимому шоку и гибели. Полученные данные согласуются с результатами изучения вопросов патогенеза на макаках и павианах при лихорадке Эбола. Однако работа с патогенными для человека вирусами ГЛ опасна: описаны случаи лабораторного заражения. В связи с этим не вызывает сомнений ценность разработанной с помощью вируса *Sukhumi/SHEV* экспериментальной модели ГЛ. Эту безопасную адекватную

модель предлагается использовать для изучения нерешенных вопросов пато- и иммуногенеза ГЛ человека и оценки разрабатываемых средств патогенетической терапии. Исследованиям такого рода придаётся большое значение.

EXPERIMENTAL HEMORRHAGIC FEVER OF MACAQUES AS A MODEL OF HUMAN HEMORRHAGIC FEVER

Lapin B.A., Shevtsova Z.V.***

** FSBSI "Research Institute of Medical Primatology", Sochi-Adler, Russia*

*** Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia*

Abstract

Results of Simian hemorrhagic fever (SHF) studies and simian hemorrhagic fever virus (SHFV) research are summarized for the semicentennial period since SHF discovery. It was established that African monkeys were the source of its infection lethal for Asian macaques. In endemic regions of Africa a complex of natural variants of SHF viruses was found. Seemingly healthy monkeys take part in SHFV circulation, so there is a risk of epizootic outbreak if such monkeys are delivered in colonies of primatological organizations. At the present time 10 virus isolates are studied and included as separate species in genus *Simarterivirus*, family *Arteriviridae*. With help of one of them – *Sukhumi/SHEV* – the experimental hemorrhagic fever (HF) in macaques was reproduced and used by us for the research of main aspects of pathogenesis as viral affinity, disorders of the hemostasis system and suprarenal cortex functioning. With help of fluorescent antibody technique the vasotropic effect of virus was shown. Specific antigen was found in capillary endothelium and in reticular cells of various localization, and also the damage of vascular endothelium was observed at morphological examination. As a result of death of these cells the level of blood-coagulation factors increases. The increase of the hydrocortisone level and the decrease of the reticuloendothelial system functioning promote the shift to hypercoagulation – the fist stage of thrombohemorrhagic syndrome (THS) is realized. Vasomotor and trophic function of capillaries are interrupted, their permeability increases, the vascular leak of plasma reach of fibrinogen in all its layers and in the perivascular space occurs. It leads to the development of disseminated intravascular clotting. As a result of increased permeability of a vessel wall diapedetic hemorrhages and bleeding take place. Fall of hydrocortisone level, decrease of fibrinolytic activity

and blood clotting ability promote the development of circulatory abnormalities in the microstream. All this leads to the development of hemorrhages (the second stage of THS), fall of vasomotor tone, irreversible shock and death. Obtained data are consistent with results of pathogenesis research in macaques and baboons ill with Ebola fever. However, the work with human pathogenic HF viruses is dangerous: causes of laboratory disease were described. In this regard, the high value of the experimental HF model developed with the help of *Sukhumi/SHEV* virus is obvious. This harmless adequate model is suggested to use for research of unsolved questions of patho- and immunogenesis of human HF and for the assessment of developed medications for pathogenetic therapy. Research of this kind is of great importance.

В группу вирусных геморрагических лихорадок (ГЛ) человека в настоящее время включено 16 этиологически самостоятельных форм. Несмотря на то, что их возбудители относятся к пяти различным семействам, эти заболевания проявляются однотипно. Для всех характерно развитие разнообразных проявлений геморрагического диатеза и сходство основных патогенетических звеньев, связанных с разрушением инфицированных клеток и патологической проницаемостью капилляров. В последние 15 – 20 лет наблюдается тенденция к утяжелению течения таких особо опасных контагиозных ГЛ, как Эбола, Марбург, Ласса и др., а также расширение ареала их распространения с возможностью завоза на неэндемичные территории разных стран [1, 2]. В связи с этим они включены в список инфекционных заболеваний, подлежащих уведомлению ВОЗ [3]. Средства этиотропной терапии и специфической профилактики отсутствуют. Применяемая патогенетическая терапия мало эффективна из-за недостаточной изученности вопросов патогенеза. Использование для этих целей обезьян как единственных животных, у которых заболевание протекает в сходной с человеком форме, ограничено из-за опасности работы с этими вирусами. В связи с изложенным несомненный интерес представляет геморрагическая лихорадка обезьян, вирус которой не патогенен для человека.

Впервые вспышка этой смертельной для макак инфекции наблюдалась в 1964 году в Сухумском питомнике обезьян и несколько позже – в колонии приматов Национального института здоровья в Бетезде. Заболевание было изучено нами, названо *геморрагической лихорадкой обезьян – ГЛО* – и описано в 1966 – 1967 гг. [4, 5]. Был установлен и возбудитель – вирус ГЛО, обозначенный как штамм *«Сухуми-64»* [6, 7]. Американские исследователи описали заболевание двумя годами позже [8, 9], а выделенный вирус назвали

“NIH” или *“Bethesda-64”*. [10]. За прошедший период в приматологических учреждениях разных стран наблюдалось 17 эпизоотий ГЛО с большой смертностью среди макак [11, 12]. Позже было показано, что источником инфекции служили носители этого вируса африканские обезьяны, в частности, красные обезьяны – *Patas* [13, 14, 15]. Штаммы этого вируса выделены также от внешне здоровых обезьян (красные колобусы, желтые павианы и др.)., находящихся в национальных парках Африки [16, 17]. В настоящее время изучено 10 изолятов вируса ГЛО. Все они по основным свойствам являются артеривирусами, но отличаются друг от друга по организации геномов и степени их гомологии. В семействе они представлены отдельным родом *Simarterivirus*. Выделенный нами вирус включен в этот род как самостоятельный вид *Sukhumi* с названием *SHEV – Simian hemorrhagic encephalitis virus* [18].

С помощью этого вируса нами была воспроизведена и подробно охарактеризована экспериментальная ГЛ макак, сходная со спонтанной [19, 20]. Сравнение полученных результатов с имеющимися в литературе данными по различным ГЛ свидетельствовало в пользу мнения большинства исследователей о том, что в основе их патогенеза лежат общие патофизиологические механизмы. Для изучения этих механизмов адекватной моделью можно считать только обезьян, так как лишь у этих животных заболевание протекает в форме, сходной с человеком. Учитывая вышеизложенное и отсутствие патогенности ВГЛО для человека, экспериментальная ГЛО была предложена и использована нами в качестве модели для изучения ряда вопросов патогенеза, общих для заболеваний этой группы [21, 22].

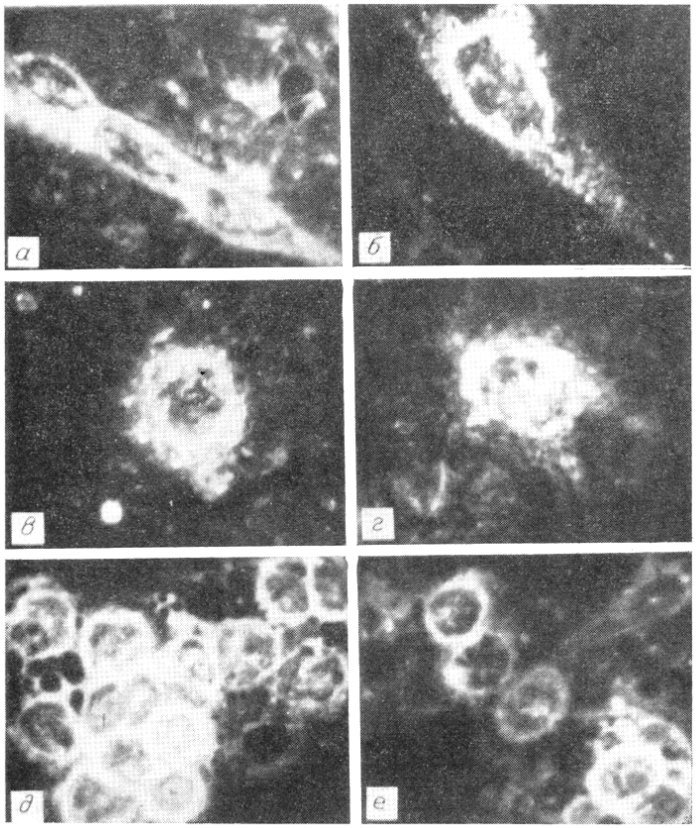


Рис.1. Локализация вирусного антигена в цитоплазме эндотелия капилляров (а), нейронов и нейроглии (б – г), клеток печени (д) и селезенки (е) макак, зараженных вирусом *Sukhumi/SHEV*.

Результаты заражения макак различным путем (на слизистые глаз, через рот, под кожу, в вену, внутримышечно и интрацеребрально) указывали на то, что основным способом проникновения вируса ГЛО является парентеральный [7]. Распространенность вируса в организме и его тропность изучали параллельно в биологической пробе (заражение макак) и методом флюоресцирующих антител (МФА). Было выявлено, что вирус циркулирует в крови со 2-го дня после заражения и до гибели (6-й – 21-й день) с максимальной концентрацией в разгар болезни (LD_{50} соответствовала 10^5/мл). В период клинических проявлений вирус был обнаружен во всех исследованных органах (головной и спинной мозг, костный мозг, печень, почки, селезенка), а также в моче и смывах носоглотки. При использовании

МФА вирусспецифический антиген был обнаружен во всех названных органах [23]. При этом диффузные скопления и глыбки антигена наблюдали преимущественно в эндотелии капилляров, в макрофагах, купферовских клетках, глиальных элементах и других ретикулярных клетках **(Рис. 1)**. Это свидетельствовало о тропности вируса к клеткам ретикуло-эндотелиальной – моноцитарно-макрофагальной системы (ММС). Позже были получены доказательства, подтверждающие наши данные, что мишенью для репликации ВГЛО являются клетки этой системы [24, 25]. Авторы установили, что штаммы *Сухуми-64* и *Bethesda-64* размножаются в культуре перитонеальных макрофагов макак резусов, причем инфекция сопровождается лизисом этих клеток. Следует отметить, что к такому же выводу пришли и исследователи, изучавшие тропность вируса Эбола на 4 видах лабораторных приматов. Ультраструктурное исследование органов зараженных обезьян выявило размножение вируса в макрофагах, эндотелии, фибробластах, гепатоцитах и клетках коры надпочечников [26].

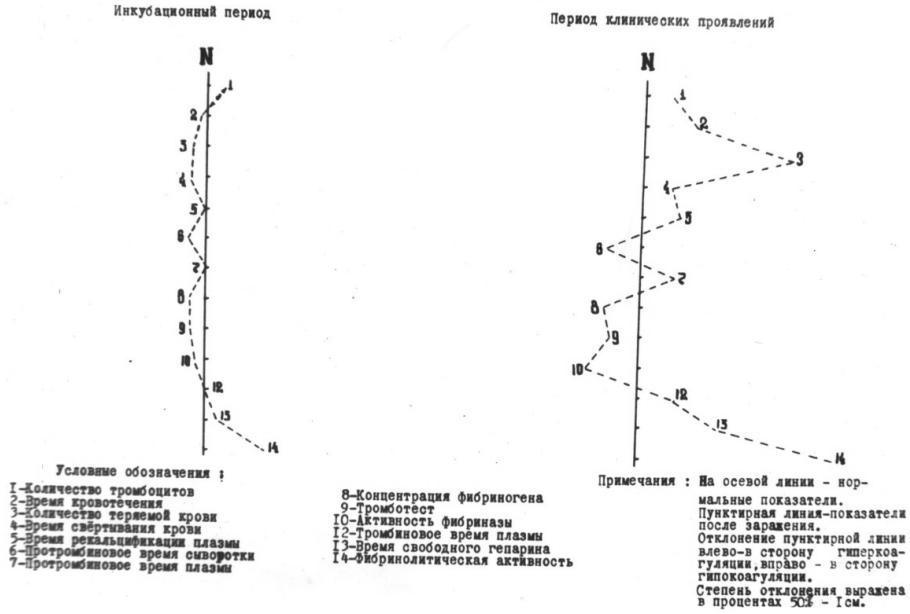


Рис. 2. Коагулограммы больных ГЛ макак в инкубационный период и в период клинических проявлений.

Экспериментальная модель ГЛО была использована и для изучения сдвигов в системе гемостаза [27]. С этой целью у зараженных макак в динамике определяли 14 показателей, характеризующих её состояние **(Рис.**

2). В инкубационный и начальный периоды, в разгар болезни и в терминальной стадии показатели этой системы имели противоположную направленность, причем в основном за счет изменений в сосудистом звене. Характер коагулограмм соответствовал наблюдаемым при тромбогеморрагическом синдроме (ТГС) и развивающимся при этом диссеминированном внутрисосудистом свертывании (ДВС). Для этого синдрома характерна выявленная нами при данном заболевании фазность гемостатических изменений: смена первичной гиперкоагуляции вторичной гипокоагуляцией. Анализ гемостатических нарушений указывал также на то, что ТГС (ДВС) развивается по линии активации сосудистого компонента системы [22]. С нашими данными согласуются результаты, полученные при изучении гемостатических нарушений у макак при ГЛО [28]. Аналогичные изменения системы гемостаза описаны и при ГЛ Эбола [29].

Существенные сдвиги в процессе заболевания были обнаружены и при исследовании кортикостероидной функции надпочечников [30]. Повышение уровня гидрокортизона в ранний период сопровождалось редукцией лимфоидной ткани и гиперкоагуляцией. О серьёзном нарушении функции коры надпочечников свидетельствовало резкое падение продукции гидрокортизона в разгар заболевания и в терминальной стадии, что согласуется с наблюдавшимися в эти периоды гипотонией, геморрагиями, снижением резистентности к бактериям, развитием периферического сосудистого коллапса. Всё это указывает на участие гормональной реакции коры надпочечников в патогенезе ГЛО.

Сопоставление полученных клинико-лабораторных и патоморфологических данных позволило придти к выводу, что в пато- и танатогенезе ГЛО важную роль играет ТГС (ДВС) и предложить следующую схему последовательности развития патологических процессов [22]. В возникновении и развитии этого синдрома ведущей является выявленная тропность вируса к ретикулоэндотелиальным элементам (эндотелий сосудов, макрофаги, глия, кунферовские клетки и др.). В результате их гибели повышается уровень тканевых факторов, что является «пусковым механизмом» повышения свертывания крови. Сдвигу в сторону гиперкоагуляции способствует также высокий уровень гидрокортизона и нарушение противосвёртывающей функции РЭС. Всё это реализуется развитием первой стадии ТГС. При повреждении эндотелия мелких сосудов и капилляров нарушается гемостатическое равновесие, которое поддерживается на поверхности контакта сосудов с кровью, повышается проницаемость сосудистой стенки, происходит пропотевание богатой фибриногеном плазмы во все её слои и околососудистые пространства с

последующим выпадением фибрина. Нарушаются вазомоторная и трофическая функции сосудов, формируются отечно-дистрофические изменения, повышается проходимость стенок сосудов для эритроцитов, что ведет к диапедезным кровоизлияниям и кровотечениям. Развитию расстройств кровообращения в микрорусле способствует падение уровня гидрокортизона, снижается фибринолитическая активность, способность крови к свертыванию. Весь комплекс происходящих изменений ведет к развитию геморрагического диатеза – 2-й стадии ТГС, к падению сосудистого тонуса, необратимому шоку и гибели [22]. Наши представления о ключевой роли в развитии ДВС повышения уровня тканевых факторов в результате инфицирования клеток ММС при ГЛО согласуются с данными, полученными позже при изучении лихорадки Эбола на макаках [29] и на павианах [26].

В заключение следует отметить, что на протяжении прошедшего полувекового периода ГЛО и её возбудители оставались в сфере внимания приматологов. Эпизоотии этой инфекции продолжают наносить урон приматологическим учреждениям, и новые изоляты вируса выделяются как от содержащихся в них обезьян, так и от животных, обитающих в специальных парках [31, 32, 33, 34]. Оказалось, что эта инфекция эндемична для некоторых регионов Африки, в которых имеется комплекс природных вариантов вируса ГЛО, а обитающие там обезьяны участвуют в его циркуляции, перенося асимптомную инфекцию. Сохраняется угроза возникновения эпизоотий при завозе африканских обезьян в колонии приматов.

Следует особенно подчеркнуть важность медицинского аспекта проблемы, актуальность которой объясняется возросшим эпидемическим потенциалом особо опасных ГЛ человека (Эбола, Марбург, Ласса и др.), возможностью заноса их на неэндемичные территории, а также внесением их возбудителей в список биотеррористических агентов. Работа с этими вирусами с целью моделирования опасна: описаны случаи лабораторных заражений [35]. В связи с этим не вызывает сомнений ценность разработанной с помощью вируса *Sukhumi/SHEV* экспериментальной модели ГЛ. Эту безопасную адекватную модель предлагается использовать для изучения нерешенных вопросов пато- и иммуногенеза ГЛ человека и оценки разрабатываемых средств патогенетической терапии [11, 36]. Исследованиям такого рода придается большое значение [37, 38].

Список литературы

1. Маркин В.А., Марков В.И. Вирусные геморрагические лихорадки – эволюция эпидемического потенциала. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2002, 1: 91 – 98.
2. Борисевич И.В., Маркин В.А., Фирсова и др. Эпидемиология, профилактика, клиника и лечение геморрагических лихорадок (Марбург, Эбола, Ласса и Боливийской). Вопросы вирусологии, 2006; 5: 8 – 16.
3. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территорий в современных условиях. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008; 1: 17 – 23.
4. Лапин Б.А., Шевцова З.В. Изучение вирусной геморрагической лихорадки обезьян. Тезисы IX Международного конгресса по микробиологии. Москва, 1966: 465 – 466.
5. Лапин Б.А., Пекерман С.М., Яковлева Л.А., и др. Вирусная геморрагическая лихорадка обезьян. Вопросы вирусологии, 1967; 2: 168 – 173.
6. Шевцова З.В., Изучение этиологии геморрагической лихорадки обезьян. Вопросы вирусологии, 1967; 1: 47 – 51.
7. Шевцова З.В. Дальнейшее изучение вируса геморрагической лихорадки обезьян. Вопросы вирусологии, 1969; 5: 604 – 607.
8. Palmer A.E., Allen A.M., Tauraso N.M., Shelokov A. Simian hemorrhagic fever. I. Clinical and epizootologic aspects of an outbreak among quarantined monkeys. Am. J. Med. Hyg. 1968; 17: 404 – 412.
9. Allen A.M., Palmer A.E., Tauraso N.M., Shelokov A. Simian hemorrhagic fever. II. Studies in pathology. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1968; 17: 413 – 421.
10. Tauraso N.M., Shelokov A., Palmer A.E., Allen A.M. Simian hemorrhagic fever. III. Isolation of viral agent. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1968; 17: 422 – 431.
11. Лапин Б.А., Шевцова З.В. К 50-летию открытия геморрагической лихорадки обезьян и вируса ГЛО. Вопросы вирусологии, 2015, т. 60, №1, с. 5 – 11.
12. Lauck M., Alkhovsky S.V., Bao Yiming, Bailey A.L., Shevtsova Z.V. et al. Historical outbreaks of simian hemorrhagic fever in captive macaques were caused by distinct arteriviruses. J. Virol., 2015, 89: 8082 – 8087.
13. London W.T. Epizootology, transmission and approach to prevention of fatal simian hemorrhagic fever in rhesus monkeys. Nature. 1977; 268: 344 – 345.
14. Шевцова З.В., Пекерман С.М., Крылова Р.И. Геморрагическая лихорадка обезьян по материалам Сухумского питомника. Моделирование патологических состояний человека. Под ред. Б.А. Лапина. Москва, 1977; том II: 114 – 118.
15. Gravell M., London W.T., Rodriguez M., Palmer A.E., Hamilton R.S. Simian hemorrhagic fever: New virus isolate from a chronically infected patas monkey. J. Gen. Virol. 1980; 51: 99 – 106.
16. Lauck M., Hyeroba D., Tumukunde A., Weny G, Lank SM, Chapman CA, O'Connor DH, Friedrich TC, Goldberg TL. Novel divergent simian hemorrhagic fever viruses in a wild Ugandan red Colobus monkey discovered using direct pyrosequencing. PLoS. 2011; 6 (4): e 19056.
17. Lauck M., Hyeroba D., Tumukunde A. et al. 2001. Novel divergent simian hemorrhagic fever viruses in a wild Ugandan red colobus monkey discovered using direct pyrosequencing. PLoS One 6: e19056. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019056.
18. Kuhn J.H., Lauck M., Bailey A.L., …, Shevtsova Z.V., Jahrling P.B., Lapin B.A. et al. Reorganization and expansion of the nidoviral family *Arteriviridae.* Arch. Virol., published online, 25 November 2015.
19. Шевцова З.В., Куксова М.И., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И., Данько Л.В. Экспериментальное изучение геморрагической лихорадки обезьян. *В кн.:* Биология и патология обезьян, изучение болезней человека в эксперименте на обезьянах. Материалы Международного симпозиума. Тбилиси; 1966: 148 – 150.
20. Lapin B.A., Shevtsova Z.V., Krylova R.I. Experimental hemorrhagic fever of monkeys. Proceedings 2nd Intern. Congress of Primatol. Ed. H.O. Hoffer. Atlanta. 1969; 3: 196 – 203.
21. Шевцова З.В., Лапин Б.А., Кармышева В.Я., Чумаков М.П. Геморрагическая лихорадка обезьян – модель для изучения патогенеза геморрагических лихорадок человека. Использование обезьян в экспериментальной медицине. Сухуми. 1974; 63 – 66.
22. Шевцова З.В. Геморрагическая лихорадка обезьян макак (этиология, клинико-морфологические особенности, патогенез). Автореферат дисс. докт. мед. наук. Сухуми, 1974, 45 с.
23. Шевцова З.В., Кармышева В.Я., Чумаков М.П. Вирусологическое изучение геморрагической лихорадки обезьян. Вопросы вирусологии. 1975; 4: 471 – 476.
24. Gravell M., Palmer A.E., Rodriguez M., London W.T., Hamilton R.S. Method to detect asymptomatic carriers of simian hemorrhagic fever virus. Lab. Anim. Sci. 1980; 30 (6): 988 – 991.

25. Gravell M., London W.T., Rodriguez M. et al. Simian hemorrhagic fever (SHF): new virus isolate from a chronically infected patas monkey. J. Gen. Virol., (1080), **51,** 99 – 106.
26. Рябчикова Е.И., Лучко С.В., Гражданцева А.А., Рассадкин Ю.Н. Опыт использования лабораторных приматов при изучении вирусной геморрагической лихорадки Эбола. Перспективные направления использования лабораторных приматов в медико-биологических исследованиях. Сочи-Адлер. 2006: 32 – 38.
27. Уварова В.И., Шевцова З.В. Изучение системы гемостаза при геморрагической лихорадке макак. Актуальные проблемы вирусологии и профилактики вирусных инфекций. Под ред. М.П. Чумакова. Москва. 1972; 329 – 330.
28. Abilgard Ch., Harrison J., España C., Spangler W, Gribble D. Simian hemorrhagic fever: studies of coagulation and pathology. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1975; 24(3):537–44.
29. Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in Ebola hemorrhagic fever: over expression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. J. Inf. Dis. 2003; 188 (11): 1618 – 1629.
30. Гончаров Н.П., Вербергер В., Шуберт К., Шевцова З.В. Секреторная функция коры надпочечников у макак резусов, больных геморрагической лихорадкой обезьян. Патол. Физиол. Эксперим. Терапия. 1971; 2: 31 – 36.
31. Renquist D. Outbreak of simian hemorrhagic fever. J. Med. Primatol., 1990, 19 (1): 77 – 79.
32. Rollin P.E., Williams R.J., Bressler D.S. et al. 1999. Ebola (subtype Reston) virus among quarantined nonhuman primates recently imported from the Philippines to the United States. J. Infect. Dis., 179: S108 – S114. http://dx.doi.org/10.1086/514303.
33. Bailey A.L., Lauck M., Sibley S.D. et al. 2014. Two novel simian arteriviruses in captive and wild baboons (Papio spp.). J. Virol., 88: 13231 – 13239. http://dx.doi.org/10.1128\JVI.02203-14.
34. Vatter H.A., Donaldson E.F., Huynh J. et al. 2015. A simian hemorrhagic fever virus isolate from persistently infected baboons efficiently induced hemorrhagic fever disease in Japanese macaques. *Virology* 474: 186 – 198. http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.10.018.
35. Семина Н.А., Ковалева Е.П. Заболевания медработников особо опасными инфекциями, ассоциированными с лабораторными заражениями. Эпидемиол. Вакцинопроф. 2005, 1 (20): 23 – 28.

36. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Шевцова З.В., Стасилевич З.К. Геморрагическая лихорадка обезьян – ГЛО. В кн.: *Моделирование инфекционных заболеваний человека на лабораторных приматах.* Сочи: ООО Стерх; 2011: 184 – 188.
37. Johnson R., Cai V., Wahl-Jensen V. et al. Simian hemorrhagic fever virus as a model for risk group 4 pathogens. В кн.: *Материалы Второй международной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии».* Сочи – Адлер; 2011; I: 227 – 233.
38. Johnson R.F., Dodd L.E., Yellayi S. et al. Simian hemorrhagic fever virus infection of rhesus macaques as a model of viral hemorrhagic fever: clinical characterization and risk factors for severe disease. *Virology,* 2011; 421 (2): 129 – 140.

ПОЛИМОРФИЗМ ОНКОГЕНА *LMP1* В ШТАММАХ ВИРУСА ЭПШТЕЙНА-БАРР, ПЕРСИСТИРУЮЩИХ СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э.

ФГБУ «РОНЦ им Н.Н.Блохина» Минздрава России, Москва, РФ

Резюме

Расшифровка молекулярных механизмов опухолевой трансформации клетки, вызываемой онкогенными вирусами человека, представляет собой актуальную проблему современных исследований в онкологии. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) в этом плане представляет особый интерес, поскольку являясь убиквитарным герпесвирусом человека, ассоциирован с широким спектром доброкачественных и злокачественных новообразований лимфоидного и эпителиального происхождения (лимфома Беркитта, недифференцированный рак носоглотки, лимфома Ходжкина, неходжкинские лимфомы и ряд других). Показано, что в патогенезе ВЭБ-ассоциированных патологий чрезвычайно важную роль играет вирусный онкоген – *LMP1*. Приоритетность изучения в этом гене генетических перестроек становится очевидной, учитывая их влияние на активность ключевых внутриклеточных молекул, таких как NF-kB, AP-1, iNOS и ряда других, приводящих к малигнизации клетки. Особенно пристальное внимание вызывают наиболее часто встречающиеся мутации – I85L, F106Y, G212S, S366T, а также делеции, характерные для высокотуморогенных вариантов LMP1. Учитывая отсутствие данных о штаммах ВЭБ,

персистирующих среди населения Дальневосточного региона РФ, целью данной работы явилось изучение изолятов ВЭБ и вариантов онкогена *LMP1* среди коренного (нанайцев) и пришлого (преимущественно русского) взрослого населения Хабаровского края.

Используя ДНК ВЭБ, мы провели амплификацию и секвенирование его онкогена, *LMP1*. Филогенетический анализ транслированных последовательностей образцов *LMP1* показал гетерогенность исследуемых вариантов. При этом не выявлено доминирование определенного варианта LMP1; все изученные образцы были равномерно распределены между известными в литературе низко- и высокодивергентными вариантами LMP1: B95-8b, Med+, Med-, China1 и NC.

Основная задача наших исследований состояла в поиске высокотуморогенных мутаций в последовательностях LMP1 изолятов ВЭБ, персистирующих на территории Дальнего Востока, расположенного в непосредственной близости от эндемичного для ВЭБ-ассоциированного нРНГ региона (южных провинций Китая). Анализ полученных данных не выявил высокотуморогенную делецию (Cao-подобную, 30 п.н.) среди исследованных образцов *LMP1*, типичную для больных нРНГ из Юго-Восточной Азии. В то же время, все исследованные образцы LMP1 имели в своей последовательности а.к. замену в 366-м (S366T) положении, характерную для его высокотуморогенных вариантов. В ряде образцов были выявлены замены глутамина на аргинин в 334-й позиции и глутаминовой кислоты на глутамин в 328-м положении (Q334R и E328Q, соответственно). Следует отметить, что последняя мутация редко встречается в европейских образцах, но широко распространена среди LMP1 ВЭБ у населения Дальнего Востока России. Кроме того, при анализе последовательностей LMP1 изолятов ВЭБ обнаружены Cao-специфические мутации в 210 и 212-м положениях (D210E и G212S, соответственно), которые затрагивают сайт распознавания HOS-белков - компонента E3-лигазы, участника процессинга молекулы IkB - супрессора NF-кB. Наличие выявленных аминокислотных замен, как показано ранее, может опосредованно приводить к активации NF-кB, посредством связывания HOS белков.

Полученные результаты свидетельствуют о персистенции на территории Дальнего Востока специфических штаммов вируса Эпштейна-Барр, с последовательностями онкогена LMP1, не характерными ни для его образцов на территории центрально-европейской части России, ни для ближайшего эндемичного региона Юго-Восточной Азии. Выявленные отдельные мутации, характерные для высокотуморогенных вариантов LMP1 ВЭБ, при воздействии дополнительных факторов окружающей среды, могут

явиться важным фактором в канцерогенезе ВЭБ-ассоциированных доброкачественных и злокачественных новообразований. Этот вопрос требует дополнительного изучения, и его решение, возможно, предоставит нам новую информацию о механизмах возникновения ВЭБ-ассоциированных опухолей на границе эндемичного и неэндемичного регионов.

LMP1 ONCOGENE POLYMORPHISM IN EPSTEIN-BARR VIRUS STRAINS PERSISTING AMONG THE POPULATION OF THE RUSSIAN FAR EAST

Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevitch V.E.

FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract

The investigation of the molecular mechanisms of tumor cell transformation induced by human oncogenic viruses is an actual problem of current research in oncology. In this context Epstein-Barr virus (EBV) represents of special interest as ubiquitous human herpesvirus associated with a wide spectrum of benign and malignant neoplasms of lymphoid and epithelial origin (Burkitt lymphoma, undifferentiated nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma and several others). It was shown that dominant role in the pathogenesis of EBV-associated pathologies played the viral oncogene - LMP1. It is obvious the priority of study genetic rearrangements in this gene especially taking into account their effect on the activity of key intracellular molecules such as NF-kB, AP-1, iNOS, and several others, involved in cell malignancy. The most common mutations, I85L, F106Y, G212S, S366T, and deletions that are typical for highly tumorigenic LMP1 variants deserves special attention. Considering the absence of the information about EBV strains persistent in the population of the Far East region of Russia, the aim our investigation was to study the EBV isolates and LMP1 oncogene variants persisting among the adult indigenous (Nanai) and newcomers (Russian mostly), the residents of the Khabarovsk Territory. Additional objective of our study was also the molecular characteristics of highly tumorigenic mutations in the LMP1 sequences of EBV isolates persisting in the Far Eastern region of Russia, which is located in close proximity to endemic for EBV-associated NPC the southern provinces of China). Using samples of EBV DNA, collected from representatives of two population groups, we performed amplification and sequencing respective LMP1 oncogene samples. Phylogenetic analyses of translated sequences of these samples have showed their molecular

heterogeneity. However, the dominance of a specific LMP1 variant was not found; all studied samples were evenly distributed between low and highly tumorogenic LMP1 variants described in the literature: B95- 8b, Med +, Med-, China1 and NC. Analysis of the data obtained revealed no highly tumorogenic deletion (Cao-like, 30 bp) among the LMP1 samples studied, which is typical for NPC patients from China and countries of Southeast Asia. At the same time, all the investigated LMP1 samples had mutation in the 366 position (S366T) of its aa sequences, that is specific for highly tumorigenic LMP1 variants. The substitutions of glutamine to arginine at 334-position and glutamic acid for glutamine at 328th position (Q334R and E328Q, respectively) were identified in several samples. It should be noted that the last mutation is rare in European samples, but is widespread among LMP1 samples of the Far East population of Russia. Furthermore, analysis of LMP1 sequences of EBV isolates investigated allowed to detect Cao specific mutations in 210 and 212 positions (D210E and G212S, respectively) affecting the HOS-recognition site - E3 ligase component that is the member of molecule IkB processing - suppressor NF- kB. It was previously shown that such amino acid substitutions can indirectly lead to the activation of NF-kB by binding HOS proteins. Thus our results allowed us to detect in the Russian Far East the EBV specific strains, with the LMP1 oncogene sequences which are different from LMP1 samples spread on the territory of the Central Russia, and neibouring endemic regions in China and South-East Asia. Identified individual mutations, specific to highly tumorogenic EBV LMP1 variants, may play important role in EBV-associated carcinogenesis of benign and malignant tumors under the influence of other environmental factors. Further study requires, to clarify the problem and the results obtained may give us a new insight into the mechanisms of origin of EBV-associated tumors on the border of the endemic and non-endemic regions.

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), являясь убиквитарным герпесвирусом человека, ассоциирован с рядом злокачественных новообразований. К их числу относятся рак носоглотки (РНГ), лимфома Беркита, лимфома Ходжкина, и ряд других. В различных географических регионах мира и этнических группах выявлены варианты ВЭБ, в ключевых генах которых обнаружены определенные наборы мутаций (замены, вставки и делеции), влияющие на их трансформирующие свойства и онкогенный потенциал. К числу функционально важных генов, с которыми связан трансформирующий и онкогенный потенциал ВЭБ, относится латентный мембранный белок 1 (*LMP1*), обладающий выраженным полиморфизмом. Являясь мультифункциональным геном ВЭБ, его онкогеном, *LMP1,* участвуя в

индукции целого ряда транскрипционных факторов (NF-kB, AP-1, STAT), влияет на изменение профиля внутриклеточной активности ряда сигнальных путей, что приводит к трансформации клетки. Показано, что уровень индукции различных сигнальных каскадов клетки часто зависит от определенных мутаций в последовательности этого онкогена.

Молекулярный анализ *LMP1* различного клинического и географического происхождения позволил обнаружить генетические варианты гена, отражающие в ряде случаев их неодинаковую биологическую активность. Так, амплифицированный более 10 лет тому назад от больного нРНГ из эндемичного для этого заболевания региона - Южного Китая - вариант *LMP1*, содержал делецию 30 пар нуклеотидов (п.н.) в С-терминальной области и кодировал соответствующий делецированный вариант белка (LMP1). Этот вариант LMP1, названный «Cao», проявлял выраженные трансформирующие свойства *in vitro* и оказался более туморогенным для мышей с выраженным комбинированным иммунодефицитом (SCID) по сравнению с LMP1 стандартного варианта ВЭБ, штамма B95.8. Опыты по трансфекции на клетках линии BALB/3T3 также подтвердили более высокий туморогенный потенциал LMP1-Cao по сравнению с LMP1-B95.8 (Baichwal, 1988). Повышенную трансформирующую активность изолята Cao связывают с наличием в его С-терминальной области делеции 30 п.н., которая ответственна за усиленную индукцию NF-kB (Kieff, 2001, Rickinson, 2001). Позже было обнаружено, что штаммы ВЭБ, содержащие делетированные варианты *LMP1*, не только широко распространены в зонах, эндемичных для нРНГ, но также встречаются и в других географических регионах мира. Более того, делетированные варианты LMP1 были амплифицированы из опухолевых клеток больных некоторыми ВЭБ-ассоциированными новообразованиями и даже здоровых лиц (Corvalan, 2006).

Проведенное нами предварительное исследование, свидетельствует о том, что среди населения центрально-европейской части России доминирует персистенция низкодивергентных вариантов ВЭБ (Смирнова и др., 2010). При этом, спектр штаммов ВЭБ и вариантов *LMP1* в восточном регионе России с большим числом малых этносов остается слабоизученным. Ряд убиквитарных вирусов человека позволяет прослеживать миграционные процессы, определенных групп населения, занимающих различные территории, представляя собой своего рода «этнические маркеры». Нанайцы, проживающие на территории современного Дальнего Востока России, являются одной из таких этнических общностей, представляющих большой интерес для исследователей. До массового заселения Дальнего Востока из

центральных регионов России, где, как уже было упомянуто, преобладают низкодивергентные варианты ВЭБ, эта этническая группа локально размещалась на юго-восточных территориях РФ и восточных провинциях Китая.

Учитывая отсутствие информации о вариантах LMP1 ВЭБ у населения Дальнего Востока РФ, данное исследование является первым, посвященным изучению полиморфизма LMP1 ВЭБ у коренного и пришлого населения данного региона, который не является эндемичным для ВЭБ-ассоциированных патологий, но находится на границе с эндемичными по РНГ южными провинциями Китая. Полученные нами результаты убедительно показали, что российские образцы LMP1 по своим последовательностям близки к описанным ранее в литературе вариантам LMP1 из различных регионов мира, но обладают рядом уникальных мутационных особенностей.

Материалы и методы

Образцы ДНК. Материалом для исследования служили образцы крови и смывов из ротоглотки, полученные от 19 здоровых доноров коренного населения (нанайцы) Дальнего Востока РФ, а также 28 здоровых доноров среди пришлого населения Дальнего Востока РФ. Из собранных образцов биологического материала была экстрагирована ДНК, используя набор Проба-НК (ДНК-диагностика). Наличие ДНК подтверждали методом ПЦР с соответствующей парой праймеров к области гена GAPDH.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование *LMP1*. На следующем этапе каждый образец ДНК изучали на присутствие гена LMP1 с помощью «гнездной» ПЦР, используя соответствующие пары праймеров: внешние – Eco3': 5'-TCCAGGAGAATTCCCCATCTCGAGAGTG-3' и 8785: 5'-CGACCCCAATCTGGATGTATTATTATGG-3'; и внутренние – Bam3': 5'-GTTTTCGTGGATCCTTATACAGTA-3' и 8702: 5'-GCTACCGATTCTGGCCATGAATCTGAC-3', как было описано ранее. Для секвенирования использовали метод, описанный Edwards et al., 1999 с небольшими модификациями. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом сиквенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant. Обработку данных секвенирования проводили с помощью программ Sequence Scanner v.1.0, Vector NTI и Mega v. 2.1.

Классификация гена LMP1. Полученные варианты LMP1 анализировались в соответствии с предложенными ранее классификациями (Mainou, 2006; Sandvej *et al.*, 1997; Walling *et al.*, 1999).

Филогенетический анализ. Полученные последовательности гена *LMP1* ВЭБ с использованием компьютерной программы Vector NTI транслировались в аминокислотные последовательности, после чего проводился филогенетический анализ. Для построения филогенетического древа использовался метод «ближайших соседей» (neighbor-joining, Кимура 2-параметр) с использованием программы MEGA v.2.1. В качестве контрольных последовательностей использовались последовательности прототипного низкодивергентного LMP1-B95-8 и высокотуморогенного LMP1-Cao, полученные из открытых баз данных PubMed и GenBank .

Результаты и обсуждение

В проведенном исследовании приняли участие две группы взрослых здоровых доноров, постоянно проживающих на территории Хабаровского края РФ: 19 человек коренного населения (нанайцы) в возрасте от 24 до 58 лет (медиана возраста – 45,7 лет), мужчин 9 (50%), женщин – 10 (53%); и 28 человек пришлого населения (преимущественно русской национальности) в возрасте от 28 до 63 лет (медиана возраста – 46,1 лет), мужчин 13 (46%), женщин – 15 (54%). У доноров обеих групп собирались образцы крови и смывы ротоглотки для исследования на присутствие ДНК вируса Эпштейна-Барр. ДНК-анализ полученного материала выявил, что в обеих изучаемых группах - коренного населения, проживающих в поселке на правобережье р.Амур, в также пришлого населения среди жителей г. Комсомольска-на-Амуре, инфицированность ВЭБ достигала 100%.

Используя ДНК вируса, нами проведена амплификация и секвенирование образцов основного вирусного онкогена *LMP1*. Анализ полученных данных показал, что ни один из исследованных *LMP1* ВЭБ не содержал «Cao» делецию 30 п.н., характерную для LMP1 ВЭБ от больных нРНГ из Юго-Восточной Азии. Неожиданным стало выявление образца FEn14.3, полученного от представителя коренного населения, содержащего вариант LMP1 с Cao-специфической мутацией в 212-м положении (G212S), которая приходится на первый сайт распознавания HOS-белков (одного из компонентов E3-лигазы, участвующего в процессинге молекулы IkB - супрессора NF-кB). В тоже время абсолютно все LMP1 ВЭБ из тестируемых нами образцов биологического материала имели характерную для Cao-вариантов LMP1 замену в 366-м (серин на треонин) положении. Кроме того, в ряде последовательностей LMP1 из обеих анализируемых групп удалось выявить дополнительные Cao-специфические мутации, например, замена глутамина на аргинин в 334-й позиции. Вместо типичной для Cao-варианта LMP1 ВЭБ замены в 328-м положении глутаминовой кислоты на аланин в

изученных нами образцах LMP1 мы выявили модифицированную замену в том же положении глутаминовой кислоты на глутамин. При этом данная замена не является типичной для европейских образцов, но распространена среди анализируемых образцов LMP1 ВЭБ у населения дальнего востока России. Вероятно, выявление данной мутации связано с географической близостью эндемичного для ВЭБ региона – КНР, а также активной взаимной миграцией населения пограничных районов РФ и КНР. В образце LMP1 FEn10.3, амплифицированном из смыва ротоглотки коренного населения Хабаровского края, нами обнаружена важная замена аспарагиновой кислоты на глутаминовую в 210-м положении. Известно, что данная аминокислота необходима для связывания HOS белков, что может опосредованно привести к активации NF-κB. Кроме того, в большинстве анализируемых последовательностей LMP1 ВЭБ у обеих групп выявлена замена гистидина на пролин в 358-й позиции. Указанная замена может приводить к нарушению способности этого белка связывать HOS белки. Таким образом, анализ аминокислотных последовательностей LMP1 ВЭБ, полученных от коренных жителей дальнего востока России и пришлого для данного региона населения, выявил ряд отличий, которые, при воздействии дополнительных факторов окружающей среды, могут носить критический характер в канцерогенезе ВЭБ-ассоциированных доброкачественных и злокачественных новообразований.

Полученные последовательности анализируемых образцов онкогена *LMP1* ВЭБ были транслированы в аминокислотные последовательности онкобелка LMP1 с использованием пакета компьютерных программ Vector NTI. Филогенетический анализ полученных таким образом аминокислотных последовательностей LMP1 позволил выявить гетерогенность исследуемых образцов вирусного онкогена (рис.1). Среди обеих исследованных групп LMP1 не удалось выявить преобладание одного варианта, как это показано для LMP1 ВЭБ, выделенных от жителей европейской части РФ, где доминируют варианты LMP1, относящиеся к низкодивергентному штамму B95.8b, для представителей которого характерен низкий уровень дивергенции - 3-4 критические замены а.к. по сравнению с прототипным вариантом LMP1-B95-8. Следует также отметить, что доминирование низкодивергентной группы LMP1-B95.8b отмечено только на территории европейской части России (Смирнова и др., 2008), в остальных странах мира представители этой группы встречаются спорадически, а превалирующее число исследованных вариантов LMP1 относится к высокодивергентным штаммам China1, NC, Med+ и ряда других (Edwards et al., 1999). В проведенном исследовании, все изучаемые варианты LMP1 ВЭБ равномерно

распределены между низко- и высокодивергентными штаммами LMP1 – B95-8b, Med+, Med-, China1 и NC. Использование компьютерной базы данных (PubMed) позволило наглядно продемонстрировать степень генетического родства анализируемых образцов LMP1, амплифицированных из полученных биологических образцов здорового пришлого и коренного населения дальнего востока РФ, постоянно проживающих на территории Хабаровского края, с высокотуморогенным (LMP1-Cao) и прототипным низкотуморогенным (LMP1-B95-8) штаммами этого вирусного онкобелка.

Заключение

До сих пор роль ВЭБ в возникновении патологий, ассоциированных с этим вирусом, в неэндемичных регионах остается невыясненной. В данной работе впервые удалось определить разнообразие вариантов ВЭБ, персистирующих у здорового населения Дальнего Востока России. Выявленные генетические отличия в изучаемых последовательностях LMP1 ВЭБ позволяют предполагать уникальные свойства таковых по сравнению с образцами LMP1, выявленными у жителей европейской части РФ. В частности, обнаруженные аминокислотные замены в 212, 328 и 366 положениях молекулы LMP1, характерные для его высокотуморогенных вариантов, могут придавать этому онкобелку агрессивные характеристики. Дальнейшие исследования свойств уникальных для жителей Дальнего Востока РФ вариантов LMP1, позволят нам уточнить имеющуюся информацию об особенностях механизмов канцерогенеза для неэндемичных регионов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научно-исследовательских проектов № 14-04-01810а и № 15-34-70031мол_а_мос.

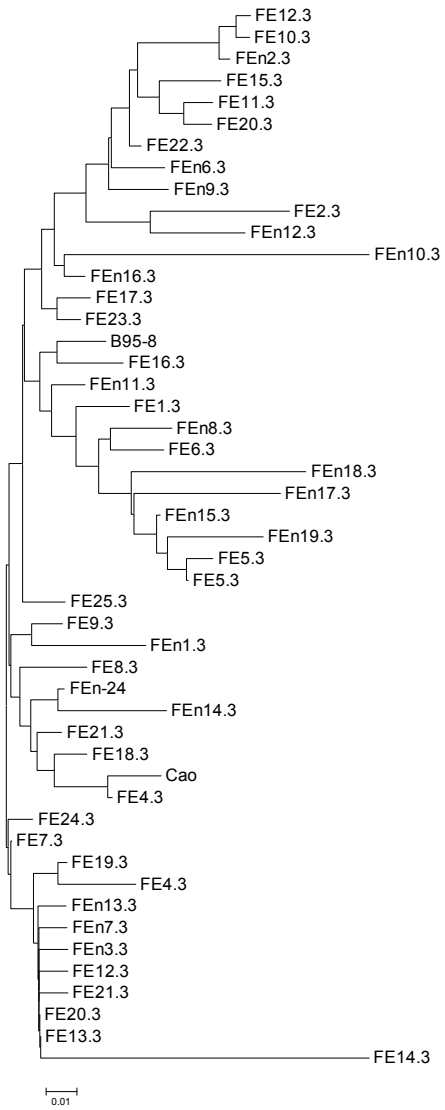


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнения аминокислотных последовательностей образцов LMP1 ВЭБ российского происхождения, полученных от коренных жителей Дальнего Востока России (FEn) и пришлого для данного региона населения (FE), с прототипным LMP1-B95.8 и высокотуморогенным LMP1-Cao (метод «ближайших соседей» (Кимура 2-параметр) с использованием программы MEGA v.2.1).

Список литературы

1. Смирнова К.В., Дидук С.В., Яковлева Л.С., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Кичигина М.Ю., Михайлова Н.А., Степина В.Н., Огородникова Е.В., Османов Е.А., Павлиш О.А., Гурцевич В.Э.. Молекулярная эпидемиология гена *LMP1* вируса Эпштейна-Барр: генетические варианты у больных опухолями лимфоидного и эпителиального происхождения в России. Мол. Медицина, 2010, № 1, с. 46-53.
2. Baichwal V.R. and Sudgen B. Transformation of Balb3T3 by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. Oncogene, 1988, v.5, pp. 461-467.
3. Corvalan A. et al., Association of a distinctive strain of Epstein-Barr virus with gastric cancer. Int. J. Cancer: 2006, 118, 1736-1742.
4. Edwards R.H., Sitki-Green D., Moore D.T. et al. Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma. J. Virol., 2004, v. 78, pp. 868-881.
5. Edwards R., Seillier Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acids changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. Virology, 1999, v. 261, pp. 79-95.
6. Kieff E. and A. Rickinson, Epstein-Barr virus and its replication, p.2511-25736. In D.N. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus (ed.), Virology, 4rd ed., Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia Pa, 2001, pp. 2511-2573
7. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. J. Virol., 2006, v. 80, pp. 6458-6468.
8. Rickinson A. and E. Kieff, Epstein-Barr virus. In D.N. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus (ed.), Virology, 4rd ed., Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia Pa , 2001, pp. 2573-2627.
9. Walling D., Shebib N., Weaver S., Nichols M.,. Flaitz C., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. J. Infect. Dis., 1999, v. 179, pp. 763-774.
10. Walling D. et al., Multiple Epstein-Barr Virus Infection in Healthy Individuals. J. Virology, 2003, pp. 6546-6550.

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОБЕЗЬЯНАХ

Давыдкин В.Ю., Лапин Б.А.**, Мелихова А.В.*, Джикидзе Э.К.** Давыдкин И.Ю.*, Кебу Т.И.**, Климова Э.В.* **, Холодилова Л.И.***

** ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, Москва, Россия*

*** ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия*

**** МИРЕА (институт МИТХТ), Москва, Россия*

Резюме

Целью настоящего исследования являлась оценка терапевтической эффективности комбинированных препаратов при острых кишечных инфекциях (ОКИ) у обезьян.

Комбинированные препараты на основе сочетания иммуноглобулинового комплексного препарата (КИП) и антибиотиков (левомицетин, офлоксацин) готовили в лабораторных условиях в МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского.

Для изучения терапевтической эффективности препаратов из болеющих ОКИ с диарейным синдромом обезьян вида макак резус и макак яванский было сформировано 4 группы общей численностью 28 обезьян. Диарейный синдром – частый жидкий стул со зловонным запахом без патологической примеси от 6 до 8 раз в сутки, умеренная сниженная активность. Состояние обезьян оценивалось как среднетяжелое. Для лечения использовали следующие препараты:

Группа 1 (опытная) получала комбинированный препарат в твердых желатиновых капсулах № 1 (1 капсула один раз в день). Каждая капсула содержала 0,30 г препарата: 0,15 г офлоксацина и 0,15 г КИП.

Группа 2 (опытная) получала комбинированный препарат в твердых желатиновых капсулах № 0 (1 капсула один раз в день). Каждая капсула содержала 0,42 г препарата: 0,30 г левомицетина (хлорамфеникола) и 0,12 г КИП.

Группа 3 (контрольная) получала левомицетин сукцинат натрия (хлороцид С) внутримышечно в дозе 50 мг/кг веса (один раз в день).

Группа 4 (контрольная) получала офлоксацин в таблетках в дозе 0,2 г (1 таблетка 1 раз в день).

Резутаты исследований:

Группа 1 - 7 макаков резусов обоего пола в возрасте от 4,2 до 12,1 лет, весом 3,1–8,4 кг (средний вес – 5,0 кг).

Средняя длительность периода полной нормализации стула и выздоровления – 12,1 дней.

Группа 2 - 7 макаков резусов обоего пола в возрасте от 2,4 до 16,6 лет, весом 3,0–6,6 кг (средний вес – 5,6 кг).

Средняя длительность клинических проявлений болезни – 9,6 дней.

Группа 4 – 7 самок макаков резусов в возрасте от 5,1 до 13,0 лет, весом 3,7–6,2 кг (средний вес – 4,7 кг).

Средняя длительность периода нормализации стула – 9,2 дня.

Группа 3 – 7 макаков яванских обоего пола в возрасте от 1,1 до 20,0 лет, весом 1,0–5,5 кг (средний вес – 3,2 кг).

Эта группа была сформирована специально для подтверждения потери левомицетином антибактериальной активности, произошедшей после более чем сорокалетнего его эффективного применения при терапии данной ОКИ в питомнике института. В последующем переведена на лечение офлоксацином в таблетках.

Показано, что комбинированный препарат (группа 2), включающий левомицетин в дозе 0,3 г и комплексный иммуноглобулиновый препарат в дозе 0,12 г, по терапевтической эффективности:

1 - не уступал таблеткам офлоксацина 0,2 г (группа 4), что подтверждается обработкой результатов экспериентов с помощью непараметрического критерия Мэнн-Уитнея, свидетельствующей при уровне достоверности 99 % об отсутствии различия средних характеристик сравниваемых групп по длительности клинических проявлений заболевания (9,6 и 9,2 дней соответственно).

2 - намного превосходил инъекционный левомицетин сукцинат натрия при том, что обезьяны сравниваемых групп (группы 2 и 3) получали левомицетин примерно в одинаковых дозах (300 мг антибиотика в капсуле соответствует 50 мг/кг для животного весом 6 кг).

По мнению авторов, объяснить полученный терапевтический эффект сменой лекарственной формы левомицетина (с инъекционной на капсульную) или одним только действием сниженной дозы КИП не представляется возможным. Предполагается, что благодаря КИП произошло ослабление популяции условно-патогенных микроорганизмов, а возможно и уменьшение их устойчивости к левомицетину. В любом случае был реализован один из принципов борьбы с антибиотикорезистентностью, заключающийся в одновременном обеспечении в организме различных механизмов антибактериального действия. Делается вывод о целесообразности проведения дальнейших углубленных исследований в этом направлении с использованием узконосых обезьян семейства мартышковых.

EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFICACY OF THE DRUG COMBINATIONS ON MONKEYS

*Davydkin VU *, Lapin BA **, Melikhova AV *, Dzhikidze EK **, Davydkin IU *, Kebu TI **, Klimova EV***, Holodilova LI. ***

** FBRI Gabrichevskiy' MRIEM, Moscow, Russia*

*** FSBSI Institute of Medical Primatology (RIMP), Sochi, Russia*

**** The Institute of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia*

Abstract

The aim of this study was to evaluate the therapeutic efficacy of the drug combinations in acute intestinal infections (AII) of monkeys.

The drugs combinations based on a combination of complex immunoglobulin preparation (CIP) and antibiotics (chloramphenicol, ofloxacin) were prepared in the laboratory of FBRI Gabrichevskiy' MRIEM.

Four groups (total 28 animals) of Macaca mulatta and Macaca fascicularis were formed to study the therapeutic efficacy of drug combinations in all the monkeys with diarrhea syndrome. (Diarrheal syndrome was defined as loose stools with the fetid odor, without pathological impurities, 6 to 8 times a day, together with a moderate decrease in activity). Clinical status of monkeys was assessed as moderate. For monkey treatment the following drug combinations were used:

Experimental group 1 received a drug combination placed in hard gelatin capsules № 1 (one capsule once a day). Each capsule contains 0.30 g of the drugs: 0.15 g of CIP and 0.15 g of ofloxacin.

Experimental group 2 received a drug combination placed in hard gelatin capsules № 0 (1 capsule once a day). Each capsule contains 0.42 g of the drugs: 0.30 g of chloramphenicol and 0.12 g of CIP.

Control group 3 received chloramphenicol sodium succinate (chlorocid C) intramuscularly at a dose of 50 mg / kg (once a day).

Control group 4 received ofloxacin tablets at a dose of 0.2 g (1 tablet 1 per day).

RESULTS

The group 1 consisted of 7 rhesus monkeys of both sexes, 4.2 - 12.1 y.o., weigh 3,1-8,4 kg (medium weight - 5.0 kg). In this group of animals the average duration of the full stool normalization period and complete recovery was 12.1 days.

Group 2 consisted of 7 rhesus monkeys of both sexes, 2.4 - 16.6 y. o., weigh 3,0-6,6 kg (medium weight - 5.6 kg). In this group of animals the average duration of the clinical manifestations of the disease was 9.6 days.

Group 4 included 7 female rhesus monkeys, 5.1 - 13.0 y. o., weigh 3,7-6,2 kg (medium weight - 4.7 kg). The average duration of the period of normalization of stool - 9.2 days.

Group 3 consisted of 7 cynomolgus macaques of both sexes, 1.1 - 20.0 y. o., weigh 1,0-5,5 kg (medium weight - 3.2 kg). This group was specially formed to confirm the loss of chloramphenicol antibacterial activity that occurred after more than forty years of its effective application in the AII treatment in the IMP nursery. These animals were subsequently treated with ofloxacin pills.

It is shown that the drugs combination (chloramphenicol at dose 0.3 g and CIP at a dose of 0.12 g, group 2) in terms of therapeutic efficacy:

1 – were at least as effective as an ofloxacin pills (0.2 g, group 4), which was confirmed by the statistical analysis using the nonparametric Mann-Whitney test, showing that at confidence level of 99% was the no differences in the average performance of comparable groups for the duration of the clinical manifestations of the disease (9,6 and 9.2 days, respectively).

2 – the drugs combination was far superior to injectable chloramphenicol sodium succinate. Monkeys of both groups (2 and 3) received chloramphenicol at approximately the same dose (300 mg antibiotic per capsule which corresponds to 50 mg / kg for 6 kg animal weight).

It is suggested that it is not possible to explain the resulting therapeutic effect by changing the chloramphenicol form preparation (an injection instead of a capsule) or by only the action of the reduced dose of CIP. We assume that CIP caused the weakening of a population of opportunistic microorganisms, and possibly reduce their resistance to chloramphenicol. In any case, one of the principles to overcome an antibiotic resistance was realized, based on simultaneous action various antibacterial mechanisms. We conclude that it is expedient to continue the further in-depth research in this area using the Old World monkeys (Cercopithecidae).

«Современные готовые комбинированные препараты являются важным вкладом в арсенал лекарственных средств. В ряде случаев они облегчают проведение фармакотерапии, расширяют ее границы, исключают необходимость экстемпорального приготовления рецептурных прописей» [1].

Созданием комбинированных средств с включением в одну лекарственную форму двух и более антибактериальных препаратов

достигается несколько преимуществ, в том числе эффективность в случае, если возбудитель устойчив к одному из компонентов, и снижение риска возникновения резистентности микроорганизмов к антибиотикам широкого спектра действия или перекрестной устойчивости. Что особенно важно, исходя из ширящейся множественной лекарственной резистентности микроорганизмов, приобретающей в последнее время угрожающие масштабы [2]. По нашему мнению, перспективными с этой точки зрения могут оказаться комбинированные препараты на основе сочетания синтетического антибактериального и иммунобиологического компонентов, например, антибиотика и комплекса сывороточных иммуноглобулинов.

Целью настоящего исследования являлась оценка терапевтической эффективности комбинированных препаратов при острых кишечных инфекциях (ОКИ) у обезьян.

Комбинированные препараты на основе сочетания иммуноглобулинового комплексного препарата (КИП) и антибиотиков (левомицетин, офлоксацин) готовили в лабораторных условиях, для чего приготовленный патентованным способом [3] лиофилизированный КИП для улучшения его реологических характеристик измельчали до состояния порошка в электромагнитном диспергаторе. Субстанции антибиотиков производства Northeast General Pharmaceutical Factory (Shenyang, P.R. China) помолу не подвергали. Измельченный порошок КИП со специфической активностью (титр против сальмонелл в реакции РПГА) 1:640 смешивали с антибиотиком в заданном соотношении и затем заполняли полученной смесью твердые желатиновые капсулы на лабораторной машине МС-1 (Италия). Учитывая устойчивость антибиотиков и КИП [4] к воздействию секретов желудка, кислотоустойчивое покрытие на капсулы не наносили.

Для изучения терапевтической эффективности препаратов из болеющих ОКИ с диарейным синдромом [5] обезьян вида макак резус и макак яванский было сформировано 4 группы общей численностью 28 обезьян в возрасте от 1,1 до 20,0 лет и весом 1,0-8,4 кг. Диарейный синдром – частый жидкий стул со зловонным запахом без патологической примеси от 6 до 8 раз в сутки, умеренная сниженная активность. Состояние обезьян оценивалось как среднетяжелое.

Особенностью этой кишечной инфекции является то, что до настоящего времени возбудитель однозначно не выявлен. Возможна этиологическая связь с вирусами и простейшими. Однако, количественное возрастание в кишечном содержимом, а также нередкое обнаружение в мезентериальных лимфоузлах, печени и селезенке представителей условно-патогенной флоры - родов *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*), *Citrobacter* (*C. freundii*),

Klebsiella (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), *Morganella* (*M. morganii*) и *Enterobacter* (*E. aerogenes*), позволяет считать вклад этих микроорганизмов в возникновение ОКИ существенным.

Для лечения использовали следующие препараты:

Группа 1 (опытная) получала комбинированный препарат в твердых желатиновых капсулах № 1 (1 капсула один раз в день). Каждая капсула содержала 0,30 г препарата: 0,15 г офлоксацина и 0,15 г КИП.

Группа 2 (опытная) получала комбинированный препарат в твердых желатиновых капсулах № 0 (1 капсула один раз в день). Каждая капсула содержала 0,42 г препарата: 0,30 г левомицетина (хлорамфеникола) и 0,12 г КИП.

Группа 3 (контрольная) получала левомицетин сукцинат натрия (хлороцид С) внутримышечно в дозе 50 мг/кг веса (один раз в день).

Группа 4 (контрольная) получала офлоксацин в таблетках в дозе 0,2 г (1 таблетка 1 раз в день).

Проводилось бактериологическое исследование фекалий до, и после окончания лечения. Осуществлялось динамическое отслеживание клинических проявлений и состояния животных - внешний вид, поза, активность, аппетит, агрессивность, частота и характер стула - ежедневно в процессе лечения и после его окончания в течение 7 дней. Наблюдение за животными продолжалось в течение 2-3 недель.

В качестве основного критерия терапевтической эффективности препаратов использовали среднюю длительность клинических проявлений острой кишечной инфекции.

Анализ микробиоты кишечника обезьян перед началом эксперимента и на 14 день лечения показал следующее. В результате первичного исследования перед началом дачи препаратов ни у одной обезьяны не выявлено патогенных представителей энтеробактерий. У всех животных дисбиоз оценивался как нарушение количественных и качественных соотношений микрофлоры кишечника 1 степени за счет снижения представительства бифидофлоры на 1-2 порядка, увеличения содержания кишечной палочки со слабой ферментативной активностью и наличия условно-патогенных микроорганизмов.

Группа 1 - 7 макаков резусов обоего пола в возрасте от 4,2 до 12,1 лет, весом 3,1–8,4 кг (средний вес – 5,0 кг).

Из условно патогенных микроорганизмов отмечено повышение содержания энтеробактерий, клебсиелл и стафилококков. Высокое содержание (до 10^8) клостридий, сниженное к концу эксперимента до 10^4.

Средняя длительность периода полной нормализации стула и выздоровления – 12,1 дней.

Группа 2 - 7 макаков резусов обоего пола в возрасте от 2,4 до 16,6 лет, весом 3,0–6,6 кг (средний вес – 5,6 кг).

Золотистый стафилококк, обнаруженный у 3 животных в концентрации 10^5 – 10^8, после лечения у двух обезьян полностью элиминирован и у одной выявлен в концентрации на 5 порядков меньше исходной (10^3). Концентрация протея, обнаруженного у всех приматов (10^5 – 10^7), у одной обезьяны осталась без изменений (10^5), у одной – снизилась на два порядка (10^3), у остальных протей был удален. Клебсиелла, найденная у двух обезьян, полностью элиминирована.

Средняя длительность клинических проявлений болезни – 9,6 дней.

Группа 4 – 7 самок макаков резусов в возрасте от 5,1 до 13,0 лет, весом 3,7–6,2 кг (средний вес – 4,7 кг).

Протей, выявленный у всех обезьян в концентрации 10^4 – 10^6, у трех животных удален, у четырех его содержание понизилось на два порядка (10^4). Концентрация клебсиеллы, найденной у двух обезьян (10^5 и 10^7), у одной снизилась до 10^2, у другой – до нуля. Содержание цитробактера, обнаруженного у двух обезьян (10^5), снижено на 3 и 4 порядка соответственно.

Средняя длительность периода нормализации стула – 9,2 дня.

Группа 3 – 7 макаков яванских обоего пола в возрасте от 1,1 до 20,0 лет, весом 1,0–5,5 кг (средний вес – 3,2 кг).

Эта группа была сформирована специально для подтверждения потери левомицетином антибактериальной активности, произошедшей после более чем сорокалетнего его эффективного применения при терапии данной ОКИ в питомнике института. Обезьянам вводили левомицетин сукцинат натрия в дозе 50 мг/кг веса внутримышечно в течение первых четырех дней эксперимента. Однако, как и ожидалось, каких-либо положительных сдвигов в терапии заболевания не наблюдалось. В связи с этим, во избежание дальнейшего ухудшения состояния животных и предотвращения нежелательных исходов, обезьян этой группы с пятого дня перевели на лечение офлоксацином в таблетках.

Анализ микробиоты кишечника животных пред началом эксперимента показал сходство количественного и качественного состава микрофлоры с таковой у обезьян 4 группы. Поэтому здесь он не приводится. По окончании курса лечения офлоксацином микрофлора полностью нормализовалась.

Итак, исследования показали, что комбинированный препарат (группа 2), включающий левомицетин в дозе 0,3 г и комплексный

иммуноглобулиновый препарат в дозе 0,12 г, по терапевтической эффективности:

1 - не уступал таблеткам офлоксацина 0,2 г (группа 4), что подтверждается обработкой результатов экспериентов с помощью непараметрического критерия Мэнн-Уитнея [6], свидетельствующей при уровне достоверности 99 % об отсутствии различия средних характеристик сравниваемых групп по длительности клинических проявлений заболевания (9,6 и 9,2 дней соответственно).

2 - намного превосходил инъекционный левомицетин сукцинат натрия при том, что обезьяны сравниваемых групп (группы 2 и 3) получали левомицетин примерно в одинаковых дозах (300 мг антибиотика в капсуле соответствует 50 мг/кг для животного весом 6 кг).

В чем же причина «обретения» левомицетином в капсульной форме комбинированного препарата активности против условно-патогенных микроорганизмов, циркулирующих в питомнике обезьян?

Объяснить установленный факт сменой лекарственной формы (с инъекционной на капсульную) и, следовательно, другим путем поступления в организм не представляется возможным из следующих соображений. Левомицетин – синтезированный в СССР в 1949 г. препарат, идентичный природному хлорамфениколу, продуцируемому грибом *Streptomyces venezuelae*, обладающий широким антибактериальным спектром в отношении многих грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, риккетсий, спирохет и некоторых крупных вирусов. Плохо растворимый в воде и хорошо растворимый в липидах при приеме внутрь легко всасывается из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Максимальная концентрация в крови достигается обычно через 2 часа и поддерживается в течение 6 – 8 часов. Легко преодолевает гематоэнцефалический барьер. В плевральной, перитонеальной и синовиальной жидкостях обнаруживается в концентрациях 30 – 50% от его уровня в крови. Оптимум действия левомицетина лежит в пределах pH от 2,0 до 9,0, то есть в кислой и нейтральной средах он достаточно устойчив, но инактивируется в щелочной среде [7]. Отсюда следует, что антибиотик, если по каким-либо причинам не произойдет его всасывания в верхних отделах ЖКТ, в активной форме до прямой кишки (основной зоны обитания вышеуказанных условно-патогенных микроорганизмов [8]) не дойдет, и рассчитывать на его местное действие в просвете кишки не приходится. Что касается скорости поступления препарата в кровь, то здесь инъекционная форма имеет явное преимущество перед пероральной.

Попытка объяснить достигнутый терапевтический эффект действием

одного только КИП также представляется неубедительной. Сравнение компонентного состава комбинированных препаратов показывает - в варианте с офлоксацином КИП на 30 мг больше, чем в варианте с левомицетином (150 и 120 мг соответственно), что в 2 раза ниже используемой для лечения ОКИ у детей дозы иммуноглобулинового препарата, составляющей 300 мг. При этом препарат, включающий 150 мг (на 50 мг меньше, чем в таблетке) эффективного антибиотика офлоксацина и половинную дозу КИП, обеспечил исчезновение клинических проявлений болезни в среднем за 12,1 дней, что более, чем на 25% превышает этот же показатель у препарата с левомицетином.

По нашему мнению, имело место следующее. Сниженного количества КИП в капсуле комбинированного препарата не хватило для проявления мощного, свойственного ему в нормальной дозировке, лечебного эффекта [9], но оказалось достаточно для ослабления популяции условно-патогенных микроорганизмов, а возможно и уменьшения их устойчивости к левомицетину. Что и позволило антибиотику проявить антибактериальную активность. В любом случае был реализован один из принципов борьбы с антибиотикорезистентностью, заключающийся в одновременном обеспечении в организме различных механизмов антибактериального действия, приводящих к быстрой гибели микробных клеток и в значительной степени затрудняющих развитие устойчивости у микроорганизмов.

И хотя эти механизмы на сегодняшний день хорошо изучены у обоих компонентов комбинированного препарата (левомицетин и КИП), целесообразно проведение дальнейших углубленных исследований в этом направлении с использованием узконосых обезьян семейства мартышковых.

Список литературы

1. http://doktor-lib.com/book/276-lekarstva-xx-veka/11-sovremennye-principy-sozdaniya-lekarstvennyx-sredstv.html.
2. Бюллетень Всемирной организации здравоохранения 2011;89:168–169. doi:10.2471/BLT.11.030311.
3. Пат. 2371200 RU, МПК A61K 39/395. Способ получения иммуноглобулинового препарата / Мелихова А.В., Давыдкин В.Ю., Алешкин В.А., Давыдкин И.Ю. (RU); ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора (RU). - № 2008122064/15; Заявлено 03.06.2008; Опубл. 27. 10.2009 г.
4. Доклинические испытания комплексного препарата КИП и B. adolescentis МС-42 / Давыдкин В.Ю., Джикидзе Э.К., Мелихова А.В., Кебу Т.И., Давыдкин И.Ю., Холодилова Л.И. // Мат. юбил. Всеросс. науч.-практич. конф. "Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения", посвящ. 90-летию Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора и 20-летию Приволжского окружного центра по проф. и борьбе со СПИД. - Н.Новгород: Издатель Гладкова, 2009. - с. 334-337.
5. Проблемы инфекционной патологии обезьян / Б.А. Лапин, Э.К. Джикидзе, Р.И. Крылова, З.К. Стасилевич, Л.А. Яковлева // М.: Издательство РАМН, 2004. – С. 48-49.
6. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1975. – 77 с.
7. G.D. Arnaudov. Pharmakotherapia. – Sofia: Editio Medicina et Phiscultura, 1975. – 1167 p.
8. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкина, С.С. Афанасьева, В.В. Поспеловой. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002. – 608 с.
9. Оценка на обезьянах реактогенности и эффективности лекарственных форм комплексного иммуноглобулинового препарата / Б.А. Лапин, В.А. Алешкин, В.Ю. Давыдкин, А.А. Воробьев, Э.К. Джикидзе, С.С. Афанасьев, З.К. Стасилевич, Т.И. Кебу, И.Ю. Давыдкин, И.В. Борисова, Т.Е. Гвоздик, В.А. Калашникова, А.Г. Гаврин, А.В. Зорик, Л.И. Новикова // Журнал микробиологии. - №3. – 2003. – С. 57-62.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КОКЛЮША НА ОБЕЗЬЯНАХ СТАРОГО СВЕТА.

Кубрава Дж.Т.[*], Синяшина Л.Н.[**], Матуа А.З.[*], Амичба А.А.[*], Шевцова З.В.[**], Семин Е.Г.[**], Медкова А.Ю.[**], Конджария И.Г.[*], Елистратова Ж.В.[*], Баркая В.С.[*], Миквабия З.Я.[*], Каратаев Г.И.[**]

[*]НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия

[**]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия.

Резюме

Несмотря на значительные успехи в изучении факторов вирулентности бактерий Bordetella pertussis, патогенез коклюша до сих пор изучен недостаточно, что объясняется отсутствием адекватной человеку экспериментальной модели этого заболевания. Целью работы являлось выяснение чувствительности к возбудителю коклюша приматов для

получения модели. На первом этапе было проведено сравнительное изучение клинико-лабораторных признаков инфекции у восьми трехлетних обезьян четырех видов (макаки резусы, макаки яванские, макаки японские и павианы гамадрилы) после интраназального заражения их вирулентным штаммом B. pertussis. У всех обезьян независимо от вида, на 7 – 10 дни наблюдалось катаральное воспаление слизистой носоглотки с колонизацией ее бактериями на протяжении 90 дней, лейкоцитоз и гипогликемия, активация фагоцитарной способности. Специфические противококлюшные антитела обнаруживались на 14-30 сутки, максимально возрастали на 60-90 сутки и постепенно снижались к 600 дню. После повторного заражения обезьян через 600 дней срок колонизации бактериями носоглотки сократился до 14 дней при отсутствии воспаления и других лабораторных показателей выявленных при первичной инфекции. При этом образование противококлюшных антител наблюдалось в более ранние сроки и в большей концентрации. Следующий опыт был проведен на шести макаках резусах (возраст 5 лет). После интраназального заражения наблюдалось воспаление слизистой носоглотки с колонизацией ее бактериями на протяжении 30 дней. На второй неделе были выявлены лейкоцитоз, гипогликемия и повышение фагоцитарной активности. Противококлюшные антитела обнаруживались на 30 день, их концентрация возрастала к 60 дню, и приближалась к исходному к 90 дню. При повторном заражении через шесть месяцев ни у одной из обезьян не было воспаления слизистой носоглотки, а сроки колонизации бактериями сократились до 20-30 дней. При этом наблюдалось более раннее образование противококлюшных антител, они обнаруживались уже на 14 день и сохранялись на этом уровне в течение трех месяцев.

Полученные данные свидетельствуют о том, что обезьяны 4 использованных видов чувствительны к возбудителю коклюша. Более подробно нами охарактеризован экспериментальный коклюш макак резусов протекающий с характерными для этой инфекции клинико-лабораторными признаками (без пароксизмального кашля), сопровождающийся иммунологической перестройкой с формированием иммунитета.

MODELING PERTUSSIS ON THE OLD WORLD MONKEYS

Kubrava D.T.[*], *Sinyashina L.N.*[**], *Matua A.Z.*[*], *Amichba A.A.*[*], *Shevtsova Z.V.*[**], *Semin E.G.*[**], *Medkova A.Yu.*[**], *Kondzariya I.G.*[*], *Elistratova Zh.V.*[*], *Barkaya V.S.*[*], *Mikvabia Z.Ya.*[*], *Karataev G.I.*[**]

[*] *Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia*

[**] *FSBI «N.F. Gamaleya Federal Scientific Research Center for Epidemiology and Microbiology» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia.*

Abstract

In spite of significant success in the research of virulence factors of Bordetella pertussis bacteria, the pertussis pathogenesis is still studied insufficiently, that is explained by the absence of the adequate experimental model for this illness. The goal of our work was the determination of primate sensitivity to Bordetella pertussis to obtain the model. At the first stage, the comparative research of clinico-laboratorial signs of infection in eight 3-year-old monkeys of four species (rhesus macaques, cynomoglus monkeys, Japanese macaques and и hamadryas baboons) after intranasal infection by the virulent strain of B. pertussis was performed. On 7 – 10 days, in all monkeys independently of species, catarrhal inflammation of nasopharynx mucous and its 90-day bacterial colonization, leucocytosis, hypoglycemia, activation of phagocytic ability were observed. Specific anti-pertussis antibodies were found on 14 – 30 days, maximally increased on 60 – 90 days and slowly decreased by 600 days. After 600 days at reinfection of monkeys the time of bacterial colonization became shorter to 14 days, there were no inflammation and other laboratory signs observed at the primary infection. At that, the formation of anti-pertussis antibodies was registered only at earlier time and in higher concentration. The next experiment was carried out on six rhesus macaques aged 5 years. After intranasal infection the inflammation of nasopharynx mucous together with its 30-day bacterial colonization were observed. At the second day, leucocytosis, hypoglycemia and increased phagocytic activity were found. Anti-pertussis antibodies were detected on the 30th day, their concentration increased to the 60th day and reached the initial level to the 90th day. After six months, at reinfection there were no found any inflammation of nasopharynx mucous in any monkey, and time of bacterial colonization became shorter to 20 – 30 days. At that, the earlier formation of anti-pertussis antibodies was observed, they were found already on the 14th day and remained at this level for 3 months.

Obtained data show that monkeys of 4 used species are sensitive to Bordetella pertussis. In more detail we characterized experimental pertussis in rhesus macaques progressing with clinico-laboratorial signs typical for this infection (without paroxysmal cough) and accompanied by immunological alteration with the formation of immunity.

В последние десятилетия достигнуты значительные успехи в изучении вирулентности и протективности бактерий *B.pertussis.* Для решения этих

вопросов была использована принятая Комитетом экспертов ВОЗ и Национальными институтами по стандартизации и контролю медицинских биологических препаратов «мышиная модель» коклюшной инфекции [1]. В то же время, патогенез заболевания, механизм и типы иммунного ответа, длительность персистенции возбудителя в макроорганизме, фазовый состав популяции бактерий и роль авирулентных форм в циркуляции возбудителя инфекции изучены недостаточно. Это объясняется отсутствием адекватной экспериментальной модели коклюша. Животные коклюшем не болеют, за исключением человекообразных обезьян, у которых описана вспышка в типичной для коклюша человека форме [2]. В литературе имеются сведения о воспроизведении ряда признаков коклюшной инфекции у тайваньских макак и у мармозет [1,3]. Однако, эти виды обезьян практически недоступны для экспериментов. Учитывая, что обезьяны являются адекватной моделью для изучения ряда инфекционных заболеваний человека [4] продолжаются исследования по получению экспериментальной модели коклюша на доступных для экспериментов низших обезьянах Старого Света [5,6].

Целью настоящей работы являлось выяснение чувствительности 4 видов низших обезьян к интраназальному заражению вирулентными бактериями *B. pertussis* и обследование их на наличие характерных для коклюша клинико-лабораторных показателей заболевания для получения экспериментальной модели.

В работе использовано 14 обезьян 4 видов: 6 макак резусов в возрасте 5 лет и 8 обезьян в возрасте 3 лет — 2 макака резуса,2 макака яванских, 2 макака японских и 2 павиана гамадрила. Материал для определения колонизации верхних дыхательных путей обезьян бактериями B. pertussis и персистенции возбудителя коклюша получали с задней стенки глотки с помощью назофарингеальных тампонов типа Dacron. Бактериологический посев проводили на селективную среду КУА (казеиново-угольный агар) с добавлением 25 мкг/мл ампициллина с последующей идентификацией выросших колоний: микроскопией после окраски по Граму и в реакции агглютинации со специфическими противококлюшными сыворотками к агглютиногенам B. pertussis 1.2.3 («Медгамал», ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ). Молекулярно-генетическое выявление бактерий B. pertussis проводили методом полимеразной цепной реакции с помощью разработанной авторами тест-системы [7]. Гематологические показатели определяли на анализаторе Particle Counter Model PCE -21. Концентрацию глюкозы в крови обезьян исследовали на анализаторе «Biochem SA» с помощью реагентов фирмы «HUMAN» (Германия). Исследование нейтрофильных гранулоцитов, их поглотительную (% ФАН) и

переваривающую способность (% ФПК в спонтанном и стимулированном НСТ-тесте) осуществляли по методическим рекомендациям И.В. Нестеровой и соавт. [8]. Для иммунофенотипирования популяций и субпопуляций лимфоцитов использовали моноклональные антитела к их кластерам дифференцировки по Новикову [9] с наборами «БААКИ» (Беларусь). Содержание общих сывороточных иммуноглобулинов классов M, G и A определяли методом радиальной иммунодиффузии в геле с использованием моноспецифических сывороток («ИмБио», Россия) [10]. Специфические иммуноглобулины класса IgG к коклюшному токсину (КТ) и филаментозному гемагглютинину (ФГА) определяли посредством иммуноферментного анализа с помощью набора «Ridascreen» (Германия). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007 и стандартных методов статистической обработки. Перед заражением и взятием назофарингеальных мазков животных усыпляли внутримышечным введением 0,03–0,04 мл золетила в концентрации 10 мг/мл (с премедикацией ксилазингидрохлоридом в дозе 20 мг/мл). В каждую ноздрю вводили $2x10^9$ живых вирулентных бактерий B. pertussis 231 в 0,5 мл фосфатного буфера pH 7,0–7,2.

В первом опыте провели сравнительное изучение чувствительности к вирулентным бактериям *B.pertussis* неполовозрелых обезьян четырёх видов Старого Света (в возрасте 3 лет): макаки резусы, макаки яванские, макаки японские и павианы гамадрилы - по две особи каждого вида. Животных заражали интраназально. Ни у одной из зараженных обезьян не было внешних клинических проявлений и характерного для типичной формы коклюша у людей пароксизмального кашля. При этом на первой неделе после заражения в слизистой носоглотки наблюдались выраженные катаральные явления с образованием слизи. Эти явления сопровождались колонизацией бактерий, ДНК которых определялась в течение 90 дней (ПЦР). С 7 по 14 дни после заражения регистрировался выраженный лейкоцитоз и гипогликемия. Количество лейкоцитов возрастало в 3 раза за счет нейтрофильных гранулоцитов. В этот же период наблюдалась их максимальная фагоцитарная активность (поглотительная и переваривающая). В количественных показателях адаптивного иммунитета (популяций и субпопуляций лимфоцитов) не было выявлено значимых изменений. При этом у всех зараженных обезьян специфические антитела класса IgG к КТ и ФГА обнаруживались на 14-30 сутки, максимально возрастали на 60-90 сутки и постепенно снижались к 600 дню (рис.1). На рисунке представлены значения относительного количества (ОК%) IgG к КТ + ФГА. Значение ОК% определялось из соотношения $ОК\%_i = ОП_i / ОП_{к+}$, где $ОП_i$ - оптическая

плотность измеряемого образца, $ОП_{к+}$ оптическая плотность стандартного образца положительной сыворотки человека).

С целью выяснения характера и длительности иммунологической перестройки, произошедшей после перенесения коклюшной инфекции, все обезьяны на фоне снижения уровня антител были заражены повторно интраназально тем же штаммом, в той же дозе спустя 600дней после первичного инфицирования (рис.1, обозначено стрелкой).

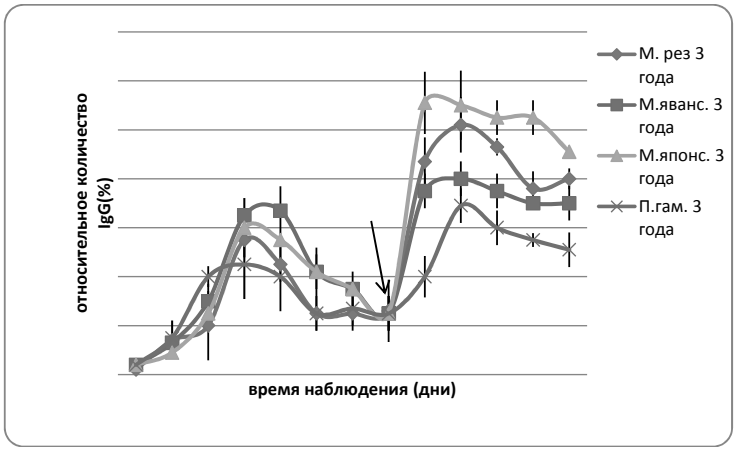


Рис. 1. Динамика изменения относительного количества IgG к КТ + ФГА в развитии инфекционного процесса у четырех видов обезьян после двухкратного интраназального введения животным вирулентных бактерий *B.pertussis 231*.

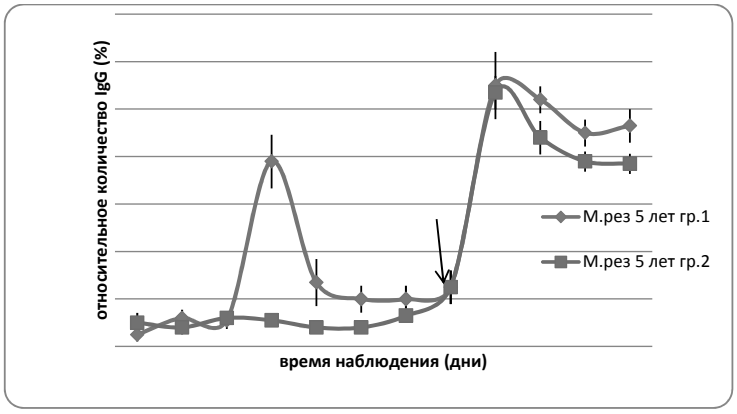


Рис. 2. Динамика изменения относительного количества IgG к КТ + ФГА в развитии инфекционного процесса после двухкратного интраназального введения макакам резусам вирулентных бактерий *B.pertussis 231*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что у обезьян 3-5 лет независимо от вида и возраста, при первичном интраназальном заражении бактериями *B.pertussis,* несмотря на отсутствие пароксизмального кашля, наблюдаются характерные для коклюша клинико-лабораторные признаки. Было выявлено катаральное воспаление слизистой носоглотки с колонизацией ее бактериями *B.pertussis*. Развитие инфекционного процесса сопровождалось лейкоцитозом, гипогликемией и активацией факторов врожденного иммунитета. Также наблюдалась активация В-звена иммунной системы – небольшое увеличение процентного содержания $CD19^+$ В-клеток, повышение уровня общих иммуноглобулинов и выработка специфических противококлюшных антител. При повторном заражении у всех обезьян отсутствовало катаральное воспаление слизистой носоглотки. Единичные бактериальные колонии и их ДНК определялись в более короткие сроки, чем при первичном, что свидетельствовало о быстрой элиминации возбудителя. При этом не наблюдались лейкоцитоз и гипогликемия, отмечавшиеся после первичного заражения. Особенно ярко проявился бустерный эффект (ускоренная и в больших концентрациях выработка специфических антител против ФГА и КТ – основных протективных антигенов возбудителя коклюша). Это свидетельствовало о произошедшей после первичного заражения иммунологической перестройке с формированием иммунитета. Определённые нами показатели экспериментального коклюша у обезьян разных видов в возрасте от 3-х до 5-ти лет соответствовали клиническим и лабораторным показателям коклюша, протекающего у людей в стертой форме, у вакцинированных детей до года, а также подростков и взрослых [11, 12]. Поскольку не выявлено значимых отличий у использованных 4 видов обезьян в показателях экспериментальной коклюшной инфекции, представленные результаты позволяют предложить для моделирования использовать хорошо адаптированных к размножению в питомниках и более доступных для работы макак резусов.

Список литературы

1. Elahi Sh., Holmstrom J., Gerdts V. The benefits of using diverse animal models for studying pertussis.// TRENDS in Microbiology 2007; 15(10): 462-468.
2. Gustavsson O.E.A., Roken B.O., Serrander R. An epizootic of whooping cough among chimpanzees in zoo. // Folia Primatol (Basel). 1990; 55(1): 45-50.
3. Huang C.C., Chen P.M., Kuo J.K. et.al. Experimental whooping cough. //The new England J. Medicin, 1962; 266(18):107-111.

4. Лапин Б.А. Некоторые актуальные направления медико-биологических исследований на приматах. //Перспективные направления использования лабораторных приматов в медико-биологических исследованиях.-2006, Сочи-Адлер.- С.11-18.
5. Кубрава Д.Т., Медкова А.Ю., Синяшина Л.Н. и др. Экспериментальный коклюш у обезьян. //Вестник РАМН, 2013, №8. С.28-33.
6. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K. et.al. Nonhuman primate model of Bordetella pertussis .// Inf.Immun. 2012; 80(4):1530-1536.
7. Патент RU2213557
8. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А. Комплексное трехуровневое исследование системы нейтрофильных гранулоцитов с возможной диагностикой ИДС при различной патологии. // Методические рекомендации, Краснодар. 1996.- №9, 6/11, 22.
9. Новиков П.Д., Новиков Д.К. Сравнительная характеристика современных методов иммунофенотипирования лимфоцитов. //Иммунопатология, аллергология и инфектология, 2000, 1, 62-66.
10. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. //Руководство по клинической иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медия, 2009. С. 98-99.
11. Медкова А.Ю., Аляпкина Ю.С, Синяшина Л.Н., и др. Выявление инсерционных авирулентных bvg-мутантов Bordetella pertussis у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и практически здоровых людей. // Детские инфекции. 2010.- №4.- С. 19-22.
12. Тимченко В.Н. Инфекционные болезни у детей. СПб.: Спец- Лит. 2006. С. 87-96.

ДЕТЕКЦИЯ ЭНТЕРОВИРУСА И НОРОВИРУСА У ОБЕЗЬЯН АДЛЕРСКОГО ПРИМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА

Кебурия В.В., Корзая Л.И., Агумава А.А., Догадов Д.И., Гончаренко А.М.

ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия

Резюме

Целью настоящей работы было выявление энтеровируса и норовируса у обезьян разных видов Адлерского питомника с дальнейшим подбором праймеров для секвенирования полученных изолятов вирусов.

Исследование проводили на базе лаборатории инфекционных вирусов ФБГНУ НИИ МП с использованием материалов от обезьян, собранных в период 2012 -2015 гг. в Адлерском питомнике.

Материалы и методы. Всего в работе было исследовано 395 фекальных проб от обезьян различных видов: 138 – от макак резусов (*Macaca mulatta*), 116 – от макак яванских (*Macaca fascicularis*), 32 – от павианов гамадрилов (Papio hamadryas), 109 - от мартышек зеленых (*Cercopithecus aethiops*).

В работе использовали два метода определения вирусных агентов – ПЦР и ИФА. Для определения РНК энтеро- и норовируса, а также Ag норовируса были использованы коммерческие тест-системы. Кроме этого, для определения РНК энтеровируса применяли подобранные нами праймеры к VP1 области вирусного генома.

Результаты исследований. РНК энтеровируса с помощью коммерческой тест-системы была выявлена у 12/52 (23,5±5,9%) животных, а с помощью праймеров к VP1 - у 12/36 (33,3±7,8%). Совпадение результатов отмечалось у 6/23 (27,3±9,3%) обследованных животных.

Специфичность детекции 5-ти РНК-позитивных проб энтеровируса была подтверждена прямым секвенированием амплифицированных фрагментов величиной 247 нуклеотидов. Поиск BLAST в базе данных NSBI подтвердил принадлежность амплифицированных последовательностей к участку генома энтеровируса VP1 WUHARV Enterovirus 1.

РНК норовируса была определена у 11/54 (20,4±5,5%) обезьян. Следует отметить, что первый генотип РНК норовируса был выявлен у 9/11(81,8%) животных, а второй генотип - у 2/11 (18,2%). Антиген норовируса был обнаружен только у 12/253 (4,7±1,3%) обследованных обезьян.

Заключение. Энтеровирус может играть определенную роль в патологии желудочно-кишечного тракта обезьян. Вместе с тем, он обнаруживается и в материалах от «клинически» здоровых животных, что свидетельствует также и о носительстве этого вирусного агента. Подобранные нами праймеры для определения РНК энтеровирусов обезьян могут быть использованы для дальнейшей диагностической работы.

Данные по выявлению РНК и Ag норовируса в материалах от обезьян являются новыми. Обнаружение у обезьян I и II генотипа норовируса свидетельствует о циркуляции штамма человека. Планируется подбор праймеров для дальнейшего выделения и секвенирования изолятов норовируса от обезьян.

DETECTION OF ENTEROVIRUS AND NOROVIRUS IN ADLER PRIMARE CENTER MONKEYS

Keburiya V.V., Korzaya L.I., Agumava A.A., Dogadov D.I., Goncharenko A.M.

FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia

Abstract

The aim of this work was to identify enterovirus and norovirus infections in different monkey species at Adler primate center colony. The second goal was to select the primers for viral isolates sequencing.

The study was carried out in laboratory of infectious viruses using materials from Adler colony monkeys collected in the period of 2012 -2015 years.

MATERIALS AND METHODS. Total 395 monkey fecal samples, of which 138 from Rhesus macaques (Macaca mulatta), 116 from Cynomolgus macaques (Macaca fascicularis), 32 from baboons (Papio hamadryas), and 109 from African green monkeys (Cercopithecus aethiops) were examined.

We used two methods for viral agent determination - PCR and ELISA. Commercial test systems for the norovirus and enterovirus RNA, as well as norovirus Ag were used. Furthermore, the primers for VP1 enterovirus RNA regions were selected.

RESULTS. Using commercial test system we detected enterovirus RNA in 12/52 (23,5 ± 5,9%) animals, and using primers to VP1 - in 12/36 (33,3 ± 7,8%). The coincidence of the results observed in 6/23 (27,3 ± 9,3%) animals.

To confirm RNA detection specificity we sequenced 5 amplified fragments (247 nucleotides). Comparison of our results with data from NSBI by BLAST showed that the amplified sequences really belong to WUHARV strain of enterovirus VP1 region.

Norovirus RNA was found in 11/54 (20,4 ± 5,5%) monkey samples. It should be noted that the genotype 1 of norovirus RNA was detected in 9/11 (81.8%) animals and the genotype 2 was determined in 2/11 (18.2%) monkeys. Norovirus antigen was detected in only 12/253 (4,7 ± 1,3%) monkeys.

CONCLUSION. Enterovirus may play a role in the monkey gastrointestinal tract pathology. However, it was also found in the materials from the 'clinically' healthy animals evidencing that monkeys may be pathology-free virus carriers. Our selected primers can be used for the enterovirus RNA diagnostics in monkeys.

For the first time we were able to determine both RNA and antigen of norovirus in monkey materials. Detection of noravirus genotypes 1 and 2 in monkeys indicates human origin of circulating strain. We plan to continue the primer selection for subsequent monkey noravirus isolation and sequencing.

О роли вирусных агентов при кишечных инфекциях у обезьян все еще мало что известно. Основные работы были проведены на этапе становления вирусологии, в середине XX века. Энтеровирусы выделяли из культуры

клеток приматов, первичных клеточных культур, образцов, полученных от содержащихся в неволе или пойманных обезьян, используемых в биомедицинских исследованиях. [13]. Серологические исследования показали, что некоторые из энтеровирусов обезьян могут передаваться от приматов к человеку, и что человек так же может передавать энтеровирусы некоторых приматам [8].

В настоящее время, Исполнительный Международный комитет по таксономии вирусов утвердил классификацию, основанную на геномных характеристиках вирусов, сходства последовательности нуклеотидов и биологических свойств (ICTV, 2012 г.) От обезьян выделено 20 серотипов энтеровируса, которые входят в 3 группы HEV-A HEV-B HEV-D и неклассифицированные вирусы рода. [9, 11]

Семейство Caliciviridae включает 6 родов [6]. Norovirus обусловливают возникновение эпидемий острого гастроэнтерита в различных странах как у детей так и пожилых людей [4,5]. На основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генома среди норовирусов выделяют семь геногрупп I - VII. Геногруппы I, II, IV выделены исключительно от человека, III и V от животных – свиньи, собаки.[3,10]. Наиболее распространенной является геногруппа II норовирусов, на долю которой приходится до 80% - 90% всех случаев [12].

Имеются лишь единичные работы, свидетельствующие о спонтанной норовирусной инфекции у обезьян рода макак с наличием антител к норовирусу [7].

Целью настоящей работы было выявление энтеровируса и норовируса у обезьян разных видов Адлерского питомника с дальнейшим подбором праймеров для секвенирования полученных изолятов вирусов.

Материалы и методы

Исследование проводили на базе лаборатории инфекционных вирусов ФБГНУ НИИ МП с использованием материалов от обезьян, собранных в период с 2012 -2015 гг. в Адлерском питомнике.

Материалы и методы. Всего в работе было исследовано 395 фекальных проб от обезьян различных видов: 138 – от макак резусов (*Macaca mulatta*), 116 – от макак яванских (*Macaca fascicularis*), 32 – от павианов гамадрилов (Papio hamadryas), 109 - от мартышек зеленых (*Cercopithecus aethiops*).

Были обследованы три группы обезьян: I группа – погибшие животные от желудочно-кишечной патологии, II группа - больные обезьяны с признаками диареи, III группа - «клинически» здоровые животные без

признаков заболеваний. Обезьяны, входящие в состав групп отличались по виду, возрасту, полу, месту содержания и срокам взятия материала.

Детекция РНК энтеровируса.

Для определения РНК энтеровируса была использована как коммерческая тест-система, так и подобранные нами праймеры.

Коммерческая тест-система ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «АмплиСенс Enterovirus EPh» (Москва). Детекция осуществлялась согласно инструкции производителя. Положительными считались образцы, содержащие светящуюся полоску на уровне 207 п.н.

Подобраны праймеры к VP1 области вирусного генома:

5′→3′ 5′ CGATGAGTCACTGCATTCCCCAC 3′

3′←5′ 5′GAAACACGGACACCCAAAGTAGTC 3′

Амплификацию осуществляли в 25 мкл реакционной смеси, температурные условия амплификации для указанных праймеров 95°-10 сек, 60°-10 сек, 72°-10 сек, 42 цикла. Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Положительными считались образы, содержащие светящуюся полоску на уровне 247 п.н.

Секвенирование и очистка РНК-позитивных образцов была проведена на базе компании «Синтол» (Москва).

Детекция РНК и антигена норовируса.

Для выделения РНК норовирсуса методом ПЦР, использовали тест-систему ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «АмплиСенс Norovirus 1, 2 genotypes-EPh» (Москва). Положительными считались образцы, содержащие светящуюся полоску для I генотипа на уровне 333 н.п., а для II генотипа на уровне 322 п.н.

Для определения антигена норовируса в фекальных суспензиях была использована тест-система «Норовирус-антиген-ИФА-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты по детекции энтеро- и норовируса в материалах от обезьян представлены в табл.

Следует отметить, что энтеровирус содержащие образцы были выявлены с помощью коммерческой тест-системы у 4 макак резус, 6 макак яванских, 2 зеленых мартышек. Праймеры к VP1 области, позволили выделить РНК энтеровируса у 6 макак резусов, 4 макак яванских, 1 павиана гамадрила и 3 зеленых мартышек. Корреляция в обнаружении РНК

энтеровируса с помощью коммерческой тест-системы и праймеров к VP1 области наблюдалась у 6/23 (27,3±9,3%) животных.

Не наблюдалось достоверной разницы в определении РНК между первой и третьей группой обезьян ($p \geq 0,05$), проверенных с помощью коммерческой тест-системы. В образцах первой и второй групп, проверенных с помощью праймеров к VP1 области, наблюдалась достоверная разница ($p \leq 0,05$), а между первой и третьей – отсутствовала ($p \geq 0,1$). Не наблюдалось достоверной разницы ($p \geq 0,05$) между энтеровирус позитивными образцами, как выявленными с помощью подобранных нами праймеров, так и выявленных с помощью коммерческой тест-системы.

Специфичность детекции 5-ти РНК-позитивных проб энтеровируса была подтверждена прямым секвенированием амплифицированных фрагментов величиной 247 нуклеотидов. Поиск BLAST в базе данных NSBI подтвердил принадлежность амплифицированных последовательностей к участку генома энтеровируса VP1 WUHARV Enterovirus 1.

Таблица.

Результаты выявления РНК энтеро- и норовирусов, а так же антигена норовируса в пробах обезьян.

NN групп	Характеристика групп обезьян	Энтеровирус		Норовирус	
		РНК «Амплисенс»	РНК праймеры	РНК «Амплисенс»	Антиген «Бест»
1.	Погибшие животные от желудочно-кишечной патологии.	5/11 (45,5±15,01)*	7/11 (63,6±14,5)	6/12 (50,0±14,2)	9/82 (11,0±3,5)
2.	Больные обезьяны с признаками диареи.	0/10	4/20 (20,0±5,8%)	5/21 (23,8±9,3)	3/76 (3,94±2,2)
3.	«Клинически» здоровые животные без признаков заболеваний.	7/31 (22,6±7,5)	1/5 (20,0±17,9)	0/21	0/95
ИТОГО:		12/52 (23,5±5,87)	12/36 (33,3±7,8)	11/54 (20,4±5,5)	12/253 (4,7±1,3)

Примечание: * - Количество позитивных/число обследованных (%) ± средняя ошибка.

Следует отметить, что первый генотип РНК норовируса был определен у 9/11 (81,8%) обезьян – от 5 макак резус, 2 макак яванских и 2 мартышек

зеленых, а второй генотип - у 2/11 (18,2%) - 1 макаки резус и 1 макаки яванской. Не наблюдалась достоверной разницы между погибшими от желудочно-кишечной патологии и больными обезьянами с признаками диареи ($p \geq 0,05$).

Антиген норовируса был выявлен только у 12/253 (4,7±1,3%) обследованных обезьян. В I группе обезьян, погибших от желудочно-кишечной патологии, было обнаружено 9/82 (10,97±3,45%) антиген положительных животных, из них – 4/42 (9,5±4,5%) от макак резусов, 3/30 (10,0±5,5%) – от макак яванских и 1/10 (10,0±9,5%) – от павианов анубисов. Во II группе животных с признаками диареи было обнаружено 3/76 (3,94±2,2%) антиген положительных обезьян: 2/30 (6,6±4,5%) от макак резусов, 1/15 (6,7±6,5%) – от макак яванских; среди мартышек зеленых и павианов, положительных проб обнаружено не было. В III группе «клинически» здоровых животных без признаков заболеваний (n=95) не было выявлено антиген положительных проб. Средняя оптическая плотность положительных проб составила 0,361 при положительных значениях от 0,225 до 0,327. Средний возраст в группе погибших животных составил 10 лет, а в группе больных животных с признаками диареи средний возраст составил 5,25 лет. Не было выявлено достоверной разницы между группами погибших и больных животных ($p \geq 0,05$).

Результаты этой работы подтверждают ранее опубликованные нами данные [1, 2] о том, что энтеровирус может играть определенную роль в патологии желудочно-кишечного тракта обезьян. Вместе с тем, он обнаруживается и в материалах от «клинически» здоровых животных, что свидетельствует также и о носительстве этого вирусного агента. Подобранные нами праймеры для определения РНК энтеровирусов обезьян могут быть использованы для дальнейшей диагностической работы.

Данные по выявлению РНК и Ag норовируса в материалах от обезьян являются новыми. Обнаружение у обезьян I и II генотипа норовируса свидетельствует о циркуляции штамма человека. Планируется подбор праймеров для дальнейшего секвенирования изолятов норовируса от обезьян.

Список литературы

1. *Кебурия В.В., Корзая Л.И., Гончаренко А.М., Гвоздик Т.Е. Изучение роли вирусных агентов в патологии желудочно-кишечного тракта обезьян. // В кн.: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии. Материалы второй международной научной конференции. Том 1. (8-10 августа 2011г., Сочи-Адлер). – 2011г. – С.216-221.*

2. *Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончаренко А.М., и др. Маркеры вирусных инфекций у лабораторных приматов. // Там же С.79-88.*
3. *Caddy S.L., de Rougemont A., Emmott E. et al. Evidence for human norovirus infection of dogs in the United kingdom. // J. Clin. Microbiol.-2015. Vol.53.N.6.-P.1873-1883.*
4. *de Wit M.A., Koopmans M.P., Kortbeek L.M. et al. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. // Am. J. Epidemiol. – 2001.- Vol. 1. N.154(7). – P.666-674.*
5. *Fankhauser R.L., Monroe S.S., Noel J.S. et al. Epidemiologic and molecular trends of Norwalk-like viruses associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. // J. Infect. Dis. – 2002. Vol.186. – P.1–7.*
6. *Green K.Y., Ando T., Balayan M.S. et al. Taxonomy of the caliciviruses. // J. Infect. Dis.-2000. – Vol.181. S.2. – P.322-330.*
7. *Jiang B., McClure H.M., Fankhauser R.L. et al. Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates. // J. Med. Primatol. – 2004. – Vol. 33. - P.30–33.*
8. *Kalter, S. S., and R. L. Heberling. Comparative virology of primates. // Bacteriol.- 1971. Rev. 35310-35364.*
9. *Knowles N.J., Hovi T., Hyypiä T., et al. Picornaviridae. In Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press. -2012. – P. 855–880.*
10. *Nakamura K., Saga Y., Iwai M. et al. Frequent detection of noroviruses and sapoviruses in swine and high genetic diversity of porcine sapovirus in Japan during Fiscal Year 2008. // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol.48. N .4. - P.1215-1222.*
11. *Oberste M.S., Maher K, Pallansch M.A. Complete genome sequences for nine simian enteroviruses. // J. Gen. Virol. – 2007. – V.88. -P. 3360–3337.*
12. *Puustinen L., Blazevic V., Huhti L. et al. Norovirus genotypes in endemic acute gastroenteritis of infants and children in Finland between 1994 and 2007. // Epidemiol. Infect. – 2012. – Vol.140.N.2. – P.268-275.*
13. *Rodriguez A. R., Kalter S. S., Heberling R. L. et al. Viral infections of the captive Kenya baboon (Papio cynocephalus): a five-year epidemiologic study of an outdoor colony. // Lab. Anim. Sci. - 1977- Vol.27. – P.356–371.*

ОЦЕНКА НАЛИЧИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ОБЕЗЬЯН, ЗАВОЗИМЫХ В РОССИЮ

*Алексеев А.Ю.***, Баранов А.В.**, Рихтер В.А.***, Шестопалов А.М.**

** ФГБНУ Научно исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, Новосибирск, Россия*

*** Общество с ограниченной ответственностью «Амазония Зоо», Москва, Россия*

**** ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

Резюме

Обезьяны различных видов часто используются в качестве лабораторных животных в медицине. Известно что, обезьяны подвержены бактериальным, вирусным и паразитарным заболеваниям, которые являются общими и для людей. Помимо этого, они являются естественными хозяевами некоторых инфекционных агентов, опасных для человека.

Целью нашей работы являлось: оценка наличия инфекционных заболеваний у обезьян, завозимых в Россию.

Для выполнения данной цели решались следующие задачи:

1) иммуноферментный анализ сыворотки крови обезьян для определения наличия антител к возбудителям лихорадки Ку, туберкулеза, ВИЧ, борреллиоза.

2) анализ крови с помощью ПЦР для определения наличия возбудителей лихорадки Ласса, лихорадки Эбола, лихорадки Марбург, желтой лихорадки, лимфотического хориоменингита, ВИЧ, оспы обезьян, гепатита А, гепатита В, гепатита С, герпеса В, туберкулеза и бореллиоза.

3) анализ кала с помощью ПЦР для определения наличия шигелл, сальмонелл, кампилобактерий, диарогенных эшерихий.

Биологический материал для анализа был собран в 2013-2015 г. от 24 обезьян вида Зеленая мартышка (Chlorocebus aethiops), 120 обезьян вида Беличий саймири (Saimiri sciureus), 30 обезьян вида Краснорукий тамарин (Saguinas midas), 20 обезьян вида Бурый капуцин (Cebus apelloa), 20 обезьян вида яванских макак (Macaca fascicularis), 20 обезьян вида макака – лапундер (северный свинохвостый макак - Macaca leonina).

Коммерческими тест-системами определялось наличие антител при разведении сыворотки крови 1/20.

Для молекулярной диагностики некоторых возбудителей инфекционных заболеваний использовались коммерческие тест-системы. Для диагностики некоторых возбудителей инфекционных заболеваний использовались молекулярные методы с оригинальными видоспецифическими праймерами.

Всего был проанализирован материал от 234 животных. Среди исследуемых обезьян присутствовали представители шести видов трех семейств обезьян: мартышковые (Cercopithecidae), цепкохвостые (Cebidae), игрунковые (Callitrichidae). Обезьяны завозились из Западной Африки, Южной Америки, Южной Азии. Нами не были обнаружены возбудители исследуемых инфекционных заболеваний или антитела к ним. У нескольких представителей саймири фиксировались повышенные значения антител к микобактериям туберкулеза, но полученные значения не были статистически значимыми.

ASSESSMENT OF THE PRESENCE OF INFECTIOUS DISEASES IN MONKEYS IMPORTED TO RUSSIA

Alekseev A. Yu.,***, A.V. Baranov**, Richter V. A.***, Shestopalov A. M.**

** Federal State Budget Scientific Organization Research Institute of experimental and clinical medicine, Novosibirsk, Russia*

*** The limited liability company "Amazonia Zoo, Moscow, Russia*

**** Institute of chemical biology and fundamental medicine, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

Abstract

Different species of monkeys are often used as laboratory animals in medicine. It is well known that monkeys are susceptible to bacterial, viral and parasitic diseases, which are the same for human. In addition, monkeys are the natural reservoir for some infectious agents that are dangerous for human.

The aim of our work was to evaluate the presence of infectious diseases in monkeys imported to Russia.

To gain this goal, following assays were conducted:

1) enzyme-linked immunosorbent assay of monkeys' serum for detection the presence of antibodies to the causative agent of fever Ku, tuberculosis, HIV, borreliosis.

2) PCR to detect the presence of pathogens of Lassa fever, Ebola fever, Marburg fever, yellow fever, lymphatic choriomeningitis, HIV, monkeypox, hepatitis A, hepatitis b, hepatitis C, herpes, tuberculosis and borelioza in blood.

3) PCR to detect the presence of Shigella, Salmonella, campylobacteria, dialoging Escherichia in fecals.

Analyzed biological samples were collected in 2013-2015 from 24 Green monkey (Chlorocebus aethiops) and 120 Squirrel monkeys (Saimiri sciureus), a 30 Red Armed Tamarin (midas Saguinas), 20 Brown Capuchin (Cebus apelloa), 20 Java macaque (Macaca fascicularis), 20 macaque – launder (North swingvote macaques - Macaca leonina).

Commercial diagnostic systems determed the presence of antibodies in blood serum in dilution of 1/20.

For some antigens detected by molecular methods commercial diagnostic systems were used. For other antigens there were used original specific primers.

Total there were analyzed biological samples from 234 animals. Among studied monkeys six different species of three families were presented: martyshkova (Cercopithecidae), cacocholia (Cebidae), hroncova (Callitrichidae). Animals were imported from West Africa, South America, South Asia. Analysis conducted by our group didn't reveal any studied pathogens or antibodies to them. Some squirrel monkeys showed increased level of antibodies to Mycobacterium tuberculosis, but these results were not statistically significant.

Обезьяны различных видов часто используются для экспериментального изучения важнейших проблем теоретической и практической медицины. Из значительного (свыше трехсот) многообразия видов обезьян Старого и Нового Света в медико-биологических экспериментах используется относительно небольшое их количество. Наиболее часто используются макаки-резусы (*M. mulatta*), макаки яванские (*M. fascicularis*), зеленые мартышки (*Cercopithecus aethiops*), павианы анубисы (*Papio anubis*), павианы гамадрилы (*Papio hamadryas*), беличьи обезьяны (*Saimiri sciuraus*), игрунки обыкновенные (*Callitrix jacchus*), капуцины (*Cebus*). Другие виды обезьян используются значительно реже.

Обезьяны подвержены бактериальным, вирусным и паразитарным заболеваниям, которые являются общими и для людей. Помимо этого, они являются естественными хозяевами некоторых инфекционных агентов, опасных для человека.

В результате заражения патогеном у обезьян может развиться заболевание с характерной клинической симптоматикой или бессимптомное носительство.

Туберкулез представляет опасность для всех видов низших и высших обезьян. Вирусы иммунодефицита были обнаружены у 5 видов обезьян из Южной Америки и у 35 видов африканских обезьян. Циркуляция гепатита А обнаружена у антропоидов, макак различных видов - резусов, яванских, лапундеров, павианов гамадрилов, зеленых мартышек. У многих человекообразных обезьян (шимпанзе, гориллы, орангутаны) иногда встречаются антитела к гепатиту В и вирусоносительство не только в условиях неволи, но и в природе. Низшие обезьяны малочувствительны к вирусу гепатита В. Что касается вируса гепатита С, то в литературе описана циркуляция лишь у шимпанзе в условиях питомника. Обезьяны Экваториальной Африки, Центральной и Южной Америки (мартышкообразные, колобусы, капуцины, саймири, ночные и паукообразные обезьяны, ревуны и игрунки) являются естественными резервуарами вируса Желтой лихорадки (Viscerophilus tropicus). Заболевание передается от обезьяны к обезьяне трансмиссивным путем через укусы комаров.

Две филовирусные геморрагические лихорадки Марбург и Эбола, вызывающие заболевания у высших приматов, привлекают особое внимание. Резервуары вирусов Марбург и Эбола до настоящего времени не установлены. Оспа обезьян способна вызывать заболевание у практически всех видов обезьян Старого и Нового Света. Резервуаром вируса герпеса В (Herpesvirus simlae) в естественных условиях являются обезьяны рода макак, у которых вирус находится в латентном состоянии. К вирусу герпеса В чувствительны многие виды обезьян.

Среди наиболее значимых для обезьян бактериальных заболеваний можно отметить туберкулез, шигеллезы, сальмонеллез, кампилобактериоз. Шигеллезы чаще всего поражают обезьян в неволе. В естественных условиях заболеваний шигеллезами у обезьян не отмечено. Сальмонеллезом, обусловленным полипатогенными сальмонеллами, болеют практически все виды африканских, азиатских и южно-американских обезьян. Кампилобактерии нередко выделяются из фекалий больных диареей обезьян. Все обезьяны, особенно молодые, высокочувствительны к кампилобактериям.

Целью нашей работы являлось: оценка наличия инфекционных заболеваний у обезьян, завозимых в Россию.

Для выполнения данной цели решались конкретные задачи:

1) Провести иммуноферментный анализ сыворотки крови обезьян для определения наличия антител к возбудителям лихорадки Ку (Coxiella burnetti), туберкулеза (Mycobacterium avium), ВИЧ, бореллиоза.

2) Провести анализ крови с помощью ПЦР для определения наличия возбудителей лихорадки Ласса, лихорадки Эбола (Ebolavirus), лихорадки Марбург (Marburgvirus), желтой лихорадки (Viscerophilus tropicus), лимфотического хориоменингита, ВИЧ, оспы обезьян, гепатита А, гепатита В, гепатита С, герпеса В (Cercopithecine herpesvirus 1), туберкулеза (Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. avium), бореллиоза.

3) Провести анализ кала с помощью ПЦР для определения наличия шигелл (Shigella), сальмонелл (Salmonella), кампилобактерий (возбудителя кампилобациллярного энтерита – Campylobacter jejuni), диарогенных эшерихий (диарогенные E.coli).

Материалы и методы

Биологический материал представлял собой образцы крови, образцы сыворотки крови, образцы кала. Биологический материал был собран в 2013-2015 г. от 24 обезьян вида Зеленая мартышка (Chlorocebus aethiops), 120 обезьян вида Беличий саймири (Saimiri sciureus), 30 обезьян вида Краснорукий тамарин (Saguinas midas), 20 обезьян вида Бурый капуцин (Cebus apelloa), 20 обезьян вида яванских макак (Macaca fascicularis), 20 обезьян вида макака – лапундер (северный свинохвостый макак - Macaca leonina).

Коммерческими тест-системами определялось наличие антител при разведении сыворотки крови 1/20 [3,4,5,6].

Для молекулярной диагностики некоторых возбудителей инфекционных заболеваний использовались коммерческие тест-системы [7,8,9,10,11,12,13, 14,15]. Для диагностики некоторых возбудителей инфекционных заболеваний использовались молекулярные методы с оригинальными видоспецифическими праймерами в соответствии с [16,17,18,19,20].

Результаты и обсуждение

Результаты иммуноферментного анализа сыворотки крови, анализа крови с помощью ПЦР, анализа кала с помощью ПЦР представлены в таблице 1.

Таблица 1

Наличие антител/ДНК/РНК

№	Антитела в сыворотке крови	Положительно (титр) / отрицательно
1	возбудитель лихорадки Ку (Coxiella burnetti)	отрицательно
2	возбудитель туберкулеза (Mycobacterium avium)	отрицательно
3	ВИЧ	отрицательно
4	возбудители бореллиоза	отрицательно
№	**Вид патогена в крови**	**Положительно / отрицательно**
1	возбудитель лихорадки Ласса	отрицательно
2	возбудитель лихорадки Эбола	отрицательно
3	возбудитель лихорадки Марбург	отрицательно
4	возбудитель лихорадки Денге	отрицательно
5	возбудитель желтой лихорадки	отрицательно
6	возбудитель лимфотического хориоменингита	отрицательно
7	ВИЧ	отрицательно
8	возбудитель оспы обезьян	отрицательно
9	возбудитель гепатита А	отрицательно
10	возбудитель гепатита В	отрицательно
11	возбудитель гепатита С	отрицательно
12	возбудитель герпеса В (Cercopithecine herpesvirus 1)	отрицательно
13	возбудители туберкулеза (Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. avium)	отрицательно
14	возбудитель лепры (Mycobacterium lepra)	отрицательно
15	возбудители бореллиоза	отрицательно
№	**Вид патогена в кале**	**Положительно / отрицательно**
1	шигеллы (Shigella)	отрицательно
2	сальмонеллы (Salmonella)	отрицательно
3	кампилобактерия (возбудитель кампилобациллярного энтерита – Campylobacter jejuni)	отрицательно
4	диарогенные эшерихии (диарогенные E.coli)	отрицательно

Всего был проанализирован материал от 234 животных. Среди исследуемых обезьян присутствовали представители шести видов трех семейств обезьян: мартышковые, цепкохвостые, игрунковые. Обезьяны завозились из Западной Африки, Южной Америки, Южной Азии. Несмотря на то что было обследовано более двухсот животных нами не были

обнаружены возбудители исследуемых инфекционных заболеваний или антитела к ним. У нескольких представителей саймири фиксировались повышенные значения антител к микобактериям туберкулеза, но подученные значения небыли статистически значимыми.

Выводы

При иммуноферментном анализе сывороток крови 234 исследуемых обезьян наличие антител к возбудителям лихорадки Ку (Coxiella burnetti), туберкулеза (Mycobacterium avium), ВИЧ, бореллиоза не обнаружено.

При анализе крови с помощью ПЦР наличие возбудителей лихорадки Ласса, лихорадки Эбола (Ebolavirus), лихорадки Марбург (Marburgvirus), лихорадки Денге, желтой лихорадки (Viscerophilus tropicus), лимфотического хориоменингита, ВИЧ, оспы обезьян, гепатита А, гепатита В, гепатита С, герпеса В, туберкулеза (Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. avium), лепры, бореллиоза не обнаружено.

При анализе кала с помощью ПЦР наличие шигелл (Shigella), сальмонелл (Salmonella), кампилобактерий (возбудителя кампилобациллярного энтерита – Campylobacter jejuni), диарогенных эшерихий (диарогенные E.coli) не обнаружено.

Таким образом, при оценке наличия инфекционных заболеваний у обезьян, ввозимых в Россию, с помощью иммуноферментных и молекулярных методов возбудители заболеваний и антитела к ним не обнаружены.

Список литературы

1. Болезни обезьян, опасные для человека. Правила содержания и работы с обезьянами в карантине при поступлении животных из внешних источников, а также при экспериментальном инфицировании: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014.—52 с.
2. Вирусные геморрагические лихорадки http://www.veterinarka.ru/diseases-sh/virusnye-gemorragicheskie-lihoradki.html
3. ID Screen® Q Fever Indirect Multi-species - Тест-система для выявления антител к Coxiella burnetti непрямым иммуноферментным методом.
4. ID Screen® Mycobacterium avium Indirect - Тест-система для выявления антител к Mycobacterium avium непрямым иммуноферментным методом.
5. КомбиБест анти-ВИЧ-1+2 - Тест-система иммуноферментная для выявления антител к ВИЧ-1,2 с использованием рекомбинантных белков и рекомбинантного конъюгата.

6. ЛаймБест-IgG - Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к возбудителям клещевого боррелиоза.
7. АмплиСенс ® HCV/HBV/HIV-FL - Набор реагентов для одновременного выявления РНК вируса гепатита С (HCV), ДНК вируса гепатита В (HBV) и РНК вируса иммунодефицита человека (HIV) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.
8. АмплиСенс® HAV-FL - Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита А (HAV) в клиническом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.
9. АмплиСенс® Shigella spp. и EIEC/Salmonella spp./Campylobacter spp.-FL - Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК бактерий рода Шигелла (Shigella spp.) и энтероинвазивных E. coli (EIEC), Сальмонелла (Salmonella spp.), термофильных Кампилобактерий (Campylobacter spp.) в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.
10. АмплиСенс® Эшерихиозы-FL - Набор реагентов для выявления и дифференциации ДНК диарогенных E.coli в объектах окружающей среды и клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.
11. АмплиСенс Salmonella spp.-EPh - Набор реагентов для амплификации ДНК Salmonella spp.
12. АмплиСенс Borrelia burgdorferi sensu lato-FL - Набор реагентов для амплификации кДНК Borrelia burgdorferi sensu lato.
13. АмплиСенс® Coxiella burnetii-FL - Набор реагентов для амплификации ДНК Coxiella burnetii.
14. АмплиСенс® МТС-FL - Набор реагентов для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (Mycobacterium tuberculosis complex) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.
15. КАМ-БАК - Тест-система для выявления и идентификации возбудителя кампилобактериоза Campylobacter jejuni методом полимеразной цепной реакции.
16. Yan W, Yan X, Lian-Chao Y, Jian L, Zhang Y, Huan-Ying L. Whole-Blood Nested-PCR Amplification of M. leprae-Specific DNA for Early Diagnosis of Leprosy // Am J Trop Med Hyg. 2013 Mar 11.

17. Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Gunther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean–Congo hemorrhagic fever virus, Rift valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR // J Clin Microbiol 2002, 40: 2323–2330.
18. McCausland MM, Crotty S. Quantitative PCR technique for detecting lymphocytic choriomeningitis virus in vivo // J Virol Methods. 2008 Jan;147(1):167-76.
19. Putkuri N, Piiparinen H, Vaheri A, Vapalahti O. Detection of human orthopoxvirus infections and differentiation of smallpox virus with real-time PCR // J Med Virol. 2009 Jan;81(1):146-52.
20. Perelygina L, Patrusheva I, Manes N, Wildes MJ, Krug P, Hilliard JK. Quantitative real-time PCR for detection of monkey B virus (Cercopithecine herpesvirus 1) in clinical samples // J Virol Methods. 2003 May;109(2):245-51.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МИКОПЛАЗМ У ОБЕЗЬЯН, ПРИВЕЗЕННЫХ ИЗ МЕСТ ЕСТЕСТВЕННОГО ОБИТАНИЯ

*Аршба И.М [*], Раковская И.В [**]., Бархатова О.И.**, Левина Г.А. [**], Горина Л.Г. **, Гамова Н.А.**, Гончарова С.А. [**]*

[*]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», г. Сочи

[**]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», г. Москва

Резюме

Целью настоящего исследования является изучение частоты распространения микоплазм у обезьян, родившихся и находящихся в питомнике и обезьян, вновь поступивших из мест их естественного обитания (Танзания).

Объектом исследования служили 53 здоровые обезьяны (самцы и самки): макаки резус – 13 особей, макаки яванские – 15 особей и зеленые мартышки – 25 животных. Материалом исследования служили сыворотка крови животных, соскобы из УГТ: соскобы эпителиальных клеток влагалища самок и соскобы из уретры самцов.

В результате исследования было показано, что степень инфицированности микоплазмами и уреаплазмами животных обеих групп была высокой. У обезьян II группы ДНК возбудителей выявляли: в материале

соскобов – у 100% и в пробах сыворотки крови – у 40%. У обезьян I группы эти показатели были ниже и составляли 25% и 17.8% соответственно. Данные по выявлению антигенов в РАГА и РПГА в основном совпадали с данными, полученными ПЦР. Типирование ДНК до вида показало, что у животных II группы в высоком проценте случаев обнаружили ДНК *M.hominis* и *Ureaplasma spp*, причем в материале соскоба из УГТ у 7 обезьян выявлена ДНК этих двух возбудителей одновременно. Сравнение результатов по полу животных, свидетельствуют о том, что носительство микоплазм и уреаплазм у самок изученных трех видов обезьян значительно выше, чем у самцов, что особенно выражено в наиболее инфицированной группе зеленых мартышек. Из материала соскобов выделено 16 культур *M.hominis* (76.2%) и 14 культур *Ureaplasma spp.* (66.6%).

Таким образом, наше исследование показало высокую распространенность носительства микоплазм у обезьян, привезенных в питомник из мест их естественного пребывания. Результаты проведенных исследований обосновывают необходимость строгого контроля обезьян на носительство возбудителей *Mycoplasma spp.* и *Ureaplasma spp.* как при формировании производственного стада, так и при использовании этих животных в медико-биологических экспериментах. Проведенное исследование дает нам основание рекомендовать обезьян в качестве моделей для экспериментального изучения вопросов патогенеза микоплазм и совершенствования диагностики у людей.

INCIDENCE OF MYCOPLASMA INFECTION AMONG MONKEYS INPORTED FROM THE WILD

I.M. Arshba[1], I.V. Rakovskaya[2], O.I. Barkhatova[2], G.A. Levina[2], L.G. Gorina[2], N.A. Gamova[2], S.A. Goncharova[2]

[1]FSBSI "Institute of Medical Primatology," Sochi, Russia

[2]FSBRI "N.F. Gamalei Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Moscow, Russia

Abstract

The purpose of this study is to investigate the frequency of Mycoplasma infection in monkeys, born in our colony and newly arrived from their natural habitats (Tanzania).

The objects of the study were 53 males and females healthy monkeys (13 Rhesus monkeys, 15 Long-tailed macaques, 25 African green monkeys). The

serum, scrapings of the UGT (scrapings of epithelial cells of the female vaginas and scrapings from the male urethras) were used as materials for the research.

It was shown that the incidence of Mycoplasma and Ureaplasma infections of both animal groups was high. Pathogenic DNA in the group II of monkeys DNA was detected in 100% of scrapings material and in 40% of serum samples. At same time these figures in the group I monkeys were accounted for 25% and 17.8%, respectively. The serological aggregation-hemagglutination test and the passive-hemagglutination test results basically coincided with the data obtained by PCR. DNA analysis has shown that *M.hominis* and *Ureaplasma spp.* DNA was present a high percentage of cases of the group II animals; what are more the DNAs of both pathogens were found simultaneously in 7 UGT scrapings.

The incidence of Mycoplasma and Ureaplasma infections was significantly higher in females of all 3 monkey species than in males, especially in African green monkeys. We were able to establish 16 *M.hominis* (76, 2%) and 14 *Ureaplasma spp* (66, 6%) cultures from scraping materials.

Thus, our study showed a high prevalence of Mycoplasma infection in monkeys imported from the Wild. The results of these studies justify the need for strict control of the monkeys for *Mycoplasma spp.* and *Ureaplasma spp.* infections, both for goals of monkey groups organization and the animals uses in medical-biological experiments. This study gives us a base to recommend the monkeys as a suitable model for the experimental Mycoplasma pathogenesis studies and diagnostics improvement in humans.

На протяжении многих лет в Сухумском НИИ ЭПиТе и в «НИИ Медицинской приматологии» изучали характеристику микоплазменной флоры обезьян разных видов, как клинически здоровых, так и при различных респираторных и урогенитальных заболеваниях, а также новопривезенных обезьян в период акклиматизации. Было показано что, частота обнаружения микоплазм на слизистой оболочке носоглотки варьировала в зависимости от вида обезьян, при этом наибольшая у красных обезьян и макаков резусов, низка у предствителей редких видов обезьян (саймири, гелады, мандрил), а у бурых макак в зеве микоплазмы не обнаружены. У больных обезьян микоплазмы изолировали не только из зева, но и из крови и внутренних органов. Микоплазменные инфекции у обезьян, как и у человека, характеризуются длительной персистенцией и генерализацией инфекции. Известно, что микоплазмы способны оказывать иммунодепрессивное воздействие на инфицированный организм, усиливать или подавлять апоптоз клеток и активировать или осложнять патологические процессы, индуцированные вирусами или другими бактериями. Сходство реакций

обезьян и человека на действие микоплазм делает обезьян незаменимыми для экспериментального изучения микоплазмозов человека. Поэтому при использовании обезьян в качестве экспериментальных животных необходимо иметь представление о степени их инфицированности различными условно патогенными микроорганизмами, вызывающими инфекции без патогномонических симптомов.

Целью настоящего исследования является изучение частоты распространения микоплазм у обезьян, родившихся и находящихся в питомнике и обезьян, вновь поступивших из мест их естественного обитания (Танзания).

Материалы и методы исследования. Объектом исследования служили 53 здоровые обезьяны (самцы и самки): макаки резус – 13 особей, макаки яванские – 15 особей и зеленые мартышки – 25 животных. По заключению диагностической лаборатории клинико-ветеринарного отдела Адлерского питомника обезьян здоровыми обезьянами считают активных животных, нормальными показателями сердечно-сосудистой, дыхательной систем и желудочно-кишечного тракта, без клинических симптомов урогенитальной инфекции. Материалом исследования служили сыворотка крови животных, соскобы эпителиальных клеток влагалища самок и соскобы из уретры самцов.

Обследованные обезьяны были разделены на две группы. Первая группа состояла из 28 животных различного возраста (от 6.5 до 28 лет): макаков резус – 13 особей (6 самцов, 7 самок) и макаков яванских – 15 особей (10 самцов, 5 самок). Все обезьяны этой группы рождены и живут в Адлерском питомнике обезьян. Вторая группа включала 25 зеленых мартышек (21 самка, 4 самца) в возрасте от 3,5 до 5 лет. Эти животные прибыли в питомник из мест естественного обитания (Танзания) и были помещены в отдельный изолятор.

Для определения инфицированности исследуемого материала микоплазмами использовали генно-диагностическим метод – полимеразно-цепную реакцию (ПЦР). Для подготовки и постановки ПЦР использовали лицензированные тест-системы, разработанные в ЦНИИ эпидемиологии Росздравнадзора (ООО «ИнтерЛабСервис»). Выделение ДНК проводили с помощью набора «ДНК-сорб В». При выявлении ДНК микоплазм и уреаплазм использовали универсальные для них тест-систему «МИК-КОМ» (*Mycoplasma spp.)*. Для видовой идентификации были взяты следующие моно тест-системы: «АмплиСенс *M.hominis*», «АмплиСенс *M. genitalium*», «АмплиСенс *M. pneumoniae*». Для выявления ДНК уреаплазм использовали тест-систему «АмплиСенс Ureaplasma spp.», типирующую одновременно *U.*

urealyticum и *U.parvum*. Детекцию продуктов амплификации проводили в агарозе с помощью электрофореза.

Для выделения культур микоплазм и уреаплазм из сыворотки крови и материала соскобов из УГТ использовали коммерческую питательную среду ВД BBLMycoplasmaBaseagar (1,3%) и бульон с добавлением 20% сыворотки крови лошади, 1% L-аргинина для роста аргинин-зависимых видов или 0.05% мочевины для уреаплазм и 1000 ед/мл пенициллина.

Антигены клеток микоплазм в пробах сыворотки крови выявляли в реакции агрегатгемагглютинации (РАГА) по методике, разработанной в ФГБУ «ФНИЦЕМ» им. Н.Ф. Гамалеи.

Антитела микоплазм и уреаплазм в сыворотке крови определяли в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) по ранее описанной методике.

Результаты исследования и их обсуждение.

Результаты исследования материала соскобов из урогенитального тракта (УГТ) и сыворотки крови обезьян методом ПЦР представлены в таблице 1.

Таблица 1

Частота выявления ДНК микоплазм и уреаплазм у обезьян в исследуемом материале

ДНК микоплазм и уреаплазм	I группа обезьян (n-28)		II группа обезьян (n-25)	
	соскоб	сыворотка	соскоб	сыворотка
Mycoplasma spp.	7 (25%)	5 (17.8%)	25 (100%)	10 (40%)
M.hominis	1 (14.3%)	0	16 (64%)	4 (40%)
M.pneumonia	0	1 (20%)	1(4%)	1 (10%)
Ureaplasma spp.	1 (14.3%)	0	8(32%)	1 (10%)
Другие виды микоплазм	5 (71.4%)	4 (80%)	7(28%)	4 (40%)

Как видно из представленных данных степень инфицированности микоплазмами и уреаплазмами животных обеих групп была высокой. У обезьян II группы ДНК возбудителей выявляли значительно чаще: в материале соскобов – у 100% и в пробах сыворотки крови – у 40%. У обезьян I группы эти показатели были ниже и составляли 25% и 17.8% соответственно. Данные по выявлению антигенов в РАГА и РПГА в

основном совпадали с данными, полученными ПЦР. Типирование ДНК до вида показало, что у животных II группы в высоком проценте случаев обнаружили ДНК *M.hominis* и *Ureaplasma spp*, причем одновременно ДНК этих двух возбудителей выявлено в материале соскоба из УГТ у 7 обезьян. Успешным было выделение культур из клинического материала от животных II группы, особенно из соскобов из УГТ. Идентификация их до вида показала, что выделенные культуры в 82.3% были типированы как *M.hominis*.

Следует отметить, что впервые из соскобов УГТ от 5 обезьян второй группы были выделены культуры *M.hominis*, растущие в виде «мини-колоний». Этот морфотип колоний микоплазм у людей впервые был описан ранее лабораторией микоплазм и L-форм бактерий при ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», г. Москва. Линейные размеры «мини-колоний» были меньше типичных на порядок (30мкм), а по площади на два порядка (300 мкм^2). Они с трудом пассировались на агаровой питательной среде и ни в одном случае не реверсировали в колонии с типичной морфологией.

При первичном посеве проб сыворотки крови из трех образцов были также выделены культуры, растущие в виде микоплазмаподобных колоний – мелкие однородные по морфологии, без выраженного центра и периферии. Уже при первом пассировании эти культуры выросли только в виде «миниколоний» (миниформы), а через 2-3 пассажа перестали расти. Выделенные культуры проанализированы на наличие ДНК микоплазм методом ПЦР. Результаты ПЦР показали, что во всех трех полученных культурах выявлена ДНК *M.hominis* и лишь одна из них содержала ДНК *M. pneumoniae*.

Обнаруженные в сыворотке крови обезьян мини-клетки *M.hominis*, образующие на агаре мини-колонии, возможно, являются одной из форм персистенции микоплазм в организме животных, возникающей, по-видимому, под воздействием различных стрессорных факторов иммунной защиты хозяина.

При выделении уреаплазм использовали лишь материал соскобов из УГТ обезьян. При высеве образцов исследуемого материала на питательную среду получено 16 культур уреаплазм. Обезьяны II группы было обсеменены уреаплазмами в довольно высокой степени (60%). В 26.7% культуры уреаплазм типировались тест-системой *Ureaplasma spp.* (*U.parvum* вместе с *U.urealyticum*). В 73 % случаев идентифицировать их до вида не удалось.

У одной из самок вида макака яванская (№36887, 8 лет, диагноз бесплодие) из соскоба влагалища были выделены культура «мини-колоний» *M.hominis* и культура уреаплазм *Ureaplasma spp*. Возможно, причиной бесплодия этой обезьяны является высокая степень инфицированности ее этими возбудителями.

У самцов макаков резус не выявлено носительства микоплазм и уреаплазм. Самцы макаков яванских инфицированы в очень низкой степени. Инфицированность самцов зеленых мартышек очень высокая (100 % по материалу соскобов и 25% по пробам сыворотки крови). Из материала соскобов УГТ культура микоплазм (*M.hominis*) выделена от трех животных, культура уреаплазм *(Ureaplasma spp*.) – от одного.

Представленные результаты в таблице 2 указывают на высокую инфицированность микоплазмами и уреаплазмами самок обезьян всех трех видов. Особенно высокие показатели отмечены в группе зеленых мартышек (100% по результатам исследования материала соскобов и 42.9% - образцов сыворотки крови). Из материала соскобов из УГТ выделены 16 культур микоплазм (76.2%) и 14 – уреаплазм (66,6%). Из соскобов УГТ у 7 обезьян и из проб сывороток у 4 обезьян, с помощью использованных тест-систем, не удалось идентифицировать до вида выделенные культуры микоплазм. Из проб сыворотки крови выделены три культуры *M.hominis.*

Сравнение результатов по полу животных, свидетельствуют о том, что носительство микоплазм и уреаплазм у самок изученных трех видов обезьян значительно выше, чем у самцов, что особенно выражено в наиболее инфицированной группе зеленых мартышек.

Как видно из представленных результатов высокая степень инфицированности обезьян микоплазмами в значительной степени определяется не установленными нами видами микоплазм и уреаплазм. Почти все микоплазмы, выделяемые от людей, находят и у обезьян. Это *M. hominis, M.salivarium, M. buccale, M.orale, M. fermentans, M. faucium, U.urealyticum*. Кроме того, у обезьян есть и собственные виды микоплазм: *M. primatum* и ахолеплазмы. Не удивительно, что с помощью тест-систем, использованных нами, было невозможно идентифицировать до вида все выделенные культуры микоплазм.

Таким образом, наше исследование показало высокую распространенность носительства микоплазм у обезьян, привезенных в питомник из мест их естественного пребывания. Результаты проведенных исследований обосновывают необходимость строгого контроля обезьян на носительство возбудителей *Mycoplasma spp.* и *Ureaplasma spp.* как при формировании производственного стада, так и при использовании этих

животных в медико-биологических экспериментах. Проведенное исследование дает нам основание рекомендовать обезьян в качестве моделей для экспериментального изучения вопросов патогенеза микоплазм и совершенствования диагностики у людей.

Таблица 2.

Частота инфицированности микоплазмами и уреаплазмами самок обезьян

Группа и число обезьян	**Вид и число обезьян**	**Исследуемый материал**	**Число и % инфицированных животных (результаты ПЦР)**				**Выделено культур**	
			M.spp.	**M.hom.**	**U.spp.**	**Другие виды**	**M.hom.**	**U.spp.**
I группа (n -12)	макаки резус 7	соскоб	3 (43%)	0	1 (33%)	2 (67%)	0	0
		сыворотка крови	2 (28.6%)	0	–	2 (100%)	0	–
	макаки яванские 5	соскоб	3 (60%)	1 (33%)	1 (33%)	2 (67%)	1*	1*
		сыворотка крови	3 (60%)	1 (33%)	_	2 (61%)	0	_
II группа (n-21)	зеленые мартышки 21	соскоб	21 (100%)	13 (62%)	6 (28.5%)	2 (9,5%)	16 (76.2%)	14 (66.6%)
		сыворотка крови	9 (49,9%)	4 (44.4%)	–	4 (44.4%)	3 (14.3%)	–

* Обе культуры выделены от одной обезьяны.

M – mycoplasma, U – ureaplasma.

III. ИНФЕКЦИОННАЯ ПАТОЛОГИЯ, ИММУНОЛОГИЯ.
III. INFECTIOUS PATHOLOGY. IMMUNOLOGY

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ПРИМАТОВ. ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ.

Корзая Л.И., Догадов Д.И., Нарышкина А.А., Кебурия В.В., Лапин Б.А.

ФГБНУ НИИ медицинской приматологии. Россия. Сочи.

Резюме

Роль многих вирусных инфекций обезьян для человека, а также инфекций человека для обезьян в настоящее время уже доказана, роль других (например, вирусных гепатитов различной этиологии, гриппа и др.) - интенсивно изучается.

Целью работы являлось серологическое изучение инфицированности отдельных групп макак Адлерского приматологического центра некоторыми актуальными вирусами человека и обезьян, оценка их эпидемиологической опасности для обслуживающего персонала питомника и возможности использования в экспериментах.

Серологически было обследовано несколько групп обезьян рода макак – резусы (M.mulatta) и яванские (M.fascicularis), планируемых для использования в экспериментах (n=116), а также лиц, контактирующих с ними (n=38). Всего было исследовано 201 сыворотка (116 - от обезьян и 85 - от людей). В работе были использованы коммерческие тест-системы нескольких отечественных производителей для определения антител к 12 вирусам человека с помощью двух методов (ИФА и РТГА).

Результаты исследований показали, что как у макак резусов, так и у макак яванских были выявлены IgG антитела к Herpes simplex virus - 1,2 (33,3±13,6 и 36,4±10,3% соответственно), CMV (16,7±10,8% и 31,8±9,9% соответственно), к HEV (8,3±8,0% и 54,6±10,6% соответственно), к HAV (100%). Вместе с тем, у этих же групп обезьян отсутствовали антитела к HIV-1,2 (SIV), HBV, HCV, measles virus.

Показатели реактивности сывороток свидетельствовали о различном уровне иммунитета обезьян к вирусным инфекциям – высоком (после инфицирования HAV и HEV) и низком (при носительстве латентных вирусов - Herpes simplex virus- 1,2 и CMV).

Получены данные об отсутствии антител к штаммам вируса гриппа А – пандемическому штамму A(H1N1)pdm09 и так называемому штамму «сезонного» гриппа H3N2 у обследованных макак резусов и яванских (n=80).

Вместе с тем, антитела к штамму вируса птичьего гриппа H5N1 были обнаружены у 100% обследованных обезьян. Титры антител были высокими и варьировали от 1:80 до 1:640. Средний титр равнялся 1:253,3.

С эпидемиологической точки зрения представляют интерес данные о наличии антител у обслуживающего персонала питомника к пандемическому штамму A(H1N1)pdm09 - 15,7±5,9% и к штамму H5N1 – 45,8±9,9%, но в более низких титрах (1:40-1:160). Средний титр составил 1:80. Среди студентов РУДН (контрольная группа) частота распространения антител к H5N1 составила 21,4±10,9%, к H3N2 – 8,3±5,6%, к A(H1N1)pdm09 – 31,9±6,8%.

Проведенные исследования позволили на основании серологических данных охарактеризовать инфицированность обезьян некоторыми вирусными агентами и сделать заключение о возможности использования этих животных в эксперименте, а также оценить их эпидемический риск для человека.

THE ETIOLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF LABORATORY PRIMATES VIRAL INFECTIONS.

Korzaya L.I., Dogadov D.I., Naryshkina A.A., Keburiya V.V., Lapin B.A.

FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia.

Abstract

The role of monkey viral infections in human pathology, and, conversely, role of human infections in monkey pathology has now been proved; the role of others (e.g., viral hepatitis of various etiologies, influenza, etc.) studied intensively.

The aim of the work was the serological screening of infection by some actual human and monkey viruses among macaques groups in Adler Primate center, the epidemiological evaluation of their hazards to the human staff and the possibility of monkey use in experiments.

Serological examination of several monkey groups belonging to Genus Macaques (M.mulatta and M.fascicularis), planned to be used in experiments (n = 116), as well as staff persons in contact with them (n=38) was carried out. Total 201 serum samples (116 monkey and 85 human samples) were screened. Commercial test systems from several domestic manufacturers have been used for the detection of antibodies to 12 human viruses which were based on two different methods (ELISA and HAI).

The results showed that both Rhesus and Cynomolgus macaques have anti-Herpes simplex virus type 1 and 2 IgG antibodies (33.3 ± 13.6% and 36.4 ± 10.3% respectively); anti-CMV antibodies (16.7 ± 10.8% and 31.8 ± 9.9% respectively); anti-HEV antibodies (8.3 ± 8.0% and 54.6 ± 10.6% respectively), and anti-HAV antibodies (100%). At the same time no antibodies to HIV-1, HIV-2(SIV), HBV, HCV, and measles viruses were detected.

Serum reactivity give evidence of different levels of immunity to monkey viral infections - high in case HAV- and HEV-infections and low in latent viruses (Herpes simplex virus-1/2 and CMV) carriers.

No antibodies to influenza A virus strains (a pandemic strain A (H1N1) pdm09 and the so-called "seasonal" H3N2 influenza strain) were detected in both Rhesus and Cynomolgus macaques (n=80). However, antibodies to avian influenza virus H5N1 strain were found in 100% of monkeys tested. Antibody titers were high and varied from 1:80 to 1: 640. The average titer was 1: 253. 3.

From an epidemiological point of view the presence of antibodies to the pandemic strain A (H1N1) pdm09 (15.7±5,9%) in high titers and to the H5N1 strain (45.8±9,9%), but in lower titers (1:40-1:160) in human staff are of great interest. Average titer was 1:80. In control group (the students of RIPF), the antibody frequency to H5N1 was 21.4±10.9%, to H3N2 was 8.3±5.6%, and to A (H1N1) pdm09 was 31.9±6.8%.

Our research based on serological data allowed to characterize the monkey infections by some viral agents and draw a conclusion about the possibility of using these animals in the experiment, as well as to assess their epidemic risk for humans.

Актуальность работы. Роль многих вирусных инфекций обезьян для человека, а также инфекций человека для обезьян в настоящее время уже доказана, роль других (например, вирусных гепатитов различной этиологии) - интенсивно изучается [2,5-7,10]. Внимание исследователей привлекают также вопросы распространения среди лабораторных приматов респираторных вирусных агентов и, в первую очередь, актуальных штаммов вируса гриппа [12,15]. Это связано с обострением эпидемической ситуации по гриппу, продолжением циркуляции пандемических и появлением новых штаммов, а также с необходимостью испытания вновь разрабатываемых вакцин и противовирусных препаратов на модели лабораторных приматов.

Полученная информация может представлять большое эпизоотологическое и эпидемиологическое значение, позволяет предотвратить инфицирование не только обезьян, но и заражение обслуживающего персонала [2].

Целью работы являлось серологическое изучение инфицированности отдельных групп макак Адлерского приматологического центра некоторыми актуальными вирусами человека и обезьян, оценка их эпидемиологической опасности для обслуживающего персонала питомника и возможности использования в экспериментах.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе лаборатории инфекционных вирусов ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии».

Серологически было обследовано несколько групп обезьян рода макак – резусы (M.mulatta) и яванские (M.fascicularis), различных возрастных групп и содержащиеся на разных участках питомника. Также были обследованы сотрудники НИИ медицинской приматологии (в основном, обслуживающий персонал питомника) и лица контрольной группы (студенты Сочинского института РУДН, обучающиеся на базовых кафедрах). Всего было исследовано 201 сыворотка (116 - от обезьян и 85 - от людей).

В работе были использованы коммерческие тест-системы нескольких отечественных производителей.

Тест системы ДС-ИФА-АНТИ-ВПГ-1,2-G, ДС-ИФА-АНТИ-ЦМВ-G, ДС-ИФА-ВИЧ-АГАТ-СКРИН (в состав сорбента входит gp36 ВИЧ-2, который аналогичен вирусу иммунодефицита обезьян SIV), ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg, ДС-ИФА-АНТИ-HCV-G, ДС-ИФА-АНТИ-HAV-G, ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G («НПО Диагностические тест-системы», Нижний Новгород).

Диагностические тест-системы ДС-ИФА-ВектоКорь-IgG и ДС-ИФА-HGV-IgG (Предприятие – изготовитель «Вектор-Бест», Новосибирск).

Были также использованы ИФА тест – системы для определения прироста уровня специфических антител класса IgG к вирусам гриппа типа А (H1N1pdm09 и H3N2) производства Института гриппа (Санкт-Петербург) и диагностикумы гриппозные (H5N1) для РТГА (ООО «ППДП», Санкт-Петербург).

Результаты ИФА учитывали на спектрофотометрах «Униплан» отечественного производства и «Immunochem-2100», производства High Technology Inc., США с использованием фильтра с длиной волны 450 нм. Реактивность сывороток в отношении ВГЕ оценивалась по значениям ОП450 (оптическая плотность исследуемых образцов сывороток при длине волны 450 нм в ИФА).

Статистическая обработка результатов проводилась с определением средней арифметической (M) и стандартной ошибки (m). Достоверность различий между явлениями оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Расчет показателей осуществляли по формулам с

использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Достоверными считали различия при p≤0,05.

Результаты и обсуждение

В результате серологических исследований (рис. 1) получены данные, свидетельствующие об отсутствии инфицированности макак резусов и яванских группой вирусов, передающихся парентеральным путем с кровью - вирусом иммунодефицита человека и обезьян (HIV и SIV), вирусом гепатита B (HBV) и вирусом гепатита C (HCV), что свидетельствует об отсутствии эпидемиологической опасности этих обезьян для обслуживающего персонала и экспериментаторов.

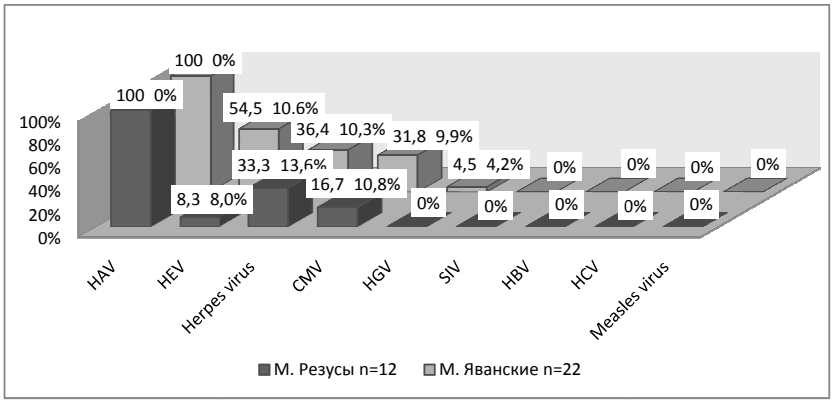


Рис. 1. Сравнительные данные по частоте распространения IgG антител к 9 вирусным агентам у макак резусов и яванских.

По данным Kalter S.S. et al., 1997 [11], антитела к SIV не были обнаружены при обследовании большого количества макак. Также были серонегативными по SIV и макаки, рожденные в Адлерском питомнике [13].

Факт обнаружения антител к HGV у одной макаки яванской в дальнейшем был подтвержден и при обследовании других обезьян рода макак – 5 из 145 (3,5%) позитивных образцов.

Инфицированность обезьян вирусом простого герпеса (HHV-1,2) и цитомегаловирусом (CMV) заслуживает особого внимания, поскольку имеются литературные данные о патогенности этих вирусов для человека [10]. Как у макак резусов, так и у макак яванских нами были выявлены IgG антитела к HHV-1,2 (33,3±13,6% и 36,4±10,3% соответственно) и CMV (16,7±10,8% и 31,8±9,9% соответственно). Следует отметить, что

герпесвирусы обезьян передаются контактным путем (в основном, со слюной). Бессимптомное носительство этих вирусов зарегистрировано ранее у значительного числа макак приматологического центра и случаев заболевания среди персонала не наблюдалось [2,9]. Поскольку животные являются клинически здоровыми, они могут быть использованы в экспериментах, не связанных с изучением специфическим свойств этих вирусов.

Представляют интерес данные об обнаружении IgG антител к возбудителям вирусных энтеральных гепатитов - HAV и HEV, передающихся фекально-оральным путем. Гепатиты А и Е являются эндемичными во многих приматологических центрах [14]. Выявлена высокая частота распространения антител к этим вирусам и среди макак Адлерского приматологического центра [6,7]. При отборе обезьян в эксперимент нами были выявлены анти-HAV IgG у 100% обследованных макак резусов и макак яванских, а антитела к HEV - у 8,3±8,0% макак резусов и у 54,6±10,6% макак яванских. Эти данные исключают возможность применения серопозитивных по HAV и HEV животных в экспериментах по изучению иммуногенности вакцин против соответствующих инфекций. Вместе с тем, серопозитивные обезьяны могут быть использованы в других экспериментах, не связанных с изучением специфических свойств вируса, поскольку HAV- и HEV – инфекции протекают, как правило, бессимптомно. При отборе обезьян в эксперименты по изучению вопросов патогенеза и иммуногенеза HAV-инфекции, а также испытания противовирусных вакцин следует иметь в виду, что только детеныши до года, возможно, не будут иметь антител к HAV. Это подтверждается исследованиями по изучению частоты распространения анти-HAV среди обезьян многих приматологических центров, в том числе, и Адлерского [7,14]. Полученные нами сероэпидемиологические данные свидетельствуют о том, что лабораторные приматы, по-видимому, не являются источником ВГЕ и ВГА- инфекции для человека.

Заслуживает внимания исследования по изучению инфицированности обезьян вирусом кори (Measles virus). Это связано с тем, что в настоящее время в России проводится интенсивная работа по созданию и испытанию различных серий отечественной тривакцины против кори, краснухи и паротита на лабораторных приматах. Наши исследования показали, что ни у одной из обследованных обезьян не выявлены антитела к вирусу кори, что свидетельствует об отсутствии циркуляции вируса среди животных. Эти данные подтверждаются результатами постоянного серологического

мониторинга и свидетельствуют об отсутствии антител к вирусу кори у обезьян, рожденных в Адлерском питомнике после 1991 года [7, 8].

Исходя из приведенных данных, следует считать, что в Адлерском приматологическом центре имеются идеальные условия для проведения экспериментов по изучению иммуногенности и безопасности противокоревых вакцин, поскольку практически все животные являются серонегативными по кори. Однако следует акцентировать внимание и на отрицательной стороне этого вопроса - отсутствия циркуляции вируса кори среди обезьян питомника. Это связано с тем, что появление источника инфекции среди серонегативных по кори обезьян может привести к вспышке кори. В таких случаях предлагается проведение вакцинации против кори как среди обезьян, так и среди обслуживающего персонала [16].

Таким образом, среди макак резусов и яванских циркулируют практически одни и те же вирусы, однако доля позитивных сывороток была достоверно выше ($p \leq 0{,}001$) лишь к HEV среди макак яванских

Большой интерес представляет оценка уровня реактивности сывороток к изученным вирусам, выраженная в значениях $ОП_{450}$ (рис. 2). Данный показатель играет немаловажную роль при оценке последствий инфекционного процесса у обезьян, отражает его интенсивность.

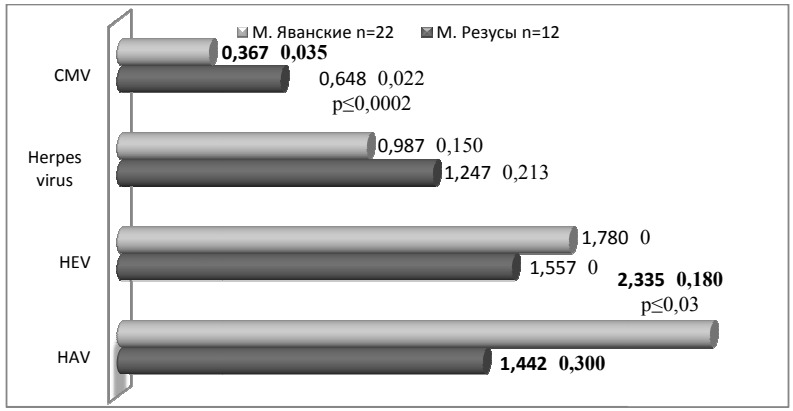


Рис. 2. Сравнительная реактивность позитивных сывороток макак резусов и яванских к различным вирусным агентам в ИФА (средние арифметические значения, выраженные в $ОП_{450}$).

Наибольшей реактивностью обладали серопозитивные сыворотки макак яванских к HAV и HEV, средней – к Herpes simplex virus и наименьшей - к CMV. Реактивность позитивных сывороток макак резусов была примерно одинаковой к HAV, HEV, Herpes simplex virus и наименьшей – к CMV. Показатели реактивности сывороток свидетельствуют также о различном уровне иммунитета обезьян к вирусным инфекциям – высоком (после инфицирования HAV и HEV) и низком (при носительстве латентных вирусов - Herpes simplex virus- 1,2 и CMV).

Являются новыми данные по определению частоты распространения антител к актуальным штаммам вируса гриппа А – пандемическому штамму (H1N1)pdm09 и так называемому штамму «сезонного гриппа» H3N2, а также к штамму птичьего гриппа H5N1 у макак резусов и яванских (n=80) в сравнительном аспекте с обслуживающим персоналом питомника (n=38) и студентами РУДН (контрольная группа) (n=47).

Полученные результаты (рис. 3) свидетельствуют об отсутствии антител к штаммам вируса гриппа А - (H1N1)pdm09 и H3N2 у обследованных макак резусов и яванских (n=80). Что касается людей, то в эпидемическом сезоне 2015 – 2016 гг. среди циркулирующих вирусов гриппа свиного происхождения пандемический штамм H1N1pdm09 был доминирующим по сравнению со штаммом «сезонного гриппа» H3N2. Доля иммунных лиц к пандемическому штамму A(H1N1)pdm09 была выше среди молодого контингента (студентов РУДН), чем у лиц старших возрастных групп (сотрудников НИИ МП) – 31,9±6,8% и 15,7±5,9% соответственно (t=1,8; p≥0,05). Уровень антител к пандемическому штамму H1N1pdm09 среди обследованных групп студентов был также значительно выше, чем у сотрудников НИИ МП.

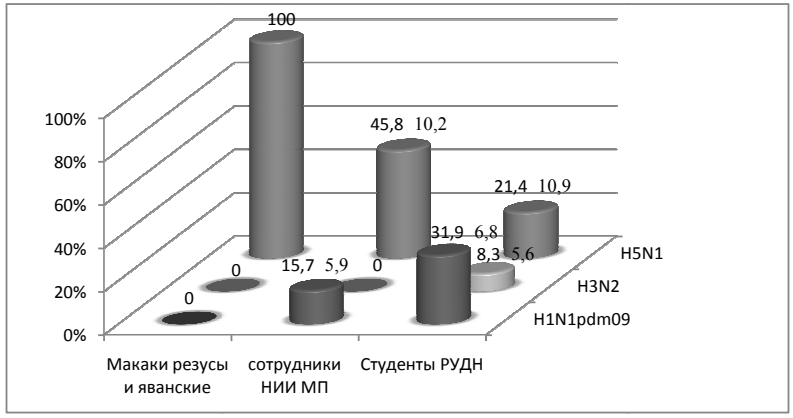


Рис. 3. Частота распространения антител к вирусам гриппа А (H1N1)pdm09, H3N2 и H5N1 среди лабораторных приматов и некоторых групп людей.

Чрезвычайно важно, что антитела к штамму вируса птичьего гриппа H5N1 были обнаружены как у макак резусов, так и у макак яванских (100%), обследованных в 2015 году (n=30). Титры антител были высокими и варьировали от 1:80 до 1:640. Средний титр равнялся 1:253,3. Титры антител распределились следующим образом: 1:80 (23,3%), 1:160 (66,7%), 1:320 (3,3%), 1:640 (6,7%.)

Следует отметить, что антитела к H5N1 были выявлены и у 45,8±10,2% обследованных сотрудников приматологического центра (n=24), но в более низких титрах 1:40-1:160. Средний титр составил 1:80. Антитела выявлялись только у лиц, обследованных в 2010-2013 гг. и отсутствовали у лиц, обследованных в 2016 г.

Обращает внимание (рис.3), что среди студентов РУДН (контрольная группа) частота распространения антител к H5N1 была ниже – 21,4±10,9% (n=14), чем среди обслуживающего персонала питомника - 45,8±10,2% (n=24), t=1,6; p≥0,05. Среди студентов, обследованных в 2016 году, было выявлено две серопозитивные к H5N1 сыворотки в титре 1:40, а в 2006 году - одна сыворотка в тире 1:160.

Полученные данные о высокой частоте обнаружения антител к штамму птичьего гриппа H5N1 среди лабораторных приматов (обезьян рода макак) представляют большое значение. Во-первых, они могут свидетельствовать, по-видимому, о возможной циркуляции штамма H5N1 среди диких птиц Адлерского района. Во-вторых, эти данные чрезвычайно важны при отборе серонегативных обезьян для изучения иммуногенности специфических вакцин. Вместе с тем, следует отметить, что обнаруженный факт серопозитивности обезьян к вирусу птичьего гриппа H5N1 в высоком титре является новым и требует всестороннего дополнительного изучения.

Наличие антител к штамму вируса гриппа H5N1 у людей может свидетельствовать либо о поствакцинальном иммунитете, либо о контакте с инфицированной птицей. Имеются литературные данные об обнаружении антитела к H5N1 у 18% здоровых доноров на территории Краснодарского края [3].

В связи с существованием угрозы возникновения новых эпидемий и пандемий гриппа, а также с целью предупреждения распространения высоко патогенных возбудителей, необходимо продолжить исследования, направленные на проведение серологического мониторинга по гриппу среди обслуживающего персонала питомника и лабораторных приматов различных видов, а также на поиск возбудителя.

Таким образом, проведенные исследования позволили на основании серологических данных охарактеризовать инфицированность обезьян возбудителями некоторых вирусных инфекций и сделать заключение о возможности использования этих животных в эксперименте, а также оценить их эпидемический риск для человека.

Список литературы

1. *Агумава А.А., Чикобава М.Г., Лапин Б.А. – Лабораторная диагностика цитомегаловируса у людей и обезьян Адлерского питомника // Бюл. экскспер.биол. - 2010. - Т.149. - №5. – С. 566-568.*
2. *Болезни обезьян, опасные для человека. Правила содержания и работы с обезьянами в карантине при поступлении животных из внешних источников, а также при экспериментальном инфицировании.// Методические рекомендации. – М.,2014. - С. 52.*
3. *Клиндухов В.П., Шевырева Т.В., Рафеенко Г.К.и др. Лабораторный мониторинг гриппа и ОРВИ на территории Краснодарского края в 2009 – 2011 г. // Инфекция и иммунитет, 2012 г., т.2, № 1 – 2.- С. 397.*
4. *Клоц И.Н., Резикян С.А., Инджия Л.В. и др. Разработка метода по созданию колонии макак резус, свободной от герпес В вирусной инфекции. // Журн. эпидемиол. и иммунобиол. – 1998. - №3. – С. 67-68.*
5. *Корзая Л.И., Лапин Б.А., Кебурия В.В., Чикобава М.Г. – Естественное инфицирование низших приматов вирусом гепатита С // Бюл.экспер. биол 2002. С. 211-214.*
6. *Корзая Л.И., Лапин Б.А., Кебурия В.В., Лазарева И.Я. – Частота выявления антител к вирусу гепатита Е у обслуживающего персонала и у макак Адлерского питомника. // Вопр. вирусол. – 2007. - №1. - С. 36-40.*
7. *Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончаренко А.М., Догадов Д.И., Лапин Б.А. – Маркеры вирусных инфекций у лабораторных приматов. //В кн.: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии. Материалы второй международной научной конференции. Том 1. (8-10 августа 2011 года, Сочи-Адлер). – 2011. - С. 79-88.*
8. *Корзая Л.И., Догадов Д.И., Кебурия В.В., Лапин Б.А. – Изучение эпидемиологических аспектов кори на модели естественной инфекции лабораторных приматов. // Материалы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням, 24-26 марта. - 2014. – Москва. - С. 146.*
9. *Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. – Проблемы инфекционной патологии обезьян. – М. 2004. - С. 140.*

10. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. / Под ред. академика РАН Д.К. Львова. // М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство». - 2013. - С. 1200.*
11. *Kalter S.S., Heberling R., Antony W. Cooke et al. – "Viral infection of nonhuman primates" // Laboratory animal science. – 1997 – P. 461-466.*
12. *Karlsson E.A., Engel G.A., Feeroz M.M. et al. Influenza virus infection in nonhuman primates. // Emerging infectious diseases – 2012. - Vol.18. - № 10. - P.1674.*
13. *Klots I.N., Sakharova T.V., Lapin B.A. Persistence of viral infections in naturally infected macaques. // In: XYth Congress of the International Primatological Society, 3-8 august, 1994, Kuta-Bali, Indonezia, (Abstracts), P.418.*
14. *Purcell R.H. and Emerson S.U. – Animal models of hepatitis A and E. // ILAR. - 2001 - Vol. 42. - No 2. – P. 161 – 177.*
15. *Schillaci MA[1], Jones-Engel L, Engel GA, Kyes RC. Exposure to human respiratory viruses among urban performing monkeys in indonesia. // Am J Trop Med Hyg. -2006. – Vol. 75. - № 4. – P. 716-719.*
16. *Willy M.E., Woodward R.A., Thornton V.B. et al. "Management of a measles outbreak among old world nonhuman Primates" // Laboratory Animal Science - 1999. – P. 42 – 48.*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГЕРМАНИЯ В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТА. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ПРИМАТАХ

Лаврентьева И.Н[1]., Семенов А.В[1]., Агрба В.З., [2,] Карал-оглы Д.Д., [2] Амбросов И.В. [3] Чугуева И.И., Гварамия И.А., Чугуев, Тотолян А.А.[1]

[1] ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

[2] ФГБНУ «НИИ МП», Адлер-Сочи, Россия

[3] ООО «ВДС Фарма», Москва, Россия

Резюме

Цель работы - доклиническое исследование возможности использования германийорганической молекулы (диаметр 0,95-1,1 нм) в качестве адъюванта.

Материалы и методы. Экспериментальная модель - половозрелые макаки и яванские, в возрасте 4-5 лет. Адъювантную активность германийорганической молекулы (ГОМ) WDS изучали при иммунизации обезьян живой краснушной вакциной (ЖКВ). Животные были разделены на две группы: 1) иммунизированные ЖКВ без адъюванта – контрольная группа) и 2) иммунизированные ЖКВ с применением адъюванта (ЖКВ+ WDS) - опытная группа). Наблюдение за макаками осуществляли на протяжении 60 суток после однократной иммунизации. *У животных обеих групп определяли* токсичность препаратов, интерфероновый статус и параметры клеточного иммунитета, уровни ИЛ-1 β, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-α и С- реактивного белка, иммуноглобулинов классов A,M,G, титры вирусспецифических антител.

Результаты. Показана безвредность использования изучаемого препарата: отсутствие местных и общих реакций на введение; отсутствие изменений биохимических и гематологических показателей сывороток крови обезьян опытной и контрольной групп. Установлено отсутствие влияния WDS на провопалительную цитокиновую систему (ИЛ-1 β, ИЛ-6, ФНО-α) и СРБ; показана также иммунологическая безопасность применения: отсутствие выраженного воздействия на показатели численности иммунокомпетентных клеток (CD3,CD4, CD8, CD16, CD20) в течение периода наблюдения (более 45 -60 суток).

Вместе с тем, под действием ГОМ выявлена существенно более активная продукция ИНФ-α, а также установлено выраженное стимулирующее действие ГОМ на факторы гуморального иммунитета.

Активирующее действие наиболее выражено (статистически достоверно, $p < 0,05$) в отношении IgA и IgM, в меньшей степени – IgG. Повышение концентрации иммуноглобулинов под действием WDS отмечалось уже на ранних сроках – через 48 час после иммунизации – и сохранялось на протяжении всего периода наблюдения.

Средняя геометрическая титра (СГТ) вирусспецифических антител, зарегистрированных в РТГА на 60-ые сутки после вакцинации, достоверно выше (в 10 раз) в подгруппе «ЖКВ + ГОМ» чем в контрольной подгруппе.

Заключение. Адъювантное действие ГОМ при применении в комплексе с живой аттенуированной вакциной в большей степени проявляется в активации факторов неспецифического иммунитета, чем в стимуляции выработки специфических антител.

Адъювантное действие изучаемого препарата в большей степени проявляется в активации адаптивного иммунитета по гуморальному (Th2)

типу ответа. Кроме того, установлена прямая антивирусная активность ГОМ (стимуляция ИНФα). Возможные области применения:

1. Усиление иммунного ответа на внеклеточные патогены.
2. Усиления действия лечебных противовирусных вакцин (например, против герпеса).

THE USE OF GERMANIUM-BASED FORMULATION AS AN ADJUVANT. THE EXPERIMENTAL STUDY ON PRIMATES.

Lavrent'eva I.N[1]., Semenov A.V[1]., Agrba VZ[2], Karal-ogly DD[2], Ambrosov IV[3] Chugueva II[2], Gvaramia IA[2], Chuguev UP[2], Totolian AA[1]

1 FSBI Institute of Epidemiology and Microbiology, Pasteur, Saint-Petersburg, Russia

2 FSBSI "RIMP" Adler-Sochi, Russia

3 "VDS Pharma" company, Moscow, Russia

Abstract

The aim of the research was a preclinical study of the possibility of using organogermanium molecule (diameter 0,95-1,1 nm) as an adjuvant.

Materials and methods. Matures (4-5 y.o.) Macaca fascicularis were used as experimental model. Adjuvant activity (WDS) of organogermanium molecule (GOM) was studied by live rubella vaccine immunization of monkeys (LRV). The animals were divided into two groups: 1) the control group monkeys were LRV immunized without adjuvant, and 2). the experimental group animals received LRV immunization with adjuvant. After a single round of immunization the monkeys were observed for 60 days. We analyzed the GOM toxicity on monkeys, the interferon status, and the parameters of cellular immunity, as well as the levels of IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, C-reactive protein (CRP) and the titers of IgG, IgA, IgM-virus-specific antibodies.

Results. The study showed that the use of GOM as adjuvant was safe and did not result in local and general reactions. No changes of biochemical and hematological parameters in monkey serums were found in both experimental and control groups. WDS did not change the levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β, IL-6, TNF-α and CRP). We also observed the absence of a pronounced effect on the numbers of immune competent cells (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20) during the observation period (45 -60 days). At the same time GOM adjuvant immunization caused a significantly more active production of IFN-α. The GOM had a pronounced stimulating effect on humoral immunity factors.

The activating effect on IgA, IgM, and, to a lesser extent, IgG-levels, was statistically significant ($p < 0.05$). Increase of immunoglobulin concentrations was observed shortly (48 hrs) after immunization and persisted throughout the observation period. The mean geometric titer (GMT) of virus-specific antibodies at 60th day after vaccination was significantly higher (10 times) in the experimental group compare to the control one.

Conclusion. GOM adjuvant effect is more pronounced when it is used in combination with the live attenuated vaccine leading to the activation of innate immunity factors rather than to the stimulation of specific antibodies.

Adjuvant effect of GOM formulation is manifested to a greater extent in the activation of humoral (Th2) adaptive immune response. In addition we found a direct antiviral activity (stimulation INFα) of GOM.

Possible areas of application are the following:

1. Enhancing the immune response to extracellular pathogens.
2. Strengthening action of therapeutic virus vaccines (e.g. anti-herpes vaccine).

Научно-исследовательские работы по созданию адъювантов активно ведутся в последнее десятилетие, чему способствует бурное развитие биотехнологии в области разработки генно-инженерных вакцин. Использование безвредных и эффективных адъювантов нового поколения зачастую необходимо для усиления иммунного ответа при вакцинации против бактерий, вирусов, простейших. В целом, применение адъювантов целесообразно при иммунизации:

- инактивированными вакцинами;
- рекомбинантными, субъединичными, пептидными вакцинами;
- групп риска (лица раннего и преклонного возраста, люди с ослабленным иммунитетом).

Цель работы - доклиническое исследование возможности использования германийорганической молекулы в качестве адъюванта.

Материалы и методы: Экспериментальная модель - половозрелые макаки яванские, в возрасте 4-5 лет, весом 2,7 - 5,2 *кг*

Адъювант – WDS - комплексное низкомолекулярное германий органическое соединение аргинина и лимонной кислоты (диаметр молекулы 0,95-1,1 нм), полученное запатентованным способом (разработчик – ООО «ВДС Фарма», патент РФ № 2476436 от 2013 г., авторы- Исаев А.В., Манашеров Т.О., Амбросов И.В., Мателo С.К.).

Адъювантную активность германий-органической молекулы (ГОМ) WDS изучали при однократной иммунизации обезьян живой

аттенуированной краснушной вакциной (ЖКВ), содержащей в качестве действующего начала вакцинный штамм вируса краснухи Wistar Ra 27/3. Прививочная доза – 1000 ТЦД 50/0,5 мл.

Животные были разделены на две группы: 1) иммунизированные ЖКВ без адъюванта – контрольная группа; и 2) иммунизированные ЖКВ с применением адъюванта (ЖКВ+ WDS, в дозе 2 мг/0,5мл) – опытная группа. Наблюдение за макаками осуществляли на протяжении 60 суток после однократной иммунизации. *У животных обеих групп определяли* острую токсичность препаратов, интерфероновый статус и параметры клеточного иммунитета, уровни ИЛ-1 β, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-α и С- реактивного белка, иммуноглобулинов классов A,M,G, титры вирусспецифических антител.

Гематологический анализ крови обезьян проводили на гематологическом анализаторе фирмы «Beckman 5 diff»,USA, *биохимический анализ* сывороток крови – на биоанализаторе BIOCHEM SA (High Technology Inc.,USA) с набором реактивов этой же фирмы.

Определение уровня цитокинов и С- реактивного белка проводили иммуноферментным методом, используя ИФА-диагностикум НПО «Вектор» (г. Новосибирск, Россия) в соответствии с инструкцией по применению.

Исследование *функциональной активности лимфоцитов* проводили путем определения способности лимфоцитов обезьян вырабатывать интерферон в ответ на воздействие индукторов интерферона. В качестве индуктора ИФН- α использовали ВБН; ИФН-γ – Con -A в концентрации 40 мкг/мл.

Для количественного определения субпопуляций лимфоцитов кровь животных исследовалась на проточном цитометре Beckman Coulter Epics XL-MCL(«Beckman Coulter», США) с использованием моноклональных антител (фирма «Becton Dickinson»). Идентификация лимфоцитов (гейтирование) осуществлялась на основе морфологических параметров клетки (по светорассеянию), т.е. на основе комбинации прямого и бокового светорассеивания. Количество клеток в гейте 5000-10000.

Состояние гуморального иммунитета изучали путем исследования сыворотки крови обезьян на присутствие иммуноглобулинов разных классов методом радиальной иммунодиффузии в геле по Манчини с использованием диагностикума производства ЦНИИ иммунологии (г. Москва).

Титры противокраснушных антител иммунизированных животных определяли в РТГА, используя «Диагностикум краснушный антигенный сухой для РТГА», производства ОНТ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» в соответствии с инструкцией по применению препарата.

Забор крови из локтевой вены в объеме 7 мл для изучения выше указанных параметров производили: до иммунизации; через 48 часов, 7, 14, 28, 45 и 60 дней после нее.

Все исследования на обезьянах проводили в строгом соответствии с требованиями комитета по биоэтике и федеральным законом РФ о защите животных от жестокого обращения (ст. 4 Закона РФ о защите животных от жестокого обращения от 01 декабря 1999 г.).

Результаты. Безопасность применения фармакологических и иммунологический препаратов, вводимых людям, наиболее важный критерий возможности их использования [2]. Поэтому на первом этапе исследования определяли безвредность адъювантов по следующим критериям:

- по наличию/отсутствию местных и общих реакций на введение препаратов в клинических наблюдениях за иммунизированными животными;
- исследованием клинических и биохимических показателей периферической крови подопытных животных.

Через 24 часа после вакцинации и в течение последующих 30 суток на месте введения видимых местных и общих реакций на введение препаратов у обезьян отмечено не было. А именно: на месте введения препарата ни в одном случае не регистрировали покраснения, отечности, расчесов. У всех опытных животных в полном объеме сохранены объем и сила движений в конечностях, координация движений, мышечный тонус.

При исследовании *гематограмм и мазков крови*, окрашенных по Романовскому-Гимза, не было обнаружено каких-либо патологических изменений клеток крови, указывающих на токсическое действие исследуемых препаратов, а именно: зернистости эритроцитов, лейкопении, появления незрелых форм лейкоцитов, эозинофилии, изменения формулы крови. *Биохимический анализ крови* исследуемых животных также не выявил сколько-нибудь существенных и закономерных изменений показателей у обезьян обеих групп как до иммунизации, так и на разных сроках после. Таким образом, по исследованным параметрам установлено отсутствие острой токсичности для лабораторных приматов препарата WDS в использованной дозе (2мг/0,5 мл).

Установлено отсутствие влияния WDS на провопалительную цитокиновую систему (ИЛ-1 β, ИЛ-6, ФНО-α) и СРБ (таблица 1), что может свидетельствовать об отсутствии активации неспецифических воспалительных реакций; о низкой реактогенности препарата. Активация

продукции IL-10 может указывать на снижение ответа по Th1-типу, усилении пролиферации В-клеток, усилении синтеза IgM и IgG.

Показатели клеточного звена иммунитета, полученные при фоновом обследовании всех экспериментальных клинически здоровых макаков яванских, варьировали в широких пределах: Т-лимфоциты (CD3) 53,2%-80,2%, Т-хелперы (CD4) 17,7%-54,6%, Т-цитотоксические/супрессоры (CD8) 20,5%-44,3%, НК-клетки (CD16) 5,0%-34,7%, В-лимфоциты (CD20) 6,5%-28,0%. Варьирование показателей содержания субпопуляций лимфоцитов у обезьян в широком диапазоне согласуются с данными других авторов [1]. В ходе эксперимента доказана иммунологическая безопасность применения WDS, а именно, отсутствие выраженного воздействия препарата на показатели численности субпопуляций лимфоцитов CD3,CD4, CD8, CD16 в течение периода наблюдения (более 45 -60 суток). Отмечена статистически значимая ($p < 0,05$) активация под действием ГОС субпопуляции лимфоцитов CD20+, которые маркируют В-клетки.

Интерфероновый (ИНФ) статус макаков яванских регистрировали по уровню α-ИФН и γ-ИФН. Ни контрольный, ни опытный препараты не оказывали существенного влияния на продукцию ИНФγ. Вместе с тем, под действием WDS выявлена более активная продукция ИНФ-α, а именно, 3-6-кратное усиление его продукции по сравнению с 2-кратным превышением исходных значений в контрольной группе. Активация продукции ИНФα свидетельствует о наличии прямого противовирусного действия WDS.

Таблица 1

Определение влияния WDS на уровень про- и противовоспалительных цитокинов и СРБ

Группа обезьян	Взятие крови	Количество цитокинов (пг/мл)				
		ИЛ-1β N=0-11	ИЛ-6 N=0-10 пг/мл	ИЛ-10 N=0-31 пг/мл	ФНО-α N=0-6 пг/мл	СРБ N=0-6 мг/мл
Контрольная (ЖКВ)	До иммунизации	0,8	0	7,8±2,3	0,3	5,6±0,8
	Через 48 час	0	0	5,0±0,2	0	6,3±0,7
	Через 28 суток	0	0	5,5±0,9	0	5,9±0,4
Опытная (ЖКВ+ WDS)	До иммунизации	0,05	0	6,8±1,6	0,2	4,8±0,9
	Через 48 час	0	0,2	12,0±1,9	0,2	5,1±0,5
	Через 28 суток	0,4	0	5,3±1,3	0,1	4,6±0,7

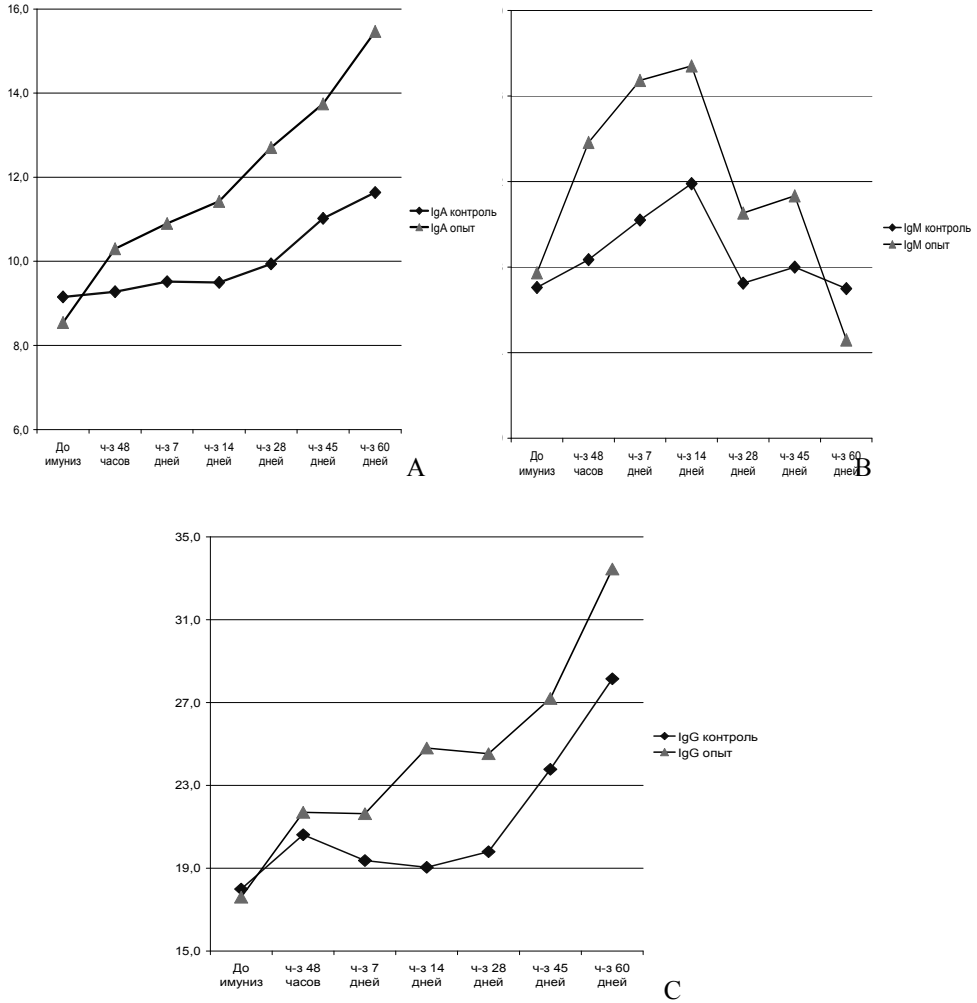


Рис. 1. Динамика формирования иммуноглобулинов классов А (А), М (В) и G (С) у обезьян опытной (ЖКВ + WDS) и контрольной (ЖКВ) групп

Установлено выраженное стимулирующее действие ГОМ на факторы гуморального иммунитета: WDS повышает концентрацию иммуноглобулинов (рис.1). Активирующее действие наиболее выражено (статистически достоверно, $p < 0,05$) в отношении IgA и IgM, в меньшей степени – IgG. Повышение концентрации иммуноглобулинов под действием WDS отмечалось уже на ранних сроках – через 48 час после иммунизации – и сохранялось на протяжении всего периода наблюдения. Несмотря на менее

выраженное воздействие WDS на иммуноглобулины класса G, средняя геометрическая титра (СГТ) вирусспецифических антител, зарегистрированных в РТГА на 60-ые сутки после вакцинации, достоверно выше в подгруппе «ЖКВ +WDS» чем в контрольной подгруппе.

Таким образом, установлена возможность применения WDS в качестве адъюванте по критериям:

1. Безвредности. А именно, отсутствию:
   - местных и общих реакций на введение препарата;
   - влияния на провоспалительную цитокиновую систему и СРБ
   - воздействия препарата на численность субпопуляций лимфоцитов.
2. Эффективности. Установлено стимулирующее действие WDS на:
   - продукцию ИНФα;
   - концентрацию IgA, IgM и IgG –антител;
   - формирование уровня вирусспецифических антител.

Заключение. Адъювантное действие германий органической молекулы WDS при применении в комплексе с живой аттенуированной краснушной вакциной в большей степени проявляется в активации адаптивного иммунитета по гуморальному (Th2) типу ответа. Кроме того, установлена прямая антивирусная активность WDS (стимуляция ИНФα**)**. Возможные области применения:

1. Усиление иммунного ответа на внеклеточные патогены.
2. Усиления действия лечебных противовирусных вакцин (например, против герпеса).

Список литературы

1. Игнатова И.Е., Агрба В.З. Показатели клеточного звена иммунитета у приматов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, Т. 149, № 1, 2010, с. 93-96.
2. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005. – М. – 829 с.

КОМПЛЕКСНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ КАК СРЕДСТВА ТЕРАПИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Новикова Л.И., Алешкин В.А., Волков А.В., Лютов А.Г., Матвеевская Н.С., Панурина Р.Л., Зуева М.М., Бочкарева С.С., Синчугова Т.В.

ФБУН МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского, Москва, Россия

Резюме

Более 70 лет иммуноглобулины применяются в медицине в качестве средств профилактики и лечения заболеваний инфекционной этиологии, причем специфическая активность таких препаратов повышается при включении в лекарственную форму кроме IgG иммуноглобулинов других изотипов (IgA и IgM). Кроме того, местное применение иммуноглобулинов на слизистых (per os, per rectum и т.д.) зачастую оказывается эффективнее и удобнее, чем парентеральное. Комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП) содержит иммуноглобулины трех основных изотипов и предназначен для местного (энтерального) применения как самостоятельный препарат, а также совместно с альфа2-интерфероном входит в комбинированный препарат «Кипферон» (суппозитории для ректального и вагинального введения). На стадии разработки находится назальная лекарственная форма КИП. Таким образом, на основании многолетнего клинического опыта можно констатировать, что именно местное применение в значительной степени обусловливает клиническую эффективность комплексного иммуноглобулинового препарата, а создание его новых лекарственных форм для местного применения на слизистых другой локализации оправданно и перспективно.

COMPLEX IMMUNOGLOBULIN PREPARATIONS FOR TOPICAL APPLICATION AS A MEAN OF THERAPY OF BACTERIAL AND VIRAL INFECTIONS

Novikova L. I., Aleshkin V. A., Volkov A. V., Lyutov A. G., Matveevskaya N. S., Panurina R. L., Zueva M. M., Bochkareva S. S., Synchugova T. V.

G.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Abstract

More than 70 years, the immunoglobulins used in medicine as a means of prevention and treatment of diseases of infectious etiology, and the specific activity of such preparations increases with inclusion in the dosage form of the immunoglobulins of other isotypes (IgA and IgM) in addition to IgG. Local application of antibodies on the mucous membranes (per os, per rectum, etc.) is often more effective and more convenient than parenteral. Immunoglobulin complex preparation (KIP) contains three major immunoglobulins isotypes and is intended for local (enteric) use as a standalone drug and in conjunction with alpha2-interferon included in the combined drug "Kipferon" (suppositories for

rectal and vaginal administration). Under development is a nasal dosage form of KIP. Thus, based on many years of clinical experience it can be stated that topical application largely determines the clinical efficacy of immunoglobulin complex preparation, and the creation of new dosage forms for topical use on mucous membranes at other sites is justified and promising.

Бактериальные и вирусные инфекции продолжают оставаться актуальной проблемой медицины несмотря на успехи терапии. По официальным данным, в России инфекции поражают около 30 млн. человек ежегодно, причем аналогичная ситуация характерна и для ряда высокоразвитых в промышленном отношении стран. Все более расширяющиеся международные контакты, в том числе проблема беженцев, формирование благоприятных условий для жизнедеятельности и переноса возбудителей инфекции внутри различных групп населения, стремительное появление новых патогенных штаммов микроорганизмов, высокорезистентных к широкому перечню современных антибактериальных средств, а также общие закономерности развития устойчивых очагов инфекций привели к тому, что зачастую инфекционные болезни не поддаются традиционным способам терапии.

Комплексное лечение инфекций предусматривает использование антибиотиков, химиотерапевтических препаратов, антитоксических средств, иммуномодуляторов и др. препаратов. Немаловажное место в этом ряду занимают препараты иммуноглобулинов. Более 70 лет назад была разработана технология фракционирования плазмы крови человека и получены первые препараты иммуноглобулинов (В.М.Русанов, Л.И.Скобелев, 1983). С тех пор иммуноглобулины применяются в медицине как в качестве самостоятельных средств профилактики и лечения ряда заболеваний инфекционной и неинфекционной этиологии, так и в комплексной терапии.

МНИИЭМ им.Г.Н. Габричевского с 40-х годов XX века занимается проблемой разработки, исследования механизмов действия и использования в клинике препаратов иммуноглобулинов, уделяя отдельное внимание способу их применения. В 1946 г. в институте были впервые получены препараты гамма-глобулина человека (Н.В.Холчев, Л.И.Колесникова, 1947), предназначенные для внутримышечного введения.

В настоящее время основная доля коммерчески доступных препаратов иммуноглобулинов, как для внутримышечного, так и для внутривенного введения, содержит иммуноглобулин G. Такой состав не обеспечивает полного использования иммунологического потенциала крови ввиду

отсутствия или крайне малого содержания антител других классов (IgM и IgA), которые также обладают высокой терапевтической активностью.

В МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского был разработан препарат, содержащий иммуноглобулины трех основных классов – IgG, IgM и IgA – и характеризующийся широким спектром антибактериальных, антивирусных и антитоксических антител – «Комплексный иммуноглобулиновый препарат» (КИП) (И.В.Борисова, 1977). Полиспецифичность КИП связана с тем обстоятельством, что он получается при фракционировании пула плазм крови от не менее чем 1000 доноров и в препарате оказываются антитела к возбудителям инфекций различной этиологии. КИП обеспечивает нейтрализацию патогенетических механизмов инфекции, что достигается наличием в препарате антител одной специфичности, но различных классов, способствующих агглютинации, нейтрализации и преципитации инфекционных агентов. Необходимо отметить, что именно из-за наличия антител других изотипов (кроме IgG) специфическая активность КИП в отношении большинства патогенов превышает таковую в препаратах, представленных только иммуноглобулином G. Помимо комплексного состава КИП отличается от других иммуноглобулиновых препаратов еще и способом введения. Он предназначен для местного (энтерального) применения.

Известно, что входными воротами большинства инфекций являются слизистые оболочки (желудочно-кишечного тракта, верхних дыхательных путей (ВДП) и т.д.), местный иммунитет которых представляет первую линию противоинфекционной защиты. Установлено, что иммунная система слизистых оболочек (ИССО) является особым и самостоятельным компонентом иммунной системы макроорганизма. В противоинфекционной защите ИССО использует как неспецифические (цитокины, натуральные киллеры и др.), так и специфические (цитотоксические лимфоциты, антитела) механизмы. В ИССО можно выделить индукторные зоны, где антигены распознаются, фагоцитируются и презентируются Т- и В-клеткам, и эффекторные зоны, где иммунокомпетентные клетки выполняют свои функции. В-лимфоциты отвечают за выработку иммуноглобулина А, главного изотипа ИССО, который появляется в индукторных зонах в ответ на антиген. При помощи Т-хелперов и цитокинов часть В-клеток дифференцируется в клетки памяти, а основная их часть мигрирует в эффекторные зоны, такие как собственная пластинка слизистой оболочки, где они трансформируются в IgA-продуцирующие плазматические клетки. Эти клетки синтезируют димеры и полимеры IgA, содержащие J-цепь. Полимерные молекулы IgA легко проникают в слизистые секреты, благодаря

трансмембранному транспорту, во время которого к ним прикрепляется секреторный компонент, превращающий IgA в секреторный – sIgA. Кроме того, в слизистых секретах можно обнаружить IgM, попавший в них также с помощью трансмембранного транспорта, и IgG, который, в основном, попадает в секреты путем транссудации из кровяного русла. Исходя из вышеизложенного представляется очевидным использовать иммуноглобулиновые препараты местно – непосредственно на слизистых оболочках, помогая местному иммунитету справиться с инфекцией.

Теоретическое обоснование энтерального применения иммуноглобулинов, в частности, КИП, разработано недостаточно, однако преимущества данного способа введения очевидны. Наряду с исключением болезненной и не всегда безвредной инъекционной манипуляции имеется возможность использования больших доз, отмечается хорошая переносимость, непосредственная и быстрая доставка препарата к очагу поражения, возможность добавления препарата в пищу, а также его введение в виде свечей при рвоте, в бессознательном состоянии и др.

Не вызывает сомнения тот факт, что под действием протеаз в кишечнике происходит частичное разрушение антител. Однако, антитела, сохранившие серологическую активность, и их фрагменты, обнаруживаются как в содержимом толстого кишечника, так и в копрофильтратах через несколько суток после перорального введения иммуноглобулинового препарата (Blum et al., 1981; Losonsky et al., 1985). По нашим данным, полученным при проведении эксперимента по введению меченного биотином КИП per os, некоторая часть иммуноглобулиновых молекул и их фрагментов всасывается в кровь (Л.И.Новикова с соавт., 2010). Кроме того, при энтеральном способе приема КИП часть иммуноглобулинов всех трех классов некоторое время остается в слюне пациента, что усиливает местный иммунитет ротоглотки.

Таким образом, терапевтический эффект при пероральном (энтеральном) применении иммуноглобулинов может быть обусловлен двумя факторами. Во-первых, местным действием препарата как в просвете тонкой кишки, так и дистальных отделов кишечника (блокирование рецепторов микробных клеток, уменьшение адгезии микробов на клетках эпителия и угнетение их размножения и др.). Во-вторых, помимо местного можно рассчитывать и на системное действие, обусловленное всасыванием молекул иммуноглобулинов в кровь с сохранением специфичности.

За 25-летний период клинического применения комплексный иммуноглобулиновый препарат зарекомендовал себя как надежное противоинфекционное средство, эффективное не только как элемент

комплексной терапии, но и как самостоятельный препарат, для лечения острых бактериальных и вирусных кишечных инфекций, дисбактериозов.

Другая точка приложения иммуноглобулинотерапии – слизистая ВДП. У здорового человека респираторный тракт (в частности, носовая полость, горло) оснащен весьма эффективными анатомическими, механическими, иммунологическими барьерными механизмами (мукоцилиарный клиренс, откашливание, секреторные иммуноглобулины (главным образом, sIgA), фагоциты, опсонины, комплемент, сурфактанты и многие другие факторы), которые участвуют в противоинфекционной защите. Перечисленные защитные механизмы находятся в состоянии постоянной борьбы или динамического противостояния с респираторными микроорганизмами и вирусами, препятствуя их колонизации слизистой оболочки и проникновению в клетки эпителия. Однако, в ряде ситуаций местный иммунитет слизистой не справляется, что выливается в рецидивирующие инфекции различной локализации вплоть до серьезных проблем в нижних отделах респираторного тракта. По мнению Daele J. & Zicot A.F. (2000), у значительного количества больных хроническими и рецидивирующими инфекциями ВДП есть местный дефицит иммуноглобулинов. Пополнить дефицит иммуноглобулинов в верхних дыхательных путях можно путем их местного (интраназального) введения.

В настоящее время в МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского на стадии разработки и доклинического изучения находится новый препарат на основе КИП – «КИП назальный». Обеспечивая благодаря соответствующей лекарственной форме поступление иммуноглобулинов непосредственно в носовой секрет, препарат будет способствовать укреплению местного иммунитета носоглотки и может быть использован для профилактики и терапии вирусных и бактериальных инфекций верхних дыхательных путей, поскольку содержит антитела различных изотипов к респираторно значимым патогенам (респираторно-синцитиальный вирус, вирусы гриппа А и В и парагриппа, *M.pneumoniae*, *S.aureus*, *B.pertussis* и др.). Разработана технология получения препарата «КИП назальный» (капли в нос), проведены исследования фармакокинетики препарата при местном (интраназальном) введении человеку (Л.И.Новикова с соавт., 2015). На базе НИИ медицинской приматологии проведены испытания безвредности (переносимости) трех экспериментально-производственных серий препарата на обезьяньей модели (соавторы – Джикидзе Э.К., Аршба И.М., Вышемирский О.И., Чугуева И.И.).

В МНИИЭМ им.Г.Н.Габричевского имеется также опыт создания комбинированных иммунобиологических препаратов местного применения, содержащих в своем составе иммуноглобулины. В первую очередь, это

препарат «Кипферон», внедренный в медицинскую практику в 2000 г. и представляющий собой комплекс КИП с рекомбинантным α_2-интерфероном человека (Г.Г.Онищенко с соавт., 2002). Кипферон выпускается в виде ректальных и вагинальных суппозиториев и предназначен для терапии острых вирусных (ротавирусных) и бактериальных (сальмонеллёз, дизентерия, коли-инфекция) кишечных инфекцияй, дисбактериоза кишечника различного происхождения у детей, урогенитального хламидиоза у женщин, в том числе, с проявлениями дисбактериоза влагалища, вульвовагинита, цервицита, эрозии шейки матки.

Комплексный иммуноглобулиновый препарат в составе препарата «Кипферон» обеспечивает стабилизацию лабильного интерферона в отношении многих физико-химических и биологических факторов секретов слизистых оболочек; нормализует местный секреторный иммунитет за счёт поступления IgG, IgA и IgM (заместительная терапия); повышает антивирусный, антибактериальный и антихламидийный эффект интерферона за счёт соответствующих специфических антител; повышает активность местно образуемых цитокинов; ускоряет ликвидацию дисбактериоза.

Таким образом, на основании многолетнего клинического опыта можно констатировать, что именно местное применение в значительной степени обусловливает клиническую эффективность комплексного иммуноглобулинового препарата, а создание его новых лекарственных форм для местного применения на слизистых другой локализации оправданно и перспективно.

ИММУННЫЕ И ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У БАБУИНОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ЗАРАЖЕННЫХ ВИРУСОМ ЭБОЛА (ВЭ), АДАПТИРОВАННЫМ К МОРСКИМ СВИНКАМ

А.А.Чепурнов, А.М.Шестопалов**, Г.М.Игнатьев***

** ФГБНУ "НИИ фундаментальной и клинической иммунологии" СО РАН, Новосибирск, Россия*

*** ФГБНУ "Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины", Новосибирск, Россия*

Резюме

Динамика патофизиологических и иммунологических параметров у обезьян Papio Hamadryas инфицированных вариантом ВЭ, адаптированным к морским свинкам показали, что этот штамм вируса сохранил свою вирулентность для обезьян и вызвал заболевание с характерными признаками, аналогичными тем, которые вызваны диким штаммом. Тем не менее, зафиксированы некоторые отличия в течение болезни: продление срока инкубационного периода на два дня; увеличение срока сохранения стабильности биохимических показателей крови после инфицирования; отмечена вакуолизация цитоплазмы нейтрофилов; появление ювенильных лимфоцитов на 3-й день и до гибели животных; значительное увеличение спонтанной пролиферации мононуклеарных клеток (наряду с уменьшением пролиферации митоген-индуцированной) в терминальной стадии инфекции. Тяжесть патологической коагуляции коррелирует с активностью сыворотки цитокинов IFN-альфа и ФНО-альфа: их деятельность увеличилась примерно 250 и 100 раз соответственно. Так же отмечено существенное изменение в активности натуральных клеток-киллеров, снизившееся к моменту гибели животных.

IMMUNE AND PATHOPHYSIOLOGICAL PROCESSES IN BABOONS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH EBOLA VIRUS (VE) ADAPTED TO GUINEA PIGS

Chepurnov A.A., Shestopalov A.M.**, Ignat'ev G.M.***

** FSBSI "Institute of Clinical Immunology", Siberian Branch, Academy of Sciences of Russia, Novosibirsk, Russia*

*** FSBSI " Institue of Experimental and Clinical Medicine", Novosibirsk, Russia*

Abstract

Dynamics of pathophysiological and immunologic parameters in Papio Hamadryas infected with VE variant adapted to guinea pigs showed that this virus strain kept its virulence for monkeys and caused the disease with characteristic signs analogous to those caused by the wild strain. However, some differences in the course of the disease were observed: the incubation period increased by 2 days; biochemical parameters of blood after infection were stable for longer time; vacuolization of neutrophil cytoplasm was noticed; juvenile lymphocytes appeared on the 3rd day and were found until the death; in the terminal stage of infection the significant increase in spontaneous proliferation of mononuclear cells (together with the decrease in mitogen-induced proliferation) was registered. The severity of pathological coagulation correlated with the activities of serum cytokines IFN-alpha and TNF-alpha increased by factors of 250 and 100, respectively. Also the significant change in the activity of natural killer cells was found. This change decreased by the death of animals.

ПЦР КАК ИНФОРМАТИВНЫЙ ТЕСТ В ДОКЛИНИЧЕСКОМ ИЗУЧЕНИИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВЫХ ВАКЦИН В ОПЫТЕ НА ОБЕЗЬЯНАХ МАКАКА-РЕЗУС

Шамсутдинова О.А., Лаврентьева И.Н.**, Агрба В.З.**

** ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия*

*** ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме

Целью данного исследования является оценка возможности использования метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в изучении нейровирулентных свойств живых противовирусных препаратов, на примере доклинического изучения остаточной нейровирулентности вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В».

В ПЦР с гибридизационно-флюоресцентнойдетекцией выявляли РНК вируса краснухи в аутопсийном материале (лимфатические узлы, кусочки легкого, поджелудочной железы, печени и селезенки) четырнадцати самцов макак-резусов, зараженных интрацеребрально препаратом из штамма «Орлов-В», коммерческой вакциной против краснухи Rudivax, содержащей в вакцинный штамм WistarRA27/3, а также контрольных животных (группа плацебо). Для подготовки и проведения метода ПЦР использовали набор реагентов «АмплиСенс RubeIIa virus-FL» (ЦНИИЭ, г. Москва). Проведенное исследование по индикации РНК вируса краснухи в аутопсийном материале не выявило ни одного положительного случая, что соответствует результатам гистологического исследования и является свидетельством безопасности вакцинных штаммов вируса краснухи. Таким образом, метод детекции НК вируса может быть использован в качестве подтверждающего теста и дополнять патоморфологические исследования при оценке специфической безопасности противовирусных вакцинных препаратов.

PCR IS AN INFORMATIVE TEST IN SAFETY PRECLINICAL STUDY OF SPECIFIC LIVE VACCINES IN MACAQUE RHESUS

O.A.Shamsutdinova[1], I.N.Lavrent'eva[2], V.Z.Agrba[1]

[1]FSBSI Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia

[2] FBUN Institute of Epidemiology and Microbiology, Pasteur, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

The aim of the research was assessment of the possibility of PCR-hybridization-fluorescence detection method to study the properties of live neurovirulent antiviral preparations, based on a preclinical study of residual neurovirulence of the rubella virus vaccine strain "Orlov-B."

The presence of rubella virus RNA in autopsy material (lymph nodes, pieces of lung, pancreas, liver, and spleen) of fourteen male rhesus macaques infected intracerebrally with "Orlov-B" strain vaccine, a commercial vaccine against rubella Rudivax (consisted of a vaccine strain Wistar RA27/3), and control animals (placebo group) was detected by PCR-hybridization-fluorescence detection method. The kit «AmpliSensRubeIIa virus-FL» (CRIE, Moscow) was used for RNa preparation and PCR. The study did not show the presence of rubella virus RNA in any autopsy materials, which coincides with the results of histological examination and confirms the safety of rubella virus vaccine strains. Thus, the proposed method of virus nucleic acid detection can be used as a confirmatory test and can supplement the pathologic morphological examination when assessing specific safety of antiviral vaccines.

Корь, краснуха, эпидемический паротит занимают важное место в инфекционной патологии человека, и наиболее эффективным методом борьбы с ними является вакцинопрофилактика.

В настоящее время специфическую профилактику кори, краснухи и эпидемического паротита во всем мире проводят только живыми аттенуированными вакцинами[1]. Несмотря на многолетнее и эффективное их применение описан ряд недостатков живых вакцин. Одним из них является их реактогенность [6,7]. В связи с этим обстоятельством ВОЗ поставила задачу особого контроля безопасности живых вакцин [5].

Ключевым требованием, предъявляемым к специфической безопасности живых вирусных вакцин,я вляетсяостаточная нейровирулентность [2]. Оценка остаточной нейровирулентности как производственных, так и посевных вакцинных штаммов, используемых для изготовления живых вакцин, проводится на обезьянах макака резус, яванских макаках и зеленых мартышках, в тесте интрацеребрального заражения. Оценка отсутствия или наличия вирусспецифических поражений ЦНС и внутренних органов основывается на анализе морфологических и гистологических данных. В том и другом случае оценка специфической

безопасности противовирусных вакцинных препаратов в значительной мере субъективна. Производственные штаммы и посевные вирусы считаются не нейровирулентными, если при гистологическом исследовании ЦНС отсутствуют множественные васкулиты с участками интенсивной диффузной или очаговой глиально-гистиоцитарной пролиферации в паренхиме мозга, выраженные дистрофические изменения и деструкция нервных клеток за пределами перитравматической зоны [3].

В настоящее время, представляется необходимым поиск и разработка новых современных методов исследования направленных на выявление инфекционного антигена и его наследственной информации (ДНК/РНК).

Одним из наиболее информативных методов лабораторной диагностики является молекулярно-биологический метод исследования – полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. В основе данного метода лежит экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК или кДНК и эквивалентное накопление сигнала флуоресценции. Это возможно благодаря использованию гибридизационныхолигонуклеотидных зондов, меченных молекулами флуорофора[4].

Целью данного исследования является оценка возможности использования метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в изучении нейровирулентных свойств живых противовирусных препаратов, на примере доклинического изученияостаточной нейровирулентности вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В».

Специфическую безопасность исследуемого препарата и препарата сравнениязучали при интрацеребральном заражении 14 клинически здоровых серонегативных самцов вида Macacamulattав возрасте от 3 до 6 лет. В эксперименте 10 животным было проведено интрацеребральное введение препарата, содержащего производственный штамм «Орлов-В», 2 животным – препарата сравнения (коммерческой краснушной вакциной Рудивакс, содержащей штамм Wistar RA 27/3), и 2 контрольным обезьянам – растворителя вакцины.

Через 27 суток после заражения животных подвергали эвтаназии с последующей полной некропсией. Материалом для проведения ПЦР служили пробы РНК, выделенные из аутопсийного материала (лимфатические узлы, кусочки легкого, поджелудочной железы, печени и селезенки).

В ходе исследования были использованы патоморфологические, гистологические и молекулярно-биологические методы исследования.

Выявление вируса краснухи методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включало в себя три этапа: экстракцию РНК из исследуемого материала, обратную транскрипцию РНК и амплификацию фрагмента кДНК, гибридизационно-флуоресцентную детекцию. Экстракцию РНК из аутопсийного материала проводили при помощи комплекта реагентов для выявления РНК/ДНК «АмплиПрайм РИБО-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Для проведения обратной транскрипции и ПЦР-амплификации кДНК с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в режиме «реально времени» использовали набор реагентов «АмплиСенсRubellavirus-FL» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Аналитическая чувствительность тест-системы составляла 400 копий/мл. Все этапы выполняли по стандартному протоколу производителя.

ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили на амплификаторе RotorGene 6000 (CorbettResearch, Австралия).

Учет результатов ПЦР-анализа и контрольных точек различных этапов ПЦР проводили на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флуоресценции с установленной на уровне 0,03 пороговой линией и последующего сравнения величины сигнала (Ct) в исследуемых образцах относительно контрольных. Положительными считались образцы, у которых кривая флуоресценции имела типичный для ПЦР в реальном времени S-образный вид, однократно пересекалась с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции и значение порового цикла (Ct) не превышало значение 35. Отрицательными считались образцы, кривая флуоресценции которых не пересекала пороговую линию.

В результате проведенного нами исследования, по выявлению РНК вируса краснухи в аутопсийном материалеу животных зараженных исследуемым препаратом и препаратом сравнения, не выявлено ни одного положительного случая (табл. 1).Полученные данные подтверждаются результатами гистологического исследования, и являются свидетельством безопасности вакцинного штамма вируса краснухи.

Таким образом, показано, что метод ПЦРс гибридизационно-флуоресцентной детекцией высоко информативен и может быть использован в доклинической проверке остаточной нейровирулентности вакцинных штаммов живых противовирусных вакцин.

Таблица 1

Выявление РНК вируса краснухи (Rubellavirus) в аутопсийном материале методом ПЦР сгибридизационно-флуоресцентной детекцией

№ обезьяны	Материал для заражения	Аутопсийный материал	Результат
38301	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
38295	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
38580	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
38813	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
39029	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
38304	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
37618	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
37726	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
37344	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
37876	Штамм «Орлов-В»	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
38429	Штамм Wistar RA 27/3	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
38348	Штамм Wistar RA 27/3	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
38781	Растворитель вакцины	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено
38980	Растворитель вакцины	лим. узлы, легкое, поджел. железа, печень, селезенка	Не обнаружено

Список литературы

1. Зверев В.В., Юминова Н.В. Проблемы кори, краснухи и эпидемического паротита в Российской Федерации // Вопросы вирусологии. – 2004. – № 3. – С. 8–11.
2. Медуницын Н.В. Вакцинология. Изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Триада-Х, 2004. – 448 с.
3. Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи //ОФС.1.7.2.0010.15

4. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР в реальном времени. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
5. Учайкин В.Ф., Шамшева О.В. Руководство по клиническойвакцинологии. – ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 592 с.
6. JeffersonT.,PriceD.,DemicheliV., BiancoE. Unintended events following immunization with MMR: a systematic review. Vaccine, 2003,vol. 21, no. 25–26, pp. 3954–3960.
7. Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. Virology., 2015, vol. 479-480, pp. 379-392.

МИКОПЛАЗМЕННЫЕ ИНФЕКЦИИ И ИХ РОЛЬ В СПОНТАННОЙ ПАТОЛОГИИ ОБЕЗЬЯН

Аршба И.М.[*], Раковская И.В.[**], Горина Л.Г.[**], Бархатова О.И.[**], Левина Г.А.[**], Гамова Н.А.[**], Гончарова С.А.[**], Агумава А.А.[*]

[*]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», г. Сочи

[**]ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», г. Москва

Резюме

Целью настоящего исследования являлось выявление частоты инфицированности и этиологической роли микоплазм в спонтанной патологии обезьян.

Были обследованы клинически здоровые обезьяны, исследованы погибшие взрослые особи и детеныши разных видов обезьян, также была обследована часть животных африканского происхождения (мартышки зеленые) привезенная из мест естественного обитания. Общее количество животных составила 144 особей разного вида (макаки резусы, яванские, лапундеры, зеленые мартышки, павианы гамадрилы, анубисы). Материалом для исследования являлись: соскобы из уретры самцов, соскобы урогенитального тракта здоровых самок, соскобы полости матки и плаценты погибших самок с патологией беременности и родов, органы погибших детенышей и взрослых обезьян от пневмоний.

Исследование включает микробиологические, молекулярно-генетические, серологические методы.

В результате исследования среди клинически здоровых обезьян при видовой идентификации микоплазм методом ПЦР было обнаружено в 28,3%

случаев *M.hominis* и 14,9% *Ureaplasma. spp.* Установлено, что длительно персистировать могут не только живые клетки урогенитальных микоплазм обезьян, но и их отдельные АГ, о чем свидетельствуют серологические данные методом РАГА *M.hominis* 46,2% и *Ur.urealyticum* 59,7%.

Выявлена высокая частота обнаружения *M. pneumonia* у обезьян с патологией органов дыхания, что составило 31,9 %.

Детекция микоплазм и уреаплазм у детенышей обезьян в пуповине, также свидетельствует о внутриутробном инфицировании плода. Об этиологической связи названной патологии с представителями класса *Mollicutes* свидетельствует обнаружение последовательностей нуклеиновых кислот соответствующих возбудителей в соскобах эндометрия погибших самок.

Таким образом, проведенное исследование установило распространение и роль микоплазменной инфекции у обезьян как при патологии урогенитального тракта, так и при патологии органов дыхания. Показана длительная персистенция микоплазм, о чем свидетельствуют серологические данные. Результаты исследований обосновывают необходимость контроля обезьян на носительство представителей класса *Mollicutes* при использовании этих животных в медико-биологических экспериментах, в частности направленных на изучение механизмов патогенеза микоплазм и испытания эффективности антимикоплазменных препаратов.

MYCOPLASMA INFECTIONS AND THEIR ROLE IN SPONTANEOUS PATHOLOGY OF MONKEYS

I.M. Arshba[1], I.V. Rakovskaya[2], O.I. Barkhatova[2] , G.A. Levina[2], L.G. Gorina[2], N.A. Gamova[2], S.A. Goncharova[2] , A.A. Agumava[1]

[1]FSBSI "Institute of Medical Primatology," Sochi, Russia

[2]FSBI "N.F. Gamalei Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology", Moscow, Russia

Abstract

The aim of this study was to determine the frequency of infection and the etiological role of Mycoplasma in the spontaneous pathology of monkeys.

Clinically healthy and dead adults and young monkeys of different species were examined. Total number of animals (Rhesus monkeys, Long-tailed macaques, African green monkeys, Baboons) was 144. The scrapings from male urethra, scrapings of the urogenital tract of healthy females, scrapings of the uterus and placenta of dead females with pathology of pregnancy and childbirth, the internal organs of young and adult monkeys died from pneumonia served as material for research.

Microbiological, molecular-genetic, and serological methods were used. PCR method allowed identification of Mycoplasma species among clinically healthy animals. Wherein we detected in 28.3% of cases *M.hominis* and in14,9% of cases *Ureaplasma. spp.* It was established that not only Urogenital Mycoplasma, but also their single antigens, might persist for a long time. It was evidenced by serological aggregation-hemagglutination test results showing the presence of *M.hominis* in 46,2% and *Ur.urealyticum* in 59,7% of cases.The high frequency of *M. pneumonia* detection in monkeys with the pathology of the respiratory system, which accounted for 31.9%, was revealed.

Detection of Mycoplasma and Ureaplasma in umbilical cord of newborns also indicates intrauterine infection of the fetus. The etiological link of this pathology with the presence of the *Mollicutes* class representatives was shown by the detection of corresponding nucleic acid sequences in scrapes of endometrium of dead females.

Thus, this study has established wide presence and possible etiological role of mycoplasma infection in monkeys both in the urogenital tract and the respiratory system pathologies. The serological data show long-term persistence of mycoplasma.

The research results prove the necessity to control the presence of *Mollicutes* class representatives when using these animals are going to be used in biomedical experiments, in particular in ones aimed to study the mechanisms of the Mycoplasma pathogenesis and the determination of anti-Mycoplasma drug effectiveness.

Возбудители микоплазмозов относятся к классу *Mollicutes,* семейству *Mycoplasmataceae*, роду *Mycoplasma*. К настоящему времени известно более 120 видов микоплазм. Микоплазмы самые мелкие свободноживущие полиморфные прокариоты, лишенные ригидной оболочки, они не способны к образованию покоящихся форм и спор, однако в неблагоприятных условиях могут переходить в некультивируемое состояние с формированием «минимальных тел». Микоплазменная инфекция широко распространена среди людей, разных видов животных, птиц и растений.

Роль микоплазм *M.hominis, U.urealyticum* и *U.parvum* в этиологии воспалительных заболеваний мочеполовой системы у людей до сих пор дискутируется, ученые не пришли к единому мнению. По мнению ряда авторов, их присутствие связывают с развитием уретрита, вагинита,

воспалительных заболеваний органов малого таза, а также данные микроорганизмы могут стать причиной бесплодия, влиять на исход беременности (приводить к преждевременным родам, рождению детей с низкой массой тела, послеродовому эндометриту), а также вызывать инфекционно-воспалительные заболевания у новорожденных.

Достаточно часто встречаются эти микроорганизмы и у обезьян. К настоящему времени микоплазмы были выделены от различных видов африканских и азиатских обезьян со слизистых оболочек носоглотки, урогенитального тракта, органов дыхания. Многие виды микоплазм выделенных у людей обнаруживаются и у обезьян (*M. hominis, M. buccale, M. orale, M. primatum* и др.). Ранее в лаборатории молекулярной биологии «НИИ Медицинской приматологии» было показано, что нуклеотидная последовательность секвенированного фрагмента 16S рРНК микоплазмы, обнаруженной у M.fascicularis, идентична нуклеотидной последовательности *M.primatum* (AY779748). Проведенный сравнительный и филогенетический анализ секвенированного фрагмента ДНК установил, что выявленная микоплазма принадлежит к виду *M.primatum* и входит в один кластер с *M. hominis*.

Целью настоящего исследования являлось выявление частоты инфицированности и этиологической роли микоплазм в спонтанной патологии обезьян.

Материалы и методы

Общее количество исследованных животных составило 144 особей разного вида (макаки резусы, яванские, лапундеры, зеленые мартышки, павианы гамадрилы, анубисы). Материалом для исследования являлись: соскобы из уретры самцов, соскобы урогенитального тракта здоровых самок, соскобы полости матки и плаценты погибших самок с патологией беременности и родов, органы погибших детенышей и взрослых обезьян от пневмоний – в частности легкое, а также другие паренхиматозные органы.

Исследование включает микробиологические, молекулярно-генетические, серологические методы.

Для культивирования микоплазм использовали коммерческую среду «Difko PPLO Broth» и «Difko PPLO Agar» с добавлением 20% сыворотки крови лошади и 1% L- аргинина (для *M.hominis*) и мочевины 0,05% (для *U.urealyticum* и U.*parvum)*, пенициллина (100 ед/мл), индикатора роста фенолового красного (0,005%). Для выделения микоплазм из сыворотки крови обезьян использовали среду SP-4.

Антигены определяли с помощью реакции агрегат-гемагглютинации (РАГА) разработанную лабораторией микоплазм и L-форм бактерий при НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, использовали для выявления антигенов микоплазм в сыворотке крови в концентрации 0,001-0,0001 мкг/мл (по белку). Учет полученных результатов производили по 4-х крестной системе. Титр при неспецифическом взаимодействии обычно не превышает 1:4. Минимальный диагностический титр 1:8.

Для выявления специфических антител к микоплазмам использовали реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА). Для выявления специфических антител G и M классов использовали модификацию иммуноферментного анализа (ИФА). Диагностические препараты и методики постановки разработаны лабораторией микоплазм и L-форм бактерий.

Выявление ДНК микоплазм осуществляли с помощью тест-систем ООО «ИнтерЛабСервис» ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, универсальная тест-система «Мик-Ком*»(Mycoplasma spp),* выявляющая ДНК микоплазм в целом; АмплиСенс *M.hominis*, АмплиСенс *M.genitalium* и АмплиСенс *M.pneumoniae* для обнаружения ДНК конкретных видов микоплазм, а также АмплиСенс *Ureaplasma spp*. для ДНК *U.urealyticum* и *U.parvum*., которые состояли из экстракции ДНК, амплификации и детекции с помощью электрофоретического анализа в агарозном геле.

Результаты и обсуждение

Для определения этиологической роли микоплазменной инфекции было исследовано 144 обезьян разного вида, пола и возраста от 1 дня до 26 лет (табл.1). Были исследованы различные группы обезьян: клинически здоровые обезьяны, погибшие самки при патологии беременности и родов, погибшие взрослые обезьяны и детеныши с патологией органов дыхания.

Таблица 1

Количество исследованных обезьян по видам.

Вид обезьян	Количество
Макаки резус	56
Макаки яванские	37
Макаки лапундер	4
Мартышки зеленые	5
Павианы гамадрилы	31
Павианы анубисы	11
ВСЕГО	144

Среди клинически здоровых обезьян при видовой идентификации микоплазм методом ПЦР было обнаружено в 28,3% случаев *M.hominis* и 14,9% *Ureaplasma spp.* Эти данные совпадают с данными литературы, ДНК *Ureaplasma spp.* выявляли значительно реже, чем других видов, об этом свидетельствует своеобразная биология уреаплазм (меньшая интенсивность размножения, большая чувствительность к условиям окружающей среды), которая влияет на длительность их персистенции в крови, и следовательно, на результаты выявления ДНК.

Установлено, что длительно персистировать могут не только живые клетки урогенитальных микоплазм обезьян, но и их отдельные АГ. Выявление антигенов также является показателем инифицированности обезьян данными возбудителями, о чем свидетельствуют серологические показатели методом РАГА *M.hominis* 46,2% и *Ur.urealyticum* 59,7%.

Циркуляция антигенов и антител микоплазм представлена в диагностических титрах 1:8- 1:16 и 1:32 соответственно. При сравнительном анализе исследования сыворотки обезьян на содержание антигена методом РАГА в течение года, было показано, что уровень антигенов снижается почти в 1,5 раза у *M.hominis* и в 2,5 раза *Ur.urealyticum* (рис.1).

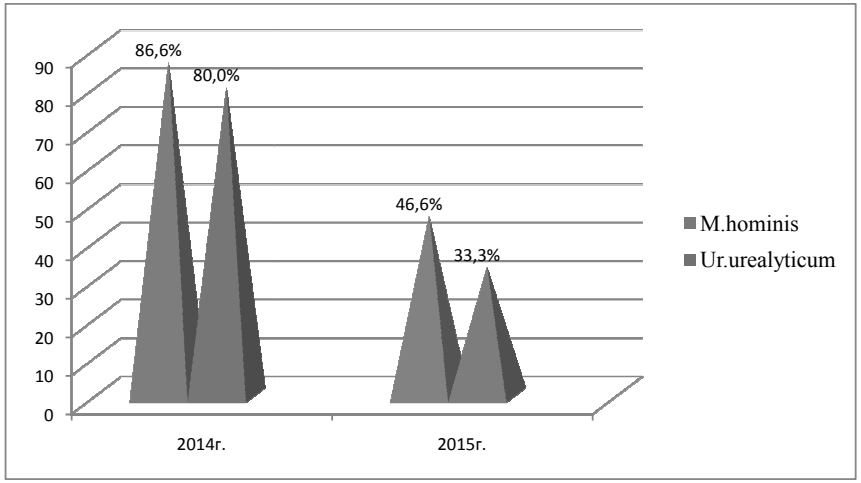


Рис.1 Циркуляция антигенов у клинически здоровых обезьян методом РАГА

Данные серологических показателей свидетельствуют о длительной персистенции микоплазм.

Микоплазменная инфекция у обезьян протекает в бессимптомной форме, без клинических проявлений. У обследованных больных обезьян с

патологией беременности и родов частота обнаружения урогенитальных микоплазм методом ПЦР значительно возрастает (56%), встречаются как моно, так и микстинфекции вызванные хламидиями. Было установлено, что антитела классов G и M чаще обнаруживались у больных обезьян, причем у некоторых самок встречались одновременно антитела классов G и M к *Ur.urealyticum.*

Из соскобов урогенитального тракта от 3 обезьян были выделены культуры, растущие в виде «мини-колоний», подтверждены молекулярно-генетическим методом как *M.hominis*. Линейные размеры «мини-колоний» были меньше типичных на порядок (30мкм), а по площади на два порядка (300мкм^2). Они с трудом пассировались на агаровой питательной среде и ни в одном случае не реверсировали в колонии с типичной морфологией.

Выявлена высокая частота обнаружения *M. pneumonia* у обезьян с патологией органов дыхания, что составило 31,9 %, с частотой 15,9% и 14,2% были обнаружены хламидии и уреаплазмы, в частности *Ch.trachomatis*, *Ureaplasma spp*. При патолого-морфологическом исследовании было показано, что патология органов дыхания сопровождалась пневмониями – левосторонними, правосторонними, двусторонними, крупозными и др. Также, отмечено, что *M. pneumonia* чаще встречается как моноинфекция и реже, как микст-инфекция с хламидией и уреаплазмой. Частота обнаружения *M. pneumonia* у детенышей наблюдается как при мертворождении, так и при патологии органов дыхания, что свидетельствует об антенатальном и интранатальном пути инфицирования исследуемых детенышей. Детекция микоплазм и уреаплазм у детенышей обезьян в пуповине, также свидетельствует о внутриутробном инфицировании плода. Об этиологической связи названной патологии с представителями класса *Mollicutes* свидетельствует обнаружение последовательностей нуклеиновых кислот соответствующих возбудителей в соскобах эндометрия погибших самок.

При хронических патологических процессах урогенитального тракта у людей отмечена длительная персистенция уреаплазм и микоплазм, описаны длительные персистенции в нижних отделах дыхательных путей новорожденных при хронических заболеваниях легких. Микоплазмы обладают удивительной способностью ускользать от иммунологического надзора и длительно персистировать в инфицированном организме. Некоторые виды микоплазм могут оказывать иммуносупрессивное воздействие, что является решающим фактором в генезе смешанных микоплазмо-вирусных и микоплазмо-бактериальных инфекций. Учитывая все выше изложенное и проведенное нами исследование еще раз показало

распространение и роль микоплазменной инфекции у обезьян как при патологии урогенитального тракта, так и при патологии органов дыхания. Показана длительная персистенция микоплазм, о чем свидетельствуют серологические данные.

Таким образом, результаты исследований обосновывают необходимость контроля обезьян на носительство представителей класса *Mollicutes* при использовании этих животных в медико-биологических экспериментах, в частности направленных на изучение механизмов патогенеза микоплазм и испытания эффективности антимикоплазменных препаратов.

МАРКЕРЫ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ОБЕЗЬЯН, ИМПОРТИРОВАННЫХ В АДЛЕРСКИЙ ПРИМАТОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР

Д. И. Догадов[*], Л. И. Корзая[*], К.К. Кюрегян[**], А.А. Карлсен[**], А.М. Гончаренко[*]

[*]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт Медицинской приматологии», Сочи

*[**]ФГБНУ **«Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова»**, Москва*

Резюме

Обезьяны, поступающие из-за рубежа, особенно из мест естественного обитания, несмотря на здоровый вид, могут быть носителями различных патогенов, представляющих опасность как для окружающих животных, так и для обслуживающего персонала. Кроме того, импортированные обезьяны могут быть подвержены вирусным инфекциям, распространенным среди акклиматизированных животных, поэтому определение специфических маркеров вирусных инфекций у импортированных обезьян является важным и необходимым этапом во время их содержания в карантине.

Целью данной работы являлось изучение распространения специфических маркеров кишечных вирусных инфекций у обезьян, импортированных в Адлерский приматологический центр.

В работе были использованы сыворотки крови и фекальные образцы от обезьян, импортированных в Адлерский приматологический центр. Всего было исследовано 40 фекальных образцов и 38 сывороток крови от зеленых мартышек (*Chlorocebus pygerythrus*), прибывших из мест естественного

обитания (Танзания) (июнь 2014), а также 44 фекальных образца и 52 сыворотки крови от макак яванских (*Macaca fascicularis*), поступивших из вьетнамского питомника (ноябрь 2015). Отбор фекалий проводили на 10, а проб сывороток на 23 день после прибытия.

Для определения антител к вирусным инфекциям, а также для определения антигена ВГА, адено- и ротавируса использовали иммуноферментный анализ. Для определения РНК ВГА использовали полимеразную цепную реакцию.

Нами были получены данные о значительной частоте распространения анти-ВГА-IgG у зеленых мартышек (63%) и макак яванских (90%). Кроме того, нами были выявлены анти-ВГА-IgM, Ag и РНК ВГА у обезьян двух групп, что свидетельствует о наличии свежих случаев ВГА-инфекции.

Получены данные о высокой частоте распространения как анти-ВГЕ-IgG (55%), так и анти ВГЕ-IgM (7,5%), только среди макак яванских. Отсутствие анти-ВГЕ у зеленых мартышек согласуются с литературными и нашими данными, согласно которым анти-ВГЕ обнаруживаются только у обезьян рода макак.

Ag аденовируса у зеленых мартышек из Танзании определялся в 4 раза чаще (44,4%), чем у макак яванских из Вьетнама (10%). Инфекция протекала бессимптомно. Антиген ротавируса был обнаружен лишь в единичных случаях как у зеленых мартышек (14,3%), так и у макак яванских (2,5%) с низкой реактивностью образцов.

Таким образом, в работе представлены данные о различной степени циркуляции кишечных вирусов среди импортированных обезьян, обсуждаются возможные источники их инфицирования.

THE PRESENCE OF ENTERIC VIRUS INFECTION MARKES IN IMPORTED IN ADLER PRIMATE CENTER MONKEYS

*D.I. Dogadov *, L.I. Korzaya *, K.K. Kyureghyan **, A.A. Carlsen **, A.M.Goncharenko **

** FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia*

***FSBRI "M.P.Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis", Moscow, Russia*

Abstract

Monkeys coming from abroad, especially from places of natural habitats, in spite of a healthy appearance, can be carriers of different pathogens that are dangerous for the surrounding animals and for staff. In addition, imported

monkeys can be exposed to viral infections, common among domesticated animals, so the determination of specific viral infection markers in monkeys imported is an important and necessary step during their keeping in quarantine.

The aim of this work was to study the intestinal virus infection markers presence in monkeys imported in Adler Primate Center.

Blood serum and fecal samples from monkeys imported in Adler Primate Center were used for study. Total 40 fecal samples and 38 serum samples from African green monkeys (Chlorocebus pygerythrus), who came from the Wild (Tanzania, June 2014), as well as 44 fecal samples and 52 serum samples from Cynomolgus macaques (Macaca fascicularis), which were received from the Vietnamese monkey colony (November 2015) were investigated. Fecal samples were collected on day 10 and serum samples were obtained on day 23 after monkey arrival.

The enzyme immunoassays for viral infections of antibodies detection as well as HAV antigen, adenovirus and rotavirus were used. PCR method was used for HAV RNA.

Our data shows the significant frequencies of anti-HAV-IgG in African green monkey (63%) and Cynomolgus monkeys (90%). In addition, we have identified anti-HAV-IgM, HAV Ag and HAV RNA in both monkey groups, which indicate the presence of fresh cases of HAV infection.

High frequency presence of anti-HEV-IgG (55%) and anti-HEV-IgM (7,5%) among only Cynomolgus macaques was found. The absence of anti-HEV antibodies in African green monkeys is consistent with the literature and our own data, showing the anti-HEV antibodies were detected only in the Macaque genus of monkey.

Adenovirus antigen in African green monkeys from Tanzania was determined 4 times more often (44.4%) than in Cynomolgus macaques from Vietnam (10%). Infections were asymptomatic. Rotavirus antigen was detected only in few cases both in African green monkeys (14.3%) and Cynomolgus macaques (2.5%) specimens with low reactivity.

Thus, the presented data demonstrate various intestinal viruses circulating degree among imported monkeys and allow discussing possible sources of infection.

Обезьяны подвержены почти всем вирусным инфекциям, к которым восприимчив человек. Кроме того, они являются естественными хозяевами ряда инфекционных агентов, опасных для человека [4].

Обезьяны поступающие из-за рубежа, особенно из мест естественного обитания, несмотря на здоровый вид могут быть носителями различных

патогенов, представляющих опасность как для окружающих животных, так и для обслуживающего персонала [2,3,4]. Кроме того, импортированные обезьяны могут быть подвержены вирусным инфекциям, распространенным среди акклиматизированных животных, поэтому определение специфических маркеров вирусных инфекций у импортированных обезьян является важным и необходимым этапом во время их содержания в карантине.

Целью данной работы являлось изучение распространения специфических маркеров кишечных вирусных инфекций у обезьян, импортированных в Адлерский приматологический центр.

Исследование проводилось на базе лаборатории инфекционных вирусов ФГБНУ «НИИ МП». В работе были использованы сыворотки крови и фекальные образцы от обезьян, импортированных в Адлерский приматологический центр. Всего было исследовано 40 фекальных образцов и 38 сывороток крови от зеленых мартышек (*Chlorocebus pygerythrus*), прибывших из мест естественного обитания (Танзания) (июнь 2014), а также 44 фекальных образца и 52 сыворотки крови от макак яванских (*Macaca fascicularis*) поступивших из вьетнамского питомника (ноябрь 2015). Отбор фекалий проводили на 10, а проб сывороток - на 23 день после прибытия.

Антитела к ВГА (анти-ВГА) и ВГЕ (анти-ВГА) определяли с помощью коммерческих тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HAV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HAV-M», а также «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» производства НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород). ВГА-Ag определяли с помощью тест-системы «ИФА-Ag-ВГА» с подтверждением положительных результатов (производство НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (Санкт-Петербург) и ИФА-ВГА-Ag производства «Вектор Бест». Антиген рота- и аденовируса определяли с помощью коммерческих тест-системы ИФА-Rota-Ag и ИФА-Adeno-Ag производства «Вектор Бест». Результаты ИФА учитывали на спектрофотометре ImmunoChem-2100 производства «Интермедика сервис» (США). Полученные данные выражали в единицах оптической плотности при длине волны 450 нм ($ОП_{450}$). Детекцию РНК ВГА проводили методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с использованием праймеров к 5`НКО [6].

Выявление средних значений показателей в сравниваемых группах проводили с использованием критерия Стьюдента в программе Microsoft EXEL 2010. Различия оценивались как достоверные при вероятности 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования. Данные об обнаружении маркеров четырех кишечных вирусных инфекций у двух видов импортированных обезьян

представлены в табл. Наиболее полно были изучены маркеры ВГА-инфекции (анти-ВГА IgG, анти-ВГА IgM, Ag, РНК). При гепатите Е определяли только IgG- и IgM-антитела, а при ротавирусной и аденовирусной инфекции – только Ag .

Таблица

Частота обнаружения маркеров кишечных вирусных инфекций у обезьян, импортированных в Адлерский приматологический центр

Вирусные инфекции	Маркеры	Зеленые мартышки, прибывшие из мест естественного обитания (Танзания)		Макаки яванские, прибывшие из питомника (Вьетнам)	
		число позитивных/ число обследованных (%)	$ОП_{450}$ (ср.арифм.)	число позитивных/ число обследованных (%)	$ОП_{450}$ (ср.арифм.)
ВГА-инфекция	анти-IgG ВГА	24/38 (63,1±7,8)	1,843	47/52 (90,4±4,1)	1,716
	анти-IgM ВГА	11/40 (27,5±7,1)	0,866	14/52 (26,9±6,1)	0,659
	Ag ВГА	11/40 (27,5±7,1)	0,946	3/44 (6,8±3,8)	0,532
	РНК ВГА	11/11 (100)	-	1/10 (10±9,5)	-
ВГЕ-инфекция	анти-IgG ВГЕ	0/34 (0)	0	22/40 (55,0±7,8)	0,997
	анти-IgM ВГЕ	0/26 (0)	0	3/40 (7,5±4,1)	0,521
Ротавирусная инфекция	Ag ротавируса	3/21 (14,3±7,6)	0,671	1/40 (2,5±2,5)	0,642
Кишечная аденовирусная инфекция	Ag аденовируса	8/18 (44,4±11,7)	1,870	4/40 (10,0±4,7)	0,411

Маркеры ВГА-инфекции. Как видно из табл., у обезьян двух импортированных групп был обнаружен весь комплекс специфических маркеров ВГА-инфекции, однако показатели некоторых из них отличались. Так, количество анти-ВГА (IgG) – позитивных особей среди макак яванских (на 23-й день после прибытия в питомник) было значительно выше ($p<0,05$), чем среди зеленых мартышек (90% и 63% соответственно). Средние значения реактивности сывороток были высокими ($\geq$ 1,0 $ОП_{450}$) и практически не отличались.

Представляют интерес маркеры (анти-ВГА-IgM, Ag ВГА и РНК ВГА), которые свидетельствуют о наличии «свежих» случаев ВГА-инфекции у обезьян, а также о репликации вируса. Частота распространения IgM-антител

на 23-й день после поступления в питомник была практически одинаковой: 27,5% у зеленых мартышек и 26,9% у макак яванских, а средние значения реактивности сывороток были невысокими ($\leq$ 1,0 $ОП_{450}$). Следует отметить, что на 10-й день после поступления ВГА-Ag обнаруживался в фекалиях зеленых мартышек в 4 раза ($p<0,05$) чаще (27,5%), чем у макак яванских (6,8%) и с более высокими показателями вирусного антигена. РНК ВГА была выявлена во всех Ag-позитивных фекальных образцах от зеленых мартышек с высокой вирусной нагрузкой. Среди макак яванских РНК ВГА была обнаружена лишь в одном из 10 образцов (10%), который был также и Ag-позитивным, вирусная нагрузка была умеренной.

Маркеры ВГЕ-инфекции. Получены данные о высокой частоте распространения как анти-ВГЕ- IgG (55%), так и анти-ВГЕ-IgM антител (7,5%) только у макак яванских (табл.). Средняя реактивность сывороток, содержащих IgG-антитела была почти в 2 раза выше, чем реактивность IgM-содержащих сывороток (0,997 и 0,521 соответственно). Следует отметить, что высокореактивные сыворотки ($ОП_{450} \geq 1,000$) встречались только среди анти-ВГЕ (IgG) позитивных образцов. Данные об отсутствии анти-ВГЕ у зеленых мартышек согласуются с литературными и нашими данными, согласно которым анти-ВГЕ обнаруживаются только у обезьян рода макак [2,3,4,8,9].

Маркеры кишечной аденовирусной инфекции. Антиген аденовируса у зеленых мартышек из Танзании обнаруживался в 4 раза ($p<0,05$) чаще, чем у макак яванских из Вьетнама (табл.). Реактивность и число высокореактивных образцов у зеленых мартышек было значительно выше, чем у макак яванских (1,870 $ОП_{450}$ и 0,411$ОП_{450,}$ а так же 75% и 0% соответственно). Следует отметить, что клинических проявлений кишечной аденовирусной инфекции среди обследованных животных не наблюдалось.

Маркеры ротавирусной инфекции. Антиген ротавируса был обнаружен лишь в единичных случаях, как у зеленых мартышек (14,3%), так и у макак яванских (2,5%) с низкой реактивностью образцов.

Данные о циркуляции адено- и ротавируса среди импортированных животных, согласуются с результатами, полученными при обследовании обезьян в нашем питомнике [1,2].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о различной степени циркуляции кишечных вирусов среди импортированных обезьян.

Выявление маркеров «свежей» ВГА-инфекции как у зеленых мартышек, так и у макак яванских свидетельствуют о недавнем их инфицировании. Вместе с тем, позднее взятие материалов для исследования (проб фекалий на 10, а проб сывороток - на 23 день после прибытия) не

позволяют точно определить источник и место заражения обезьян. Животные могли инфицироваться как в местах их концентрации после отлова, что часто происходит с пойманными обезьянами в местах естественного обитания [2,4], так и в Адлерском питомнике, где происходит постоянная циркуляция ВГА среди обезьян различных видов [2]. По результатам исследования можно также предположить, что макаки яванские, прибывшие из Вьетнамского питомника, могли инфицироваться непосредственно по месту их постоянного содержания, поскольку ВГА циркулирует практически во всех приматологических центрах [8]. Это подтверждается высоким количеством анти-ВГА (IgG) - позитивных сывороток и, наоборот, низким процентом Ag и РНК - содержащих фекальных проб. В настоящее время проводится сравнительное молекулярно-генетическое изучение изолятов ВГА от импортированных обезьян и животных из Адлерского питомника, что позволит сделать окончательный вывод об источнике и месте их инфицирования.

Список литературы

1. *Догадов Д.И., Корзая Л.И., Кебурия В.В. «Молекулярно- генетические маркеры кишечных вирусов лабораторных приматов» // Материалы VIII международной конференции «Молекулярная диагностика - 2014», 2014г.*
2. *Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончаренко А.М., Догадов Д.И., Лапин Б.А. Маркеры вирусных инфекций у лабораторных приматов. // В кн.: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии. Материалы второй международной научной конференции. Том 1. (8-10 августа 2011г., Сочи-Адлер). – 2011г. – С.79-88.*
3. *Корзая Л.И., Лапин Б.А., Кебурия В.В., Лазарева И.Я. Частота выявления антител к вирусу гепатита Е у обслуживающего персонала и у макак Адлерского питомника. // Вопр. вирусол. – 2007. - №1. - С. 36-40.*
4. *Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. и др. Проблемы инфекционной патологии обезьян. – М.: РАМН, 2004.*
5. *Andzhaparidze A.G., Karetnyĭ Iu.V., Korzaia L.I., Balaian M.S., Titova I.P. Epizootic hepatitis A among African green monkeys kept in a vivarium // VoprVirusol.– 1989. – 34(3). – P. 292 – 296.*
6. *Arankalle V. A. and Ramakrishnan J. Simian hepatitis A virus derived from a captive rhesus monkey in India is similar to the strain isolated from wild African green monkeys in Kenya // J. Viral. Hepat. – 2009. – N. 16. – P. 214 – 218.*
7. *Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A.W. Viral infections of nonhuman primates // Lab. Anim. Sci. – 1997. – Vol.47. – P. 461 – 468.*

8. *Purcell R.H., Emerson S.U. Animal Models of Hepatitis A and E // ILAR J. 42(2) – 2001 – P: 161–77.*
9. *Yamamoto H., Tian-Cheng Li, Chihiro Koshimoto et al., Serological Evidence for Hepatitis E Virus Infection in Laboratory Monkeys and Pigs in Animal Facilities in Japan // Exp. Anim. 57(4) – 2008 – P: 367–376.*

ЛЯМБЛИОЗНАЯ ИНВАЗИЯ У НИЗШИХ ОБЕЗЬЯН В УСЛОВИЯХ НЕВОЛИ

Т.П. Егорова, Т.И. Кебу

ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, г. Сочи, Россия

Резюме

Представлены данные о встречаемости протозойного паразита кишечника Lamblia intestinalis у низших обезьян 4-х видов: макак резус (Macaca mulatta), макак яванский (M. fascicularis), мартышка зеленая (Cercopithecus aethiops), павиан гамадрил (Papio gamadrias). Показано, что встречаемость лямблий у обезьян с патологией желудочно-кишечного тракта значительно выше, чем у животных с инвазией, но без клинических признаков болезни. Наибольшая частота встречаемости отмечалась у макаков резусов, как у клинически здоровых, так и у больных. Присутствие лямблий у клинически здоровых животных рассматривается как факт бессимптомного носительства. Наиболее подвержены инвазии детеныши. Лямблиозная инвазия в редких случаях присутствовала в чистом виде и, как правило, сочеталась с сопутствующей инвазией другими паразитами. У инвазированных лямблиями животных наблюдалось снижение облигатной и увеличение количества условно-патогенной микрофлоры, изменение ее качества и развитие дисбактериоза кишечника.

LAMBLIA INFESTATION OF MONKEYS LIVING IN THE ADLER COLONY

T.P. Egorova, T.I.Kebu

FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia

Abstract

The data on the occurrence of Lamblia intestinalis intestinal protozoan parasite in four monkey species - Macaca mulatta (Rhesus monkeys), M.fascicularis (Cynomolgus monkeys), Cercopithecus aethiops (African green

monkeys), Papio hamadryas (Hamadryas baboon) are presented. It was shown that the frequency of Lamblia intestinalis occurrence in monkeys with gastro-intestinal pathology is significantly higher compare to animals with invasion but without clinical manifestations of the disease. The highest frequency of Lamblia intestinalis infectation was found in healthy as well as sick Rhesus monkeys. The presence of Lamblia intestinalis in clinically healthy animals is considered to be an asymptomatic carriage. The infants are most vulnerable to invasion. Lamblia infestation was rarely seen as a single infection and, as a rule was accompanied by other parasites.

The animals with Lamblia infestation showed the decrease of obligate microflora as well as the increase of the amount of opportunistic microflora along with the change of its quality and the development of intestinal disbacteriosis.

Одной из тенденций развития патологических процессов в последние десятилетия является увеличение инфекций, среди которых все более значительное место занимают болезни, вызываемые паразитами. Вместе с тем увеличивается и число клинически значимых видов паразитов, в том числе простейших, вызывающих заболевания желудочно-кишечного тракта. Среди них важное значение всё больше приобретает лямблиоз. Исследования по проблеме лямблиоза свидетельствуют о способности паразитов, его вызывающих, отягощать сопутствующие заболевания желудочно-кишечного тракта, приводя к мальабсорбции и длительной диарее. Поскольку лямблии паразитируют в тонком кишечнике, то, прежде всего, нарушают его функцию, вызывая, как механическое, так и токсическое повреждение эпителия на значительной поверхности кишечника. Атрофия ворсинок кишечника – основное патологоанатомическое нарушение, сопровождающее лямблиозную инвазию (Корниенко, Минина, 2008). Усугубляя заболевания тонкого кишечника, лямблиоз ведет не только к нарушению эффективности пищеварения, но и к снижению защитных сил, нарушает иммунную систему. При длительном паразитировании лямблий изменяется состав микрофлоры кишечника, при этом нарушается макроэкологическое равновесие. Имеются доказательства того, что лямблиозная инвазия и дисбактериоз взаимосвязаны (Катаева и др., 2011) и в большинстве случаев может служить “индикатором“ дисбактериоза. Механизм передачи данной инвазии – фекально-оральный. Пути распространения – водный, контактно-бытовой и пищевой. Жизненный цикл лямблий включает две стадии развития: вегетативную и цистную. В процессе своей жизнедеятельности вегетативные формы лямблий постепенно спускаются в дистальные отделы кишечника, где образуют цисты и в таком виде выводятся из организма.

Возбудитель лямблиоза Lamblia intestinalis (Lamble, 1859) Blanhard 1988 впервые был обнаружен в 1681 году А. Левенгуком у больного с жидким стулом. Но первое подробное описание было дано в 1859 году профессором Харьковского университета Д. Лямблем, который обнаружил этого возбудителя в кишечном содержимом детей, страдающих диареей, под названием Cercomonas intestinalis. В 1988 г. по предложению Блэнхарда (Blanhard) возбудитель классифицирован как Lamblia intestinalis в честь первооткрывателя. В 1915 году при пересмотре систематики простейших, этот вид был отнесен к роду Giardia Kunstler, 1882 и переименован в честь Д.Ф. Лямбля и парижского профессора А. Жиарда в Giardia lamblia (Stills, 1915). В зарубежной литературе используется именно это название - G. lamblia (G. intestinalis, G. duodenalis), а заболевание – жиардиаз. Однако в отечественной практике утвердилось устаревшее название паразита L. intestinalis, а вызываемое им заболевание – лямблиоз (Гинецинская, Добровольский, 1978; Агафонова и др., 2008; Корниенко, Минина, 2008).

На основе морфологических исследований надежно дифференцируют 3 вида лямблий: L. intestinalis, L. muris, L. agilis. Патогенной для человека и большинства млекопитающих, в том числе и обезьян, считается L. intestinalis. L. muris встречается главным образом у грызунов, птиц и рептилий, а L. agilis найдена только у амфибий (Корниенко, Минина, 2008).

В настоящее время накопилось значительное количество литературы по теоретическим и практическим аспектам изучения лямблиоза у человека. (Ruch, 1959; Burrow, 1972; Toft, 1982; Сахарова, 1989; Gomes et al., 1996; Егорова, Кебу, 2007; Лапин и др., 2014). Однако роль лямблий в желудочно-кишечной патологии у приматов изучена недостаточно и заслуживает особого внимания.

Материал и методика

Исследования проводились в условиях питомника обезьян, находящегося в Адлерском районе г. Сочи. Материалом послужили пробы фекалий, отобранные от клинически здоровых обезьян при профилактических осмотрах и от больных с нарушениями функций желудочно-кишечного тракта. Объектом исследований в течение трёх лет (2011-2013г.г.) были 2108 обезьян 4-х видов: 871 Macaca mullata (макак резус – 670 здоровых, 201 больная), 854 M. fascicularis (макак яванский – 754 здоровых, 100 больных), 116 Cercopithecus aethiops (мартышка зеленая – 86 здоровых, 30 больных), 267 Papio hamadrias (павиан гамадрил – 228 здоровых, 39 больных). Как правило, здоровые обезьяны содержатся в групповых клетках или вольерах, больные животные переводятся в

помещение изолятора в индивидуальные клетки. Для исследований применялся метод микроскопии нативных препаратов с физиологическим раствором и окрашенных раствором Люголя из свежевыделенных фекалий. Микроскопическое исследование проводили при увеличении 10х10, 10х40. Этот же материал был использован для бактериологических исследований, выполненных по общепринятым методикам (Киселева, Голубева, 1977).

Результаты и обсуждение

Изучение фауны паразитов обезьян, а также влияние их на организм хозяина имеет теоретическое и практическое значение, особенно, при разработке мер борьбы с паразитарными болезнями, а также при использовании этих животных в качестве экспериментальных моделей.

Желудочно-кишечные заболевания, возникающие на фоне различных предрасполагающих факторов, являются наиболее частой патологией при содержании обезьян в неволе. При изучении этой проблемы ранее, сотрудниками лаборатории инфекционной патологии института Медицинской приматологии, было установлено, что около 50% острых кишечных инфекций у обезьян этиологически связаны с известными условно-патогенными возбудителями сем. Enterobacteriaceae, однако значительная часть случаев остается нерасшифрованной (Кебу и др., 1998). Наши исследования были направлены на определение частоты встречаемости лямблий у обезьян, а также на изучение лямблиоза, как возможного этиологического фактора в развитии острых кишечных заболеваний у этих животных в неволе.

Для анализа результатов наших исследований обезьяны были распределены на 2 группы: 1 - клинически здоровые и 2 - больные с кишечной патологией, а также на 5 возрастных групп: детеныши (до 1 года), подростки (от 1 года до 3-х лет), молодые (от 3-х до 8 лет), взрослые (от 8 до 17 лет), старые (от 17 и больше лет). Общая экстенсивность инвазии лямблиями обследованных нами обезьян 4-х видов составила 6.2%. Исходя из полученных данных инвазированности лямблиями обезьян по видам, нами была отмечена наибольшая экстенсивность инвазии у макаков резусов, как среди здоровых, так и больных обезьян. Обращает на себя внимание тот факт, что экстенсивность инвазии лямблиями у больных мартышек зеленых оказалась также высока, хотя у здоровых животных лямблии не были зарегистрированы ни у одной из обследованных обезьян. Оценивая данные возрастной динамики зараженности, необходимо отметить, что наиболее высокая экстенсивность инвазии лямблиями оказались у детенышей каждого из видов с проявлениями желудочно-кишечной патологии. При сравнении

экстенсивности инвазии лямблиями у здоровых и больных животных наблюдалось её увеличение у обезьян с кишечными расстройствами в несколько раз (Таблицы 1, 2).

Таблица 1

Экстенсивность инвазии лямблиями у клинически здоровых обезьян разных видов и возрастов

Инвазия	детеныши		подростки		молодые		взрослые		старые		Итого	
Обезьяны	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Макак резус	-	-	22	9.0	14	1.7	6	8.0	3	4.3	45	6.7
Макак яванский	4	3.0	2	0.9	2	1.4	6	5.8	1	1.2	15	1.9
Мартышка зеленая	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Павиан гамадрил	-	-	-	-	1	1.9	-	-	-	-	1	0.4
Итого	4	1.0	24	4.0	17	5.0	12	5.4	4	2.2	61	3.5

Таблица 2

Экстенсивность инвазии лямблиями у больных обезьян разных видов и возрастов

Инвазия	детёныши		подростки		молодые		взрослые		старые		Итого	
Обезьяны	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Макак резус	9	20.0	10	16.0	11	15.7	6	54.5	5	38.0	41	20.0
Макак яванский	5	45.0	5	10.6	2	9.5	2	28.0	2	14.2	16	16.0
Мартышка зелен.	5	35.7	1	12.5	-	-	-	-	-	-	6	20.0
Павиан гамадрил	1	25.0	2	25.0	2	15.3	-	-	1	12.5	6	15.3
Итого	20	27.0	18	14.0	15	13.8	8	32.0	8	21.0	69	18.6

Лямблиоз относится к числу спонтанно возникающих заболеваний. При этом на степень клинического проявления лямблиоза может влиять исходное состояние организма, наличие других болезней пищеварительного тракта, возраст животного и уровень зрелости иммунной системы. В результате инвазии лямблиями обезьян возникают либо как манифестирующиее заболевание с характерным для него клиническим проявлением, либо развивается носительство с массовым выделением цист во внешнюю среду. Благодаря тому, что цисты лямблий способны к длительному выживанию во внешней среде и обладают высокой устойчивостью ко многим дезинфектантам, заражение обезьян наступает постоянно или периодически.

У клинически здоровых обезьян выделенные паразиты находились в стадии цист, в то время как у больных с манифестными признаками кишечных расстройств наблюдалась как цистная, так и вегетативная форма паразита. Обнаружение у клинически здоровых обезьян лямблиозной

инвазии мы рассматриваем, как факт бессимптомного носительства этих паразитов.

В результате наших исследований были выявлены ассоциации лямблиозной инвазии с другими паразитарными инвазиями и некоторыми условно-патогенными бактериями сем. Enterobacteriaceae. Протозойно-протозойные сочетания с балантидиями обнаруживались достоверно чаще остальных у большинства инвазированных лямблиями обезьян. Сочетания с нематодами Strongyloides sp. и Trichocephalus sp. отмечены в основном у больных макаков резусов и павианов гамадрилов. Обладая значительной репродуктивной способностью, а также способностью присасываться к слизистой оболочке кишечника, лямблии, как правило, нарушают экскреторно-секреторную функцию пищеварительной системы. В связи с этим у больных обезьян, инвазированных лямблиями, в значительной степени наблюдалось развитие дисбактериоза кишечника, сопровождающегося исчезновением или снижением облигатных её представителей – лакто- и бифидобактерий, непатогенной кишечной палочки, энтерококков и повышением количества негативной микрофлоры - гемолитической кишечной палочки, лактозонегативных энтеробактерий, протеа. Характеризуя состав микрофлоры кишечника при лямблиозной инвазии, необходимо отметить, что из его представителей чаще всего идентифицировались условно-патогенные бактерии родов Proteus, Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter . В итоге такие микробные ассоциации оказывались не в состоянии обеспечивать защитные и физиологические функции нормофлоры, осуществляемые в условиях нормобиоценоза кишечника.

Таким образом, исследования, проведенные нами, подтверждают, как потенциальную, так и реальную этиологическую роль лямблий в кишечной патологии у обезьян, а именно, как один из факторов, ослабляющих организм и приводящих к клиническим формам кишечных расстройств.

Список литературы

Агафонова Е.В., Долбин Д.А., Куликов С.Н., Тюрин Е.А. 2008. Современные аспекты диагностики лямблиоза у человека. Рус. Мед. Журн., 16, (17): 146-149.

Гинецинская,Т.А., Добровольский А.А. 1978.Паразитические простейшие. В кн. Частная паразитология. М., Высшая школа, ч.1, 13-207.

Егорова Т.П., Кебу Т.И. 2007. Роль паразитарных инвазий в возникновении острых кишечных заболеваний у обезьян. Фундаментальные и прикладные проблемы медицины и биологии в опытах на обезьянах. Мат. международн. научн. конф., Сочи-Адлер, 125-130.

Катаева Л.В., Степанова К.Б., Степанова Т.Ф., Ташланова В.В, Швед Е.И., Нижегородцева Н.Ф., Бычкова Л.А. 2011. Возрастные особенности дисбиоза толстого кишечника при лямблиозной инвазии. Мед. паразитол., 1: 7-10.

Кебу Т.И., Стасилевич З.К., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. 1998. Условно-патогенные энтеробактерии у здоровых и больных острыми кишечными инфекциями обезьян. Baltic. Journ. Lab. Anim. Sci., 8: 177-182.

Киселёва Б.С., Голубева И.В. 1977 Дифференциация и идентификация бактерий семейства Enterobacteriaceae. Диагностические препараты и методы диагностики заболеваний, вызываемых энтеробактериями. М., Изд. НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова, 1: 30-49.

Корниенко Е.А., Минина С.Н. 2008. Клиника, диагностика и лечение лямблиоза у детей. С-П. 31 с.

Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Яковлева Л.А., Егорова Т.П., Корзая Л.И. 2014. Болезни обезьян опасные для человека. Методические рекомендации М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 52 с.

Сахарова Т.В. 1998. Кишечные простейшие низших обезьян в условиях неволи. Автореф. дис. … канд. биол. Наук. М.,21 с.

Burrow R.B. 1972. Protozoa of the intestinal tract. Pathology of the simian primates. Karger, Basel, 2: 2-28.

Gomez M.S., Gracenea M., Montoliu I., Feliu C., Monleon A., Fernandez J., Ensenat C. 1996. Intestinal parasitism – protozoa and helminths – in primates at the Barcelona Zoo. J. Med. Primatol., 25: 419-423.

Toft J. 1982. The pathoparasitology of the alimentary tract and pancreas of nonhuman primates. A rewiew: Vet. Pathol., 19, 7: 44-87.

Ruch T.C. 1959. Diseases of laboratory primates. Intestinal protozoa. Saunders, Philadelphia-London, 121-150.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ COA- ГЕНА STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВЫДЕЛЕННЫХ У ОБЕЗЬЯН

Калашникова В.А.

ФГБУ «НИИ медицинской приматологии», Сочи, Россия

Резюме

Работа посвящена изучению генетического разнообразия коагулазного гена золотистого стафилококка, выделенного у обезьян. Установлено, что

коагулазный ген имеет значительную гетерогенность. Мы обнаружили 16 различных ПДРФ-профилей коагулазного гена, что предполагает наличие значительной неоднородности в полиморфной области этого гена золотистого стафилококка, следовательно, циркуляции нескольких штаммов *S.aureus* среди обезьян питомника. Тем не менее, эта неоднородность не столь значительна, поскольку в стаде обезьян преобладает 2 генотипа (37%). Впервые нами выявлен ампликон вариабельного участка коагулазного гена протяжённостью 1000 н.п.

COA-GENE GENETIC DIVERSITY OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ISOLATED FROM MONKEYS

V.A. Kalashnikova

FSBSI "Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia

Abstract

The work is devoted to the study of the genetic diversity of coagulase gene (Coa-gene) of Staphylococcus aureus isolated from monkeys. It was established that the Coa-gene shows a significant heterogeneity. We found 16 different PCR-RFLP (Restriction analysis of the amplification products based on the size of the amplicons and their restriction fragments) profiles of Coa-gene, suggesting a significant heterogeneity at this gene polymorphic region of Staphylococcus aureus. Therefore we conclude that there are S.aureus strains circulating among monkeys in our colony. However, this heterogeneity is not so large because only 2 genotypes (37%) prevails in the monkey colony. For the first time we have detected the amplicon of Coa-gene variable region length of 1000 bp.

Введение

S.aureus – часть нормофлоры людей и животных, а также причина множества инфекций в диапазоне от инфекций кожи до инвазивных заболеваний. Многие млекопитающие, птицы, рептилии также могут быть колонизированы этим бактериальным возбудителем. Сведений по естественной стафилококковой инфекции, по изучению молекулярно-генетических характеристик и типированию изолятов золотистого стафилококка, выделенных у низших приматов, в зарубежной литературе малочисленны и, при этом, изучались либо «носительские» штаммы от здоровых обезьян, либо единичные штаммы, выделенные при патологии. Нам представилось целесообразным провести исследование в плане продолжения изучения *S.aureus* «обезьяньего» происхождения на примере

типирования штаммов золотистых стафилококков, выделенных у низших обезьян, содержащихся в Адлерском питомнике. Мы выбрали один из генов *S.aureus* – коагулазный ген (*coa*), кодирующий синтез коагулазы. Продукция коагулазы – принципиальный критерий, использующийся в клинических микробиологических лабораториях для идентификации изолятов *S.aureus*. Коагулаза связывается с протромбином образуя комплекс «стафилотромбин», который может стимулировать свёртывание реакции в плазме путём преобразования фибриногена в фибрин. Коагулазный ген имеет полиморфный регион с повторяющимися нуклеотидными последовательностями, который может быть использован для дифференциации изолятов *S.aureus*. Вариабельный регион coa состоит из 81 н.п. тандемных коротких последовательностей, которые различаются по числу и последовательностям, что определяется в рестрикционном анализе длин фрагментов (ПДРФ).

Цель работы – типирование изолятов S. aureus, выделенных от низших обезьян, на основании исследования структурного полиморфизма вариабельного участка коагулазного гена (coa).

Материалы и методы

Было исследовано 76 изолятов *S.aureus*, выделенных от обезьян 6 видов: макаков резусов (n=25), макаков яванских (n=15), мартышек зелёных (n=5), павианов анубисов (n=9), павианов гамадрилов (n=21), магота (n=1).

60 изолятов *S.aureus* были выделены от погибших обезьян с различными патологоанатомическими диагнозами (пневмония, энтероколит, менингит, мастит, травмы и др.). Исследованию подвергали кусочки органов (лёгкие, печень, почка, селезёнка, лимфоузел, матка, плацента), биожидкости (кровь, моча), содержимое кишечника и гнойное отделяемое (при ранах различной локализации, маститах, эндометрите, конъюктивите).

16 изолятов выделены от клинически здоровых обезьян, у которых брали мазки стерильными тампонами со слизистой носовой полости, из гнойного отделяемого глаза, урогенитальными зондами из влагалища и ректальными тампонами из кишечника.

Бактериологическое и биохимическое и молекулярно-генетическое (ПЦР) исследования проводили стандартными методами. Рестрикционный анализ продуктов амплификации на основе определения размеров полученных ампликонов, количества и протяжённости фрагментов рестрикции (метод ПЦР-ПДРФ) был проведён с использованием эндонуклеазы *Cfo*1 («Promega», США) по прилагаемой инструкции.

Результаты исследования

На основании размера образовавшегося ПЦР-продукта все изоляты можно было разделить на 5 кластеров (табл. 2). Наибольшее число изолятов *S. aureus* сформировали ампликоны протяженностью 700 и 900 н.п. (34% и 29% соответственно). 15 (20%) изолятов *S.aureus* образовали ампликоны протяженностью 600 н.п., 9 (12%) – 800 н.п. Наименьшую группу составили 4 ампликона, которые имели протяжённость 1000 н.п. (5%). Дальнейший анализ структуры коагулазного гена проводили на основании рестрикции образовавшихся ампликонов с использованием эндонуклеаз *Cfo*1.

Таблица 2.

Структурный полиморфизм коагулазного гена у *S.aureus*, выделенных от обезьян, на основании результатов рестрикции амплификатов *coa* с использованием *Cfo1*.

Протяженность ампликона *coa*	Общее кол-во изолятов / %	Число изолятов	Число фрагментов рестрикции	Величина фрагментов рестрикции (н.п.)	Тип *coa* гена
600	15/20	6 5 4	1 3 4	300 80-150-300 80-140-180-220	1 2 3
700	26/34	**16** 1 2 **7**	0 3 4 4	н/с* 80-150-400 80-140-180-220 80-150-180-300	**4** 5 6 **7**
800	9/12	3 3 1 2	1 2 3 4	400 150-500 80-150-220 80-150-180-300	8 9 10 11
900	22/29	**12** 2 **7** 1	3 4 4 5	140-300-500 80-140-300-500 80-220-240-300 80-120-220-300-500	**12** 13 14 15
1000	4/5	4	3	220-280-300	16

** н/с – нет сайта рестрикции для эндонуклеазы Cfo1.*

Использование эндонуклеазы *Cfo1* позволило выявить 16 различных профилей рестрикции *coa* гена у тестируемых изолятов (табл. 2). Для удобства анализа генетический профиль каждого ампликона был оценен на основании его размера (1-ая графа таблицы), числа фрагментов рестрикции и их протяженности (при сопоставлении с данными электрофореза ДНК-руллера).

Так среди изолятов *S.aureus*, сформировавших ампликоны вариабельного фрагмента с протяжённостью 600 н.п., было выявлено три варианта рестрикции, а среди изолятов с ампликонами 700 н.п., 800 н.п., 900 н.п. – 4 варианта и ампликон протяжённостью 1000 н.п. дал 1 вариант рестрикции. Размер рестрикционных фрагментов колебался от 80 н.п. до 500 н.п. В исследуемой выборке превалировали изоляты золотистого стафилококка, у которых вариабельный участок коагулазного гена имел протяжённость 700 н.п. и не имел сайтов рестрикции для эндонуклеазы *Cfo1* (61,5% от количества изолятов с протяженностью ампликона 700 н.п.). Вторая, наиболее многочисленная группа, была представлена изолятами *S.aureus*, образовавшими ампликон протяженностью 900 н.п., и давшими 3 фрагмента рестрикции, протяженностью 140-300-500 н.п. (такой тип структуры коагулазного гена был идентифицирован у 12 изолятов, что составило 54,6% от количества изолятов с соответствующей протяжённостью ампликона). Наиболее редкими были ПДРФ-профили 5-го, 6-го, 10-го, 11-го, 13-го и 15-го типов (по 1 или 2 изолята). Несколько реже встречались изоляты *S.aureus*, у которых коагулазный ген имел ампликон протяжённостью 700 н.п. и 4 сайта рестрикции – 80-150-180-300 н.п., а также 900 н.п. с фрагментами 80-220-240-300 н.п. (по 7 изолятов соответственно). У шести изолятов *S.aureus* с ампликоном коагулазного гена 600 н.п. был 1 сайт рестрикции, который образовал фрагмент 300 н.п. У 5 изолятов с таким же размером ампликона в результате рестрикции образовалось 3 фрагмента – 80-150-300 н.п.

Заключение

Наша работа посвящена изучению генетического разнообразия *S.aureus*, выделенных от низших обезьян, содержащихся в условиях неволи, а также первое исследование естественной стафилококковой инфекции в ветеринарной медицине, проведённое на достаточно большом количестве обезьян (n=76 животных). Как известно, продукция коагулазы – важный фенотипический признак *S.aureus*, который ассоциируется с вирулентностью и является причиной коагуляции плазмы. Мы использовали метод ПЦР-ПДРФ чтобы разделить штаммы *S.aureus* на основе полиморфизма

коагулазного гена, что позволило нам выявить некоторые генетические вариации в его пределах. Полученные нами результаты указывают на значительную гетерогенность коагулазного гена штаммов *S.aureus*, изолированных от обезьян. Мы обнаружили 16 различных ПДРФ-профилей коагулазного гена, что предполагает наличие значительной неоднородности в полиморфной области этого гена золотистого стафилококка, следовательно, циркуляции нескольких штаммов *S.aureus* среди обезьян питомника. Тем не менее, эта неоднородность не столь значительна, поскольку в стаде обезьян преобладает 2 генотипа (37%). Впервые нами выявлен ампликон вариабельного участка коагулазного гена протяжённостью 1000 н.п. До этого упоминалось только о том, что коагулазный ген может содержать от 400 до 900 н.п. Взаимосвязи между принадлежностью *S.aureus* к какому-либо типу коагулазного гена и видом обезьян не отмечено. Хочется отметить, что наше исследование поддерживает предыдущие зарубежные работы и раскрывает некоторую генетическую гетерогенность среди стафилококковых изолятов, выделенных от низших обезьян. Необходимо провести дальнейшее исследование, чтобы определить другие молекулярно-генетические характеристики превалирующих штаммов.

РАСШИФРОВКА ВСПЫШКИ ОСТРОГО ИНФЕКЦИОННОГО МИОКАРДИТА СРЕДИ ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА ОБЕЗЬЯН

Калайджян А.А., Агумава А.А.*, Альховский С.В.**, Щетинин А.М.**, Вишневская Т.В.**, Лапин Б.А.*, Вышемирский О.И.**

**ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии», Сочи, Россия.*

***НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава Российской Федерации, Москва, Россия.*

Резюме

В одной из вольер Адлерского питомника с марта по апрель 2007 года из 46 павианов гамадрилов погибло 37 особей. При патологоанатомическом обследовании было выявлено, что все животные погибли от острого миокардита. Возникло подозрение, что причиной гибели приматов стало инфицирование вольеры вирусом энцефаломиокардита (сем. Picornaviridae, род Cardiovirus). Ткань миокарда и перикардиальная жидкость одной из погибших самок была обследована методом бипробы на мышах-сосунках и культуре клеток Vero, СПЭВ с целью выделения штамма вируса. На мышах-сосунках

удалось выделить штамм вируса, который обозначили «3761 ИМП». Концентрированный ультрацентрифугированием вирусный материал обследовали на приборе MiSeq, Illumina, для полногеномного секвенирования. Множественное сравнение полногеномных последовательностей выделенного штамма и 34 штаммов вируса энцефаломиокардита (ЭМК) позволили определить штамм 3761 ИМП, как Менго-подобный вирус. Геном штамма 3761 ИМП на 80% совпадает с геном штамма ЭМК (1086 С) и на 83,7% совпадает с геномом штаммов Менго (M, Rz-pmwt). С остальными штаммами сходство оказалось еще меньшим.

DETECTION OF ACUTE INFECTIOUS MYOCARDITIS IN HAMADRYAS BABOO OF ADLER MONKEY COLONY

Kalaydzhyan A.A., Agumava A.A.*, Alkhovsky S.V.**, Shchetinin A.M.**, Vishnevskaya T.V.**, Lapin B.A.*, Vyshemirsky O.I.**

** FSBSI "Scientific Research Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia*

*** Institute of Virology, N.F. Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*

Abstract

From March to April of the year 2007 37 hamadryas baboons of a total number of 46 died in one of the corrals of Adler monkey Colony. The post mortem examination showed that all the animals died of acute myocarditis. It was suggested that the cause of death of primates was the infection of encephalomyocarditis (Picornaviridae family, Cardiovirus genus). Myocardial tissue and the pericardial fluid from one of the died animals was investigated by biosample analysis in suckling mice and in Vero cell cultures (SPEV) for isolation of virus strain marked as "3761 IMP". The concentrated virus material (after the ultracentrifugation) was investigated using the equipment MiSeg, Illumina for full genome sequencing. Multiple comparison of full genome sequencing of the isolated strain as well as of 34 encephalomyocarditis virus strains (EMC) allowed to identify the strain 3761 as a Mengo-like virus. There is a 80% coincidence of the genome of 3761 IMP strain with a gene of EMC strain (1086 C), as well as 83.7% coincidence with the genome of Mengo strain (M, Rz-pmwt). The similarity with other strains was even less evident.

Вирус энцефаломиокардита (сем. *Picornaviridae*, род *Cardiovirus*) имеет широкое географическое распространение, его циркуляция обнаружена на всех континентах (1,2,3,4). Этот вирус способен инфицировать многие виды

животных: свиней (5), крыс, мышей (6), крупный рогатый скот, слонов (5), высших, включая человека, и низших приматов (1,7,8). Крысы и мыши являются природными хозяевами вируса, выделяют вирус через мочу и фекалии и основным способом распространения является фекально-оральный. Вирус энцефаломиокардита (ЭМК) представляет большую проблему для приматологических центров, питомников обезьян и зоопарков, т.к. способен вызвать тяжелые миокардиты с летальным исходом у шимпанзе, карликовых шимпанзе (8), павианов, макаков резусов (10) и орангутанов (11). У человека вирус вызывает острые лихорадки с общим недомоганием, головной болью, бледностью кожных покровов, тошнотой (1,9).

В 2007 г. одной из вольер с павианами гамадрилами питомника НИИ медицинской приматологии РАМН имела место массовая гибель животных. С марта по апрель из 46 обезьян погибли 37. Гибель животных происходила внезапно без каких либо предшествующих признаков. Если утром павиан был активным, подвижным, охотно поедал корм, то вечером животное обнаруживали без признаков жизни в одной из частей вольеры (кормовая площадка, зимнее помещение или зона выгула). Обычно в течения дня гибло одно животное, но в некоторые дни умирало две или три особи. Первые вскрытия обезьян позволили заподозрить острый миокардит вирусной этиологии. Экстренные противоэпизоотические мероприятия существенного эффекта не дали.

При патологоанатомическом вскрытии самки павиана №3761 было выявлено, что сердце размером 11,0х10,0х4,0 см. (вес 195,2 г.) свободно лежит в полости сердечной сорочки, в которой до 15 мл. прозрачной желтоватой жидкости. Листки перикарда тонкие, гладкие, блестящие, с белесовато серыми очагами, в области верхушки с точечными бурыми участками. Под эпикардом умеренное отложение жира. Пристеночный и клапанный эндокард тонкий, гладкий, блестящий. В полостях сердца свертки и жидкая кровь. Миокард коричневый, не равномерной плотности, дряблый, с очагами неравномерного кровенаполнения. Толщина стенки левого желудочка 0,7см, правого – 0,4 см. Интима коронарных артерий, аорты чистая, цвета слоновой кости. При гистологическом исследовании ткани миокарда выявлено, что в кусочках из различных отделов миокарда миокардиоциты с сохраненными ядрами, округлой, овальной формы, мелкозернистой цитоплазмой, поперечно продольная исчерченность сохранена, местами гипертрофированы. Полнокровие сосудов. Местами сладжи. Перимизиально, периваскулярно, очагово, в отдельных полях зрения диффузно густая лейкоцитарная, лимфогистиоцитарная инфильтрация.

У этой погибшей самки павиана в асептических условиях были взяты ткань миокарда, перикардиальная жидкость. Материал подвергли вирусологическому обследованию.

Измельченные ножницами кусочки ткани миокарда растерли в фарфоровой ступке с добавлением стеклянного песка. Затем добавили охлажденную среду для культуры клеток Игла МЕМ производства Предприятия «ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН» с антибиотиками (стрептомицин, гентамицин, пенициллин). Осветленную центрифугированием (2000 об/мин, 5 минут) и фильтрованную через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм 10% суспензию миокарда ввели в мозг по 10 мкл. 1-2 дневным белым мышам-сосункам и заразили монослой культур клеток Vero и СПЭВ. Мышей-сосунков и культуры клеток иннокулировали и нативной перикардиальной жидкостью после стерилизующей фильтрации. Состояние сосунков и культуры клеток контролировали два раза в день в течение двух недель.

Выделить штамм удалось только на мышах-сосунках из суспензии ткани миокарда.

Выделенный штамм получил наименование «3761 ИМП». 3761 — номер обезьяны по списку питомника, а ИМП — сокращение от «Институт медицинской приматологии».

Результаты изучения биологических свойств штамма 3761 ИМП представлены в таблице № 1.

Таблица №1.

Биологические свойства штамма 3761 ИМП

Объект:	Беспородные белые мыши (внутрибрюшин. введение)	Мыши-сосунки 1-2 дневные (введение в мозг)	Культура клеток Vero (заражение монослоя)	Культура клеток СПЭВ (заражение монослоя)
Признаки:	Парезы, параличи лапок, гибель на 10-12 день	Парезы, параличи, гибель в течение 24-46 часов; > 9 lg LD 50/0,01 ml	8,2 lg ТЦД 50% в 1 мл.	9,0 lg ТЦД 50% в 1 мл.

Попытки выделения штаммов вирусов предпринимались и при вирусологическом обследовании образцов ткани миокарда еще 7 погибших в

2012-2014 годах обезьян (5 павианов гамадрилов, 2 макака резус), при вскрытии которых обнаруживали миокардит. Ни в одном из семи случаев штамм вируса выделить не удалось. У этих обезьян кроме миокардита еще обнаруживали различные формы пневмоний, которые, скорее всего, и стали причиной гибели животных.

Sequence Identity Matrix

Seq->	3761 IM
3761 IMP	**ID**
EMC strain BD2 KF709977	0,794
EMC isolate BD2 KC762214	0,794
EMC isolate K3 EU780148	0,794
EMC isolate K11 EU780149	0,794
EMC polyprotein M81861 ident. NC_001479	0,793
EMC strain BEL-2887A91 AF356822	0,795
EMC strain BJC3 DQ464062	0,795
EMC strain FJ13 KF293299	0,793
EMC strain GX06O1 polyprotein mRNA FJ604852	0,795
EMC strain GX06O2 polyprotein mRNA FJ604853	0,795
EMC strain GXLC FJ897755	0,794
EMC strain HB1 DQ464063	0,794
EMC isolate HB1O JQ864080	0,796
EMC strain JX polyprotein gene KF598863	0,793
EMC strain pEC9 DQ288856	0,795
EMC X74312	0,794
EMC strain XX1 polyprotein gene KF598860	0,794
EMC strain XX2 polyprotein gene KF598861	0,794
EMC strain XX3 polyprotein gene KF598862	0,795
EMC strain ZM polyprotein gene KF598864	0,793
Porcine EMC strain EMCV-CBNU polyprotein DQ517424	0,796
Porcine EMC strain NJ08 polyprotein gene HM641897	0,794
EMC viral RNA polyprotein X00463	0,792
EMC strain 1086C polyprotein gene DQ835185	0,804
EMC isolate Sing-M105-02 KC310737	0,758
EMC isolate Sing-M105-02 KC310738	0,758
EMC X87335	0,795
EMC B variant M22457	0,794
EMC D variant M22458	0,794
EMC diabetogenic D variant M37588	0,795
Mengo virus isolate M	**0,837**
Mengo virus isolate Rz-pMwt DQ294633	**0,837**
EMC V-30 polyprotein gene AY296731	0,793
Porcine EMC type 2 isolate RD 1338 JX257003	0,711

Рисунок 1. Степень идентичности геномов штаммов вируса ЭМК

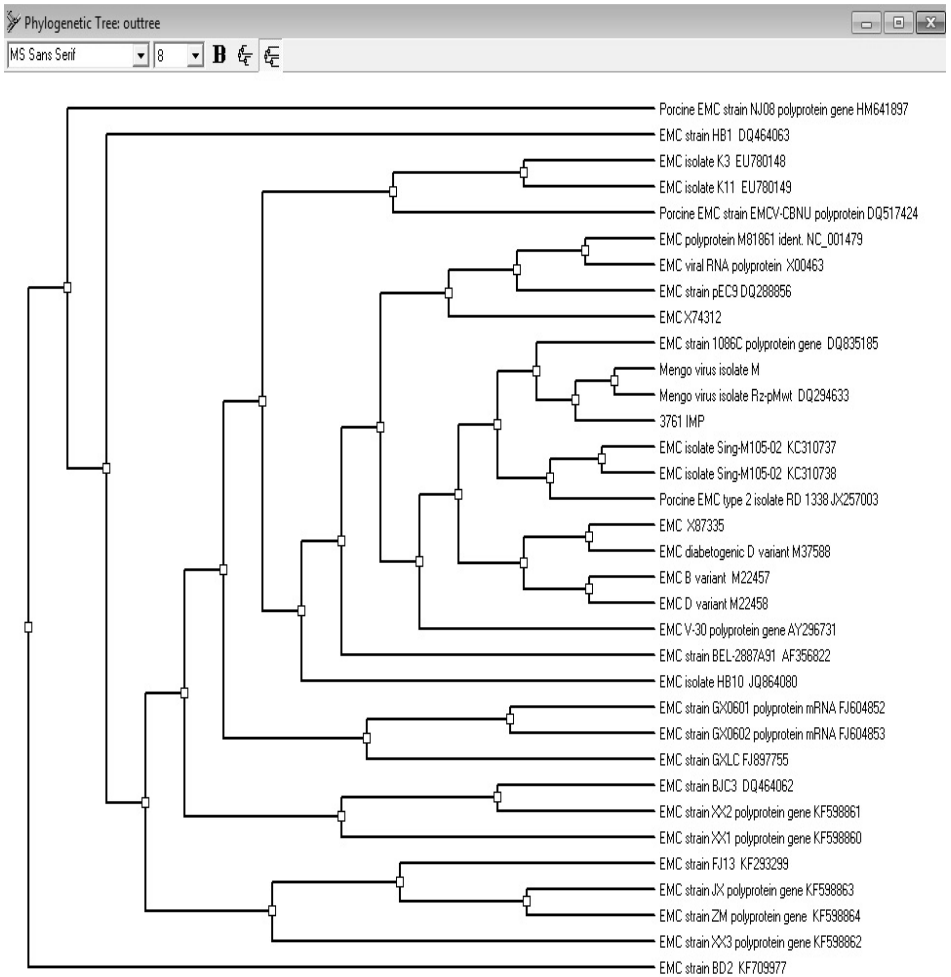


Рис. 2. Филогенетическое древо построенное программой Bioedit с встроенным модулем protdist метод построения neighbor joining

В настоящем исследовании использовали современный подход к изучению РНК-содержащих вирусов, основанный на сочетании технологии секвенирования нового поколения (next-generation sequencing). Технология секвенирования нового поколения позволяет проводить полногеномное секвенирование вирусных геномов без использования специфических праймеров. Этот метод является наиболее эффективным для изучения новых

или дивергентных вирусов, геном которых сложно определить и секвенировать традиционными генетическими методами.

С целью полногеномного секвенирования штамма 3761 ИМП было наработано 50 мл. культуральной жидкости инфицированных клеток Vero. Культуральная жидкость собиралась при наступлении не менее 50% ЦПД. Затем после предварительно центрифугирования при 10.000 об/мин в течение 30 мин. при +4ºС, вирус осаждался в бляшку ультрацентрифугированием при 30.000 об/мин в течение 90 мин. при +4ºС. Культуральная жидкость удалялась из пробирки, а осадок вируса (бляшка) лизировали в 1 мл реагента TRIzol (Life Technologies, США) для последующего выделения РНК. Далее РНК была секвенирована с использованием технологии полногеномного секвенирования (прибор MiSeq, Illumina, США). В результате была определена полная последовательность генома штамма 3761 ИМП (депонирована в GenBank под номером KX231802). Результаты анализа полученных геномных данных показали, что штамм 3761 ИМП принадлежит роду *Cardiovirus* (семейство *Picornaviridae*) и наиболее близок изолятам вируса Менго. Результаты сравнения выровненных последовательностей генома выделенного штамма и 33 различных штаммов вируса ЭМК (данные получены из базы GenBank) показали, что геном штамма 3761 ИМП обладает 83,7% схожести с изолятами вируса Менго «M» и Rz-pmwt, тогда как с изолятами вируса ЭМК это значение не превышает 80% (штамм 1086 C) (см. рисунок №1). С остальными штаммами сходство оказалось еще меньшим. Результаты филогенетического анализа полноразмерных геномов штаммов вируса ЭМК в программе Bioedit представлены в рисунке № 2.

Список литературы

1. M. Steven Oberste, Eduardo Gotuzzo, Patrick Blair, W. Allan Nix, Thomas G. Ksiazek, James A. Comer, Pierre Rollin, Cynthia S. Goldsmith, James Olson, and Tadeusz J. Koche Human Febrile Illness Caused by Encephalomyocarditis Virus Infection, Peru. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 15, No. 4, April 2009
2. Tesh RB, Wallace GD. Observations on the natural history of encephalomyocarditis virus. Am J Trop Med Hyg. 1978;27:133–43.
3. Hubbard GB, Soike KF, Butler TM, Carey KD, Davis H, Butcher WI, et al. An encephalomyocarditis virus epizootic in a baboon colony. Lab Anim Sci. 1992;42:233–9.
4. Reddacliff LA, Kirkland PD, Hartley WJ, Reece RL. Encephalo-myocarditis virus infections in an Australian zoo. J Zoo Wildl Med. 1997;28:153–7.

5. van Sandwyk JH, Bennett NC, Swanepoel R, Bastos AD: Retrospective genetic characterisation of Encephalomyocarditis viruses from African elephant and swine recovers two distinct lineages in South Africa. Vet Microbiol 2013, 162:23–31.
6. Seaman JT, Boulton JG, Carrigan MJ. Encephalomyocarditis virus disease of pigs associated with a plague of rodents. Aust Vet J. 1986;63:292–4. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1986.tb08069.x
7. Masek-Hammerman K, Miller AD, Lin KC, MacKey J, Weissenbock H, Gierbolini L, Burgos A, Perez H, Mansfield KG: Epizootic myocarditis associated with Encephalomyocarditis virus in a group of rhesus macaques (macaca mulatta). Vet Path 2012, 49:386–392.
8. Jones P, Mahamba C, Rest J, André C. Fatal inflammatory heart disease in a bonobo (Pan paniscus). J Med Primatol. 2005;34:45–9. DOI: 10.1111/j.1600-0684.2004.00091.x
9. Gajdusek DC. Encephalomyocarditis virus infection in childhood. Pediatr. 1955;16:902–6. Verlinde JD, Tongeren V. Human infection with viruses of the Co-lumbia SK group. Arch Ges Virusforsch. 1953;5:217–27.
10. Крылова Р.И., Джикидзе Э.К. /Энцефаломиокардит у обезьян.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005, т.139, №3, стр. 355–359.
11. Citino SB, Gaskin HJH, Wickham DJ: Fatal Encephalomyocarditis virus infection in Sumatran orangutan (Pongo pygmaeus abelii). J Zoo Wildl Med 1998, 19:214–218.

4. КЛЕТОЧНАЯ МЕДИЦИНА. КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ. СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ.
IV. CELL MEDICINE. CELL TECHNOLOGIES. STEMM CELLS. TRANSPLANTOLOGY AND ARTIFICIAL ORGANS

INDUCED PLURIPOTENT STEM (IPS) CELLS FOR HEART REPAIR: NEED FOR PRECLINICAL PRIMATE STUDIES?

Ulrich Martin

Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO), Department for Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery, REBIRTH Cluster of Excellence, Hannover Medical School, Germany

Contact: *Ulrich Martin, Hannover Medical School, Clinic for Cardiac, Thoracic, Transplantation and Vascular Surgery, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover*

Phone: +49 511 532 8820, Fax: +49 511 532 8819

Email: martin.ulrich@mh-hannover.de

Abstract

Stem cell based therapies are considered to be promising and innovative therapeutic strategies for heart repair. Patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) are now available, which combine the advantages of autologous adult stem cells with the unlimited potential of embryonic stem cells. Intense research has successfully driven forward recent dramatic clinically relevant progress in iPSC technology. On the other hand, critical hurdles such survival and proper functional integration of cellular transplants after myocardial infarction have yet to be overcome. Addressing the limitation of small animal models of myocardial infarction, first studies in nonhuman primates revealed substantial engraftment and *de novo* formation of well-structured myocardium. Although various hurdles and uncertainties remain, concepts of cellular cardiomyoplasty seem to have come of age and the first clinical applications of iPSC-based heart repair can be expected within the coming years.

STEM CELLS FOR HEART REPAIR. Myocardial infarction leads to irreversible cell loss and scar formation, which result in impaired cardiac function, cardiac hypertrophy and, eventually, heart failure. As the intrinsic regenerative capacity of the human heart is very limited, organ transplantation or ventricular assist devices remain the only end-stage therapy options to date.

For at least two decades, alternative therapeutic concepts of heart repair based either on direct cell injection or on the transplantation of *in vitro* engineered tissue constructs have been considered as potential approaches to overcome the shortage of donor organs. However, the multitude of recent experimental and clinical studies applying various adult stem cells have thus far not been able to fulfil the initial high hopes vested in adult stem cell-based therapies. As summarized in a recent meta study, the vast majority of these studies resulted in either no or only minor functional improvement [1], most likely due to paracrine effects, including accelerated revascularisation, enhanced myocyte survival in the infarct border zone and the modulation of scar formation, resulting in improved mechanical properties [2]. Despite sporadic myocyte formation, a significant generation of *de novo* myocardium could not be demonstrated [3].

For many years, embryonic stem cells (ESCs) were considered as the only cell source suitable to supply the huge numbers of cardiomyocytes lost after myocardial infarction. However, a potential clinical use of ESCs is highly controversial since their generation requires the destruction of human embryos and, if not produced through therapeutic cloning, no autologous ESCs are available for cellular therapies.

In 2006, these limitations were overcome by the groundbreaking development of induced pluripotent stem cells (iPSCs) by S. Yamanka [4], who was awarded the Nobel Prize in Medicine in 2012. In the meantime, the generation of human iPSCs has become a standard procedure in many laboratories and it is now clear that these cells are almost indistinguishable from ESCs with respect to their phenotype, culture characteristics and potential for proliferation and differentiation.

PROGRESS IN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL TECHNOLOGY. Meanwhile, many hurdles and limitations for production of clinically applicable iPSC derivatives have already been overcome. Transgene-free iPSCs can be efficiently derived from easily accessible cell sources such as blood [5-7], and highly efficient protocols for a site-specific (and thus relatively safe) introduction of transgenes by homologous recombination based on engineered nucleases including Zinc finger- and TALE-nucleases as well as the CRISPR/Cas9 system [8]. Utilizing these novel tools, it has been possible to develop protocols for footprintless gene editing without the need for antibiotic selection [9]. Such techniques are of key importance for preclinical animal studies and future cellular

therapies as they allow e.g. the correction of disease-related mutations or the well-defined expression of reporter transgenes that facilitates the monitoring of graft survival, functional integration and distribution in small and large animals [10]. Moreover, the targeted introduction of transgenes into safe harbour sites [9] is possible, enabling genetic enrichment of pure CMs prior to transplantation [11, 12], or to open up the possibility of killing the cellular graft in case of tumour formation through inducible expression of suicide genes [13].

Moreover, iPSCs can now be expanded in scalable suspension culture [14] and large numbers of human iPSCs can be produced in fully controlled bioreactors [15]. Moreover, sequential inhibition and activation of molecular differentiation pathways has for the first time allowed a targeted, more robust and efficient differentiation of human ESCs and iPSCs [16, 17]. In the meantime, small molecules instead of recombinant proteins are used in such protocols, which has greatly improved the efficiency of cardiac differentiation [18]. The introduction of small molecules as an activator or inhibitor of molecular key pathways has facilitated the development of scalable protocols that are relatively inexpensive and more robust. Highly improved cardiac differentiation efficiencies of up to 90 % now enable the production of the vast numbers of CMs required for clinical cell therapy or the engineering of large contractile muscle patches in stirred tank bioreactors [19]. Further enrichment is possible through genetic strategies but also by using non-genetic approaches including fluorescence-activated cell sorting [20, 21] or metabolic enrichment [22]. The functionality of human PSC-derived CMs, also in terms of proper reaction to various pharmacological stimuli, has been proven by various groups *in vitro*. Moreover, recent promising reports strongly suggest that different approaches such as long-term culturing, 3-dimensional tissue engineering, mechanical or electric stimulation, and treatment with neuro-hormonal factors, or combinations thereof, will lead to mature human PSC-derived CMs [23].

***IN VIVO* APPLICATION OF iPSC DERIVATIVES S FOR CARDIAC CELL THERAPY.** Unfortunately, the availability of human iPSCs and cardiomyocytes derived from these cells has solved only one of the most severe limitations for current concepts for myocardial repair. Further critical hurdles are low cell survival and the lack of functional integration of the cellular transplants. In particular, the functional coupling and formation of well-organized myocardium appears to be difficult to achieve. The direct injection of cells to improve heart function was investigated in different animal models with a variety of mouse and human cell sources, including undifferentiated cells as well as cells, which had been differentiated to cardiac progenitors or cardiomyocytes. Regardless of the cell type

or application method (intramyocardial or intracoronary injection), only up to 5 % of the cells remained in the heart, and neither significant integration nor long term survival could be shown ([24], reviewed by [25]). Although survival and cardiovascular *in vitro* differentiation has been demonstrated, the injection of iPSC-derived cardiovascular progenitors did not result in the formation of structured myocardium [26].

In contrast, a very recent study was the first to report the formation of relatively large electrically coupled and well-structured muscle islands from injected human ESC-derived myocytes in a guinea pig model of MI [27]. These data are considered to be very promising, although it was necessary to inject extremely high numbers of myocytes, (i.e. 10^8 cells, which correlates to ~ $2x10^{10}$ or approximately 4 times the total number of myocytes in the adult human adult left ventricle, when projected from the guinea pig to the human heart, which is twenty times larger).

Until recently, there has been a lack of a suitable preclinical large animal model for cardiac repair using iPSC derivatives. Although various reports have claimed to have generated iPSCs from pigs and sheep, there are still no true pluripotent stem cells available from these animals, and the reported iPS-like cells typically depend on the introduced transgenes [28]. On the other hand, an immunological rejection of human iPSC-derivatives is obviously very difficult to prevent in pigs and sheep. Although no engrafted CMs could be detected, at least engraftment and long term survival of vascular hiPSC-derivatives has recently been demonstrated in a large animal model of myocardial infarction (MI) [10] using novel imaging technologies. Interestingly, improved intramyocardial graft survival after the co-injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) [10] was observed, which might indicate an immunomodulatory effect of these cells. Very recently, another report raised hopes that the survival of iPSC-derived myocytes may be achievable in pigs using suitable protocols of pharmacological immunosuppression [29]. Interestingly, the authors observed that injection through a fibrin patch containing insulin growth factor IGF)-encapsulated microspheres significantly improved cell retention and survival in the treated heart [29].

NONHUMAN PRIMATE STUDIES FOR CELLULAR CARDIOMYOPLASTY. In view of this lack of a suitable large animal model, it became clear that non-human primate (NHP) models will be of critical importance for translation of iPSC technologies into clinical heart repair. A rhesus monkey model of MI was recently applied to investigate the effects of transplanted allogeneic early stage specific antigen 1 (SSEA-1) cardiovascular progenitors [30]. Immunohistological analyses two months after injection of these cells into the scar area revealed engraftment of

GFP-labelled donor cells and provided evidence for their differentiation into cardiomyocytes, apparently with a mature phenotype. These findings more recently led to a first clinical trial in 2014 [31], with no complications observed in the respective patient so far.

In another extremely promising approach, the survival and functional coupling of large human ESC-derived heart muscle islands was demonstrated in a preclinical NHP model of myocardial infarction MI [32], although no conclusive data concerning potential increased contractility and improved heart function was shown. Our own group is currently preparing for application of iPSC-derived cardiomyocytes into cynomolgus monkeys (M. fascucularis), and the respective animal model of MI is currently established.

Conclusions

Of course, there are still many hurdles to be overcome prior to clinical application. These include the need for better graft survival, proper integration and vascularisation, and the elucidation and reduction of risks associated with the recently observed chromosomal abnormalities that become apparent after reprogramming and iPSC expansion [33], and the appearance of cardiac arrythmias.

However, the extremely low incidence of CM-derived tumors in general suggests a low risk factor for a malignant transformation of terminally differentiated iPSC-derived CMs, and potential implant-related arrhythmias could be controlled through artificial pacemakers. NHP models are definitely of utmost importance to study feasibility and risks of iPSC-based heart repair prior to clinical application and may eventually lead to broadly applied cellular heart repair in humans.

References

1. Jiang, M., *et al.*, Expert opinion on biological therapy, 2010. **10**(5): p. 667-80.
2. Gruh, I. and U. Martin, Adv Biochem Eng Biotechnol, 2009. **114**: p. 73-106.
3. Ptaszek, L.M., *et al.*, Lancet, 2012. **379**(9819): p. 933-42.
4. Takahashi, K., *et al.*, Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
5. Haase, A., *et al.*, Cell Stem Cell, 2009. **5**(4): p. 434-41.
6. Lachmann, N., *et al.*, Am J Respir Crit Care Med, 2014. **189**(2): p. 167-82.
7. Schlaeger, T.M., *et al.*, Nat Biotechnol, 2014.
8. Gaj, T., *et al.*, Trends Biotechnol, 2013. **31**(7): p. 397-405.
9. Merkert, S., *et al.*, Stem Cell Reports, 2014. **2**(1): p. 107-18.
10. Templin, C., *et al.*, Circulation, 2012. **126**(4): p. 430-9.

11. Klug, M.G., *et al.*, J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 216-24.
12. Kensah, G., *et al.*, Eur Heart J, 2013. **34**(15): p. 1134-46.
13. Di Stasi, A., *et al.*, N Engl J Med, 2011. **365**(18): p. 1673-83.
14. Olmer, R., *et al.*, Stem Cell Res, 2010. **5**(1): p. 51-64.
15. Olmer, R., *et al.*, Tissue Eng Part C Methods, 2012.
16. Burridge, P.W., *et al.*, PloS one, 2011. **6**(4): p. e18293.
17. Murry, C.E. and G. Keller, Cell, 2008. **132**(4): p. 661-80.
18. Lian, X., *et al.*, Nature protocols, 2013. **8**(1): p. 162-75.
19. Kempf, H., *et al.*, Stem Cell Reports, 2014.
20. Hattori, F., *et al.*, Nat Methods, 2010. **7**(1): p. 61-6.
21. Dubois, N.C., *et al.*, Nat Biotechnol, 2011. **29**(11): p. 1011-8.
22. Tohyama, S., *et al.*, Cell Stem Cell, 2013. **12**(1): p. 127-37.
23. Yang, X., *et al.*, Circ Res, 2014. **114**(3): p. 511-23.
24. van Laake, L.W., *et al.*, Circulation research, 2008. **102**(9): p. 1008-10.
25. Nunes, S.S., *et al.*, Journal of cardiovascular translational research, 2011. **4**(5): p. 592-602.
26. Mauritz, C., *et al.*, Eur Heart J, 2011. **32**(21): p. 2634-2641.
27. Shiba, Y., *et al.*, Nature, 2012. **489**(7415): p. 322-5.
28. Gandolfi, F., *et al.*, Reprod Domest Anim, 2012. **47 Suppl 5**: p. 11-7.
29. Ye, L., *et al.*, Cell Stem Cell, 2014. **15**(6): p. 750-61.
30. Blin, G., *et al.*, J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1125-39.
31. INSERM.
32. Chong, J.J., *et al.*, Nature, 2014. **510**(7504): p. 273-7.
33. Ronen, D. and N. Benvenisty, Current opinion in genetics & development, 2012. **22**(5): p. 444-9.

ОТРАБОТКА ТРАНСЛОКАЦИИ МЯГКОТКАННОГО ВАСКУЛЯРИЗОВАННОГО ЛИЦЕВОГО ЛОСКУТА НА ПРИМАТАХ

Порханов В.А., Дикарев А.С., Богданов С.Б., Виноградов Р.А., Иващук Ю.В., Кочергина Е.В., Парамонова О.А., Павлов И.В., Савосин Ю.В.

НИИ- Краевая клиническая больница №1, г. Краснодар, Россия

Резюме

Нами проведены четыре экспериментальные операции на приматах с целью отработки методов мобилизации поликомпозитного лицевого лоскута с включением различных мягкотканных и костных структур лица:

жевательной мускулатуры, околоушной слюнной железы, нижней челюсти, ушной раковины.

Опытным путем в процессе диссекции выявлены определенные особенности топографии приматов, а именно: атипичное по сравнению с анатомией человека расположение лицевой артерии, связанное с разницей объемных соотношений лицевого и мозгового скелета.

Уровень отхождения лицевой артерии от наружной сонной артерии располагается на уровне выхода ствола лицевого нерва из основания черепа.

Такая топография осложняет подъем лицевого лоскута возможностью повреждения ветвей лицевого нерва и как следствие нарушения работы мимической мускулатуры.

В процессе эксплантации и реплантации поликомпозитного лицевого лоскута у приматов получено заключение о том, что бассейн кровоснабжения лицевой артерии полностью обеспечивает питание лицевого лоскута.

TRANSLOCATION OF THE SOFT-TISSUE VASCULARIZED FACIAL FLAP ON PRIMATES

Porkhanov V.A., Dikarev A.S., Bogdanov S.B., Vinogradov R.A., Ivashchuk Yu.V., Kochergina E.V., Paramonova O.A., Pavlov I.V., Savosin Yu.V.

The regional clinical hospital №1, Krasnodar, Russia

Abstract

We performed four experimental operations on primates to improve methods of mobilization of the polycomposite facial flap including various soft-tissue and osseous structures of the face: masseter muscles, parotid salivary gland, lower jaw bone, external ear.

Experimentally, in the process of dissection some features of primate topography were determined: the atypical position of the facial artery as compared to the human anatomy and rising caused by the difference in the volume ratio of the facial and cerebral skeletons.

The level of the facial artery origin from the external carotid artery is located at the exit level of facial nerve trunk from the skull base.

Such topography complicates the facial flap rising by the possible damage of branches of the facial nerve and, as a result, the disorder of mimic muscles.

In the process of exteriorization and replantation of the primate polycomposite facial flap it was concluded that blood supply of the facial artery completely provides supply of the facial flap.

Введение

Дефекты мягкотканных и костных структур лица различной этиологии предполагают многоэтапное хирургическое лечение с длительными периодами восстановления/реабилитации. На современном этапе хирургия развивается по пути одноэтапных реконструктивная вмешательств.

Трансплантация лица как метод лечения вышеуказанных пациентов планируется как завершающий, когда остальные методы реконструкции были исчерпаны, либо их применение не представляется возможным.

Прямыми показаниями к использованию данного метода хирургического лечения является наличие дефектов двух из трех зон лица с выпадением функции круговых мышц глаза и рта.

Трансплантация лица является наиболее технически сложной операцией. Первая частичная трансплантация лица была произведена во Франции в 2005 году – были пересажены нос, губы, подбородок. Полная пересадка лица впервые произведена в 2010 году в Испании, а в 2015г. в США выполнена наиболее обширная трансплантация, которая включала новое лицо, уши и волосы.

В России в 2015 году была выполнена частичная трансплантация лица.

Учитывая сложность операции, подготовка к трансплантации лица, как правило, длится несколько лет и требует участия нескольких десятков различных специалистов.

Сложность методики обусловлена необходимостью обеспечения кровоснабжения всех структур и областей лица, как костных, так и мягкотканных.

В связи с этим, в передовых медицинских центрах мира проводятся исследования и отработки методики трансплантации лица.

Трансплантация лица на сегодняшний день была осуществлена в 8 странах мира, выполнено 35 операций.

С 2013 года нами ведется подготовка к выполнению трансплантации лица. Первым этапом отработка методики подъема лицевого лоскута нами осуществлена на трупном материале.

В 2015 году впервые на приматах выполнены 4 операции с целью отработки методики эксплантации с последующей реплантацией поликомпозитного лицевого лоскута.

Задачей нашего исследования явилось проведение оперативного вмешательства на приматах, дублирующего аналогичное вмешательство на человеке.

В процессе операции проводилось определение бассейнов кровоснабжения питающих сосудов; определение эстетических и

функциональных границ забора трансплантата, исключающих пересечение мышечно-апоневротической системы лица и ветвей лицевого нерва, с возможностью включения различных поверхностных и глубоких структур лица.

Методика:

В условиях операционной под общим обезболиванием и искусственной вентиляции легких посредством оро-трахеальной интубации.

Произведен забор различных типов лоскутов:

- полнослойный васкуляризированный лицевой лоскут с включением жевательной мускулатуры и околоушных слюнных желез.
- лицевой лоскут, включающий кожные покровы и мышечно-апоневротический слой.

Путем 2-стороннего преаурикулярного доступа с продлением в коронарный. Диссекция мягких тканей лица в подапоневротическом слое в височной, лобной областях до скуловой дуги. В местах прикрепления мягких тканей параорбитальной области рассекается надкостница по верхнему и нижнему орбитальному краю. Производится супра- и субцилиарный разрезы, окаймляющие глазную щель, при этом диссекция круговой мышцы глаза выполняется в пресептальной порции, сохраняя ветви лицевого нерва, идущие к мышце. Отсекается латеральная кантальная связка от края орбиты.

Результаты и обсуждение

Нами проведены четыре экспериментальные операции на приматах с целью отработки методов мобилизации поликомпозитного лицевого лоскута с включением различных мягкотканных и костных структур лица: жевательной мускулатуры, околоушной слюнной железы, нижней челюсти, ушной раковины.

Опытным путем в процессе диссекции выявлены определенные особенности топографии приматов, а именно: атипичное по сравнению с анатомией человека расположение лицевой артерии, связанное с разницей объемных соотношений лицевого и мозгового скелета.

Уровень отхождения лицевой артерии от наружной сонной артерии располагается на уровне выхода ствола лицевого нерва из основания черепа.

Такая топография осложняет подъем лицевого лоскута возможностью повреждения ветвей лицевого нерва и как следствие нарушения работы мимической мускулатуры.

В процессе эксплантации и реплантации поликомпозитного лицевого лоскута у приматов получено заключение о том, что бассейн кровоснабжения лицевой артерии полностью обеспечивает питание лицевого лоскута.

Таким образом, отработана методика операции и получены данные, способствующие дальнейшему прогрессу в разработке программы по трансплантации лица в России.

ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА ОБЕЗЬЯН ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ДРЦ (ДОКСОРУБИЦИНА) И ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.

В.З.Агрба[1], Д.Д. Карал-оглы[1], С.Ш.Кальсина[2], Т.Е Гвоздик[1], П.А. Капланян [1], И.А.Гварамия[1], Е.И. Мухаметзянова[1], Ю.П.Чугуев[1], О.А.Шамсутдинова[1], И.Н.Клоц[1], В.А.Порханов[3], Д.Э. Аравиашвили[1] ,Б.А.Лапин[1]

[1] ФГБНУ «НИИ МП», г.Сочи, РФ

[2] МНРЦ им. А.Ф.Цыба МЗиСР , Обнинск,РФ

[3] Краевая клиническая больница им. Очаповского, Краснодар, РФ

Резюме

Изучены физиологические параметры обезьян после введения им доксорубицина (ДРЦ) и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК). При введении доксорубицина обезьянам вида макака резус (Macaca Mulatta) наблюдается клиническая картина интоксикации, сходная с таковой у людей, что подтверждает адекватность используемой нами модели. Клиническая картина интоксикации у обезьян сопровождается изменениями со стороны картины крови: тромбоцитопенией, лейкопенией, нейтропенией и лимфоцитозом. У обезьян, получивших Доксорубицин, на пике интоксикации изменяется белковый обмен: значительно уменьшается в крови содержание общего белка и альбуминов, а также существенно увеличивается активность щелочной фосфатазы. Резко повышается уровень С-реактивного белка (СРБ), при этом увеличивается концентрация цитокина ИЛ-6, при отсутствии признаков изменения других провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО-альфа. Трансплантация МСК при использовании умеренных доз Доксорубицина полностью сохраняет нормальный клинический статус обезьян. Поздняя трансплантация МСК не оказывает защитного действия. Защитный эффект МСК по результатам наших

исследований зависит от дозы вводимого препарата, суммарного количества трансплантированных МСК и времени их трансплантации.

PARAMETERS OF MONKEY ORGANISM PHYSIOLOGICAL SYSTEM FUNCTIONING AFTER DOXORUBICIN ADMINISTRATION AND STEM CELL TRANSPLANTATION

V.Z.Agrba[1], D.D. Karal-ogly[1], S.Sh. Kalsina[2], T.E. Gvozdik[1], P.A. Kaplanyan[1], I.A. Gvaramia[1], E.I. Muchametzianova[1], Y.P. Chuguev[1], O.A. Shamsutdinova[1], I.N. Klots[1], V.A. Porkhanov[3], D.E.Araviashvili[1], B.A. Lapin[1].

[1] FSBSI "RIMP",Sochi, Russia

[2] A. Tsyb Medical Radiological Research Centre - branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

[3] The regional clinical hospital №1, Krasnodar, Russia

Abstract

Physiological parameters of monkeys after the doxorubicin (DRC) administration and mesenchymal stem cells (MSC) transplantation were studied. After doxorubicin injection in Rhesus monkeys (Macaca Mulatta) the clinical picture of intoxication was similar to the one observed in a human that confirms the adequacy of our monkey model. The clinical picture of intoxication in monkeys is accompanied by changes in the blood picture, resulting to thrombocytopenia, leucopenia, neutropenia and lymphocytosis. At the peak of intoxication in monkeys treated with doxorubicin the protein metabolism changes take place with a significant decrease of total protein content and considerable increase of alkaline phosphatase activity. The C-reactive protein level (CRP) has sharply raised and the IL-6 cytokine concentration increased, while the levels of other pro-inflammatory cytokines (IL-1 and TNF-alpha) didn't change. When moderate doses of doxorubicin were used, the transplantation of mesenchymal stem cells completely preserved the normal clinical status of monkeys. The delayed MSC transplantation didn't have the protective effect. Our results suggest that the protective effect of MSC depends on DRC doses, the total quantity of transplanted MSC and a time of their transplantation.

Известно высоко токсическое действие антибиотика антрациклинового ряда Доксорубицина (ДРЦ), широко используемого в онкологической практике [12]. Известно также действие мезенхимальных стволовых клеток

(МСК) для репарации поврежденных органов и клеток, что делает перспективным использование МСК для восстановления пораженных Доксорубицином органов [4,9].

Учитывая анатомо-физиологическое сходство человека и обезьян [6,7], их филогенетическую близость, использование лабораторных приматов для изучения патологических состояний человека в эксперименте на обезьянах, позволяет экстраполировать результаты исследований с минимальной коррекцией их в человеческую практику. В силу указанного, моделирование патологических состояний человека, в том числе изучение действия ДРЦ на организм обезьян и возможностей уменьшения токсического действия препарата, делает перспективным использование обезьян в этих целях.

Раннее нами было показано, что МСК, трансплантированные обезьянам до введения ДРЦ, способны экранировать сердце от повреждающего действия этого препарата [1,1а], но при этом не изучалось состояние физиологических систем организма обезьян. Целью наших настоящих исследований явилось изучение физиологических параметров обезьян после введения им ДРЦ и попытки уменьшения токсического действия ДРЦ после трансплантации МСК. Исследование носит пилотный характер и в случае получения удовлетворительных результатов значительно расширит спектр возможностей использования МСК .

Материалы и методы

В эксперимент были отобраны 3 самца макаки резус 6-7 лет и весом 8,1, 8,6 и 9,3 кг. Доксорубицин-ЛЭНС 0,1%, разведенный на воде для инъекций, вводили внутривенно, капельно в течение 30 минут. Мониторинг состояния физиологических систем организма обезьян после введения ДРЦ включал: оценку общего клинического состояния обезьян, включая динамику веса тела животных, а также изучение гематологических параметров, биохимических показателей, содержание в крови клеток, несущих В клеточный маркер, концентрацию провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α, а также содержание С-реактивного протеина (СРП).

Гематологический анализ крови обезьян проводили на гематологическом анализаторе фирмы «Beckman 5 diff»,USA.

Биохимический анализ сывороток крови обезьян проводили на биоанализаторе BIOCHEMSA (HighTechnologyInc.,USA) с набором реактивов этой же фирмы.

Иммунофенотипический анализ клеток проводили с помощью проточной цитофлюорометрии на проточном цитометре («Beckman Coulter

Epics XL-MCL»). Для иммунофенотипирования клеток использовали меченные флюорохромами MoAT (Becton Dickinson “), специфичные к антигенам клеток обезьян .

Провоспалительные цитокины: ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α а также С-реактивный протеин (СРП) изучались методом твердофазного иммуноферментного анализа с набором реактивов фирмы «Вектор-Бест».

Результаты и обсуждение

Первое введение ДРЦ в дозе 5,7 мг/кг всем 3-м обезьянам с последующей через 48 часов трансплантацией МСК обезьяны перенесли хорошо, признаков интоксикации не наблюдалось. Двум обезьянам 37260 и 37221 были введены МСК человеческого происхождения в количестве по $65x10^6$клеток, а одной 37905 – обезьяньего. На введение клеток человеческого происхождения реакции не последовало как и ожидалось, поскольку МСК не несут на своей поверхности антигенов гистосовместимости. Через 34 дня после первого провели второе введение ДРЦ, приведшее к появлению признаков интоксикации на 3 -й день после введения. Например, обезьяна 37260 - появились анемия, жидкий стул, цианоз слизистых,тремор туловища и конечностей, обезьяна стонала, ложилась.. Животному были трансплантированы $45x10^6$ МСК. Через 3 дня признаки интоксикации стали заметно уменьшаться: появился аппетит, цианоз слизистых и тремор исчезли. Еще через 2 дня состояние обезьяны оценивалось как удовлетворительное. Аналогичная картина наблюдалась и у 2-х других обезьян (37905 и 37211). Исключение составила обезьяна 37905, у которой после 2-го введения ДРЦ и трансплантации $30x10^6$ МСК на фоне удовлетворительного общего состояния появились некротические повреждения на туловище и по ходу левой локтевой вены. Эти явления устранялись аппликациями культуральной жидкости МСК. Лечебный эффект этого метода уже был описан [6] и он оказался эффективным и в нашем случае. После 2-х введений ДРЦ и трансплантации МСК общее клиническое состояние обезьян оставалось удовлетворительным. 3-е введение ДРЦ провели через месяц после второго, но уже более высокой дозой ДРЦ (9 мг/кг), которую обезьяны перенесли по-разному. Обезьяна 37260 - через 4 дня после 3-го введения ДРЦ и отсутствия трансплантации МСК появились и быстро нарастали клинические признаки интоксикации, приведшие животное к гибели. 37905 - признаки интоксикации появились через 48 часов, затянувшиеся некротические поражения вскрылись вновь. Через 8 и 10 дней после введения ДРЦ в два приема обезьяне в общей сложности было введено $93x10^6$ МСК, что не оказало защитного действия и

обезьяна погибла. 37211 - через 48 часов после 3-го введения ДРЦ появились и нарастали симптомы интоксикации: потеря аппетита, веса, рвота с примесью желчи, эксикоз. Через 48 часов обезьяне были трансплантированы МСК в 2 приемы в общей сложности $65x10^6$. Через 3 дня у обезьяны появились и нарастали признаки улучшения. Через 12 дней после 3-го введения ДРЦ и 10 дней после трансплантации МСК клиническое состояние обезьяны определялось как удовлетворительное. В настоящее время обезьяна практически здорова.

Первое введение ДРЦ обезьяне 37260 (♂ вес 9,3 кг) в дозе 5,7 мг/кг с последующей трансплантацией человеческих МСК через 48 часов в количестве $65x10^6$ обезьяна перенесла удовлетворительно. Признаков интоксикации не отмечалось. Следующее введение ДРЦ было проведено через 34 дня после первого в той же дозе. Признаки интоксикации были отмечены через 4 дня: угнетена, анемична, глаза запавшие, стул жидкий, одышка, постоянно ложится, стонет, тремор туловища и конечностей, отказывается от пищи. МСК введено было через 4 дня после ДРЦ в количестве $45x10^6$ в/в, струйно. На 4-й день после введения МСК признаки интоксикации стали уменьшаться, появился аппетит, цианоз слизистых и тремор исчезли. Через 2 дня обезьяна была клинически здорова. Через 4 дня после 3-го введения высокой дозы ДРЦ (9 мг/кг) и без трансплантации МСК обезьяна погибла.

Обезьяне 37905 (♂ вес 8.650) был введен ДРЦ в дозе 5,7 мг/кг и через 48 часов $30x10^6$ МСК обезьяньего происхождения. В течение месяца клиническое состояние обезьяны оставалось удовлетворительным. Через месяц после первого введения ДРЦ обезьяне вновь повторили введение препарата в той же дозировке. На фоне удовлетворительного общего клинического состояния у животного появились некротические поражения на туловище и по ходу левой локтевой вены. Было начато лечение пораженных участков аппликациями кондиционной среды от культивирования МСК, лечебный эффект этого метода был описан [6]. Постепенно раны очистились и полностью зажили. Состояние обезьяны было удовлетворительным. Третье введение ДРЦ провели через месяц после второго, но большей дозой (9 мг/кг). Через 48 часов появились признаки интоксикации, которые быстро нарастали. В частности, обезьяна перестала есть, была слаба с трудом передвигалась по клетке или лежала, эксикоз, одышка, слизистые бледные, глаза запавшие. Зажившие некротические поражения вскрылись вновь. Через 8-10 дней в два приема обезьяне ввели в общей сложности $93x10^6$ человеческих МСК. Запоздалое введение МСК не дало эффекта и обезьяна погибла.

Обезьяна 37221 (♂, вес 8,1 кг). .Протокол исследования такой же как и у 37905. Т.е. животное получило ДРЦ в дозе 5,7 на кг, в общей сложности 46,17 мг.. Через 48 часов ей были трансплантированы человеческие МСК в количестве $65x10^6$ клеток. Заметных признаков интоксикации не отмечалось. Через месяц после первого введения обезьяне ввели вторую аналогичную первой дозу ДРЦ , МСК не вводили. Через 48 часов появились , купирующиеся признаки интоксикации.. Через 1,5 месяца после второго введении я МСК на фоне общего удовлетворительного состояния обезьяне ввели третий раз ДРЦ в дозе 9 мг/кг, в общем 72 мг. Через 48 часов у животного появились и быстро нарастали признаки интоксикции: обезьяна перестала есть, угнетена, анемична, больше лежит, кожная складка не расправляется, рвота с примесью желчи, стул жидкий. Через 20 и 14 дней в два приема животному были трансплантированы человеческие МСК в общей сложности $65x10^{6.}$ клеток. Через 2 дня после введения МСК появились первые очень слабые признаки улучшения и с каждым днем общее состояние обезьяны улучшалось . Применение кондиционной среды в виде аппликаций давало хороший клинический эффект. В течение 10 дней раневая поверхность значительно уменьшилась с грануляцией пораженных участков. Еще через 2 недели клиническое состояние обезьяны опасений не вызывало.

Т.о. результаты проведенных исследований позволяют предполагать, что МСК обладают свойством значительно уменьшать повреждения органов, вызываемые ДРЦ, о чем свидетельствуют не только наши данные, но и работы других авторов [8, 11], в том числе исследователей, наблюдавших миграцию трансплантированных МСК в поврежденные ткани [9].

После двух введений ДРЦ обезьянам и последующей двукратной трансплантации МСК, концентрация СРБ и уровень цитокинов определялись в пределах нормы. Однако, через 24 часа после 3-го введения ДРЦ резко повысилось содержание СРБ у всех 3-х обезьян в 15, 37 и 120 раз соответственно, у двух обезьян (37221 и 37905) увеличилось и содержание ИЛ-6. Затем концентрация СРБ понизилась, но продолжала оставаться выше референтных значений. За сутки до гибели СРБ у обезьяны 37260 находилось на уровне 1050 мг/л (норма 10 мг/л). Повышение уровня СРБ у обезьяны 37905 до концентрации 920 мг/л также предшествовало резкому ухудшению клинического состояния животного, которое постепенно ухудшалось, несмотря на некоторое снижение СРБ до 470, 420, а перед самой гибелью определялось на уровне 30 мг/л. Что касается обезьяны 37221, то у нее после 3-го введения ДРЦ СРБ повысился до 1100 мг/л, затем по мере лечения постепенно снижалось и достигло уровня 20 мг/л. Обезьяна выжила и

находится в удовлетворительном состоянии. Значение и роль цитокинов в диагностической практике описана в ряде работ [2.10].

Следует отметить, что использование кондиционной среды (КС) от МСК , для лечения глубоких некрозов , вызванных ДРЦ, приводило к хорошему терапевтическому эффекту, раны очищались, появлялись грануляции и через 10 дней использования КС кожные поражения исчезали. Лечебный эффект КС связан , скорее всего, с набором цитокинов и ростовых факторов, содержащихся в КС, как это уже было описано [5]

Интересные факты были выявлены с концентрацией СРБ и провоспалительным цитокином ИЛ-6. Известно, что СРБ – неспецифический показатель острой фазы, основным стимулятором его синтеза в печени являются провоспалительные цитокины. В нашем случае была отмечена четкая корреляция между клиническим статусом обезьян и концентрацией СРБ и ИЛ-6. Высокий уровень последних предшествовал гибели животных. Так, у обезьяны 37260 за сутки до гибели СРБ определялся на уровне 1050 (при норме 0 – 8 мг/л), а ИЛ-6 - >300 (при норме 0-10 пг/мл). Та же картина имела место у обезьяны 37905, у которой за 27 дней до гибели определялось содержание СРБ на уровне 920 мг/л, а ИЛ-6 – 230 пг/мл. Затем у этой обезьяны стало уменьшаться содержание СРБ, и перед гибелью концентрация СРБ определялась на уровне 30 мг/л и содержание ИЛ-6 уменьшилось до 125 пг/мл. Что касается выжившей обезьяны 37221, то у неё в те же сроки, что и у перовых двух , СРБ содержался на уровне 1100 мг/л, а ИЛ-6 - > 300. К моменту полного выздоровления эти показатели у обезьяны пришли к норме. Ни в одной из точек обследования не было выявлено увеличение уровней ИЛ-1 и ФНО-α. (Таблица №1) . Известно также существование корреляции между повышенным содержанием СРБ и ускорением СОЭ [3].

В нашем эксперименте установлено, что показатели гематологического анализа у всех 3-х обезьян исходно не выходили за рамки нормативных (Таблица №1). Существенных изменений красной крови у обезьян не наблюдалось в течение всего периода наблюдения. Однако, наиболее выраженные изменениия определялись у обезьяны 37260 после 3-го введения ДРЦ, проведенного без участия МСК. Так, у животного определялась лейкопения тромбоцитопения, нейтропения и лимфоцитоз.У двух обезьян отмечалось значительное ускорение СОЭ (37221 – 11 мм/ч и 37905 – 24 мм/ч при 1-3 мм/ч у клинически здоровых обезьян) незадолго до гибели. Т.о. 3 показателя: СРБ, ИЛ-6 и СОЭ являются прогностическими при оценке токсического действия ДРЦ.

Что касается биохимических показателей сыворотки крови, взятой в динамике, то у двух обезьян (37905 и 37221) значительно возросли показатели щелочной фосфатазы , причем у обезьяны 37905 этот показатель определялся на уровне 1629-1757 Е/л, что в 13-14 раз выше нормативных показателей, а у животного 37221 этот показатель превышал норму лишь в 2-4 раза [3]. Определялись выскакивающие величины и по другим показателям (АсАТ, мочевина, глюкоза), но они не носили регулярного характера и скорее всего были связаны и с нервно-психическим состоянием животного и с характером кормления.

Белковый обмен у обезьян на пике проявлений интоксикации существенно страдает. Показатели общего белка и альбуминов снижены значительно, особенно перед гибелью у всех обезьян. К моменту уменьшения признаков интоксикации у обезьяны 37211- показатели белкового обмена стали выправляться, доходя до нормативных показателей. Углеводный обмен не страдает, хотя и имеются единичные случаи повышения содержания глюкозы. Показатели липидного обмена у всех обезьян остаются в пределах референтных значений. Что касается мочевины и креатинина, то уровень их в некоторых случаях незначительно выходит за рамки нормативных. Один из показателей пигментного обмена (билирубин общий) в 3 точках обследования снижен только у обезьяны 37211. Увеличение активности щелочной фосфатазы также связано со степенью проявления интоксикации. На примере обезьяны 37211 видно, что при клиническом улучшении состояния животного активность этого фермента снижается. Т.о. при высокой степени интоксикации животных, связанной с введением ДРЦ, в конечном итоге более всего страдает белковый обмен.

Что касается картины крови, то первые два введения доксорубицина с последующей трансплантацией МСК, не приводили к заметным нарушениям гематологических показателей. Существенные нарушения картины крови определялись у всех животных только поле 3-го введения препарата в дозе значительно превышающей первые две. Уже через 2 дня после введения доксорубицина у всех трех животных наблюдается сходная картина: резкое падение содержания тромбоцитов, выраженная лейкопения, нейтропения и значительный лимфоцитоз. Картину крови стала улучшаться после трансплантация МСК обезьяне 37221, у которой гематологические показатели постепенно возвратились к исходным нормальным значениям (Таблица №2).

Исследование крови обезьян на проточном цитофлюориметре четко выявило повреждающее действие ДРЦ на В-клетки, которые уже через несколько минут после введения препарата не определялись вовсе.

Т.о. после введения высоких доз доксорубицина происходит резкое падение содержания тромбоцитов, лейкопения, нейтропения, лимфоцитоз

Эффект от действия ДРЦ на В-лимфоциты (CD20+) обезьян аналогичен действию этого препарата на людей, что и используется в клинической практике для лечения больных с В клеточной лейкемией [4,9]. Если исходно содержание В-лимфоцитов у обезьян определялось на уровне 18-21 %, то уже через 72 часа после введения ДРЦ оно падало до 0,67-1,51 %. Эти исследования еще раз подтверждают адекватность использованной нами модели .

Заключение

При введение доксорубицина обезьянам вида макака резус (Масаса Mulatta) наблюдается клиническая картина сходная с таковой у людей, что подтверждает адекватность используемой нами модели. Клиническая картина интоксикации у обезьян сопровождается изменениями со стороны картины крови: тромбоцитопенией, лейкопенией, нейтропенией, лимфоцитозом, резким падением числа CD20+ клеток. У обезьян, получивших Доксорубицин, на пике интоксикации изменяется белковый обмен: значительно уменьшается содержание в крови общего белка и альбуминов, существенно увеличи вается активность щелочной фосфатазы. Резко повышается уровень СРБ, сопровождающийся увеличением концентрации цитокина ИЛ-6, при отсутствии признаков изменения других провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и ФНО-альфа. Трансплантация МСК полностью сохраняет нормальный клинический статус обезьян после введения им больших доз Доксорубицина. Поздняя трансплантация МСК не предохраняла животных от повреждающего действия Доксорубицина. Защитный эффект МСК по результатам наших исследований зависит от дозы вводимого препарата, суммарного количества МСК и времени их трансплантации.

Выводы: 1) СРБ, ИЛ-6, СОЭ – являются прогностическими показателями при оценке токсического действия ДРЦ.2) При высокой степени интоксикации животных, связанной с введением ДРЦ, более всего страдает белковый обмен; 3) Клиническая картина интоксикации у обезьян сопровождается изменениями со стороны картины крови: тромбоцитопенией, лейкопенией, нейтропенией, лимфоцитозом, резким падением числа CD20+ клеток.4) МСК обладают свойством значительно уменьшать повреждение органов, вызываемых введением ДРЦ.

Таблица №1

Содержание С-реактивного белка и цитокинов у обезьян в эксперименте.

№ об.	Показа-тели	Норма	Точки забора биоматериала													Результат
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
37260	СРБ	0-8 мг/л	4,4	3,5	3,0	7,0	3,8	150	30	1050	Гибель 2.10.15 на 9 день					
	ИЛ-1	0-11 пг/мл	4,0	2,0	4,0	4,0	0	0	0	12,0						
	ИЛ-6	0-10 пг/мл	0	1,5	1,0	1,0	0,5	5,6		›300						
	ФНО-α	0-6 пг/мл	0	0	0	0	0	1,0		0						
37221	СРБ	0-8 мг/л	9,1	9,1	3,7	4,3	4,2	370	140	1100	990	390	370	20,0	10,0	Выздоровление
	ИЛ-1	0-11 пг/мл	5,0	0,5	3,5	1,0	0	2,0	0	10,0	0	0	0		0	
	ИЛ-6	0-10 пг/мл	0	1,0	1,0	0	0	50,0		›300			17,0		0	
	ФНО-α	0-6 пг/мл	0	0	0	0	0,5	2,0		0			0		0	
37905	СРБ	0-8 мг/л	5,1	11	12	15	7,1	1200	50	920	470	420	30	Гибель 27.10.15		
	ИЛ-1	0-11 пг/мл	1,5	1,0	5,0	1,0	1,0	0	0	0	2,0	2,0				
	ИЛ-6	0-10 пг/мл	0	12,0	1,5	6,0	1,0	200,0		230,0			125,0			
	ФНО-α	0-6 пг/мл	0	0	0	0	0	0		0			2,0			

Обозначения: 1- исходные, 1 введение ДРЦ; 2- через 72 часа после введения ДРЦ и 1 введение МСК; 3- через 1 месяц после 1 введения ДРЦ; 4- второе введение ДРЦ; 5,7, 9, 10, 11, 12, 13 – плановое обследование; 6- через 24 часа после III введения ДРЦ; 8- введение МСК

Список литературы

1. Агрба В.З., Лапин Б.А., Порханов В.А., Коноплянников А.Г., Кальсина С.Ш., Карал-оглы Д.Д., Агумава А.А., Леонтюк А.В., Игнатова И.Е. Культуры мезенхимальных стволовых клеток лабораторных приматов и перспективы их использования в экспериментальной медицине. // В сб. статей «Стволовые клетки и регенеративная медицина». Под ред. В.А. Ткачука. М: Макс-Пресс, 2012. С. 23 – 29.

1а. Агрба В.З., Порханов В.А., Коноплянников А.Г., Кальсина С.Ш., Карал-оглы Д.Д., Игнатова И.Е., Гвоздик Т.Е., Агумава А.А., Леонтюк А.В., Лапин Б.А. Возможные аспекты использования культур стволовых клеток лабораторных приматов в экспериментальной медицине.//Клеточные технологии в биологии и медицине. 2012. №3.С.139-142

2. Демьянов А.В., А.Ю.Котов, А.С.Симбирцев. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике. //Цитокины и воспаление. 2003. Т.2.№3.С.20-35

3. Долгов В., Морозова В., Марцишевская Р., Мадрала ВА., Якубовский З., Кабата И., Калиновский Л., Щеканьская – Конкель М., Ангельский С. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей . Москва. 1995,. 215 С..

4. Иванов А.А. Перспективы применения стволовых клеток в медицине.// В кн.: Биология стволовых клеток и клеточных технологий. Под ред. М.А. Пальцева. Том I. – Москва: «Медицина», «Шико», 2009, С. 31 – 43

5. Коноплянников А.Г., Филимонова М.В., Коноплянников М.А., Чеснакова Е.А., Корнеева Т.С., Самсонова А.С., Кальсина С.Ш., Лепехина Л.А., Попучиев В.В. Лечебный эффект мезенхимальных стволовых клеток и комплексов на основе кондиционной среды и детонационных наноалмазов при кардиомиодистрофии у крыс. // II Национальный конгресс по регенеративной медицине. Москва, 3 – 5 декабря 2015. – С. 82.

6. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии. М.1987.188С

7. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Шевцова З.В., Стасилевич З.К. Моделирование инфекционных заболеваний человека на лабораторных приматах. Сочи, 2011, 225 С.

8. Маклакова И.Ю., Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П. Влияние экстремальных факторов на хоуминг мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2015.,№4, С.82-86

9. Романов Ю.А., Смирнов В.Н. Мезенхимальные стволовые клетки: биология и перспективы клинического применения.//В кн.: Биология стволовых клеток и клеточные технологии. М.: «Медицина», «Шико».2009,С.193-205
10. Симбирцев А.С.. Цитокины: классификация и биологические функции.// Цитокины и воспаление. 2004.Т.3.№2,С.16-22.
11. Agrba V.Z., Porkhanov V.A., Konoplyannykov A.G., Kal'sina S.Sh., Karal-ogly D.D., Ignatova I.E., Gvozdik T.E., Agumava A.A., Leontiuk A.V., Lapin B.A. Possible aspects of using cultured stem cell of laboratory primates in experimental medicine. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2012, 154 (1). P. 133 – 135.
12. Cruet-Hennequart S., Prendergast M., Shaw G., Barry F/P., Carty M.P. Doxorubicin induces the DNA damage response in cultured human mesenchymal stem cells .// International Journal of Hematology. 2012, 96 (5). P. 649 – 656
13. Dominici M., Le Blank K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent masenchymal stromal cells. The International Society for cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006. v.8. №4. P.315-317

ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА МИОКАРДА МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНОЙ, ТКАНЕВОЙ И ОРГАННОЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ И ПРИМАТАХ

Петрова Е.С.[*], Агрба В.З.[**], Карал-оглы Д.Д.[**], Русия А.Г.[*], Тямбина А.С.[*], Лубяко А.А.[*]

[*]Научно-исследовательский центр курортологии и реабилитации Филиал ФГБУ «Северокавказский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства в г.Сочи», г. Сочи, Россия

[**]ФГБНУ Научно-исследовательский институт медицинской приматологии ФАН России, г. Сочи, Россия

Резюме

Ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, недостаточность кровообращения занимают одно из лидирующих мест среди заболеваний, сопровождающихся высокой летальностью. Причин возникновения этих заболеваний очень много, но их объединяет общность патогенетического

начала, детерминированного дефицитом потребления миокардом кислорода, энергетических субстратов, что инициирует целый спектр патологических процессов. Современная наука знает множество способов, направленных на компенсацию возникающего дефицита энергии, но их всё-равно недостаточно.

В этой связи, целью исследования явилась оценка эффективности противоишемической защиты миокарда одним из способов клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии - введением биологически активных веществ ксеногенного происхождения, тропных миокарду реципиента.

Исследование выполнено на 183-х изолированных по *Langendorf* сердцах крыс (время тепловой ишемии 4 сек) в условиях тотальной гипотермической ишемии (+18°С). В процессе естественного умирания регистрировали тонус сердца в изометрическом режиме, ориентируясь на время начала формирования ишемической контрактуры и её окончания. Время начала формирования контрактуры, связанное с появлением в саркоплазме свободных ионов Ca^{++}, расценивали как первый признак дефицита энергии (фаза обратимости функции). Время завершения формирования контрактуры, характерное для stone hart, свидетельствовало о необратимости функциональных нарушений.

В качестве модели физической и психоэмоциональной нагрузки использовали методику вынужденного плаванья животных в течение 30-40 минут.

Купание в пресной воде пролонгировало время начала формирования ишемической контрактуры на 20 минут ($p<0,05$), хотя ускоряло её завершение ($p>0,05$). Этот эффект можно трактовать тренинговым к повышенной физической и психоэмоциональной нагрузке.

Предварительная ингаляция биологически активных веществ в комбинации с купанием на 40 минут пролонгировало период изотонического плато ($p<0,01$), завершая процесс формирования stone hart на 30 минут позже ($p<0,03$), что может быть охарактеризовано ярко выраженным протекторным действием биологически активных веществ ксеногенного происхождения, тропных органу-мишени (миокарду), что нашло своё подтверждение в экспериментах на приматах (5 Макак-Резус) при моделировании острого трансмурального инфаркта миокарда.

В острый период животным внутривенно вводили инкрет ксеногенного сердца (содержание биологически активных веществ $5,0 \cdot 10^{-5}$ мг), что вызвало немедленную реакцию, нивелирующую острую ишемию миокарда. Данные ЭКГ были подтверждены снижением КФК МВ фракции, общей КФК и

нормализацией содержания К в плазме крови при биохимическом исследовании.

ANTI-ISCHEMIC MYOCARDIAL PROTECTION USING IMPROVED METHODS OF CELLULAR, TISSUE AND ORGAN REHABILITATION THERAPY IN EXPERIMENTS ON SMALL LABORATORY ANIMALS AND PRIMATES

Petrova E.S., Agrba V.Z.**, Karal-ogly D.D.**, Rusiya A.G.*, Tyambina A.S.*, Lubyako A.A**

**Research Center of balneology and rehabilitation, Branch of FSBI "North Caucasian State Research Clinical Center of the Federal Medical-Biological Agency", Sochi, Russia*

***FSBSI "Research Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia*

Abstract

Coronary heart disease, myocardial infarction, circulatory failure occupies a leading position among the diseases associated with high mortality. The causes of these diseases are a lot, but they share a common pathogenic start which determines a deficit of myocardial oxygen consumption and energy substrates, initiating a variety of pathological processes. Modern science knows many ways intended to compensate for the emerging energy shortage, but it's still not enough.

In this context, the aim of the study was to evaluate the effectiveness of myocardial anti-ischemic protection by using one of the ways of cell, tissue and organ replacement therapy, namely, the administration of xenogeneic biologically active substances origin, tropic to recipient myocardium.

One hundred and eighty three isolated Langendorf rat hearts (heat ischemia time was 4 seconds, a total hypothermic ischemia conditions are +18°C) were used in study. Isometric mode of heart tone was recorded in the process of natural dying, focusing on time when the formation of ischemic contracture starts and its completion.

The start time of contracture formation associated with the free ions Ca++ appearance in the sarcoplasm, regarded as the first sign of the energy deficit (phase of function reversibility). Time of contracture completion, which characterizes stone hart, indicated the functional disorders irreversibility.

Forced 30-40 minutes swimming method was used as a model of physical and psycho-emotional loads. Swimming in fresh water delayed a time of the ischemic contracture formation beginning of 20 minutes ($p < 0,05$), although accelerated its completion ($p > 0,05$). This effect can be interpreted as an exercise adaptation to increased physical and psycho-emotional stress.

Preliminary inhalation of bioactive ingredients in combination with a swimming (40 minutes) prolonged isotonic plateau period ($p < 0,01$), completing the process of stone hart formation 30 minutes later ($p < 0,03$). It can speak in favor of a pronounced protective effect of xenogeneic biologically active substances, tropic to target organ (myocardium). This was confirmed by experiments on the primate model of acute transmural myocardial infarction (5 Rhesus macaques).

In the acute phase the animals were injected intravenously with xenogeneic heart hormones (the concentration of biologically active substances was $5,0 \times 10^{-5}$ mg), which caused an immediate reaction, smoothing acute myocardial ischemia. ECG data were confirmed by Creatine kinase activity reduction and plasma potassium concentration normalization.

Ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, недостаточность кровообращения занимают одно из лидирующих мест среди заболеваний, сопровождающихся высокой летальностью. Причин возникновения этих заболеваний очень много, но их объединяет общность патогенетического начала, детерминированного дефицитом потребления миокардом кислорода, энергетических субстратов, что инициирует целый спектр патологических процессов. Современная наука знает множество способов, направленных на компенсацию возникающего дефицита энергии, но их всё-равно недостаточно.

В этой связи, целью исследования явилась оценка эффективности противоишемической защиты миокарда одним из способов клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии - введением биологически активных веществ ксеногенного происхождения, тропных миокарду реципиента.

Исследование выполнено на 183-х изолированных по *Langendorf* сердцах крыс (время тепловой ишемии 4 сек) в условиях тотальной гипотермической ишемии (+18°C) [8, 9, 10]. В процессе естественного умирания регистрировали тонус сердца в изометрическом режиме, ориентируясь на время начала формирования ишемической контрактуры и её окончания. Время начала формирования контрактуры, связанное с появлением в саркоплазме свободных ионов Ca^{++}, расценивали как первый признак дефицита энергии (фаза обратимости функции). Время завершения формирования контрактуры, характерное для *stone hart*, свидетельствовало о необратимости функциональных нарушений [3, 4].

В качестве модели физической и психоэмоциональной нагрузки использовали методику вынужденного плаванья животных в течение 30-40 минут [1]. В качестве дополнительной нагрузки применяли сверхслабое ультразвуковое облучение изолированного сердца в течение 1 минуты. (10 мВт/см^3)

Острый трансмуральный инфаркт миокарда вызывали в эксперименте на приматах (*Macaca mulatta*) внутривенным введением препарата CBL0137 (инкурон) в объеме 5,0-8,0 мкг/кг массы тела [2].

Электрокардиографические исследования проводили в условиях лекарственного наркоза (ксила 0,1 мг/кг + золетил 0,05 мг/кг массы тела животного) на электрокардиографе Поли-Спектр - 8/ЕХ на 1, 3, 8, 15 и 42 день. Содержание биохимических показателей (АЛТ, АСТ, КФК, КФК - МВ, К+) в сыворотке крови определяли на 1, 3, 8, 15 и 42 день.

С целью купирования процесса на этапе констатации острого инфаркта миокарда или грубых ишемических повреждений, животным внутривенно водили 5,0 мл нативного раствора БАВ (*ad mass* 5,0·10^{-5} мг). Одному животному (№ 37407) внутривенно вводили мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в количестве 2·10^6 клеток, которые получали последовательным культивированием и БАВ в количестве 5,0·10^{-5} мг. Всего в исследованиях приняли участие 5 приматов.

Противоишемическая резистентность миокарда сердец крыс, прошедших курс повышенной физической и психоэмоциональной нагрузки плаванием.

Динамика напряжения покоя и сократительной активности миокарда в данной группе экспериментов на первом этапе мало отличалась от контрольной (рисунок 1).

Также как в контрольной серии опытов, в течение первых 10 минут после прекращения перфузии, сердце продолжало сокращаться. Сила и частота сокращений постепенно падали, а напряжение покоя в динамике сопровождалось снижением до значений, близких к базальным.

Начиная с 10-ой до 20-ой минуты показатель напряжения покоя «выходил» на уровень базального, но сохранялся в таком состоянии не до 30-40 минут, как в контрольной группе, а до 50-60 минут ($p<0,05$). Начиная с этого времени, напряжение покоя начинало сначала плавно, а затем (с 80-ой минуты), более резко расти и выходило на плато к 110-120 минуте.

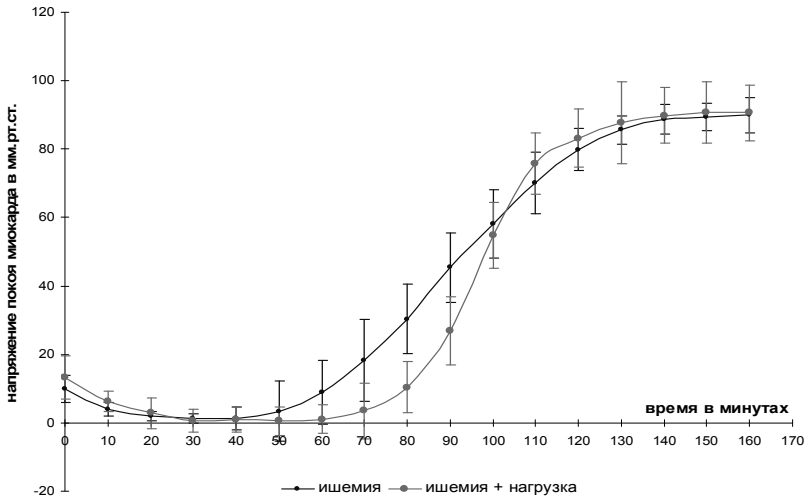


Рисунок 1 - Напряжение покоя миокарда в период гипотермической ишемии +17°С у животных, предварительно прошедших курс физической и психологической нагрузки купанием в пресной воде

На основании полученных результатов сделан вывод: физическая и психоэмоциональная нагрузка позволяют пролонгировать время наступления необратимых ишемических нарушений и может быть охарактеризована как фактор тренинга. При этом, суммарные функциональные возможности сердца (его резерв) практически остались неизменными, поскольку время формирования устойчивой ишемической контрактуры практически не отличалось от контрольного ($p>0,05$).

Противоишемическая резистентность миокарда сердец крыс, предварительно прошедших курс повышенной физической и психоэмоциональной нагрузки плаванием и получивших однократную ингаляцию БАВ ксеногенной природы

Динамика напряжения покоя и сократительной активности миокарда в данной группе экспериментов на первом этапе мало отличалась от остальных. Также как в предыдущих сериях, первые 10 минут гипотермической ишемии сопровождались затухающими сердечными сокращениями, а показатель динамики напряжения покоя снижался до значений, близких к базальным к 20-ти минутам эксперимента (рисунок 2).

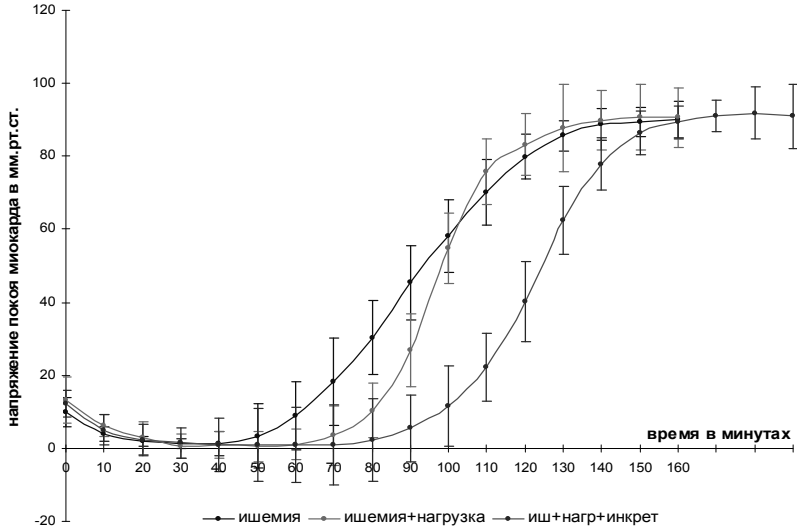


Рисунок 2 - Напряжение покоя миокарда в период гипотермической ишемии +17°С у животных, предварительно прошедших курс физической и психологической нагрузки купанием в пресной воде, получивших однократную ингаляцию БАВ животного происхождения

Вместе с тем, период изотонического плато был пролонгирован до 80-90 минут ($p<0,001$ по отношению к 1-ой группе и $p<0,01$ по отношению ко 2-ой контрольной группе (ишемия + нагрузка плаваньем). Более того, начиная с этого времени, напряжение покоя, хотя и начинало нарастать, но выходило на плато ишемической контрактуры только к 150-160 минуте ($p<0,001$). Таким образом, введение БАВ обеспечивает выраженное противоишемическое действие (на 30 минут) даже в сочетании с нагрузкой. Это позволяет сделать вывод, что однократная ингаляция БАВ в дозе $1,79 \cdot 10^{-5}$ мг позволяет увеличить противоишемическую резистентность миокарда за счёт его внутренних резервов, поскольку иных внешних источников энергии изолированное и неперфузируемое сердце не имеет.

Противоишемическая резистентность миокарда сердец крыс, предварительно прошедших курс повышенной физической и психоэмоциональной нагрузки плаванием и получивших однократную ингаляцию БАВ ксеногенной природы в комбинации с действием сверхслабого ультразвукового облучения (УВЧ)

Добавив к факторам действия слабое излучение УВЧ, мы столкнулись со сложной реакцией миокарда, хотя воздействие было кратким (1 минута). И хотя характеристика напряжения покоя миокарда в данной группе экспериментов мало отличалась от предыдущей, динамика сократительной активности таких сердец была принципиально иной.

Достоверно установлено (с абсолютной повторяемостью результата), что на фоне типичной кривой напряжения покоя и постепенного расслабления миокарда к 10-20 минутам с последующим изотоническим плато (50-60 минут), завершающимся формированием ишемической контрактуры к 140-150 минутам (рисунок 3), сердца сокращались до момента естественной смерти (до момента *stone heart*).

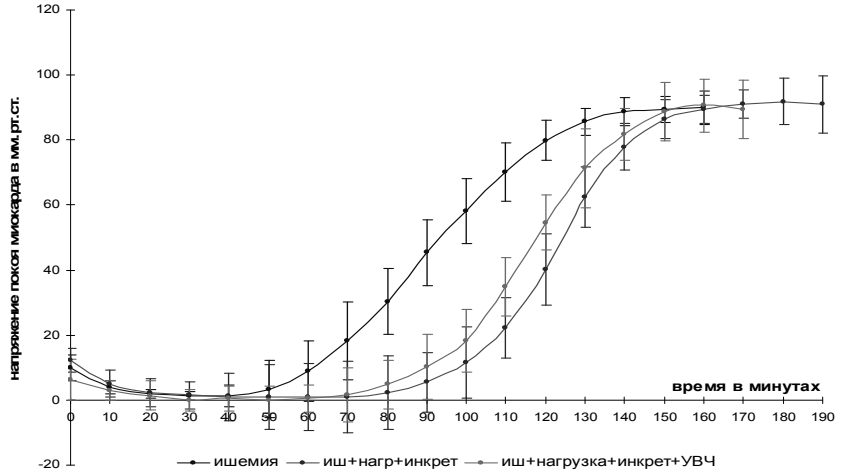


Рисунок 3 - Напряжение покоя миокарда в период гипотермической ишемии +17°С у животных, получивших нагрузку купанием в пресной воде, прошедших ингаляцию БАВ, сердца которых были подвергнуты действию ультразвука (1 Вт/см^2) в течение 1 минуты

Полученные таким образом результаты, заставили включить в план работы дополнительное исследование, предусматривающее комбинацию действия УВЧ с действием тотальной ишемии.

Противоишемическая резистентность миокарда сердец крыс, предварительно получивших сверхслабое ультразвуковое облучение

Устранив таким образом все дополнительные факторы действия (нагрузка плаваньем, ингаляция БАВ), было установлено, что эффект

сохранения сократительной активности сердец, подвергнутых облучению УВЧ, повторился во всех случаях. Все сердца, сохраняя типичную динамику изометрического напряжения покоя, практически не отличались от таковой в группе животных, подвергнутых действию только ишемии (первая контрольная группа), но также, как в группе с УВЧ и плаваньем продолжали сокращаться до момента естественного умирания. (рисунок 4).

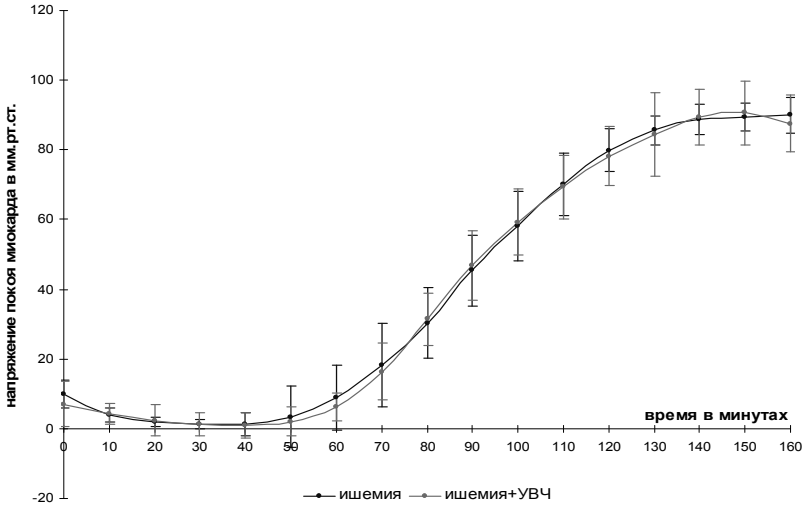


Рисунок 4 - Напряжение покоя миокарда в период гипотермической ишемии +17°С под действием УВЧ (1 Вт/см^2) в течение 1 минуты

Это дало основание сделать вывод, что слабые или сверхслабые физические воздействия УВЧ на ишемический миокард так изменяют его энергетический метаболизм, что сердца способны сохранять свою электрическую и механическую активность в течение всего периода естественного умирания. Безусловно, этот феномен требует специального и более углублённого изучения, хотя уже теперь можно с уверенностью констатировать, что резервные возможности кардиомиоцитов и миокарда в целом во много раз превышают размерность наших представлений о них. И коль скоро одноминутное воздействие УВЧ мощностью не более 10 мВт/см^3, позволило получить столь наглядный, хотя и труднообъяснимый пока результат, можно надеяться, что комбинация факторов действия различной природы может оказаться эффективным средством противоишемической защиты миокарда.

Ещё более интересным видится то, что действие УВЧ, имея чёткую мишень (изолированное сердце), может стать важным фактором не только для углублённого изучения генеза всех без исключения способов клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии, зарекомендовавших себя с самой благоприятной стороны [7, 11-13], но и для выбора наиболее эффективных комбинаций факторов и средств противоишемического действия.

Не менее важным видится и то, что комбинация испытанных в настоящей работе факторов действия, не позволяет объединить те из их, механизм которых, так или иначе сопряжён с лавинообразным выходом ионов Ca^{2+} в саркоплазму, увеличивающим скорость формирования ишемической контрактуры. При этом, можно считать достоверно установленным, что негативные последствия от действия различных внутренних и/или внешних факторов действия могут быть компенсированы предварительным введением БАВ, в механизм которых заложен принцип активизации скорости ресинтеза АТФ и рационализация её (АТФ) расходования [43-46]. Это видится чрезвычайно важным при формировании общих и индивидуальных программ реабилитации резервных возможностей организма, особенно, если они предполагают сочетанное действие нескольких факторов.

Кардиопротекторное действие БАВ ксеногенной природы в модели острого трансмурального инфаркта миокарда приматов

Пример 1. Внутривенное введение БАВ (пациент 37517).

1 день (до введения БАВ). Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 107/мин. Вертикальное положение электрической оси сердца. Синусовая аритмия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой задней ветви пучка Гисса. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда (в 1 отведении депрессия сегмента ST + 4 мм, амплитуда зубца Т 7 мм; во 2 отведении депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 13 мм). В момент внутривенного введения БАВ признаки острой ишемии миокарда («кошачья спинка») пропадали «на игле».

1 день (после введения БАВ). Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 100/мин. Вертикальное положение электрической оси сердца. Дыхательная аритмия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой задней ветви пучка Гисса. Уменьшение зоны повреждения, т.к. сегмент ST приближается к изолинии (в 1 отведении депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 5 мм; во 2 отведении депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 13 мм).

3 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 139/мин. Вертикальное

положение электрической оси сердца. Дыхательная аритмия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой задней ветви пучка Гисса. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда. Увеличение глубины зоны ишемии (в 1 отведении депрессия сегмента ST + 4 мм амплитуда зубца Т 7 мм; во 2 отведении депрессия сегмента ST + 5 мм, амплитуда зубца Т 10 мм).

8 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 135/мин. Вертикальное положение электрической оси сердца. Дыхательная аритмия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой задней ветви пучка Гисса. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда. Увеличение глубины зоны ишемии (в 1 отведении депрессия сегмента ST + 4 мм, амплитуда зубца Т 7 мм; во 2 отведении депрессия сегмента ST + 5 мм, амплитуда зубца Т 10 мм).

15 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 103/мин. Вертикальное положение электрической оси сердца. Дыхательная аритмия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой задней ветви пучка Гисса. Сохраняется острая стадия ишемии. Уменьшение величины зоны повреждения, т.к приближается сегмент ST к изолинии (в 1 отведении депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 4 мм; во 2 отведении депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 10 мм).

42 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 65/мин. Вертикальное положение электрической оси сердца. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой задней ветви пучка Гисса. Сохраняется острая стадия ишемии. Сохранение ишемического повреждения, без изменений, депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 12 мм.

Заключение: внутривенное введение БАВ в дозе $5 \cdot 10^{-5}$ мг вызывает немедленную реакцию, снижающую степень ишемического повреждения миокарда. Эффект носит больше кратковременный характер, что можно связать с избранной моделью химической агрессии на миокард (избыточная нагрузка на печень подтверждена динамическим нарастанием АЛТ и АСТ в ~10 раз), хотя общую тенденцию можно назвать неустойчиво положительной на фоне нормализации содержания K^+ в сыворотке крови (снижение в ~2 раза).

Пример 2. Внутривенное введение БАВ (пациент 37011).

1 день (до введения БАВ). Ритм синусовый, правильный, ЧСС 166/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда (амплитуда зубца Т 8 мм). В момент внутривенного введения БАВ признаки

инфаркта миокарда («кошачья спинка») пропадали «на игле».

1 день (после введения БАВ). Ритм синусовый, правильный, ЧСС 150/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда (депрессия сегмента ST + 2 мм амплитуда зубца Т 8 мм). Разница до введения инкрета и после отсутствует.

3 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 125/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Увеличение зоны ишемического повреждения миокарда (увеличение амплитуды зубца Т, депрессия сегмента ST + 2 мм).

8 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 139/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Сохранение ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 7 мм).

15 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 150/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Сохранение ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 6 мм).

42 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 166/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Сохранение ишемического повреждения миокарда, без изменений (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 6 мм).

42 день. Без наркоза. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 244/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Желудочковая тахикардия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Увеличение ишемического повреждения миокарда, в сравнении с наркозом (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 16 мм).

Заключение: внутривенное введение БАВ в дозе $5 \cdot 10^{-5}$ мг вызывает немедленную реакцию, снижающую степень ишемического повреждения миокарда. Эффект носит кратковременный характер, что можно связать с избранной моделью химической агрессии на миокард (избыточная нагрузка на печень подтверждена динамическим нарастанием АЛТ и высокими цифрами АСТ). Общую тенденцию можно назвать слабо положительной,

подтверждённой только снижением КФК - МВ фракции в ~2 раза, общей КФК в ~10 раз и нормализацией содержания K^+ в сыворотке крови (снижение в ~2 раза).

Пример 3. Внутривенное введение БАВ (пациент 36973).

1 день (до введения БАВ). Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 75/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая аритмия. Гипертрофия правого предсердия. Полная блокада правой ножки пучка Гисса. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда (депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 9 мм). В момент внутривенного введения БАВ признаки инфаркта миокарда («кошачья спинка») пропадали «на игле».

3 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 88/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая аритмия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Уменьшение ишемического повреждения миокарда (снижение депрессии сегмента ST + 2 мм, снижение амплитуды зубца Т 5 мм).

8 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 96/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая аритмия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Ишемического повреждение миокарда без изменений (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 5 мм).

15 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 60/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Исчезновение перегрузки предсердий. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Уменьшение ишемического повреждения миокарда (снижение депрессии сегмента ST + 1 мм, амплитуда зубца Т 5 мм).

42 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 70/мин. Нормальное положение электрической оси сердца. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Ишемического повреждение миокарда без изменений (депрессия сегмента ST + 1 мм, амплитуда зубца Т 6 мм).

Заключение: внутривенное введение БАВ в дозе $5 \cdot 10^{-5}$ мг вызывает немедленную реакцию, снижающую степень ишемического повреждения миокарда. Эффект носит выраженный характер, что можно, скорее всего, объяснить не столь ярко выраженным действием CBL0137 при моделировании острой ишемии миокарда и, быть может, большей устойчивостью данного животного к его действию (нормальные значения АЛТ, динамическое снижение АСТ до нормальных значений). Общую тенденцию можно назвать положительной, подтверждённой не только

данными ЭКГ, но и снижением КФК - МВ фракции в ~2 раза, общей КФК в ~4 раза и нормализацией содержания К+ в сыворотке крови.

Пример 4. Внутривенное введение плацебо (5,0 мл. физиологического раствора), контроль, пациент – 37012.

1 день (до физиологического раствора). Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 120/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая аритмия. Полная блокада правой ножки пучка Гисса. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда (депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 7 мм).

После введения физиологического раствора: ритм синусовый, неправильный, ЧСС 100/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая аритмия. Полная блокада правой ножки пучка Гисса. Уменьшение ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 1,5 мм, амплитуда зубца Т 6 мм).

3 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 150/мин. Нормальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Полная блокада правой ножки пучка Гисса. Уменьшение глубины ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 1 мм, амплитуда зубца Т 5 мм).

8 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 125/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая аритмия. Полная блокада правой ножки пучка Гисса. Уменьшение ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 1 мм, амплитуда зубца Т 4 мм).

42 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 136/мин. Вертикальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Полная блокада правой ножки пучка Гисса. Увеличение зоны ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 8 мм). Без наркоза. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 136/мин. Вертикальное положение электрической оси сердца. Желудочковая тахикардия. Полная блокада правой ножки пучка Гисса. Ишемическое повреждение миокарда в сравнении с наркозом без изменений (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 8 мм).

Заключение: внутривенное введение 5,0 мл. физиологического раствора не вызывал никаких реакций. Динамика ЭКГ не была устойчивой. Общую тенденцию в развитии ишемического повреждения миокарда нельзя охарактеризовать устойчивой не в положительную, не в отрицательную сторону. Первичное снижение КФК – МВ фракции и общей КФК в течение недели было незначительным, а их последующий прирост к концу второй недели наблюдения был резким на фоне нормальных цифр содержания K^+ в

плазме крови. Это может свидетельствовать о том, что избранная модель инфаркта миокарда не носила критический характер. Вместе с тем, высокие цифры АЛТ и АСТ, их постепенное нарастание позволяют утверждать, что избранный для моделирования препарат CBL0137 обладает высокой степенью цитотоксичности и, если его проявления на примере других животных не были столь ярко выражены, это можно объяснить протекторной составляющей использованных в эксперименте БАВ.

Пример 5. Внутривенное введение БАВ и МСК (пациент 37407).

1 день (до введения БАВ и МСК). Ритм синусовый, правильный, ЧСС 150/мин. Нормальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Перегрузка правого предсердия. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 5 мм). В момент внутривенного введения БАВ и МСК признаки инфаркта миокарда («кошачья спинка») пропадали «на игле».

1 день (после введения БАВ и МСК). Ритм синусовый, правильный, ЧСС 142/мин. Нормальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Значительное уменьшение перегрузки правого предсердия. Трансмуральное ишемическое повреждение миокарда (депрессия сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 6 мм).

3 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 125/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Гипертрофия правого предсердия. Блокада левой передней ветви пучка Гисса. Сохранение ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 6 мм).

8 день. Ритм синусовый, неправильный, ЧСС 103/мин. Горизонтальное положение электрической оси сердца. Синусовая аритмия. Углубление ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 3 мм, амплитуда зубца Т 9 мм).

15 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 157/мин. Нормальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Уменьшение ишемического повреждения миокарда (снижение депрессии сегмента ST + 2 мм, амплитуда зубца Т 5 мм).

42 день. Ритм синусовый, правильный, ЧСС 230/мин. Нормальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Уменьшение ишемического повреждения миокарда (депрессия сегмента ST + 1 мм, амплитуда зубца Т 4 мм). Без наркоза: ритм синусовый, правильный, ЧСС 230/мин. Нормальное положение электрической оси сердца. Синусовая тахикардия. Ишемическое повреждение миокарда без изменений в

сравнении с наркозом (депрессия сегмента ST + 1 мм, амплитуда зубца Т 3 мм).

Заключение: совместное внутривенное введение БАВ в дозе $5 \cdot 10^{-5}$ мг и МСК в количестве $2 \cdot 10^{6}$ клеток вызывает немедленную реакцию, но, скорее всего, на введение БАВ. Дальнейшая динамика демонстрирует неэффективный лечебный эффект БАВ и МСК. Он носит ярко выраженный кратковременный характер, обеспеченный, по нашему мнению, немедленным действием БАВ. При этом, избранная модель химического воздействия CBL0137 на миокард (динамическое нарастание АЛТ и высокие цифры АСТ). Общую тенденцию нельзя назвать положительной, т.к. стабильно высокие цифры КФК - МВ фракции подтверждают наличие острых ишемических нарушений миокарда. При этом, нормализация общей КФК и содержания K^{+} в плазме крови свидетельствуют, скорее всего о неспецифическом действии МСК. Следует особо отметить, что в данном случае совместное действие БАВ и МСК показало самый высокий гепатопротекторный эффект среди всех участников эксперимента - значения и динамика АЛТ и АСТ, хотя и были на предельных границах нормы, а иногда превышали их, тем не менее в своих средних значениях они были близки нормальным.

Эффект действия БАВ в дозе $5 \cdot 10^{-5}$ мг, полученного в результате изолированной экстракорпоральной перфузии ткани миокарда молодых поросят, можно охарактеризовать как положительный, обеспечивающий выраженную динамику уменьшения зоны и/или глубины ишемического поражения миокарда. Совместное же применение БАВ и МСК на данном этапе исследований не может быть рекомендовано к применению в качестве средства противоишемической защиты миокарда. Вместе с тем, БАВ и МСК обладают выраженным гепатопротекторным действием и, безусловно, требуют дальнейшего более внимательного изучения.

Следует особо подчеркнуть, что избранная модель острой трансмуральной ишемии миокарда (инфаркта миокарда) с использованием препарата CBL0137 не вполне адекватна, т.к. сопряжена с высокой и неизбирательной цитотоксичностью.

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. Межакадемическое издание ВПК, М, 2004, 607 с.
2. Костина Г. У рака не остается выхода // Эксперт.- 2013.- №8;
3. Лубяко А.А. Противоишемическая защита миокарда кардиоплегическими растворами / Дис. ... канд.биол.наук. М. 1986г., 189 с.;

4. Лубяко А.А. Механизмы формирования и принципы диагностики противоишемической резистентности миокарда / Дис. ... докт. биол. наук, М.: 1994, 487 с.;
5. Лубяко А.А. Органотерапия и органосберегающие технологии / В журн. Технологии живых систем, Том 6, № 4, 2009 г., с. 30-41;
6. Butler J., Parker D., Pillai R.,Westaby S. et al. Effect of cardiopulmonary bypass on systemic release of neutrophil elastase and tumor necrosis factor / J. Thorac. Cardiovasc. Surg. - 1993. - 105(1). p.25-30;
7. Khatib S.Y., Lab M.J. A modified Langendorf preperation for changing left ventricular loading conditions / In: J. Physiology, (Gr> Brit.), 1982, 324, P8-P9;
8. Langendorf O. Uber den Einfluss von Warme und Kalte auf das Herz der warmblutigen Tiere / In: Arch. f.d. ges. Physiol. d. Menschen u.d. Thiere, 1897, 66, p.355-400;
9. Langendorf O. Untersuchungen am uberlebeden Saugethirhirherzen / In: Pflugers Arch., 1895, 61, p.291-382;
10. Liu G.S., Thornton J., Van Winkle D.M. et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by Al adenosine receptors in rabbit heart / //Circulation. - 1991. - Vol. 84(1), p.350-356.;
11. Morse D.S., 1Adams D., Magnani B. Platelet and neutrophil activationduring cardiac surgical procedures : impact of cardiopulmonary bypass. -Ann. Thorac. Surg. - 1998. - V. 65, p.691-695;
12. Noora J, Lamy A, Kelly M. Smith L.R. The effects of membranes on blood: a comparison of two oxygenation in open heart surgery / Perfusion. 2003; 18, 313-320, p.315-421

ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ, ИММУННОГО СТАТУСА И ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАКА РЕЗУС (MACACA MULATTA) АДЛЕРСКОГО ПИТОМНИКА.

Карал-оглы Д.Д., Игнатова И.Е. , Деменкова Н.П., Мухаметзянова Е.И., Гварамия И.А., Агрба В.З.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (ФГБНУ «НИИ МП»), Россия, Сочи Адрес: Сочи-А, Веселое -1, ФГБНУ «НИИМП» Тел/факс.:8 (8622) 43-20-28

Резюме

Изучены показатели клеточного звена иммунитета, интерфероновый статус (ИФН-α , ИФН-γ, спонтанная продукция ИФН, циркулирующий в крови-сывороточный ИФН), определены провоспалительные цитокины, установлены гематологические показатели для клинически здоровых макак резус- обезьян, наиболее часто используемых в медико-биологических исследованиях. Показано, что нормы физиологических показателей, установленные на обезьянах, максимально приближены к таковым, установленным для человека.

В ходе работы были изучены показатели клеточного звена иммунитета, интерфероновый статус (ИФН-α , ИФН-γ, спонтанная продукция ИФН, циркулирующий в крови- сывороточный ИФН), определены провоспалительные цитокины, установлены гематологические показатели для клинически здоровых макак резус Адлерского питомника.

По результатам иммунного статуса следует, что экспрессия CD3,CD4 и CD 45RA у самцов незначительно выше, а экспрессия CD8 ниже, чем у самок. Установлено, что данные, полученные на макаках резус как для самцов, так и для самок, максимально приближены к границам нормы таковых у людей. Данные интерферонового статуса показали, что имеет место вариабельность в продукции некоторых интерферонов между самцами и самками обезьян, однако эти показатели лежат в пределах нижних границ референтных величин, установленных для людей. В задачи данной работы входило также определение уровня некоторых провоспалительных цитокинов клинически здоровых макак резус для установления их нормативных значений. Было показано, что содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови клинически здоровых половозрелых макак резус обоего пола максимально приближено к нормам для людей, приводимых в инструкциях к наборам реагентов. Колебания значений С-реактивного белка от 0,4 до 9,6 мг/мл можно объяснить вариабельностью многих показателей у обезьян.

Установлено, что данные, полученные на макаках резус как для самцов, так и для самок, максимально приближены к границам нормы таковых у людей. Показано, что физиологические показатели макак резус максимально приближены к аналогичным у людей, что подтверждает возможность использования обезьян этого вида как адекватной модели для воспроизведения и изучения различных патологических состояний человека, а также доклинических испытаний новых фармакологических препаратов.

THE EVALUATION OF RHESUS MONKEY (*MACACA MULATTA*) CYTOKINE PROFILE, IMMUNE STATUS, AND HEMATOLOGY IN THE ADLER MONKEY COLONY.

Karal-ogly DD, Ignatova IE , Demenkova NP, Mukhametzyanova EI, Gvaramia IA, Agrba VZ

Federal State Budgetary Research Scientific Institution "Research Institute of Medical Primatology" (FSBSI "RIMP"), Sochi, Russia

Abstract

The parameters of cellular immunity, interferon status (IFN-α, IFN-γ, spontaneous production of circulating IFNs in serum) were studied. The pro-inflammatory cytokine levels and hematology for clinically healthy rhesus monkeys of the Adler monkey colony were determined.

Immune status data showed that expression of CD3, CD4 and CD 45RA is slightly higher and CD8 expression is lower in males than in females. It was found that both males and females Macaca rhesus parameters are close to normal ones in humans. The interferon status results show that there is variability in the production of some interferons between male and female monkeys, but these values are within the lower limits of the human reference data. The aim of this study was also to determine the levels of some pro-inflammatory cytokines in clinically healthy rhesus monkeys to determine their norm values. It was shown that the serum levels of pro-inflammatory cytokines of clinically healthy adult male and female rhesus macaques are close to the norm human values (which were provided by reagent kit manufacture). Fluctuating values of C-reactive protein ranged from 0.4 to 9.6 mg / ml, may be explained by the variability of many other parameters in monkeys.

It was found that the data obtained for both males and females rhesus monkeys are very close to the normal limits of human values. It is shown that the rhesus monkeys physiological parameters are similar to human ones. It confirms the possibility of using this animal species as an adequate model for development and study various human pathologies and for preclinical trials of new pharmaceuticals.

Введение

Известно, что в силу анатомо-физиологического сходства с человеком, обезьяны являются незаменимой моделью для воспроизведения на них различных патологических и иммунопатологических состояний человека [10,11], а также для испытания вакцин и фармакопрепаратов. Обезьяны вида

макака (макаки резус, макаки яванские) являются наиболее удобными и востребованными в работе, широко используются в медико-биологических исследованиях. Для корректной оценки данных, полученных на обезьянах, необходимы точные сведения о функционировании их физиологических систем в норме. В литературе описаны сведения о функционировании кроветворной [9], эндокринной[3,4], иммунной [6,8] и интерфероновой [1,2,9] систем обезьян. Однако, отсутствуют суммарные данные, полученные в комплексе на одних и тех же обезьянах. Целью нашего исследования явилось изучение в комплексе кроветворной и иммунной систем макак резус Адлерского питомника. Все исследования на животных проводили в соответствии с требованиями комитета по биоэтике и федеральным законом РФ о защите животных от жестокого обращения (ст.4 Закона РФ о защите животных от жестокого обращения от 01 декабря 1999 г.).

Материалы и методы

Материалом для исследования служила цельная кровь, взятая в гепарин, а также сыворотка крови 30 макак резус обоего пола в возрасте от 3 до 5 лет.

В эксперименте были использованы следующие методы:

1. С целью изучения клеточного звена иммунитета кровь исследовалась методом, описанным ранее [6], на проточном цитометре Beckman Coulter EpicsXL-MCL(«Beckton Coulter», США) с аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Для постановки реакции использовали моноклональные антитела (фирма «BectonDickinson»),специфичные для антигенов обезьян, в следующих комбинациях:

CD3 – FITC/CD4-PE
CD3 – FITC/CD8-PE
CD3 – FITC/CD16-PE
CD3 –FITC/CD20-PE
CD3 –FITC/CD25-PE
CD3 –FITC/CD45RA
CD3 –FITC/HLA-DR

Цитограммы исследуемой клеточной взвеси выводили на основе регистрируемых параметров малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния.

2. Гематологический анализ крови обезьян проводили на гематологическом анализаторе фирмы «Beckman 5 diff»,USA.

3. Исследование функциональной активности лимфоцитов обезьян изучали биологическим методом [5] в нашей модификации [1,2,8] путем

определения способности лимфоцитов обезьян отвечать интерфероновой реакцией на адекватное воздействие.

4. Определение провоспалительных цитокинов проводили методом ИФА на приборе «УНИПЛАН» с использованием наборов ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ».

Результаты

Показатели клеточного звена иммунитета клинически здоровых обезьян варьировали в широких пределах.

В таблице 1 приведены показатели клеточного звена иммунитета 30 клинически здоровых макаков резус обоего пола в возрасте от 3 до 5 лет.

Таблица 1

Показатели различных субпопуляций лимфоцитов(%) клинически здоровых макаков резус

Вид	Возраст, лет	Пол	Кол-во животных	CD3	CD4	CD8	CD16	CD20	CD25	CD45 RA	HLA -DR
Человек*				67±9	45,5± 9,5	27±9	16±10	13,5± 5,5	2,5± 2,5	55±10	11±4
Обезьяна	3-5 лет	♂	16	63,5± 13,5	37±15	26,75± 9,25	12,75± 8,25	25,25± 13,25	1,85± 1,85	62,5± 17,5	23,45± 16,05
Обезьяна		♀	14	58,8± 18,8	27,85± 9,35	32,255± 16,05	13,45± 9,55	30,1± 17,1	Не опред.	56,45± 3,45	24,3± 7,8

*нормы для людей [12]

Оценивая полученные результаты, следует отметить, что экспрессия CD3,CD4 и CD45RA у самцов незначительно выше, а экспрессия CD8 ниже, чем у самок.

Установлено, что данные, полученные на макаках резус как для самцов, так и для самок, максимально приближены к границам нормы таковых у людей. Оценивая результаты иммунного статуса макак резус, следует отметить, что в сравнительном аспекте полученные результаты не изменялись в зависимости от антикоагулянта, но при использовании гепарина гистограммы получались более видоспецифичными[6].

Поскольку клинический анализ крови имеет важное значение при диагностике различных заболеваний, представляло интерес оценить гематологические показатели макак резус Адлерского питомника. В таблице 2 приведены данные гематологического анализа 30 макак резус обоего пола.

Таблица 2

Показатели гематологического анализа клинически здоровых макак резус

Показатель	Пределы значений		
	самцы	самки	человек
Эритроциты	4,9±0,7X10^{12}/л	4,95±0,55X10^{12}/л	5,25±1,25X10^{12}/л
Лейкоциты	15,3±6,7X10^{9}/л	13,8±6,2X10^{9}/л	9,75±5,25X10^{9}/л
Гемоглобин	140,5±4,5г/л	129±7г/л	130 ±30г/л
СОЭ	1,75±1,25мм/час	1,75±1,25мм/ч	10±5мм/ч
Палочкоядерные нейтрофилы	2±1%	2±1%	2,5±1,5%
Эозинофилы	1,5±1,5%	1,5±1,5%	3±2%
Сегментоядерные нейтрофилы	59±9%	59±9%	53,5±17,5%
Моноциты	2±2%	2±2%	7,5±4,5%
Лимфоциты	44±60%	44±6%	27,5±12,5%

Показано, что результаты гематологического анализа существенно не отличаются от таковых установленных для людей [5] и соответствуют данным, описанным ранее [9].

В таблице 3 приведены результаты определения интерферонового статуса обезьян.

Таблица 3

Интерфероновый статус клинически здоровых макаков резус (*Macaca mulatta*),n=30

Кол-во обезьян	Возраст, пол	Показатели интерферонового статуса, ЕД/мл			
		ИФН-α	ИФН-γ	ИФН-сп.	ИФН-S
13	3-5 лет,♂	192±64 Ед/мл	48±16 Ед/мл	2±2 Ед/мл	6±2 Ед/мл
17	3-5 лет,♀	128±0 Ед/мл	48±16 Ед/мл	6±2 Ед/мл	2±2 Ед/мл
Нормы для людей		288±224 Ед/мл	72±56 Ед/мл	5±3 Ед/мл	5±3 Ед/мл

Из таблицы 3 следует, что имеет место вариабельность в продукции некоторых интерферонов между самцами и самками обезьян, однако эти показатели лежат в пределах нормативных величин, установленных для людей. способность к продукции интерферонов у самцов и самок

практически одинакова, а показатели приближены к референтным значениям, установленным для людей.

Таблица 4

Определение провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β,ИЛ-6,ФНО-α) и С-реактивного белка у клинически здоровых макак резус

№№ обезьян	Пол	Результаты анализа			
		ИЛ-1 β *N-0-11пг/мл	ИЛ-6 N-0-10 пг/мл	ФНО-α N -0-6 пг/мл	СРБ N-0-6 мг/мл
36814	♂	0	0,5±0,5	1±1	1,1±1,1
36569	♂	0	3±3	0	0,4±0,4
38051	♂	0	0	0	3,25±3,25
37678	♂	0	1±1	0	1,65±1,65
37021	♂	0,9±0,9	0	0,9±0,9	1,95±1,95
37765	♂	0	0	1±1	2,35±2,35
36001	♂	1±1	0,25±0,25	0	4,8±4,8
36599	♂	0	0	1±1	1,8±1,8
37394	♂	0	2,8±2,8	0	3,85±3,85
36728	♂	5,5±5,5	3,5±3,5	0,5±0,5	0,8±0,8
37780	♂	1,25±1,25	3,5±3,5	0	4,45±4,45
37734	♂	0,5±0,5	3±3	0,75±0,75	1,1±1,1
35982	♂	0	0	0	0,95±0,95
37803	♀	2,6±2,6	6,5±6,5	0,25±0,25	0,4±0,4
36616	♀	2,75±2,75	3,5±3,5	0	1,7±1,7
36555	♀	0,5±0,5	3±3	0	1,1±1,1
37895	♀	0	0,45±0,45	0	5±5
37877	♀	0	0,4±0,4	0,4±0,4	1,65±165
37660	♀	0	0	0	5±5
36727	♀	0	0,55±0,55	0,4±0,4	5±5
37602	♀	0	0,45±0,45	0	0,35±0,35
38065	♀	0	0,45±0,45	0	4,85±4,85
36657	♀	0	3±3	0	5±5
37212	♀	0	0,5±0,5	0	4,3±4,3
37747	♀	2,5±2,5	0,45±0,45	0,4±0,4	0,15±0,15

*нормы приведены для людей

В настоящее время определение цитокинов достаточно широко используется в клинической практике, поскольку их количественное определение и соотношения между собой, как правило, отражают динамику патологического процесса, коррелируют с активностью заболевания и позволяют судить об эффективности проводимого лечения. Однако при этом необходимо четко знать «референтные» уровни цитокинов, свойственные здоровым животным. Среди многочисленного семейства цитокинов выделяют цитокины с провоспалительным действием, которые играют важную роль в развитии как врожденного, так и приобретенного иммунитета против различных инфекционных агентов[7]. В задачи данной работы входило также определение уровня некоторых провоспалительных цитокинов клинически здоровых макак резус для установления их нормативных значений. В таблице 4 представлены результаты определения провоспалительных цитокинов и С-реактивного белка14 самцов и 11 самок макак резус.

Из полученных результатов следует, что содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови клинически здоровых половозрелых макак резус обоего пола максимально приближено к нормам, установленным для людей. Колебания значений С-реактивного белка от 0,4 до 9,6 мг/мл можно объяснить вариабельностью многих показателей у обезьян.

Таким образом, в результате проведенных исследований были установлены гематологические показатели, изучены клеточное звено иммунитет, интерфероновый статус, определены провоспалительные цитокины клинически здоровых макак резус Адлерского питомника. Показано, что исследованные показатели макак резус максимально приближены к аналогичным у людей, что еще раз подтверждает возможность использования обезьян этого вида как адекватной модели для воспроизведения и изучения различных патологических состояний человека, а также доклинических испытаний новых фармакологических препаратов.

Список литературы/References

1. Агрба В.З., Лапин Б.А., Мезенцева М.В. и др. Интерфероновый статус и содержание В- и Т-лимфоцитов у клинически здоровых макак резус.// BalticJ.AnimalSci. 2003, №13. P.19-25.
2. Агрба В.З., Лапин Б.А., Мезенцева М.В. и др. Показатели функционирования системы цитокинов у лабораторных приматов. //Бюллетень эксп. биологии и медицины. 2009.т.148. №8. С.223-225.

3. Гончарова Н.Д., Лапин Б.А., Хавинсон В.Х. Возрастные нарушения эндокринных функций и возможные пути их коррекции.//Бюл. Экспериментальной Биологии и медицины.2002,1134,№11,с.484-489.
4. Гончаров Н.П., Воронцов В.И., Кация Г.В., Антоничев А.В., Бутиев В.Ю. Изучение гормональной функции надпочечников и половых желез в опытах на обезьянах.//Вестник Академии Мед.наук СССР-1977,с.13-20.
5. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии.//Москва.М.1996. 240с.
6. Игнатова И.Е., Агрба В.З. Показатели клеточного звена иммунитета у приматов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, Т. 149, № 1, 2010, с. 93-96
7. Зайцева Г.А., Вершинина О.А., Матрохина О.И., Сенькина Е.А., Карпова М.В. Цитокиновый статутс доноров крови и ее компонентов /Журнал «Фундаментальные исследования». – 2011. – № 3 – С. 61-65
8. Карал-оглы Д.Д., Агрба В.З., Медведева Н.М. и др. Иммунный и интерфероновый статус приматов.//Вестник РАМН. 2005. №9.С.17-20.
9. Куксова М.И. Кроветворная система обезьян в норме и патологии.//М.1972.128с.
10. Лапин Б.А., Яковлева Л.А. Очерки сравнительной патологии обезьян.//М. Медгиз.1960.303с.
11. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И. и др. Проблемы инфекционной патологии обезьян. М. Изд-во РАМН. 2004. 140с.
12. Никулин Б.А. Оценка и коррекция иммунного статуса М.:ГЭОТАР-Медиа, 2007, 376 с.

Адрес для корреспонденции: Карал-оглы Д.Д. Karal_5@mail.ruтел.8(928) 449 34 38
1.Агрба Виолета Засимовна – AgrbaVioletaZasimovna
2.Карал-оглы Джина Джинаровна- Karal-oglyDjinaDjinarovna
3. Игнатова Инна Евгеньевна- IgnatovaInnaEvgenievna
4. Деменкова Надежда Петровна –DemenkovaNadezhdaPetrovna

БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ МЕТОДОВ КЛЕТОЧНОЙ, ТКАНЕВОЙ И ОРГАННОЙ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Русия А.Г.[1], Петрова Е.С.[1], Карал-оглы Д.Д.[2], Аравиашвили Д.Э.[2], Игнатова И.Е.[2], Сергеева Н.В.[2], ГварамияИ.А.[2], Агрба В.З.[2]

1 Научно-исследовательский центр курортологии и реабилитации Филиал ФГБУ «Северокавказский федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» в г. Сочи, г. Сочи, Россия

2 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии Федерального агентства науки», г. Сочи, Россия

Резюме

В последние десятилетия в клинической практике стали широко применяться методы клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии. Одним из направлений этих методов является применение перфузатов, содержащих инкрет жизненноважных органов, включающих комплекс биологически активных веществ животного (ксеногенного) происхождения (БАВ), представляющих собой набор метаболитов и тканевых субстратов пептидной природы молекулярной массой от 2,5 тыс. до 50 тыс. дальтон.

Цель настоящего сообщения: демонстрация результатов исследования биологической безопасности БАВ.

Работа выполнена на 16 лабораторных мышах, культуре клеток, 12 лабораторных крысах линии CD и 6 половозрелых обезьянах макаках резус при исследовании БАВ, полученных в результате 45 минутной изолированной экстракорпоральной перфузии гипофиза, гипоталамуса, селезенки, щитовидной железы, почки и тимуса новорожденных поросят.

Показано, что БАВ по CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+ не обладают иммунотоксичностью, не содержат провоспалительных цитокинов, а лимфоциты крови сохраняют функциональную способность продуцировать интерфероны.

Не выявлены также изменения IgE, IgM, IgG, тератогенных, эмбрио и цитотоксических свойств БАВ. В опытах на иммуносупрессированных мышах не установлены онкогенные свойства, а цитогенетический тест (кариотипический анализ метафазных пластинок) не выявил мутагенные свойства БАВ. В опытах на монослойных и суспензионных культурах клеток показано, что БАВ не обладают цитотоксичностью.

Таким образом, БАВ, входящие в состав перфузата в дозе $1{,}786 \cdot 10^{-5}$мг/кг до $181{,}19 \cdot 10^{-5}$мг/кг отвечают всем требованиям биологической безопасности. При этом, отмечено, что увеличение дозы БАВ в 1120 раз приводит к замедлению прироста массы тела потомства до третьего поколения, сопровождаемого увеличением физической силы и выносливости животных, что может косвенно свидетельствовать о наследовании приобретенных в результате применения БАВ признаков.

BIOLOGICAL SECURITY OF METHODS OF CELLULAR, TISSUE AND ORGAN REGENERATIVE THERAPY

Rusia AG[1], Petrova E.S.[1], Karal-ogly D.D.[2], Araviashvili D.E.[2], Ignatova I.E.[2], SergeevaN.V.[2], Gvaramiya I.A.[2], Agrba V.Z.[2]

1 Scientific Research Center of Balneology and Rehabilitation of the Federal Medical and Biological Agency in Sochi", Sochi, Russia

2 FSBSI "Research Institute of Medical Primatology", Sochi, Russia

Abstract

The report presents the research materials of biologically active and biological safety of the substances (biologically active substances of animal origin - BAS), resulting from an isolated extracorporeal perfusion of organs and tissues of animals. It is shown that the BAS have no immunotoxic problems, no contain proinflammatory cytokines, and blood lymphocytes retain the ability to produce functional interferones. We did not identify teratogenic, embryotoxic and cytotoxic properties of the BAS. Cytogenetic test revealed no mutagenic properties of BAS. It is concluded that the BAS, obtained by perfusion of animals biomaterial are safe and can be used in the treatment of patients.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия интенсивно стали развиваться инновационные биомедицинские технологии. Среди них широкое распространение получили методы клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии. Как показывает многолетний опыт, эти методы оказались очень эффективными в лечении ряда болезней различной степени тяжести. Одним из направлений этих технологий является применение биологически активных веществ (БАВ) животного происхождения в качестве лечебного фактора. Несмотря на то, что безопасность названных технологий, отсутствие побочных эффектов не вызывают у исследователей никаких сомнений и подкреплена многолетним (более 10 лет) наблюдением [1-3], медицинская этика и существующие государственные стандарты требуют определения их биологической безопасности в установленном порядке.

В этой связи, целью настоящей работы является исследование параметров биологической безопасности одного из методов клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии, а именно использования перфузатов содержащих комплекс БАВ животного происхождения. Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- Исследованы аллергенные, мутагенные, канцерогенные, иммунотоксические, эмбриотоксические свойства БАВ животного происхождения.
- Оценено влияние БАВ животного происхождения на морфологическую и биохимическую картину крови подопытных животных, с оценкой содержания маркеров воспаления и определением функциональной активности лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены на половозрелых обезьянах макаках резус (6 особей), лабораторных крысах линии CD (12 голов) и лабораторных мышах (16 голов) .Животных содержали в стандартных условиях вивария. Эксперименты с животными проводились в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целей» (Страсбург, 18 марта 1986 г).

В эксперименте использовали БАВ животного происхождения, входящие в состав инкрета гипофиза, гипоталамуса, селезенки, щитовидной железы, почки и тимуса новорожденных поросят, полученного в результате 45 минутной изолированной экстракорпоральной перфузии [1].

Анализы крови экспериментальных крыс проводили на автоматических анализаторах: гематологическом анализаторе Rayto RT-7600S (Rayto, Китай), биохимическом анализаторе Liasys 2 (AMS, Италия) и иммунохимическом анализаторе Liaison (DiaSorin, Италия).

Для определения иммунотоксичности кровь исследовали на проточном цитометре Beckman Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител (от фирмы «Beckton Dickinson») [4].

Аллергенное действие и состояние гуморального иммунитета изучали путем исследования сыворотки крови обезьян на присутствие антител IgE и иммуноглобулонов разных классов. Анализ производили с использованием диагностических наборов фирмы «Вектор Бест» (Новороссийск). Оптическую плотность измеряли с использованием фильтра 450 нм на автоматическом фотометре «Униплан» (Пикон, Россия) [5].

Мутагенное действие изучали цитогенетическим методом путем анализа кариотипов обезьян согласно приведенным методикам [6-7] с некоторыми модификациями [8].

Исследования функциональной активности лимфоцитов обезьян изучали биологическим методом [9] в модификации [10-11] путем определения способности лимфоцитов обезьян отвечать интерфероновой реакцией на адекватное воздействие.

Канцерогенное действие изучали на половозрелых мышах, которым был введен БАВ животного происхождения на третьи сутки после подкожного введения иммунодепрессанта циклофосфан 2 мг/кг.

Для цитогенетических исследований получали культуру клеток с использованием стандартного полумикрометода культивирования лимфоцитов периферической крови человека [6-7] с некоторыми модификациями [8]. Одним из основных критериев оценки действия мутагенного фактора считали число повреждений хромосом. Этот критерий принято выражать по отношению к числу поврежденных хромосом. При учете последнего принимали во внимание следующие моменты: каждый одиночный и парные фрагменты учитывались как одна поврежденная хромосома. Данные цитогенетических исследований заносили в бланк-протокол [12].

Эмбриотоксические свойства исследовали на беспородных самках крыс. В качестве критериев, указывающих на эмбриотоксические свойства БАВ, учитывали морфологические особенности развития (изменение массы тела, краниокаудального размера крысят, особенности шерстного покрова, влияние на нервно-мышечную деятельность), а так же параметры венозной крови и патологоанатомические исследования органов экспериментальных животных [13-15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аллергенное, мутагенное, канцерогенное, иммунотоксическое действие БАВ, а также определение функциональной активности лимфоцитов и маркеров воспаления изучались в опытах на обезьянах. Из 6 обезьян были сформированы две группы: контрольная – контрольная и опытная. Обезьянам из контрольной группы был введен физиологический раствор в объеме 5 мл, а обезьянам из опытной группы такое же количество БАВ животного происхождения. Взятие крови у обезьян проводили из локтевой вены до введения препарата и затем через 24, 48, 72 часа, через 1 неделю и 2 недели.

В ходе эксперимента вели ежедневное наблюдение за животными, периодически проводили контрольные взвешивания. Анализ динамики веса в процессе эксперимента не выявил существенных изменений. В двух случаях у опытных обезьян вес даже увеличился. Следует отметить, что в течение всего периода наблюдения обезьяны были активны и адекватны.

Гематологические показатели обезьян контрольной и опытной групп, установленные как на гематологическом анализаторе, так и при подсчете мазков крови не выходили за пределы значений, установленных ранее [5].

При анализе клеточного звена иммунитета у контрольных животных выявлены колебания в содержании клеток, экспрессирующих антигены клеточной поверхности лимфоцитов в пределах нормативных, за исключением клеток, экспрессирующих CD 20 антиген (В-клетки) у одной обезьяны. У этой обезьяны как исходно, так и на протяжении всего периода исследования этот показатель оставался практически на одном уровне. На ряду с этим по остальным иммунологическим показателям наблюдается их определенный разброс при отсутствии видимых патологий. Это, по-видимому, можно связать или с индивидуальными особенностями, сезонными и возрастными влияниями на физиологические процессы животных, или с исходным состоянием иммуносупрессии.

У всех обезьян отмечается выраженная иммуносупрессия по состоянию гуморального звена иммунитета. Содержание всех классов иммуноглобулинов обезьян значительно ниже установленной нормы [4, 12].

Одним из методов решения вопроса о потенциальной опасности новых медицинских препаратов является цитогенетический метод, позволяющий выявить хромосомные аберрации (т.е. метфазный анализ кариотипов экспериментальных животных) [16-17]. В связи с этим цитогенетическим методом путем рутинного окрашивания хромосом проанализировано в динамике по 50 метафазных пластинок трех опытных обезьян. До введения БАВ основные показатели цитогенетического анализа кариотипов опытных обезьян выглядели следующим образом:

- Общее количество проанализированных клеток – 50
- Кариотип – 42, XY
- Число клеток с аберрациями – 0
- Число аберраций – 0
- Число поврежденных клеток – 0

Анализируя эти данные, сделан вывод, что после введения БАВ наблюдается допустимая норма вовлекаемости индивидуальных хромосом в перестройки хромосом. В частности, после введения БАВ в кариотипах опытных обезьян на разных этапах исследование выявленное число аберраций равнялось 1,5%, что не превышает допустимую норму в 3%.

Тест на аллергенность провели также на обезьянах. После внутривенного введения БАВ, произвели забор крови в разные периоды времени. Кровь анализировали на наличие IgE. По результатам эксперимента видно, что введение БАВ не вызывает в организме синтеза цитофильных антител IgE, что может свидетельствовать об отсутствии аллергенных свойств БАВ животного происхождения.

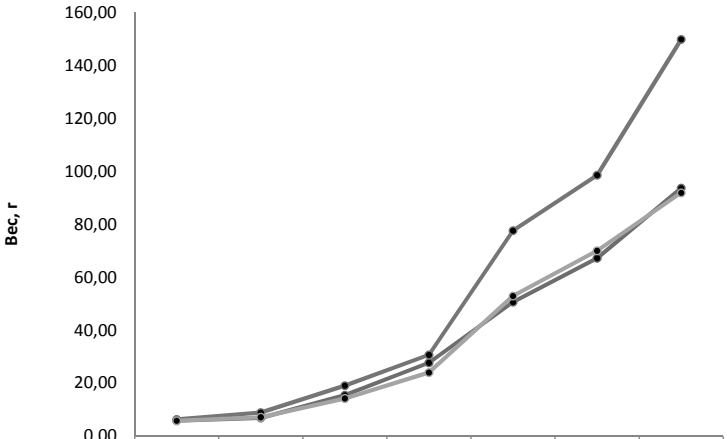
Функциональная активность лимфоцитов крови животных оценивалась биологическим методом по их способности синтезировать интерфероны после адекватного воздействия. Эта способность у некоторых обезьян сохранялась полностью (у одной опытной и у одной контрольной). У всех остальных обезьян эта способность сохранилась на среднем уровне.

О способности БАВ вызывать воспалительные процессы в организме судили по наличию в анализируемом материале таких провоспалительных цитокинов как ФНО-α (фактор некроза опухолей α) и ИЛ-1β (интерлейкин 1β), а также по содержанию СРБ (С-реактивного белка). В результате этого теста ни у контрольных, ни у опытных обезьян, провоспалительных цитокинов обнаружено не было.

Для определения канцерогенности были отобраны 12 мышей обоего пола весом 25-30 г. Животные были распределены на контрольную (3 мыши) и опытную (9 мышей) группы. Для индукции иммуносупрессии мышам был введен циклофосфан в дозе 2 мг/кг и в объеме 1 мл. Затем через трое суток контрольным мышам ввели физ. раствор в объеме 0,5 мл, а опытным животным – БАВ также в объеме 0,5 мл. В ходе вскрытия опытных животных никаких патологических изменений обнаружено не было

Исследование эмбриотоксического действия БАВ было проведено на крысах. Для этого было отобрано по 4 самки каждую из группы. В период беременности, животные из опытной группы ежедневно получали ингаляции соответствующих веществ (экспозиция 15-16 мин) на протяжении 19-ти суток. Контрольная группа никаким воздействиям не подвергалась. Животным из первой опытной группы проводили ингаляции физиологического раствора, а крысам из второй опытной группы – БАВ. В качестве критериев, указывающих на токсичность БАВ, учитывали морфологические особенности развития (изменение массы тела, краниокаудального размера крысят, особенности шерстного покрова), а так же параметры венозной крови и патологоанатомические исследования крыс из потомства экспериментальных животных. Результаты контрольных измерений массы тела и краниокаудального размера представлены на рисунке 1.

Как видно из полученных данных потомство животных, получавших ингаляции БАВ, отставало в весе от крысят из контрольной группы. Такое же отставание наблюдается и в случая с крысятами от самок получавших физраствор. Хотя динамика их роста практически полностью повторяло динамику роста и развития крысят контрольной группы.



	3	5	15	26	52	64	80
Контроль	6,30	8,83	19,03	30,67	77,61	98,56	149,90
Физ. р-ор	5,84	6,88	15,50	27,73	50,63	67,26	93,69
Опыт	5,82	7,12	14,23	24,02	52,94	70,05	91,93

Рис. 1 Результаты теста на эмбриотоксичность (различия между контрольной и опытными группами входят в доверительные интервал $p \leq 0,03$ во всех точках измерений)

Проведенные исследования, включавшие гематологический и биохимический анализы крови, а также макроскопию и морфометерию внутренних органов значимых различий не показали. Несмотря на это, масса тела крыс из контрольной и опытной групп достоверно различается, и разница составляет более 25 г ($p<0,01$). Кроме того заметные различия были обнаружены в особенностях нервно-мышечной деятельности крысят из потомства экспериментальных самок крыс. Крысята, рождённые от самок получавших БАВ, были физически сильнее и выносливее животных контрольной группы (рисунок 2).

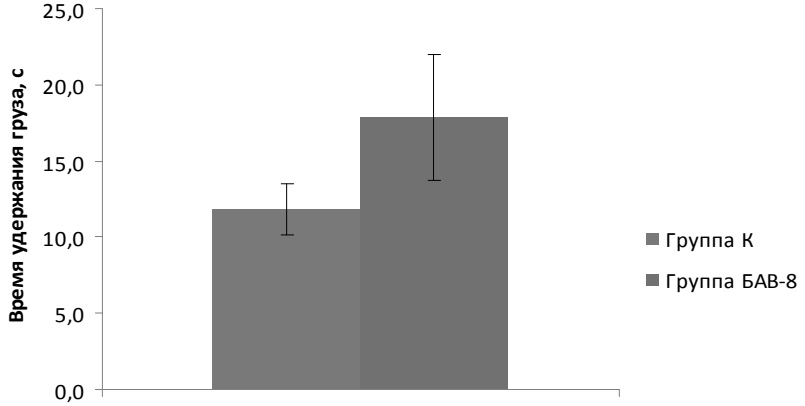


Рис. 2 Сравнение результатов на силу хватки крыс из потомства контрольной и опытной групп (возраст крыс ~2,5 месяца).

Сила их хватки превосходила силу хватки крысят, рождённых от самок контрольной группы, хотя и на пределе достоверности (p=0,05). Это, безусловно, результат чрезвычайной важности, требующий определения повторяемости в дополнительных экспериментах на большой выборке, поскольку именно он открывает возможность для фундаментального исследования перспектив усовершенствованных способов клеточной, тканевой и органной восстановительной терапии в наследовании (теория Менделя) приобретенных признаков (теория Н.И. Вернадского) посредством закрепления системного структурного следа Ф.З Меерсона в генной памяти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из проведенных исследований можно заключить, что использование перфузатов, содержащих БАВ животного происхождения не влияет на картину периферической крови, а также на биохимические показатели сыворотки крови обезьян и крыс. Так же в сыворотке крови не выявлены провоспалительные цитокины, а лимфоциты крови экспериментальных обезьян полностью сохраняют функциональную активность, определяемую способностью продуцировать интерфероны после адекватного воздействия. Опираясь на содержание В-, Т- и НК-клеток показано, что БАВ не обладают иммунотоксичностью. Установлено, что БАВ не проявляют аллергенных (не выявляется IgE), эмбриотоксических (в опытах на беременных самках крыс), онкогенных (в опытах на иммуносупрессированных мышах), мутагенных (в цитогенетическом тесте путем кариотипического анализа метафазных пластинок) свойств.

Список литературы

1. Уйба В.В. (под ред.) Клеточная, тканевая и органная восстановительная терапия. Медицинская технология. – Сочи, 2011. – 94 с.
2. Остапишин В.Д. (под ред.) Применение инновационных способов клеточной, тканевой и органно-восстановительной терапии в общем курсе санаторно-курортного оздоровительного лечения. Методические рекомендации. – Сочи, 2010, 99 с.
3. Лубяко А.А., Мисин В.М., Николаев Е.Н., Талызенков Ю.А., Баринов А.В. Исследование композиции биологически активных веществ, входящих в состав инкрета некоторых жизненно важных паренхиматозных органов / В журн. Прикладная аналитическая химия, 2010, том I, № 2, с.32-47.
4. Игнатова И.Е., Агрба В.З. Показатели клеточного звена иммунитета у приматов.//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Том 149. №31. С. 93-96.
5. Карал-оглы Д.Д., Игнатова И.Е., Гварамия И.А. Картина крови и интерфероновый статус у обезьян, инфицированных латентными вирусами приматов.//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. №6. С. 693-694.
6. Мамаева С.Е. Хромосомный анализ культивируемых клеток.//В кн.: «Методы культивирования клеток». Л. «Наука». 1988, С.78-98.
7. Hunderford D.A. Leukocytes cultured from small inocula of blood and the preparation of the metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCL.//Stain Techn. 1965. V. 40. P. 333-338
8. Аравиашвили Д.Э., Козлова В.С. Неслучайный характер возникновения структурных хромосомных перестроек в В-лимфоидных линиях клеток обезьян.// В кн.: «Фундаментальные и прикладные медицины и биологии в опытах на обезьянах.» Материалы международной конференции. Сочи-Адлер. С. 347-353.
9. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии.// М.: 1996. 240 с.
10. Агрба В.З., Лапин Б.А., Мезенцева М.В. Интерфероновый статус и содержание В- и Т-лимфоцитов у клинически здоровых макаков резус.// Baltic J. Animal Sci. 2003. № 13. P. 19-25.
11. Агрба В.З., Лапин Б.А., Мезенцева М.В. Показатели функциональной системы цитокинов у лабораторных приматов.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Том 148. № 8. С. 223-225.
12. Захаров А.Ф. Бенюш В.Ф.// Хромосомы человека. М.: «Медицина». 1982. С. 195-197.

13. Каркищенко Н.М.Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2004. – 608 с.
14. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В.. (под ред.) Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях, М.: «Профиль-2С», 2010, 358 с.
15. Хабриев Р.У. (под ред.) Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; 2-ое издание, перераб. и доп. – М.: «Медицина», 2005, 832 с.
16. Бочков Н.П. Анализ типов аберрантных клеток – необходимый элемент биологической индукции облучения./ Медицинская радиология. 1993. № 2. С.31-35.
17. Бочков Н.П. Генетические технологии в педиатрии./ Педиатрия. 1995. № 4. С. 21-24.

5. КОСМИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА. РАДИОБИОЛОГИЯ. ФИЗИОЛОГИЯ
V. SPACE MEDICINE. RADIOBIOLOGY. PHYSIOLOGY

«ПРИМАТЫ» - УНИКАЛЬНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ В КОСМОСЕ

Григорьев А.И., Лапин Б.А.**, Козловская И.Б.*, Ильин Е.А.**

** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН (ГНЦ РФ-ИМБП РАН), Москва, Россия*

*** ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия*

«PRIMATES» - THE UNIQUE INTERNATIONAL EXPERIMENT IN SPACE

Grigoriev A.I., Lapin B.A.**, Kozlovskaya I.B.*, Ilyin E.A.**

** State Scientific Center of Russian Federation Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*** Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia*

Abstract

Experiments on primates (macaca mulatta) took an essential place in the Scientific Program of "Bion" biosatellites. Electrodes and gauges implanted in animals has allowed to register an activity of their brain structures, muscles and heart as well as biorythmical and other parameters combined with possibilities of detailed morphological, histochemical and biochemical researches during monkeys activities. Tissue sampling (muscular and bone), taking probes of blood, bone marrow right after flight has allowed to obtain a unique material which is necessary for assessment and understanding of processes, developing in various systems of an organism under weightlessness conditions. Total of six biosatellites with 12 monkeys onboard were launched since year 1983. Participants of research are Russia, USA, France and Germany.

Experimental program in flights of biosatellites gave a priority place to sensorineural researches. Vestibular and sensomotor researche have found the significant effect of weightlessness on characteristics of reactions which are carried

out with otolithic and canalicular components of vestibular system, and on the organization of motion control, developed by monkeys after first day of space flight. Postflight tests detected a profound and continuous suppression of oculomotor and cardiac rhythm responses to a stimulation of otolith.

Results of the conducted research has shown that during first hours and even days of space flight an increase in the central volume of blood is not definite . At the same time during this period of flight intracranial pressure has increased. That can't be considered as an intracranial hypertension because its parameters remained within the limits of the "norm" rate's top line. Changes in pattern of pulse fluctuations of intracranial pressure in the first week of flight testify that outflow of venous blood from a cranial cavity is difficult. Nevertheless similar disfunctions of cerebrospinal fluid circulation did not cause hypoxemia in frontal and somatic sensory areas of a cerebral cortex that we had investigated.

Decrease in postflight orthostatic tolerance and the expressed reaction of intracranial pressure on ortho-orientation during one month period shows that readjustment of the cerebrospinal fluid circulation regulation system to gravity conditions on the ground is a long process.

Studies of structure, function and metabolism of skeletal muscles of monkeys after two weeks period under conditions of space flight have shown that sizes of the fibers of both types in all investigated muscles, except for m. gastrocnemius medialis had significantly decreased. Thus atrophic changes have been more expressed in extensor muscles (m.soleus, a deep zone of m.triceps brachii and m.vastus lateralis). After flight an atrophy of fibers of the slow type was more expressed in the majority of investigated muscles (except for m. tibialis anterior). However an atrophy of fibers of the fast type was also great enough.

Significant decrease in number of capillaries in antigravitational extensor muscles of both limbs in flight animals (more than 30 %) and absence of such decrease in animals of control groups was also observed.

Results of bone biopsy sample analysis have shown that weightlessness can lead to: reduction of spongy substance in ilium and mineral density in lumbar vertebrae, decrease in a new growth and mineralization processes of a bone tissue, decrease in parameters of activity of osteoblasts and increase in osteolytic activity of osteocytes. The analysis of bone marrow aspirates in the first day after flight has shown strongly pronounced decrease in intensity of erythro- and granulopoiesis of bone marrow.

Results of the experiments executed in flight by the international groups of scientists make a serious contribution to understanding of organism's adaptation mechanisms to weightlessness. Obtained results allow finding scientific approaches for the development of new perspective means and methods of

countermeasures and maintenance of high work performance level of cosmonauts in the long duration orbital and future interplanetary flights.

Экспериментальные исследования в полетах российских биоспутников явились составной частью обширной программы фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований, проводимых в России и США в космических полетах (Григорьев А.И.).

Центральное место в программе шести полетов биоспутников «Бион» было отведено исследованиям на приматах – макаках резусах (Лапин Б.А.). Обезьяны, находившиеся на борту биоспутников, были обучены выполнять двигательные задачи, аналогичные выполняемым человеком в пилотируемых полетах. Были разработаны системы содержания и жизнеобеспечения животных в полете, специальный пастообразный корм, методы отбора и подготовки животных к эксперименту в космическом полете. Наличие у животных вживленных электродов и датчиков позволило регистрировать в процессе деятельности обезьян активность их мозговых структур, мышц, сердца, биоритмологические и другие показатели в совокупности с возможностями детального морфологического, гистохимического и биохимического исследований.

Взятие образцов тканей (мышечной и костной), крови и костного мозга сразу после полета позволило получить уникальный материал, необходимый для оценки и понимания процессов, развивающихся в различных системах организма в условиях невесомости.

Начиная с 1983 года, было запущено 6 биологических спутников с 12 обезьянами на борту. В исследованиях принимали участие специалисты ГДР, работавшие в рамках программы «Интеркосмос», а также ученые ряда ведущих университетов США, Франции, Швейцарии, Канады и Украины. Основной задачей исследования явилось изучение адаптационных реакций организма приматов в условиях действия микрогравитации.

Нейросенсорные исследования составляли приоритетный раздел экспериментальной программы в полетах биоспутников. Данные, полученные в этих исследованиях, открыли возможность понимания природы нарушений вестибулярных функций в невесомости, динамики их развития и некоторых нейрональных механизмов. Вестибулярные и сенсо-моторные исследования обнаружили выраженное влияние невесомости на характеристики реакций, осуществляемых с участием отолитового и каналового отделов вестибулярной системы, и на организацию двигательного управления (Козловская И.Б., Корольков В.И., Grindeland R., Viso M.).

Увеличение амплитуды компенсаторного противовращения головы и ответа сердечного ритма на отолитовую стимуляцию так же, как и увеличение коэффициента горизонтального вестибуло-окулярного рефлекса, сопровождалось увеличением ответа нейронов вестибулярных ядер. К концу полета наблюдалось адаптивное подавление всех наблюдаемых ответов, вероятно, по механизму вестибуло-мозжечковой петли. Послеполетные тестирования выявили глубокое и длительное подавление глазодвигательных реакций и ответа сердечного ритма на отолитовую стимуляцию, а также подавление глазодвигательных реакций, осуществляемых с участием отолитового входа (Козловская И.Б., Якушин С.Б., Cohen B., Holstein G.).

Из комплекса факторов, оказывающих влияние на организм в космическом полете, ведущим является невесомость. Её непосредственный эффект выражается в снятии весовой нагрузки. Гипотетически при этом перемещающиеся в краниальном направлении жидкие среды организма, и в первую очередь внутрисосудистая жидкость, приводят к увеличению центрального объема крови, затруднению оттока крови из полости черепа и, как следствие, нарушению мозгового кровообращения, сдвигам внутричерепной гемоликвородинамики.

В результате проведенных исследований установлено, что в первые часы и даже дни космического полета увеличение центрального объема крови не являлось безусловным. В то же время в этот период полета повышалось внутричерепное давление, которое, однако, нельзя рассматривать как внутричерепную гипертензию, т.к. его значения оставались в пределах верхней границы «нормы». Изменения паттерна пульсовых колебаний внутричерепного давления в первую неделю полета свидетельствуют о затруднении оттока венозной крови из полости черепа. Тем не менее подобные нарушения гемоликвородинамики не вызывали гипоксемию в изучаемых областях коры головного мозга – лобной и соматосенсорной. Более того, в первые минуты и часы космического полета уровень pO2 в этих областях коры мозга даже увеличивался, что, скорее всего, связано со стрессом в результате сочетанного влияния на обезьяну предшествующей перегрузки при выводе биоспутника на орбиту и последующим воздействием невесомости. Прогрессирующее повышение уровня pO2 на 3-5 сутки полета и его превышение фонового значения на протяжении всего периода 2-недельного полета может быть обусловлено сочетанием возможного снижения интенсивности метаболизма в исследуемом участке коры мозга с рассогласованием под влиянием гипонорадренергического синдрома нейрогенного механизма регуляции

локального мозгового кровотока (Кротов В.П., Sandler G, Ильин Е.А., Корольков В.И.).

Во время полета не обнаружена зависимость между динамикой показателей центрального кровообращения и характером кровотока в бассейне общей сонной артерии. Полученные данные о динамике кровотока в общей сонной артерии в 1-е сутки полета (как увеличение, так и его уменьшение) свидетельствуют о том, что патогенез отека мягких тканей лица и шеи не обязательно связан с увеличением их кровоснабжения.

Снижение после полета ортостатической устойчивости и наличие в течение месяца выраженной реакции внутричерепного давления на ортоположение свидетельствует о длительности процесса перестройки аппарата регуляции гемоликвородинамики к условиям измененной силы тяжести (Кротов В.П., Ильин Е.А., Sandler G.).

В целом, выраженность и длительность, а также направленность сдвигов гемодинамических характеристик на начальном этапе адаптации к невесомости существенно различались между собой, что позволяет усомниться в доминирующей роли перераспределения жидкости в развитии реакций системы кровообращения в условиях микрогравитации. Более вероятным представляется предположение о том, что эти реакции являются следствием рассогласования в деятельности различных систем регуляции, что обусловлено как эффектом перераспределения жидких сред, так и изменениями характера суммарного афферентного потока.

Результаты исследования системы управления движениями показали, что невесомость существенно снижает возможности точностного управления движениями любого типа: быстрыми и медленными, одно- и многосуставными, пространственно ориентированными и не связанными с пространственными задачами, включающими и не включающими позную компоненту, а также выполняемыми различными эффекторами. Когнитивные функции при этом не страдают (Козловская И.Б., Recktenward M., Hodgson J., Roy R.).

Исследования структуры, функции и метаболизма скелетных мышц обезьян после двух недельного пребывания в условиях космического полета показали, что размеры волокон обоих типов во всех исследованных мышцах, кроме m. gastrocnemius medialis существенно снизились. При этом атрофические изменения были более выражены в мышцах-экстензорах (m.soleus, глубокая зона m.triceps brachii и m.vastus lateralis). После полета в большинстве исследованных мышц (кроме m. tibialis anterior) атрофия волокон медленного типа была более выраженной. Однако атрофия волокон быстрого типа была также достаточно велика. Резкое снижение в полете

характерной для этой мышцы фазной активности могло привести к уменьшению размеров волокон быстрого типа. Ни в одной из контрольных групп животных подобных однонаправленных изменений не было обнаружено, что позволяет относить их преимущественно за счет влияния невесомости, а не гипокинезии (Козловская И.Б., Шенкман Б.С., Белозерова И., Немировская Т.Л.).

Отмечено также значительное уменьшение количества капилляров в антигравитационных мышцах-разгибателях обеих конечностей у полетных животных (более 30%) и отсутствие такого снижения у животных контрольных групп.

Использование в исследованиях костного скелета методов системного (фотонная абсорбциометрия) и прямого клеточного (биопсия) исследования открыло возможность изучения не только количественных характеристик самого феномена снижения минеральной насыщенности костного скелета, но и механизмов его развития. Как показали результаты анализа костного биоптата, невесомость приводит к уменьшению губчатого вещества подвздошной кости и минеральной плотности поясничных позвонков, снижению новообразования и процессов минерализации костной ткани, снижение показателей активности остеобластов и возрастанию остеолитической активности остеоцитов (Оганов В.С., Новиков В.Е., Zerath E., Novicov V., LeBlanc A., Arnaud S., Navidi M., Deftos L.). При этом концентрация кальция в сыворотке крови повышается (Корольков В.И., Доценко М.А., Bengtson S.).

Анализ пунктата костного мозга в первые сутки после полета показал ярко выраженное снижение интенсивности процесса костномозгового эритро- и гранулопоэзов (Бурковская Т.Е., Корольков В.И.).

Полученные данные позволили изучить влияние на организм невесомости в «чистом» виде без применения в процессе полета профилактических мероприятий, а также с помощью имплантированные электродов и датчиков получить прямую физиологическую информацию о реакциях нейро-сенсорной, сенсомоторной систем и системы кровообращения на различных этапах пребывания в невесомости.

Результаты экспериментов, выполненных в полете международными коллективами ученых, являются серьезным вкладом в понимании механизмов адаптации организма к невесомости, в развитии научных подходов к созданию новых перспективных средств и методов профилактики и сохранения на высоком уровне работоспособности космонавтов в будущих длительных орбитальных и межпланетных полетах.

В 2016 г. исполнилось 19 лет со дня окончания 14-суточного полета биоспутника «Бион-11» (1997 г.) с двумя обезьянами. Фактически это был последний запуск обезьян в космос. Анализируя научные результаты, полученные в этом и других летных экспериментах на приматах, понимаешь, что эти эксперименты намного опередили свое время и их повторение в настоящее время не представляется возможным. Во-первых, это сложно и очень дорого. Во-вторых, это требует для набора статистически значимых результатов нескольких запусков, а это опять очень дорого и долго.

В действующей российской программе исследований по космической биологии и физиологии не предусматривается проведение летных исследований на нечеловекообразных приматах. Их место в исследованиях по новой программе «Бион-М» занимают мыши как основной объект физиологических и молекулярно-биологических исследований. Однако это по-прежнему остается актуальным – проведение на приматах исследований по космической физиологии и радиобиологии.

ВЕСТИБУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В КОСМОСЕ. ЭКСПЕРИМЕНТ «ПРИМАТЫ» ЧТО РАССКАЗАЛИ ПРИМАТЫ О РАБОТЕ ВЕСТИБУЛИРНОГО АППАРАТА В НЕВЕСОМОСТИ

Козловская И.Б., Ильин Е.А.*, Лапин Б.А.**, Григорьев А.И.**

** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр РФ Институт медико-биологических проблем РАН (ГНЦ РФ-ИМБП РАН), Москва, Россия*

*** ФГБНУ НИИ медицинской приматологии, Сочи, Россия*

VESTIBULAR STUDIES IN SPACE. EXPERIMENT “PRIMATES”

Abstract

The primate research program Bion on the biosatellite Cosmos was planned in the 1970s to investigate vestibular dysfunction in space, with the aim that the outcome would benefit humans traveling in space/ At the same time the Space Adaption Syndrome (SAS) was observed in 30-40% of cosmonauts, but there was no possibility of obtaining direct measurements of parameters related to vestibular, proprioceptive, motor, or other dysfunction during piloted flight, and most of the information on vestibule-oculomotor dysfunction related to microgravity was

obtained during postflight testing (Yegorov B.B., Samarin G.I. Possible change in the paired functions of the vestibular apparatus. Kosm. Biol. Med., 4, 86-88, 1970).

There were two main vestibular studies in the Cosmos project. One was to study eye-head coordination and activity in the vestibular nerve, the medical vestibular nuclei (MVN) and the cerebral flocculus associated with angular head movement in the horizontal plane during gaze shifts performed by the head and eyes to lateral targets, the gaze fixation reaction (GFR). Another project studied the sensitivity of central vestibular neurons to linear head displacement along the body axis.

The results presented in the paper are based on information from many sources (Shipov et al., 1986, Sirota et al., 1987, KozlovskaYA ET AL. 1989, Yakushkin et al., 1989, 1992).

The data from the Cosmos flights show that the sensitivity of central vestibular neurons in MVN to both angular head rotation and vertical linear motion was affected by microgravity. In general, the sensitivity of these neurons increased in the earlier days in Space and that gradually normalized.

A string finding was that the observed changes in neuronal sensitivity were qualitatively similar to the changes observed in the aVOR gains and occurred over the same time course. Changing in sensitivity of the floccular neurons to the angular rotation were more uniform than the changes in MVN activities, presumably, because the flocculus was responsible for producing these adaptive changes.

Changes in sensitivity of the neural populations in the vestibular nuclei to the otolin stimulation were also relatively uniform and had approximately the same time course as the sensitivity to angular acceleration. The sensitivity to linear acceleration gradually increased, reaching a maximum by the end of the first week in space. This was different from the changes in sensitivity of the same neuronal population to angular rotation, which increased earlier in flight and was normalized by the time the otolin sensitivity had reached a maximum.

Космический адаптационный синдром (КАС) является одним из наиболее постоянных спутников пребывания в невесомости, существенно осложняющих жизнь космонавтов и их адаптацию к условиям космических полетов. Не вызывает сомнений ведущая роль в его развитии изменений в деятельности сенсорных систем и в первую очередь вестибулярной системы, гравитационная зависимость которой чрезвычайно высока. Именно поэтому большинство гипотетических представлений связывают КАС с дисфункцией в невесомости вестибулярного аппарата, обуславливающей возможность нарушения парной деятельности вестибулярных структур (1), развитие

сдвигов в каналово-отолитовом взаимодействии (2), подавление трансляторных возможностей отолитовой системы (3) и пр. Однако ни одна из этих гипотез, базирующихся в основном на теоретических построениях, не была подтверждена в связи с отсутствием надежных экспериментальных данных, получение которых в условиях наземного моделирования вряд ли возможно, а в реальных космических полетах с участием членов экипажей крайне затруднено в связи со сложностями стандартизации экспериментальных условий и ограниченными возможностями применения необходимых экспериментальных процедур.

В связи со всем сказанным при формировании программы эксперимента на приматах абсолютный приоритет – 60-70% экспериментального времени был отдан вестибулярным исследованиям Задачи исследований при этом составили: а) изучение влияний микрогравитации на характеристики двигательных реакций, опосредуемых вестибулярной чувствительностью; б) определение основных закономерностей вестибулярной адаптации к невесомости и в) лежащих в ее основе измененияx нейрональной организации вестибулярных ответов.

Эксперимент проведен в полетах 6 биоспутников на 12 самцах macaca mulatta в возрасте около 4-х лет, обученных соблюдать спокойствие и выполнять стабильно в измененных условиях среды все требования исследования. Использовавшаяся в полетах аппаратура включала 2 капсулы, обеспечивающие необходимые для жизни животных условия среды, снабженные специальными креслами, костюмной системой фиксации животных, устройствами для подачи пищи и сока, системой уборки отходов, а также устройствами, необходимыми для осуществления экспериментов, а именно: дисплеем для предъявления зрительных стимулов и двумя актографами - для верхней и нижней конечностей. Имеющийся в каждой капсуле комплекс научной аппаратуры включал в свою очередь необходимые сенсоры, усилители и другие приборы, обеспечивающие регистрацию и хранению всей необходимой научной информации, объем которой, поступающий от устройств слежения за жизнедеятельностью животных, за работой всех технических систем и биологических систем регистрации был огромным. Достаточно отметить, что каждое экспериментальное животное являлось носителем более 40 вживленных датчиков, 18 из которых обеспечивали сбор информации по вестибулярной части эксперимента.

Особенности работы в невесомости каналовой части вестибулярного аппарата изучали по показателям теста «Реакция Установки Взора» (РУВ), в ходе которого животные для получения небольшого количества сока в течение короткого временного интервала (1 с) должны были установить взор

на одной из 4-х зрительных мишеней размером в 1 угловой градус, предъявляемых в случайном порядке на зрительной панели, расположенной по дуге на расстоянии 30 см от их глаз. При выполнении теста регистрировали амплитуды и скорости горизонтальных движений глаз и головы, нейрональную активность ядерного вестибулярного комплекса (6 каналов) и вестибуломозжечка, а также характеристики общего состояния животного – по показателям ЭЭГ, ЭКГ и температуры тела.

Исследования по данной программе выполняли до и после завершения полетов, а также ежедневно в их ходе дважды в день – утром и вечером. При каждом тестировании животные выполняли 256 реакций РУВ, выпивая при этом около 50 мл сока.

Для изучения функции отолитовой части вестибулярного аппарата определяли характеристики нейрональных ответов вестибулярного ядра и вестибуломозжечка на вертикальные синусоидальные перемещения кресла обезьяны с частотой 0,24 Hz (V=3,4 см/с; 0,005 g); 0,67 Hz (V=9,5 см/с; 0,41 g); 0,93 Hz (V=13,2 см/с0,078 g) и 1,7 Hz (24,0 см/с; 0,26 g). В ходе эксперимента на каждой частоте выполнялось 40 колебаний вверх/вниз с перерывами между ними в 30 минут, так что в целом тест занимал утром лишь 10 минут. При выполнении теста регистрировали параметры движений кресла, амплитуду вертикальных движений головы, нейрональную активность среднего вестибулярного ядра, нейрональную активность флоккулярной доли мозжечка, а также параметры жизнедеятельности животного - ЧСС, частоту дыхания и температуру тела.

Результаты выполненных исследований показали, что переход к невесомости у всех обезьян сопровождался практически немедленным возрастанием возбудимости каналовой части вестибулярного аппарата (4), что проявлялось а) возрастанием в первый же день горизонтального усиления КВОР в 1,5 – 1,8 и более раз; и б) одновременном увеличении интенсивности нейрональных ответов на горизонтальные движения головы. Начиная со 2-5-х суток полета оба показателя начинали снижаться, возвращаясь к 14-м суткам полета к предполетным значениям. Сохраняющаяся в течение всех дней высокая нейрональная активность во флоккулюсе мозжечка позволила предположить участие вестибуло-мозжечковой петли в развитии указанного выше адаптационного торможения избыточной каналовой чувствительности.

Динамика изменений нейрональных ответов среднего вестибулярного ядра на синусоидальные вертикальные перемещения при переходе к невесомости была аналогичной (5): в первые 2-8 дней полета интенсивность ответов на раздражения всех тестируемых частот возрастала, а затем снижалась. Глубокая длительная суппрессия почти всех исследовавшихся

отолитовых реакций после завершения космических полетов длительностью 10-12 дней была выявлена у приматов американскими исследователями в совместных российско-американских экспериментах программы (6). Амплитуды компенсаторного противовращения глаз при динамическом и статическом наклонах головы в течение 11-ти послеполетных дней составляли у летавших обезьян менее 70% от исходной. Величина вергентной модуляции при вертикальной ротации в то же время была снижена более чем на 50%. Выраженность асимметрии движений вертикального нистагма глаз вверх и вниз, характерная для 1g, также была снижена (7). Аналогичная суппрессия реакции на отолитовые раздражения была обнаружена в невесомости у приматов в системе регуляции сердечного ритма: в ходе полета у всех экспериментальных животных регистрирующиеся в условиях 1g при линейном ускорении двухфазные изменения RR интервалов ЭКГ полностью подавлялись, восстанавливаясь лишь на 8-й и далее послеполетный день (7).

Таким образом, результаты, выполненных в рамках экспериментальной программы «Приматы» исследований, существенно расширили наши знания об обуславливаемых невесомостью процессах в вестибулярной системе и механизмах их развития, что открыло новые возможности прогнозирования изменений в деятельности систем управления движением в условиях изменяющихся гравитационных условий среды и их профилактики.

Список литературы

1. Yegorov B.B., Samarin G.I. Possible change in the paired functions of the vestibular apparatus. Kosm. Biol. Med., 4, 86-88, 1970
2. Kornilovs L.N., Yakovleva L.Yu., Tarasov I.K. Vestibular disfunction in cosmonauts during adaptation to zero g and readaptation to 1 g. In Proceeding of the Fifth Annual meeting of IUPS, 26:35, 1983
3. Kozlovskaya I.B., Babaev B.M., Belozerova J.N., Sirota M. The effect of weightlessness on motor and vestibulomotor reaction. Physiologist, 25: 111-114, 1984
4. Badakva A.M., Zalking D.K., Miller N.V., Riazansky S.M. Head movements and vestibular Neuronal Activity in Response to Otolith Stimulation of Monkey in Space. J. of Gravit. Physiology 7.1:99-107, 1998
5. Dai M., Raphan T., Cohen B. Modulation of vergence by off-vertical axis rotation in the monkey Exp. Brain Res. 111: 21-29, 1996
6. Dai. M., McGarvie, Kozlovskaya I.B. et al. Effect of Space flights on ocular correcter rolling. Exp. Brain Res. 106:111-123, 1995

7. Badakva A.M., Zalkind D.K., Miller N.V. Cardiac Rhytme Responces to otolith Stimulation of monkey in microgravity. J. of Gravit. Physiology, 7.1:99-107, 1998

ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ КОНСТРУКЦИИ КА «БИОН» С ПРИМАТАМИ НА БОРТУ

В.И Абрашкин, Н.Р.Стратилатов, С.М. Шатохин

АО «РАКЕТНО-КОСМИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «ПРОГРЕСС» (АО РКЦ «ПРОГРЕСС»)

443009, г.Самара, ул.Земеца д.18,E-mail csdb@samspace.ru

Резюме

В начале 80-х годов АО РКЦ «Прогресс» был разработан и изготовлен специализированный биологический КА «Бион» для проведения экспериментов на приматах. Выбор макак-резусов для проведения экспериментов в космосе потребовал пересмотра требований к системам КА Размещение в спускаемом аппарате приматов, необходимость создания для них комфортной среды обитания, особенности условий эксплуатации КА «Бион» потребовали решения целого ряда технических проблем.

Для снижения перегрузок между парашютной системой и СА был установлен твердотопливный двигатель. Для включения двигателя на нужной высоте была разработана вновь система измерения малых высот.

В начале проекта ученые ИМБП поставили условие, что минимальное количество макак-резусов должно быть 3 особи и чтобы они могли видеть друг друга во время полета. Совместная работа со специалистами СКТБ «Биофизприбор» показала несостоятельность такого требования. В результате в СА были установлены только 2 блока содержания животных БИОС-Примат и обезьяны видели друг друга во время полета. Для обезьян было также выполнено требование по их положению при приземлении СА в направлении спина-грудь. Для наблюдения за обезьянами во время полета и передачи изображения на Землю в СА впервые была установлена телевизионная аппаратура. Большой объем доработок СА потребовал проведения наземной экспериментальной отработки.

Возникла необходимость изучения переносимости животными ударных перегрузок и отработки конструкции ложементов для животных.. Благодаря содействию руководителя ИЭПИТ Бориса Аркадьевича Лапина нашему предприятию с разрешения правительства Абхазии было выделено

место на берегу Черного моря в 5 км от села Адзюбжа для создания лаборатории. В лаборатории был смонтирован копровый стенд, привезен макет СА. Было проведено несколько сбросов СА с находящимися внутри обезьянами

Уже в декабре 1983 года модернизированный КА «Бион» совершил полет с обезьянами на борту. После полета КА «Бион» №6 совершили полет еще 5 КА с обезьянами на борту. Последний полет обезьян состоялся в 1996 году на КА «Бион» №11.

В настоящее время АО РКЦ «Прогресс» и смежные организации разрабатывают документацию на КА «Бион-М» №2. Перед КА поставлены новые задачи. КА впервые будет летать на орбите с высотой 800-1000км. КА претерпел большие изменения по сравнению с КА «Бион» №6, но неизменными остались СА с парашютной системой с двигателем «мягкой» посадки и системой измерения малых высот. На КА вновь устанавливается телевизионная аппаратура того же разработчика, что был на КА «Бион» с приматами, выполненная на современном уровне. Телевизионная аппаратура будет отслеживать поведение 75 мышей в полете и передавать их изображение на Землю.

Благодаря полету обезьян на КА «Бион» мы получили безупречную парашютную систему с двигателем, обеспечивающим «мягкую» посадку не только на КА «Бион», «Бион-М», но также на КА «Фотон», «Фотон-М» и «Ресурс-Ф1».

CHARACTERISTICS OF SPASESHIP “BION” CONSTRUCTION DEVELOPMENT WITH PRIMATES ON BOARD

V.Abrashkin, N.Stratilatov, S.Shatokhin

JSC «Rocket-space center “Progress”» (JSC RSC “Progress”)

18 Zemetsa st, Samara, 443009, Russia E-mail csdb@samspace.ru

In the early 80-s the RCC JSC "Progress" has been designed and manufactured a specialized biological spaceship "Bion" (SS) for experiments on primates. Selection of rhesus monkeys for space experiments demanded a revision of the requirements for SS systems. Primate stationing in the descent module (DM), the need to create for them a comfortable environment, special conditions of SS "Bion" exploitation demanded to solve a number of technical problems.

To reduce overload between the parachute system and the DM a solid-propellant engine was installed. To turn on the engine at the desired altitude a new system for measuring low altitudes was designed.

At the project beginning the scientists of the Institute of Biomedical Problems (IBMP) put the condition that a minimum number of rhesus monkeys should be 3 animals and that they could see each other during the flight. Collaboration with experts of Specialized Construction Technical Bureaus "Biofizpribor" showed the failure of such a requirement. As a result, the only 2 BIOS-primates keeping blocks were mounted and monkeys were visible to each other during the flight. The requirement of monkey positions in the direction “chest-back” during DM landing was also satisfied. To watch the monkeys during the flight and to transmit images to Earth the TV equipment was set in DM. A large volume of improvements of DM has demanded carrying out ground experimental tests.

There was a need to study the animals tolerance to shock overloads and working off animals lodgment construction. With the support of the director IEPT AMS USSR Boris Arkad’evich Lapin to our company and with the permission of the Abkhazia Government, a place was allocated on the Black Sea coast 5 km from the Adzyubzha village to establish the laboratory. The stand was mounted and DM layout was brought to the laboratory. DM multiple discharges were carried with monkeys on board.

As early as in December 1983 a modernized SS "Bion" flew with the monkeys on board. After the №6 SS"Bion” flight another 5 space ships with monkeys on board flew. The last flight with monkeys took place in 1996 on the №11 SS “Bion”.

Currently JSC RSC "Progress" and the related organizations are developing the documentation for the №2 SS "Bion-M". New tasks for SS are set. For the first time the SS will fly on an 800-1000 km height orbit. Although SS has undergone big changes in comparison with the №6 SS "Bion", a parachute system with the engine "soft" landing and a system of measurement of small height remained unchanged in SS. TV equipment made to date from the same developer that was on the SS "Bion" with primates is set on SS. TV equipment will monitor the behavior of the 75 mice during flight and transmit their images to Earth.

Due to the flight of monkeys on SS "Bion" we got a flawless parachute system with the engine, providing a "soft" landing not only for SS "Bion", "Bion-M", but also for the “Photon”, “Photon-M” and “Resource-F1” space ships.

КА «Бион» были разработаны АО РКЦ «Прогресс» на конструктивной базе космических аппаратов типа «Зенит», обеспечивающих фотонаблюдение земной поверхности с доставкой информации на Землю в спускаемых аппаратах (СА). Размещение в спускаемом аппарате живых существ, необходимость создания для них комфортной среды обитания, особенности условий эксплуатации КА «Бион» потребовали решения целого ряда технических проблем.

При разработке КА "Бион" была решена теоретически и внедрена на практике задача длительного неориентированного полета космического аппарата «Бион», что потребовало доработки системы управления движением КА. Для обеспечения возросшего энергопотребления снаружи СА был установлен герметичный отсек с аккумуляторными батареями, в приборный отсек были установлены дополнительные аккумуляторные батареи. Все это потребовало доработки и системы электропитания КА.

Космические аппараты типа «Зенит» были разработаны с высокой степенью надежности, были просты в эксплуатации, имели СА с удобными монтажными люками, подходящими для проведения монтажно-сборочных работ и демонтажа научной аппаратуры из СА на месте приземления. Доработка конструкции СА КА типа «Зенит» под выполнение биологических задач была минимальной и заключалась в усилении парашютного контейнера, изготовлении рам для размещения научной аппаратуры. В СА была установлена система регенерации атмосферы, обеспечивающая необходимые для животных параметры воздуха. В составе бортовой системы терморегулирования вместо газожидкостного агрегата был установлен холодильно-сушильный агрегат, обеспечивающий не только сброс тепла, но и отбор влаги из воздуха. В то же время была модернизирована наземная система охлаждения.

Такое удачное решение по созданию КА «Бион» на конструктивной базе космических аппаратов типа «Зенит» позволило создать первый специализированный биологический КА, обеспечивающий проведение фундаментальных исследований в области космической биологии и медицины в минимально возможные сроки. Запуск КА с космодрома «Плесецк» состоялся уже в 1973 году.

Последующие КА отличались от предыдущих усложнением научных экспериментов и соответственно изменением состава научной аппаратуры. На КА №1 слетало в космос 45 крыс, на КА №2 был установлен облучатель, на КА №3 центрифуга для создания искусственной силы тяжести, на КА №4 были установлены две большие центрифуги, на КА №5 было установлено

самое большое количество блоков содержания животных. Запуск КА «Бион» №5 состоялся в 1979 году.

Длительность полетов КА «Бион» №1-5 составляла от 18,5 до 21,5 суток.

В 1979 году наше предприятие приступило к разработке конструкции КА «Бион» №6. Выбор макак-резусов для проведения экспериментов в космосе, определенный в том числе и их размерами, потребовал пересмотра требований к системам КА «Бион» №5. Выяснилось, что уровень перегрузок при приземлении допустимый для крыс недопустим для обезьян. Для снижения перегрузок между парашютной системой и СА был установлен твердотопливный двигатель, применявшийся на СА КА разработки нашего предприятия. При этом для его размещения в парашютном контейнере у двигателя были обрезаны сопла. Для включения двигателя на нужной высоте, зависящей от веса СА, была разработана система измерения малых высот (СИМВ). Подобная система применялась на других СА нашего предприятия, но она была неработоспособна на аппаратах со сферической формой. К тому же для обеспечения работы системы производился отстрел теплозащитного днища. Поэтому на СА КА «Бион» №6 была разработана новая СИМВ, которая работала без отстрела теплозащитного покрытия СА. В связи с установкой твердотопливного двигателя (двигателя «мягкой» посадки) в парашютной системе был установлен вертлюг, из-за чего обеспечить электрическую связь с антеннами, на которые работали передатчики для обеспечения поиска СА, установленными в стропах парашюта, стало невозможно. Пришлось в нижней части СА устанавливать механизм ввода тросиковых антенн.

В связи с появившейся необходимостью разработки новой парашютной системы был введен отстрел основного парашюта после приземления СА для исключения волочения СА по земле при сильном ветре. Вместо имеющейся системы отделения крышки парашютного люка на КА «Бион» №6 была установлена более совершенная система. Для повышения надежности поиска в темное время суток на СА установили светопоисковый маяк. На КА были заменены средства телеметрического контроля на более современные.

В начале проекта ученые ИМБП поставили условие, что минимальное количество макак-резусов должно быть 3 особи и чтобы они могли видеть друг друга во время полета. Совместная работа со специалистами СКТБ «Биофизприбор» показала несостоятельность такого требования. В результате в СА были установлены только 2 блока содержания животных БИОС-Примат и обезьяны видели друг друга во время полета. Для обезьян было также выполнено требование по их положению при приземлении СА в

направлении спина-грудь. Для наблюдения за обезьянами во время полета и передачи изображения на Землю в СА впервые была установлена телевизионная аппаратура «Клест-М». АФУ телевизионной аппаратуры было разработано нашим предприятием и крепилось к стяжным лентам системы отделения СА.

Большой объем доработок СА потребовал проведения наземной экспериментальной отработки. В короткие сроки было проведено макетирование парашютной системы с твердотопливным двигателем в парашютном контейнере, последовательное выдергивание составных частей парашютной системы из парашютного контейнера, со скоростями аналогичными реальным, подтверждена работоспособность СИМВ на макете СА. В заключение были проведены комплексные межведомственные испытания со сбросом СА с вертолета. Весь проведенный положительный объем испытаний позволил дать заключение на допуск КА «Бион» №6 к полету.

С помощью двигателя «мягкой» посадки скорость приземления СА уменьшается с 12м/с до 5м/с, но перегрузка при этом достигает до 40 единиц. Возникла необходимость изучения переносимости животными ударных перегрузок и отработки конструкции ложементов для животных. Рассматривалось проведение копровых испытаний в Самаре. И все таки было принято решение о проведении испытаний недалеко от ИЭПИТ. Благодаря содействию руководителя ИЭПИТ Бориса Аркадьевича Лапина нашему предприятию с разрешения правительства Абхазии было выделено место на берегу Черного моря в 5 км от села Адзюбжа для создания лаборатории. В лаборатории был смонтирован копровый стенд, привезен макет СА. Было проведено несколько сбросов СА с находящимися внутри обезьянами По результатам копровых испытаний также было дано заключение о возможности полета обезьян в космос.

Уже в декабре 1983 года модернизированный КА «Бион» №6 совершил полет с обезьянами на борту. Полет был недолгим, через 5 суток СА вернулся на Землю. После полета КА «Бион» №6 совершили полет еще 5 КА с обезьянами на борту. Последний полет обезьян состоялся в 1996 году на КА «Бион» №11.

Длительность полетов КА «Бион» №6-11 составляла от 5 до 14 суток.

В настоящее время АО РКЦ «Прогресс» и смежные организации разрабатывают документацию на КА «Бион-М» №2. Перед КА поставлены новые задачи. КА впервые будет летать на орбите с высотой 800-1000км. КА претерпел большие изменения по сравнению с КА «Бион» №6, но неизменными остались СА с парашютной системой с двигателем «мягкой»

посадки и системой измерения малых высот. На КА вновь устанавливается телевизионная аппаратура того же разработчика, что был на КА «Бион» с приматами, выполненная на современном уровне. Телевизионная аппаратура будет отслеживать поведение 75 мышей в полете и передавать их изображение на Землю.

Благодаря полету обезьян на КА «Бион» мы получили безупречную парашютную систему с двигателем, СИМВ, обеспечивающие «мягкую» посадку не только на КА «Бион», «Бион-М», но также на КА «Фотон», «Фотон-М» и «Ресурс-Ф1».

ПРОБЛЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ РАДИАЦИОННЫХ И НЕРАДИАЦИОННЫХ ФАКТОРОВ МЕЖПЛАНЕТНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В НАЗЕМНЫХ МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА ПРИМАТАХ

А.С.Штемберг, А.Г.Беляева, О.В.Васильева, Ю.В.Гордеев

ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

Резюме

Рассматривается стратегия и методология экспериментальных исследований нейробиологических эффектов радиационных и гравитационных факторов межпланетных полетов в наземных модельных экспериментах на приматах. Основную опасность представляют галактические космические лучи – протоны высоких энергий и тяжелые ионы, воздействие которых может привести к нарушению операторской деятельности космонавтов и представлять опасность для их жизни непосредственно во время полета.

Методология моделирования факторов космического полета (ФКП) в наземных экспериментах заключается в длительном гамма-облучении и воздействии тяжелых ионов в сочетании с факторами, воспроизводящими эффекты измененной гравитации. В качестве моделей гипогравитации могут использоваться антиортостатическая гипокинезия или водная иммерсия, гипергравитации (перегрузок) – вращение на центрифуге. Методология изучения нейробиологических эффектов ФКП на приматах заключается в моделировании базовых элементов операторской деятельности и

исследовании механизмов реакций центральной нервной системы на всех уровнях ее организации (от молекулярного до интегративного).

Выделены базовые элементы операторской деятельности космонавта и обоснованы методические подходы к моделированию их в экспериментах на приматах.

В проведенных экспериментах по изучению нейробиологических эффектов воздействия высокоэнергетических протонов и ионов углерода ^{12}C на мозг макаков резусов показано, что протоны не вызывают существенных нарушений когнитивных функций, в то время как облучение ионами углерода приводит к достоверному снижению когнитивных функций у животных со слабо выраженной пластичностью нервных процессов (обезьян возбудимого типа ВНД); у обезьяны же сильного уравновешенного типа показатели остаются на прежнем уровне. Эти изменения сопровождаются снижением концентрации ряда моноаминов и их метаболитов в периферической крови.

Предложена стратегия экспериментальных исследований нейробиологических эффектов комбинированного воздействия радиационных и гравитационных факторов межпланетного полета в наземных модельных экспериментах на приматах. Сформулирован алгоритм получения экспериментальных данных, необходимых для оценки нарушений операторской деятельности в условиях космического полета, в наземных экспериментах на приматах.

THE PROBLEMS OF THE INVESTIGATION OF RADIATION AND NONRADIATION INTERPLANETARY SPACEFLIGHTS FACTORS INFLUENCE ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM FUNCTIONAL REACTIONS IN GROUND MODEL EXPERIMENTS IN PRIMATES

A.S.Shtemberg, A.G.Belyaeva, O.V.Vasilyeva, Yu.V.Gordeev

Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow, Russia

Abstract

The strategy and methodology of neurobiological effects of interplanetary spaceflight factors experimental investigations in the ground model experiments in primates were observed. The main danger is the galactic space rays – protons of high energies and heavy ions impact that may provoke the astronauts operator performance disturbances and may be dangerous for their life during the spaceflight.

The methodology of the spaceflight factors (SFF) modeling in the ground experiments includes the combination of the longtime gamma-irradiation, heavy ions impact on organism and nonradiation factors that modeling of the changed gravitation effects. The ground experimental models of hypogravitation may be the head-down bed rest or water immersion, the model of hypergravitation (G-force) – the centrifugation. The methodology of the SFF neurobiological effects investigation in primates includes the basic elements of operator performers modeling and the investigation of the central nervous system reactions mechanisms on all their organization levels (from molecular to integrative).

The basic elements of astronauts operator performance were identified and methodological approaches to their modeling in experiments in primates were shown.

In experiments on neurobiological effects of high energy protons and carbon ^{12}C ions impact on rhesus monkey brain it was shown that protons did not provoke significant disturbances of cognitive functions, but the carbon ions impact led to the significant cognitive functions decreasing in monkeys with the weak plasticity of nervous processes (the monkeys with the excitable type of higher nervous activity). At the same time we did not observe significant changes in cognitive functions in monkeys with a strong balanced type of higher nervous activity. These changes were accompanied with the decrease in monoamines and concentrations of their metabolites in peripheral blood.

The strategy of the neurobiological effects of the radiation and gravitation SFF combined impacts in the ground model experiments in primates was proposed. The algorithm of experimental data realization that necessary for the disturbances of operator performance estimation in the interplanetary spaceflight was represented.

Исследование эффектов воздействия космической радиации на функции центральной нервной системы (ЦНС) приобретает особенную актуальность в связи с планированием и подготовкой межпланетных экспедиций. В таких экспедициях, связанных с выходом корабля за пределы магнитосферы Земли, одним из основных лимитирующих возможность их осуществления факторов становится радиационный, который, в сочетании с другими факторами космического полета, может привести к нарушениям функций ЦНС, лежащих в основе операторской деятельности космонавтов. А это, в свою очередь, представляет реальную опасность для выполнения ими полетного задания и самой их жизни. При этом, в отличие от отдаленных стохастических последствий воздействия радиации, эргономический риск, обусловленный возможными нарушениями операторской деятельности

космонавтов, связан с угрозой их жизни непосредственно в процессе полета. Основную опасность представляют галактические космические лучи - протоны высоких энергий и тяжелые ионы, обладающие энергиями в широком диапазоне, вплоть до сверхвысоких энергий порядка 10^{20} МэВ.

Для получения экспериментальных данных, на основании которых можно было бы судить о возможности нарушений операторской деятельности космонавтов в межпланетных экспедициях, а также провести их экстраполяцию на человека и оценить риск этих нарушений в отношении возможных сбоев в выполнении полетного задания необходимо моделирование конкретных видов операторской деятельности и изучение нервных и нейрохимических механизмов изучаемых нарушений. В этом отношении наиболее информативными представляются эксперименты на обезьянах, имитирующие элементы операторской деятельности, в совокупности с изучением нейрохимических механизмов, лежащих в основе этих процессов. Вместе с тем, подобные данные в известной нам литературе отсутствуют.

Можно выделить следующие базовые элементы операторской деятельности космонавта, которые представляется возможным моделировать в экспериментах на приматах:

- Прием информации (формирование перцептивного образа – обнаружение, опознание и различение)
- Характеристики кратковременной (оперативной) и долговременной памяти
- Задачи слежения (класс непрерывных перцептивно-моторных задач операторской деятельности)
- Задачи выбора (выделение релевантного стимула из шумового потока)

Полученные экспериментальные данные позволят сделать выводы об изменении основных характеристик операторской деятельности, таких как быстродействие, надежность и точность.

Ключевым моментом успешного проведения экспериментов является тщательный отбор животных по индивидуальным особенностям высшей нервной деятельности (ВНД) и всесторонний учет данного фактора в процессе проведения эксперимента и анализа полученных экспериментальных данных. В противном случае индивидуальный разброс полученных данных может превысить изменения, связанные с воздействием изучаемого фактора

Можно выделить следующие критерии отбора животных по типологическим и индивидуальным характеристикам ВНД:

- оценка соотношения процессов возбуждения и торможения (выработка дифференцировок, сближение условного и дифференцировочного раздражителей, выработка запаздывающего условного рефлекса (УР), скорость угашения УР, число межсигнальных реакций, частота возникновения гипнотических фаз и др.);
- оценка подвижности нервных процессов (переделка сигнального значения условного и дифференцировочного раздражителей, усложнение дифференцировок при выделении релевантного сигнала из шумового потока и др.);
- оценка соотношения двигательной, исследовательской активности и эмоционально-мотвационных компонентов поведения;
- оценка скорости реакции (при сокращении времени на выполнение задачи);
- оценка устойчивости выработанных форм поведения и невротических компонентов поведения (угашение, мягкие конфликтные ситуации);
- оценка индивидуальных особенностей краткосрочной и долгосрочной памяти;
- оценка индивидуальных функциональных особенностей нейромедиаторных систем и вегетативных процессов экспериментальных животных в сопоставлении с поведенческими характеристиками;
- оценка возбудимости, эмоциональности, соотношения исследовательской активности и пассивно-оборонительного поведения;
- количественная оценка уровня мотивации к используемой в эксперименте игровой и когнитивной деятельности.

Основные трудности моделирования элементов операторской деятельности на обезьянах видятся нам в следующем.

- Сложность создания уровня мотивации, адекватно моделирующего чрезвычайно высокий уровень эмоционального напряжения, характерный для космонавта при возникновении нештатной ситуации. Уровень мотивации обязательно должен оцениваться индивидуально для каждой обезьяны и выражаться количественно.
- Сложность моделирования дозированных движений, характеризующих точность операторской деятельности, что весьма важно в условиях измененной гравитации. Это связано с импульсивностью поведения обезьян, затрудняющей их концентрацию внимания и дозирование движений по силе.

- Длительность экспериментов, моделирующих условия дальних полетов, создает проблему возрастных изменений в поведении обезьян, в особенности в пубертатный период.

В наших экспериментах исследовали нейробиологические эффекты воздействия двух компонентов галактического космического излучения – протонов высокой энергии и ионов углерода ^{12}C в модельных экспериментах на обезьянах.

Опыты проводили на 6 самцах макаков-резусов (Macaca mulatta) в возрасте 4 года массой 5-7 кг: 3 подопытных и 3 контрольных животных.

Предварительно животных обучали по методике психологической тестовой системы (ПТС), разработанной американскими исследователями и модифицированной нами (Washburn at al, 2000; Васильева и др., 2003), имитирующей некоторые элементы операторской деятельности (в частности, задачи слежения), в течение 12 мес. Облучение головы обезьян протонами проводили на установке «Фазотрон» в Объединенном институте ядерных исследований (Дубна). Доза облучения составила 3 Гр, энергия протонов 170 МэВ. После облучения в течение 40 дней исследовали воспроизведение выработанных навыков и дальнейшее обучение. Для нейрохимических исследований у животных брали кровь из локтевой вены под кетаналовым наркозом на следующий день и через месяц после облучения. Через 40 дней проводили облучение головы обезьян ионами ^{12}C на установке «Нуклотрон». Доза облучения составила 1 Гр, энергия 160 МэВ, линейная передача энергии (ЛПЭ) – 0,53 КэВ/микрон. Контрольных животных подвергали тем же воздействиям, что и экспериментальных, кроме облучения. Взятие крови осуществляли через 8 дней и через месяц после второго облучения. Определение концентрации моноаминов и их метаболитов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионопарная хроматография). Для статистической обработки полученных данных нами был применен критерий Колмогорова-Смирнова (Большев, Смирнов, 1983).

Анализ динамики когнитивных процессов у обезьян после воздействия двумя видами ионизирующих излучений показал, что облучение протонами не вызывает их заметных нарушений. Более того, анализ плотности распределения показал, что в экспериментальной группе после облучения протонами у всех обезьян увеличился процент успешно выполненных тестов по сравнению с предрадиационным фоном ($p<0.05$). Эффект улучшения условнорефлекторной деятельности после облучения известен достаточно давно и показан как на крысах (Blair, 1958), так и на обезьянах (Harlow et al, 1956; Riopelle et al, 1956). Причины его до сих пор окончательно не выяснены. Есть предположение, что, с одной стороны, это может

объясняться так называемым эффектом «сужения внимания» - подавлением исполнительных механизмов ориентировочной реакции в ретикулярной формации и таламусе, в результате чего животные меньше отвлекаются на посторонние раздражители; с другой стороны, может иметь место активизация компенсаторных процессов в ЦНС, вызванная облучением на первом этапе лучевой реакции.

В то же время облучение ионами углерода приводило к достоверному снижению когнитивных функций у животных со слабо выраженной пластичностью нервных процессов (обезьян возбудимого типа ВНД), в то время как у обезьяны сильного уравновешенного типа показатели оставались на прежнем уровне (рис. 1).

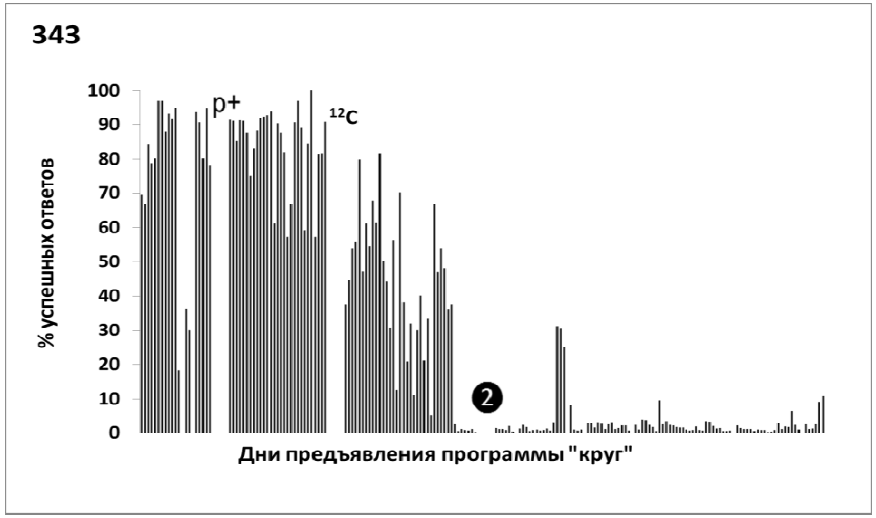


Рис. 1. Показатели когнитивных функций обезьяны возбудимого типа ВНД. P^+ - облучение протонами; ^{12}C – облучение ионами углерода; 2 – переход на новый уровень сложности игровой программы.

При исследовании нейрохимических показателей экспериментальных животных были получены следующие результаты. Через 8 дней после облучения ионами ^{12}C концентрации всех исследованных веществ уменьшались, но достоверные данные были получены лишь по концентрации ГВК, метаболита ДА. По концентрации НА, ДОФУК - другого метаболита ДА и 5-HIAA - метаболита 5-НТ наблюдались выраженные тенденции снижения их концентраций. Через месяц после облучения ионами ^{12}C, также

наблюдалось снижение концентрации всех исследованных веществ. Достоверность изменений достигалась по концентрациям НА и ДОФУК - метаболита ДА. По концентрациям L-ДОФА - предшественника ДА, ГВК - метаболита ДА и 5-HIAA - метаболита 5-НТ наблюдались выраженные тенденции их снижения (рис. 2).

Эти результаты согласуются с полученными нами данными по изменению когнитивных процессов у экспериментальных животных. Как было указано выше, наиболее выраженное снижение правильных реакций мы наблюдали именно после облучения ионами углерода, так что можно предположить, что, действительно, снижение концентрации метаболитов в плазме крови может косвенно свидетельствовать о соответствующем снижении концентрации нейромедиаторов в ключевых структурах мозга.

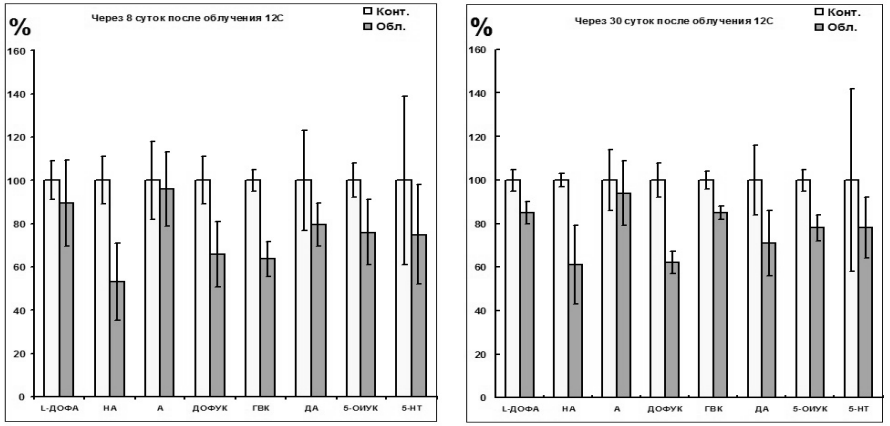


Рис. 2. Содержание моноаминов и их метаболитов в периферической крови обезьян после облучения.

Чрезвычайно важной и, в то же время, наименее исследованной проблемой является изучение нейробиологических эффектов комбинированного действия радиационных и нерадиационных факторов космического полета и, в первую очередь, гравитационных. В настоящее время имеются лишь единичные работы по этой проблеме, выполненные на крысах, данные же, полученные на приматах, совершенно необходимые для экстраполяции их на человека, отсутствуют полностью.

Оптимальной стратегией таких экспериментальных исследований может быть изучение эффектов синхронного воздействия длительного гамма-облучения в сочетании с сеансами облучения тяжелыми ионами, а также

воспроизведением в наземных экспериментальных моделях эффектов гипо- и гипергравитации. В качестве первых могут использоваться модели антиортостатической гипокинезии (АНОГ) и водной иммерсии. В АНОГ обезьяна фиксируется на специальном столе, который затем приводится в наклонное положение (головой обезьяны вниз). В этой экспериментальной ситуации моделируются жесткое ограничение двигательной и мускульной активности, а также перераспределение жидкостей в организме, что является характерными элементами состояния невесомости. В модели водной иммерсии обезьяна в специальном костюме помещается в ванну с водой, подогретой до комфортной температуры; таким образом, снимается опорная нагрузка с конечностей.

Итак, можно предложить следующий алгоритм получения экспериментальных данных, необходимых для оценки нарушений операторской деятельности в условиях космического полета, в наземных экспериментах на приматах:

- учет индивидуальных особенностей ВНД подопытных животных и тщательный их отбор по этому признаку;
- оценка вероятности и характера нарушений ВНД, регистрируемых в эксперименте по методикам, моделирующим различные виды операторской деятельности;
- оценка граничных значений уровня сложности предъявляемых задач, при котором возникают существенные нарушения их выполнения, зависимости характера нарушений от уровня сложности и градация возрастания риска нарушений при повышении сложности задач;
- зависимость характера и вероятности нарушений от характера усложнения предъявляемых задач;
- анализ характера изменения центральных нервных процессов, лежащих в основе наблюдающихся нарушений;
- параллельное экспериментальное изучение и анализ нейрохимических механизмов, лежащих в основе зарегистрированных нарушений, сопоставление их с поведенческими изменениями и поиск корреляций;
- оценка «физиологической цены» моделируемых элементов операторской деятельности;
- экстраполяция полученных данных на человека;
- оценка риска возникновения сбоев операторской деятельности космонавтов при различных сценариях радиационной обстановки в полете и допустимых дозовых нагрузок, обеспечивающих уровни приемлемого риска.

Список литературы

Большев Л.Н., Смирнов Н.В. Таблицы математической статистики. М. Наука. 1983. 417 с.

Васильева ОН., Капустина Е.А., Корольков В.И. Исследование психосоматического состояния обезьян в экстремальных условиях с использованием психомоторной тестовой системы // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2003. Т. 37. № 6. С. 55-63.

Blair W.C. The effects of cranial X-irradiation on maze acquisition in rats. // J. Compar. and Physiol. Psychol. 1958. V. 54. № 2. P. 175-178.

Harlow H.F., Scrier A.M., Simons D.G. Exposure of primates by cosmic radiation above 90000 feet. // J. Compar. and Physiol. Psychol. 1956. V. 49. № 2. P. 195-200.

Riopelle A.J., Gronsky M.A., Ades H.W. Learned performance of monkeys after single and repeated X-irradiation. // J. Compar. and Physiol. Psychol. 1956. V. 49. № 5. P. 521-524.

Washburn D.A., Rumbaugh D.M., Richardson W.K., Gulledge J.P., Shlyk G.G., Vasilieva O.N. PTS performance by flight- and control-group macaques. // J. Gravit. Physiol. 2000. V.7 № 1. P. 89-93.

ВЛИЯНИЕ ОПОРНОЙ РАЗГРУЗКИ НА УСТАНОВКУ ВЗОРА У ОБЕЗЬЯН

Миллер Н.В., Зобова Л.Н., Гордеев Ю.В., Бадаква А.М.

Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН.

THE EFFECT OF SUPPORT DISCHARGE ON GAZE FIXATION IN MONKEYS

N.V. Miller, L.N. Zobova, Y.V. Gordeev, A.M. Badakva

State Research Center of the Russian Federation - Institute for Biomedical Problems

Abstract

The gaze fixation reaction was studied in rhesus monkeys before and during thermoneutral (35◦C) water immersion to the mid-chest level (3 animals) and to the neck level (2 animals). Both the eye saccade amplitude and the angular vestibulo-ocular reflex gain increased whereas the head angular velocity decreased

significantly in 3 monkeys in 5 h after the start of immersion to the mid-chest level. Changes of the head movements characteristics and of the angular vestibulo-ocular reflex gain were more pronounced in monkeys in 5 h after the start of immersion to the neck level. These alterations of characteristics of eye-head coordination are similar to that observed in monkeys in space flights. Similarities of effects of immersions and space flights allow supposing that the support withdrawal contributes to the alterations of vestibular functions in microgravity.

Координация движений глаз и головы во время перевода взора на боковые мишени (реакция установки взора, РУВ) была исследована у обезьян в проекте БИОН [1]. Точность и быстрота фиксации взора на мишени зависит от взаимодействия трех компонентов: саккады глаз к мишени, движения головы в том же направлении и компенсаторного противовращения глаз, осуществляемого вестибуло-окулярным рефлексом (ВОР) [2]. В первые дни полета смещение взора на боковые мишени становилось гиперметричным, а амплитуда движения головы уменьшалась. Эти изменения сопровождались увеличением коэффициента ВОР (Квор) [3,4]. Увеличение Квор во времени было тесно связано с увеличением ответа нейронов вестибулярных ядер на стимуляцию каналов [5].

Однако подобные изменения в РУВ были получены в иммерсионных исследованиях у человека [6]. Поскольку гравитационное воздействие на вестибулярный аппарат оставалось неизменным в этих экспериментах, то возможной причиной влияния иммерсии на РУВ могли быть изменения в активности проприоцептивных входов. Из этого следует, что повышенная вестибулярная возбудимость в начальный период микрогравитации может быть связана с ослаблением тормозного тонического афферентного влияния опоры и мышц [7].

Целью наших экспериментов [8,9,10] являлось исследование влияния опорной разгрузки во время водной иммерсии по уровень грудины и по уровень шеи на характеристики РУВ у обезьян для оценки возможного вклада устранения опоры в изменение вестибулярной функции в микрогравитации.

МЕТОДИКА

Исследование проведено на пяти обезьянах - самцах (Macaca mulatta) весом 5-6 кг. Хирургическая подготовка включала: (1) установку на черепе животного акрилового кольца, на котором крепились предусилитель и защитный колпак с датчиком угловой скорости головы (фирма Watson); (2) битемпоральное вживление электродов для регистрации электро-

окулограммы (ЭОГ). Все хирургические и экспериментальные процедуры были рассмотрены и одобрены Биоэтической комиссией ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Обезьян (А, Б, В, Г и Д) предварительно обучали выполнению условно-рефлекторной моторной задачи [11]. Животное должно было гасить нажатием пальца руки световые стимулы (1°), расположенные на горизонтальной полукружной панели (R=24 см) на расстоянии 25 см от глаз животного. После гашения центрального (триггерного) стимула в случайном порядке зажигался один из боковых световых стимулов (± 18° или ± 36°) в виде положительного или дифференцировочного (отрицательного) сигнала на время, не большее 1 с. Гашение положительного сигнала подкреплялось дозой сока из штуцера, отрицательного - штрафовалось задержкой предъявления стимулов.

В первой серии экспериментов животное, посаженное в специальное кресло, выполняло тест РУВ до (в пустой ванне), через 2 ч и 5 ч после начала термонейтральной (35° С) водной иммерсии по уровень грудины. Во время иммерсии руки обезьяны были свободны и отделены от поверхности воды горизонтальной пластиной, что давало возможность не прерывать иммерсию для выполнения животным теста РУВ. Обезьяны подвергались иммерсионному воздействию 1 раз в неделю: обезьяна А - 3 раза, Б – 4 раза и В – 2 раза. Данные иммерсий каждого животного объединяли.

Дополнительно на обезьянах В и Г были проведены контрольные тестирования РУВ в пустой ванне (до и через 5 ч сидения в специальном кресле). Кроме того, на обезьянах В и Д было проведено тестирование пассивного ВОР (до и через 5 ч иммерсии по уровень грудины) с помощью ступенчатого изменения скорости поворота головы [12]. В последнем случае после калибровки ЭОГ в темноте глаза животного закрывали светонепроницаемой повязкой и фиксировали голову обезьяны в устройстве кресла. Кресло закрепляли на платформе поворотного стола и подвергали животное кратковременным (менее 1 с) вращениям относительно вертикальной оси со скоростью 120-140°/с, вызывая горизонтальный вестибулярный нистагм. Ступеньку скорости вращения создавали вручную при отпускании груза массой 10 кг, поворачивающего кресло с обезьяной с ускорением около 800°/с^2 в течение 0,16 с. Торможение кресла после поворота на 100° обеспечивалось упругим амортизатором. Количество поворотов было не менее 30. Выбор направления вращения осуществлялся в случайном порядке.

Во второй серии экспериментов обезьяны Г и Д дважды (с интервалом 2 недели) выполняла тест РУВ до и через 5 ч иммерсии по уровень шеи. Для

выполнения теста в последнем случае воду в ванне спускали чуть ниже разделительной пластины (до уровня грудины животного). Калибровку ЭОГ проводили при каждом тестировании РУВ, используя только те движения глаз при переводе взора на мишени ± 18°, при которых голова не двигалась.

Регистрируемые сигналы ЭОГ, скорости поворота головы и метки событий оцифровывали с частотой 500 Гц и сохраняли в памяти РС. При просмотре данных на экране дисплея в интерактивном режиме определяли начало саккады глаз и вычисляли латентный период саккады глаз и время реакции (период от начала саккады глаз до момента гашения боковой мишени). Вычисляли кривые скоростей движения глаз и головы, позиций глаз и головы с шагом 10 мс и объединяли их в единый массив для мишеней ± 36°, синхронизируя данные по началу саккады глаз. Определяли максимальную скорость и амплитуду саккады глаз, максимальную скорость поворота головы и вычисляли значение Квор как отношение скорости глаз к скорости поворота головы на участке противовращения глаз длительностью 30 мс. При тестировании пассивного ВОР значения Квор вычисляли во время медленной фазы первой выраженной волны нистагма для каждого вращения.

Для статистической обработки отбирали кривые, не имеющие выраженных (>20°/с) движений глаз и головы в период между зажиганием боковой мишени и началом саккады глаз. Вычисляли средние по массиву данных значения показателей и их стандартные отклонения. Достоверность анализируемых различий оценивали с помощью параметрического t – критерия Стьюдента (с поправкой Бонферрони для множественных сравнений), принимая критический уровень достоверности равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Пятичасовая иммерсия по уровень грудины у обезьян А, Б и В. У обезьяны А амплитуда саккады глаз увеличилась через 2 ч и 5 ч иммерсии (на 14,3 % и 13,0 %), а у обезьян Б и В - лишь через 5 ч иммерсии (на 12,0 % и на 8,7 %, соответственно). Эти изменения определялись главным образом увеличением максимальной скорости саккады глаз в соответствующее время: у обезьяны А – на 12,9 % и 11,4 %; у обезьяны Б – на 8,8 %. У обезьяны В увеличение амплитуды саккады глаз было связано в большей мере с увеличением длительности сакады глаз. У всех трех обезьян через 5 ч иммерсии величина Квор увеличивалась (на 6,5% - у обезьяны А; на 6,9 % - у обезьяны Б; на 5,5% - у обезьяны В). Чрезвычайно выраженным было снижение максимальной скорости поворота головы к 5 ч иммерсии (на 19,2% - у обезьяны А; на 19,0% - у обезьяны Б; на 27,7% - у обезьяны В).

2. Пятичасовое пребывание в пустой иммерсионной ванне у обезьян В и Г. Контрольное тестирование РУВ в пустой ванне у обезьян В и Г не обнаружило достоверных изменений ни одного из анализируемых параметров, что свидетельствует об отсутствии влияния гипокинезии, сопутствующей иммерсии, на характеристики РУВ.

3. Тестирование пассивного Квор у обезьян В и Д. После 5 ч иммерсии по уровень грудины коэффициент пассивного ВОР у обезьян В и Д не изменился (1,03 ± 0,15, в сравнении с контрольным значением 1,03 ± 0,14, и 0,97 ± 0,13, в сравнении с контрольным значением 0,96 ± 0,15, соответственно), также как не изменялся он и под действием микрогравитации [4].

4. Пятичасовая иммерсия по уровень шеи у обезьян Г и Д. У обезьяны Г максимальная скорость саккады глаз увеличивалась вследствие первой иммерсии на 8,2 % (от 616 ± 66 град/с в контроле до 667 ± 81 град/с; $p < 0,05$) и на 5,8 % (до 652 ± 57 град/с; $p < 0,01$) – вследствие второй иммерсии. У обезьяны Д увеличение максимальной скорости саккады глаз составляло 2,8 % (от 717 ± 77 град/с в контроле до 737 ± 85 град/с; $p < 0,05$) после первой иммерсии и 10,3 % (до 791 ± 145 град/с; $p < 0,001$) после второй иммерсии. Амплитуда саккады глаз у обезьяны Г возросла на 11,0 % (от 27,4 ± 3,0 град в контроле до 30,4 ± 3,7 град; $p < 0,001$) после первой иммерсии и на 10,7 % (до 30,3 ± 3,2 град; $p < 0,001$) – после второй иммерсии. У обезьяны Д увеличение амплитуды саккады глаз было достоверно только после второй иммерсии – на 9 % (от 28,7 ± 4,2 град в контроле до 31,3 ± 7,4 град; $p < 0,001$).

Максимальная скорость поворота головы у обезьяны Г уменьшилась вследствие первой иммерсии на 17,0 % (от 80,8 ± 14,1 град/с в контроле до 67,1 ± 20,3 град/с; $p < 0,01$) и на 51,9 % (до 38,9 ± 21,7 град/с) - вследствие второй иммерсии ($p < 0,001$ при сравнении как с контролем, так и с первой иммерсией). У обезьяны Д уменьшение максимальной скорости поворота головы составило 9,0 % (от 100,2 ± 35,5 град/с в контроле до 91,2 ± 34,3 град/с; $p < 0,05$) после первой иммерсии и 49,5% (до 50,6 ± 24,4 град/с) после второй иммерсии ($p < 0,001$ при сравнении как с контролем, так и с первой иммерсией).

Абсолютное значение Квор у обезьяны Г увеличилось на 12,7 % (с 0,99 ± 0,13 в контроле до 1,11 ± 0,28; $p < 0,001$) после первой иммерсии и на 18,2 % (до 1,16 ± 0,38; $p < 0,001$) – после второй. У обезьяны Д абсолютное значение Квор увеличилось на 14,0 % (с 1,05 ± 0,20 в контроле до 1,20 ± 0,42; $p < 0,001$) после первой иммерсии и на 28,8 % (до 1,36 ± 0,47; $p < 0,001$) - после второй иммерсии.

Значительное снижение максимума скорости поворота головы во время второй иммерсии сопровождалось возникновением новой стратегии движения головы у обеих обезьян. У обезьяны Г наряду с привычным, как в контроле, одноволновым профилем (тип 1 – 43 %), наблюдался двухволновый профиль скорости поворота головы (тип 2 - 57%): после первой волны ускорения и торможения голова практически останавливалась, после чего возникало повторное движение головы в сторону мишени. У обезьяны Д движения головы и саккады глаз как в контроле, так и в конце первой иммерсии начинались одновременно: латентные периоды движения головы и саккады глаз в контроле составляли 125±30 мс и 125±26 мс, соответственно, и не изменились к концу первой иммерсии. Однако к концу второй иммерсии движение головы начиналось существенно раньше, чем в контроле (латентный период движения головы снижался до 98 ± 46 мс; $p < 0,001$), тогда как глаза начинали двигаться существенно позже, чем в контроле (латентный период саккады глаз увеличивался до 172 ± 44 мс; $p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования влияния опорной депривации во время водной иммерсии по уровень грудины и по уровень шеи на характеристики РУВ у обезьян показали, что:

несмотря на индивидуальные различия в выраженности изменений различных характеристик РУВ в течение иммерсии по уровень грудины, у всех трех обезьян через 5 ч после начала иммерсии амплитуда саккады глаз и абсолютное значение Квор увеличились, а максимальная скорость поворота головы уменьшилась;

постепенное развитие изменений характеристик РУВ в условиях иммерсии исключает связь наблюдаемых результатов с различием в биомеханических условиях выполняемой задачи или с перераспределением жидких сред организма;

изменения характеристик РУВ не связаны с сопутствующей иммерсии гипокинезией;

влияние иммерсии на Квор во время РУВ определяется не прямым воздействием на нейрональную дугу ВОР, а опосредуется изменениями, возникающими в системе управления взором в условиях измененного проприоцептивного входа;

изменения максимальной скорости поворота головы и абсолютного значения Квор при погружении обезьян Г и Д по уровень шеи наиболее

выразительно демонстрируют влияние увеличения степени опорной депривации на организацию РУВ;

снижение скорости поворота головы под воздействием второй иммерсии по уровень шеи сопровождалось у обеих обезьян изменением организации движения головы во время установки взора: появлением двухволнового профиля скорости поворота головы у одного животного и значительным опережением начала движения головы саккады глаз у другого;

большая степень опорной разгрузки вызывает более выраженные изменения в центральном программировании координации движений глаз и головы при управлении взором.

ВЫВОДЫ

Изменения характеристик координации движения глаз и головы при выполнении РУВ у обезьян под воздействием опорной разгрузки во время водной иммерсии по уровень грудины и по уровень шеи были подобны обнаруженным у обезьян в космических полетах. Подобие эффектов иммерсий и космических полетов позволяет предполагать, что устранение опоры вносит свой вклад в изменения вестибулярной функции в микрогравитации.

Список литературы

1. Kozlovskaya I.B., et al. BION 11 science objectives and results. J. Grav. Physiol. 7(1), S19 – S25, 2000.
2. Bizzi E., Kalil R.E., Morasso P. Two modes of eye-head coordination in monkeys. Brain Res. 40, 45-48, 1972.
3. Kozlovskaya I.B., et al. Human and animal results on vestibular research in space – VERIS, in: Proceedings of the Fourth European Symposium on Life Sciences Research in Space, held in Trieste, Italy, from 28 May to 1 June 1990 (ESA SP-307, November 1990), pp. 353-357, 1990.
4. Cohen B., et al. Vestibular experiments in space. Advances in Space Biology and Medicine. Vol. 10. Experimentation with animal models in space. Sonnenfeld G. (ed.). Elsevier B.V., 105-164, 2005.
5. Sirota M.G., et al. Neuronal activity of nucleus vestibularis during coordinated movement of eyes and head in microgravitation.. The Physiologist. 31(1), S8-S9, 1988.
6. Barmin V.A., et al. Influence of optokinetic stimulation and immersion on eye-head coordination in man. The Physiologist. 26(6), S83-S85, 1983.
7. Kozlovskaya I.B., et al. The effects of real and microgravity on vestibulo-oculomotor interaction. The Physiologist. 28(6), S51 – S56 1985.

8. Badakva A.M., Miller N.V., Eron J.N. Effect of head-out water immersion on eye-head coordination in rhesus monkeys. J. Grav. Physiol. 10(1), P5-P8, 2003.
9. Eron J.N., Miller N.V., Badakva A.M. Changes in the gaze fixation reaction in rhesus monkeys during the initial stage of water immersion. J.Grav. Physiol. 11(2), P31-P32, 2004.
10. Badakva A.M., Miller N.V., Zobova L.N. The possible contribution of the support withdrawal to the alterations of vestibular function in microgravity. J.Grav.Physiol. (this issue).
11. Shlyk G.G., et al. General and special training of rhesus monkeys flown on BION biosatellites. J.Grav.Physiol. 7(1), S75-S80, 2000.
12. Minor L.B., et al. Horizontal vestibuloocular reflex evoked by high – acceleration rotations in the squirrel monkey. I. Normal responses. J. Neurophysiol. 82(3), 1254 – 1270, 1999.

ОЦЕНКА ХАРАКТЕРА ФОРМИРОВАНИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ МОТИВАЦИИ У ОБЕЗЬЯН (*MACACA MULATTA*) ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ СОДЕРЖАНИИ

Шмалий А.В.[1], Павлова Л.Е.[1], Колик Л.Г.[2], Коваленко В.В.[3], Середенин С.Б.[2], Лапин Б.А.[1]

[1]ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии», г. Сочи, Россия;

[2]ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва, Россия;

[3]ФГБОУ ВО «Сочинский государственный университет», г. Сочи, Россия;

Резюме

В настоящей работе проведена оценка влияния средовых факторов (вкусовых добавок, концентрации этанола, алкогольной депривации, пищевого подкрепления и продолжительности доступа к раствору этанола) на процесс формирования алкогольной мотивации у обезьян (*Macaca mulatta*) при индивидуальном содержании. На этапе инициации формирования алкогольной мотивации (сессии 1-160) половозрелым самцам (n=6) предоставляли ограниченный доступ 1ч/сутки к раствору этанола (1.0–6.0об.%) с добавлением подсластителей, лишали доступа к этанолу и использовали разные режимы пищевого подкрепления. Показано, что обезьяны отдавали предпочтение 4%-раствору этанола с добавкой «мультифрукт», демонстрировали выраженные индивидуальные различия в потреблении этанола как при отсутствии пищевого подкрепления (от

0.09±0.01 до 0.55±0.13 г/кг), так и при его наличии (от 0.26±0.9 до 1.2±0.15 г/кг), при этом при неограниченном доступе к стандартному корму отмечалось усилению алкогольной мотивации ($p<0.0001$). Повторные алкогольные депривации не влияли на потребление раствора этанола. На последующем этапе формирования устойчивой алкогольной мотивации (сессии 161-366) обезьяны получали 4%-раствор этанола без подсластителя 24 ч/сутки, что способствовало увеличению потребления этанола до 1.2059±0.049 г/кг ($p=0.0003$).Полученные данные позволяют сделать заключение о влиянии концентрации этанол-содержащего раствора, пищевого подкрепления и продолжительности доступа к раствору на формирование устойчивой алкогольной мотивации у обезьян.

ASSESSMENT OF ALCOHOL-SEEKING BEHAVIOR DEVELOPMENT IN INDIVIDUALLY HOUSED RHESUS MACAQUES

Shmaliy A.V.[1], Pavlova L.E.[1], Kolik L.G.[2], Kovalenko V.V.[3], Seredenin S.B.[2], Lapin B.A.[1]

[1]FSBSI "Research Institute of Medical Primatology", Sochi; Russia

[2]FSBI "V.V.Zakusov Research Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

[3]FSBEI HE "Sochi State University", Sochi, Russia

Abstract

The aim of the present work was to assess the effects of several factors (flavorings, ethanol concentration, alcohol deprivation, food reinforcement and access duration to alcohol) on the induction of alcohol-seeking behavior in individually housed rhesus macaques (*Macaca mulatta*).

At the first stage of alcohol-seeking behavior initiation (sessions 1-160), 6 sexually mature male rhesus macaques were given 1-hr daily limited access to an ethanol solution (1.0 - 6.0%, w/w) sweetened with fruit additives, deprived of access to water and used food reinforcement.

It was shown that monkeys preferred 4% ethanol solution with "multifruit" supplement. Free food access increased alcohol consumption ($p<0.0001$), while repeated alcohol deprivations had no effects on alcohol intake escalation. There were strong individual differences among rhesus macaques in alcohol behavior regardless of food deprivation (0.09±0.01 to 0.55±0.13 g/kg) or food reinforcement (0.26±0.9 to 1.2±0.15 g/kg). At the same time free food access to standard diet the alcohol motivation has increased ($p<0.0001$).

At the next stage of experiment to develop a stable alcoholic motivation (sessions 161-366) monkeys were given unlimited 24h/day free choice between water and ethanol 4% w/w unsweetened solution in two-bottle paradigm with free access to standard feed which increased alcohol intake up to 1.2059±0.049 g/kg (p=0.0003).

These data allow us to conclude that the ethanol solution concentration, food reinforcement and ethanol access duration play pivotal role on alcohol-seeking behavior development of individually housed rhesus macaques.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения алкоголь является пятым фактором риска в мире, способным вызвать инвалидность и преждевременную смерть. Этанол оказывает негативное воздействие на все органы и системы человеческого организма и ежегодно приводит к преждевременной смерти около полумиллиона человек в России.

В нашей стране была разработана Концепция реализации государственной политики по снижению масштабов злоупотребления алкоголем и профилактике алкоголизма среди населения Российской Федерации на период до 2020 года (распоряжение Правительства РФ от 30.12.2009 № 2128-р) [1]. В результате реализации приоритетных задач Концепции с 2009 по 2014 гг. потребление алкоголя в Российской Федерации снизилось с 16,8 до 13,6 литров в год на лиц старше 15 лет. Доля крепкой алкогольной продукции в потреблении алкоголя с 2011 по 2014 гг. снизилась с 66 % до 60 %, однако, к сожалению, остается аномально высокой по мировым меркам.

Все вышесказанное определяет актуальность поиска биологических механизмов формирования аддиктивных состояний, обусловленных действием алкоголя, новых терапевтических стратегий и эффективных фармакологических мишеней для направленного воздействия на все звенья алкогольной зависимости. Центральным звеном в системе доклинического поиска эффективных средств для фармакологической коррекции нарушений, вызываемых хроническим воздействием алкоголя, должна стать батарея экспериментальных моделей, воспроизводящих действие различных средовых и генетических факторов, участвующих в формировании алкоголизма у человека. Большинство лабораторных исследований нейробиологических и поведенческих механизмов употребления этанола были проведены на грызунах [2,3]. Однако, существует комплекс сложных поведенческих и социальных расстройств личности, вызванных употреблением алкоголя, полный комплекс которых невозможно исследовать

у ряда животных моделей в силу ограниченного диапазона поведения, более упрощенной нервной системы, отсутствия долгосрочных социальных отношений и сложного комплекса социальной иерархии.

Использование приматов в исследованиях по влиянию алкоголя имеет относительно недавнюю историю. Результаты первых исследований были опубликованы в 1968 году [4]. Основными направлениями исследований на приматах являются: моделирование стабильного добровольного потребления этанола на приматах, воспроизведение патологических процессов, возникающих вследствие хронического употребления алкоголя, изучение факторов риска развития алкогольной зависимости и, наконец, поиск новых путей фармакологической коррекции алкоголизма.

В 80-90-х годах прошлого столетия в Научно-исследовательском институте экспериментальной патологии и терапии АМН СССР (г. Сухуми) было проведено исследование по изучению изменения поведения и функции нейрогормональных систем у обезьян при действии эмоционально-стрессорных раздражителей, алкоголя и их комбинации. Исследование проводилось на самцах павианах гамадрилах и самцах макаках резусах. В этом эксперименте моделировалась острая алкогольная интоксикация различной степени тяжести, полученная путем внутривенного или внутрижелудочного введения водного раствора этанола соответственно 33 % и 40% в дозах от 0,2 до 4,0 г/кг. Моделирование хронической алкогольной интоксикации проводилось с помощью полупринудительной алкоголизации самцов макаков резусов 15% раствором этанола непрерывно на протяжении 3-х лет [5,6].

В настоящее время при моделировании алкогольной зависимости на приматах используются методы, приводящие к стабильному добровольному потреблению раствора этанола. Методами индукции потребления этанола являются: ограничение доступа к раствору и питанию либо комбинация приема этанола с пищей, использование подсластителя в растворе, изолированное содержание, постепенное увеличение содержания этанола в растворе. Для формирования физической зависимости от этанола предоставляется неограниченный доступ к алкоголю в условиях свободного выбора между этанолом и водой. Попытка воспроизведения описанной в зарубежной литературе модели не привела к желаемому результату. Поэтому целью настоящего исследования стало создание отечественной модели для оценки влияния средовых факторов на формирование алкогольной мотивации у макаков резусов.

Нами разработана новая трансляционной модель алкогольной зависимости у макак резусов, основанная на добровольном потреблении

раствора этанола, которая позволит в дальнейшем применять данную методику для изучения фундаментальных аспектов развития алкогольной зависимости, включая использование новых молекулярно-генетических подходов к изучению аддиктивных состояний, моделирование особенностей функционирования нейрональных сетей в головном мозге при хроническом действии алкоголя с помощью современных методов нейровизуализации, изучение влияния социальных факторов на формирование и поддержание алкогольной мотивации, а также исследование новых биомаркеров и молекулярных мишеней для определения вектора поиска новых средств для эффективного воздействия на негативные последствия хронической алкогольной зависимости.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили 6 клинически здоровых молодых половозрелых самцов макаков резусов (*Macaca mulatta*) в возрасте 6-9 лет, содержащихся в питомнике ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии» (ФГБНУ «НИИ МП») г. Сочи.

Самцы макаков резусов были отсажены в индивидуальные метаболические клетки (56х55х80см) в изолированную комнату с контролируемым освещением (с 6-00 до 18-00 ч), температурой воздуха (от 20-25^0 С) и возможностью прекращения подачи питьевой воды. До проведения экспериментов животные проходили курс адаптации к условиям пребывания в индивидуальных метаболических клетках и потреблению жидкости из индивидуальной поилки. Обезьяны получали сбалансированное питание в виде стандартного гранулированного корма, изготовленного в ФГБНУ «НИИ МП», а так же дополнительно хлеб, яйца, свежие овощи, фрукты. Раствор этанола подавался через сконструированные индивидуальные поилки, предотвращающие пролив жидкости.

Методика формирования алкогольной мотивации обезьян основана на модифицированной методике, предложенной S.N. Katner с соавторами в 2004 году [7, 8]. На этапе инициации формирования алкогольной мотивации за 1 час до начала эксперимента животным прекращалась подача воды и пищи (сессия 1-99). С сессии 100 по 366 животных не ограничивали в приеме пищи на фоне употребления раствора этанола. В 10.00 в поилки помещался раствор этанола и предоставлялся животным на 60 мин с сессии 1 по 160, с ограничением по объему выпитого до 53 сессии, далее - без ограничений (ad libitum) (табл.1). После 60 минут доступа к этанолу регистрировали количество выпитого раствора, животных кормили и восстанавливали подачу воды. Продолжительность подачи раствора – 5 дней в неделю, с

понедельника по пятницу. Употребление этанола индуцировали путем постепенного увеличения концентрации (%) и лимита этанола (с 0,5 г/кг до 2 г/кг массы тела животного) в ароматизированном подслащенном растворе (с 1 по 160 сессии). В качестве подсластителя был использован пищевой концентрат «Yupi»: апельсин, персик, вишня, мультифрукт. Для дополнительной оценки уровня алкогольной мотивации животных лишали доступа к этанолу в течение 7-ми суток между сессиями 31/32, 62/63 и на 14 суток между сессиями 117/118, 299/300 (табл. 1).

На этапе формирования устойчивой алкогольной мотивации (сессии 161-366) животным предоставляли свободный выбор между водой и раствором этанола без подсластителя 24 ч/сутки без ограничения доступа к стандартному корму, ежедневно в 10.00 регистрируя количество выпитого раствора. Исследование было одобрено Комиссией по этике ФГБНУ «НИИ МП».

Согласно схеме эксперимента (табл.1), рассчитывали среднесуточное потребление этанола для каждого животного (в г/кг массы тела в пересчете на чистый этанол). Полученные результаты обрабатывали статистически. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как все анализируемые переменные имели распределение близкое к нормальному, то статистическую значимость различий определяли с помощью дисперсионного анализа повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Дункану. Полученные результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Критический уровень значимости α=0.05.

Таблица 1

Схема инициации и формирования алкогольной мотивации

№ блока сессии	Сессии	Концентрация этанола в растворе (%)	Дни	Лимит этанола (г/кг массы тела)	Длительность доступа к раствору (часы)
1.	1-6	1	6	0,5	1
2.	7-11	2	5	0,5	1
3.	12-16	4	5	0,5	1
4.	17-21	4	5	1	1
5.	22-26	6	5	1	1
6.	27-31	6	5	1,5	1
	Алкогольная депривация		7	-	
7.	32-36	6	5	1,5	1
8.	37-51	6	15	2	1
9.	52-62	4	11	ad libitum	1
	Алкогольная депривация		7	-	
10.	63-67	4	5	ad libitum	1
11.	68-99	4	32	ad libitum	1
12	100-117*	4	18	ad libitum	1
	Алкогольная депривация		14	-	
13.	118-122*	4	5	ad libitum	1
14.	123-160*	4	38	ad libitum	1
15.	161-299*#	4	139	ad libitum	24
	Алкогольная депривация		14	-	
16.	300-304*#	4	5	ad libitum	24
17.	305-366*#	4	62	ad libitum	24

* - без ограничения доступа к пище

\# - без подсластителя

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая работа посвящена оценке влияния различных факторов на формирование алкогольного поведения у индивидуально содержащихся самцов макаков резусов.

На рис. 1 представлен график потребления раствора этанола макаками резус в течение 366-ти экспериментальных сессий.

1. Влияние вкусовых добавок на потребление раствора этанола.

На этапе инициации формирования алкогольной мотивации в качестве подсластителя использовали: сухой быстрорастворимый пищевой концентрат «Yupi»: апельсин, персик, вишня, мультифрукт. Полученные нами данные показали, что все экспериментальные животные имели индивидуальные

вкусовые предпочтения (рис. 2). Однако, подавляющее большинство животных преимущественно употребляло сухой быстрорастворимый пищевой концентрат «Yupi» со вкусом «мультифрукт» (рис. 2). По этой причине именно он в дальнейшем использовался в эксперименте в качестве подсластителя. Полученные данные свидетельствуют о наличии индивидуальных вкусовых предпочтений макаков резусов, также как у человека.

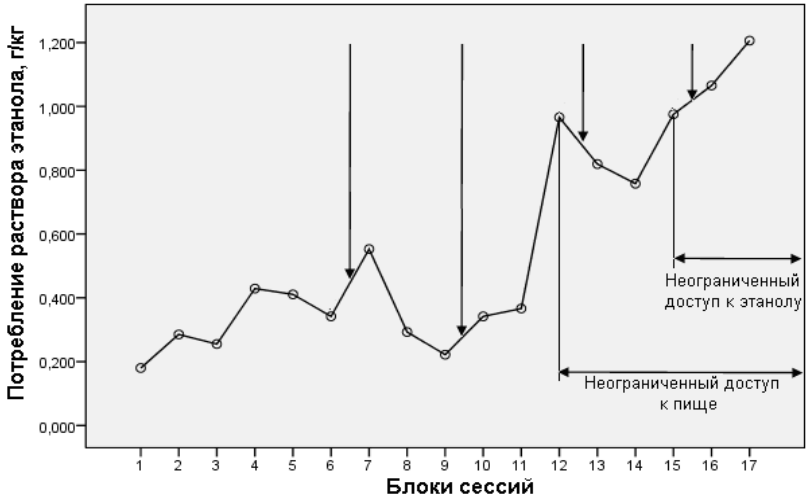
2. Влияние концентрации раствора этанола на формирование алкогольной мотивации

Для инициации алкогольной мотивации макакам резусам сначала был предоставлен ароматизированный 1% раствор этанола, который в последующем заменен на 2% раствор (рис.1). При постепенном увеличении содержания этанола до 4% и 6% среднесуточное потребление раствора у опытных обезьян статистически значимо повышалось (4% раствор - 0.429±0.034 г/кг и 6% раствор – 0.4108±0.017 г/кг, p=0.001) по сравнению с начальным уровнем (1% раствор, 0.1800±0.012 г/кг). С 27-й по 31-ю сессии отмечалось снижение среднесуточного потребления 6% раствора этанола до 0.3418±0.022 г/кг. Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных установлено, что 4% раствор этанола является оптимальным для индукции формирования алкогольной мотивации у макаков резусов, что согласуется с работами других авторов [7].

3. Влияние алкогольной депривации на последующее потребление раствора этанола.

Ранее было показано, что повторяющиеся циклы алкогольная интоксикация/депривация приводят к постепенной эскалации добровольного потребления и предпочтения алкоголя у аутбредных крыс, достигая уровня 5-6 г/кг/24 ч и фармакологически значимого содержания алкоголя в крови [9, 10]. В связи с этим была предпринята попытка оценить влияние алкогольной депривации на потребление этанола у макаков резусов.

При первом лишении животных доступа к этанолу в течение 7 суток между сессиями 31/32 наблюдалось резкое увеличение потребления раствора этанола (6%, 0.5528±0.127 г/кг) по сравнению с начальным уровнем (1%, 0.1800±0.012 г/кг) и потреблением раствора до первой алкогольной депривации (6%, 0.3418±0.022 г/кг) (рис. 1). Наблюдавшееся резкое увеличение потребления раствора этанола после его первой 7-дневной депривации напоминает алкоголь-депривационный эффект, возникающий у грызунов и соответствует данным Sinclair J.D., полученным на самцах макаках резусах после 22-х дней экспозиции с этанолом [11].



Этанол,%	1	2	4	4	6	6	6	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Лимит этанола, г/кг	0,5	0,5	0,5	1	1	1,5	1,5	2	a.l.	a.l.	a.l.	a.l.	a.l.	a.l.	a.l.	a.l.	a.l.

Рис.1. Динамика потребления раствора этанола макаками резус. Данные представлены в виде средних значений (n=6).

a.l. – ad libitum

Стрелками обозначены периоды алкогольной депривации в соответствии с дизайном исследования.

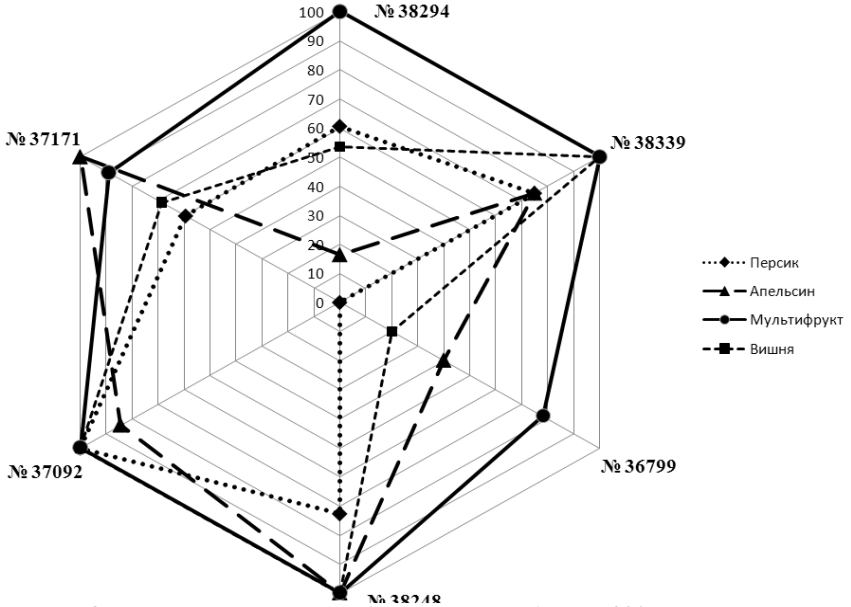


Рис. 2. Влияние вкусовых добавок на потребление 2% раствора этанола.

Последующий анализ паттерна алкогольного поведения животных свидетельствовал об ослаблении влечения к этанолу и снижении потребления до уровня начальных значений как 6% (6%, 0.2929±0.027 г/кг), так и 4% раствора (4%, 0.2219±0.040 г/кг). Повторное лишение животных доступа к алкоголю (между сессиями 62/63) не влияло статистически значимо на характер потребления этанола (4%, 0.3418±0.051 г/кг). Увеличение продолжительности алкогольной депривации до 14 дней между сессиями 117/118 и 299/300 так же существенно не влияло на их влечении к этанолу (4%,0.8192±0.069 г/кг, 1,065±0.292 г/кг), перед проводимой депривацией (4%, 0.9656±0.48 г/кг, 0.9753±0.317 г/кг соответственно), то есть при повторном лишении обезьян доступа к этанолу развития алкоголь-депривационного эффекта не наблюдалось.

Как известно, подкрепляющие свойства этанола у макаков резусов проявляются в виде восстановления и/или временного увеличения потребления этанола после его отмены, когда влечение к алкоголю становится неконтролируемым, отражая формирование побудительной мотивации. Выявленные особенности алкогольного поведения на макаках резусах коррелируют с характером потребления 4.5% раствора этанола на фоне повторных алкогольных депривaций у взрослых крыс Sprague Dawley [12].

4. Влияние пищевого подкрепления на потребление раствора этанола.

Предоставление животным свободного доступа к 4% раствору этанола одновременно со стандартным кормом (сессия 100-117) способствовало резкому увеличению потребления 4% раствора (4%, 0.9656±0.48 г/кг, p=0.00003) по сравнению со среднесуточным потреблением раствора этанола той же концентрации во время 63-99 сессий (4%, 0.3664±0.023 г/кг,) и начальным уровнем потребления (1%, 0.1800±0.012 г/кг, p=0.00001).

5. Влияние продолжительности доступа к раствору на развитие устойчивой алкогольной мотивации.

При условиях свободного выбора между этанолом и водой, отсутствия подсластителя и неограниченного доступа к раствору этанола 24 ч/сутки, с сессии 161 по 366, происходило резкое увеличение среднесуточного употребление раствора (4%, 1.2059±0.049 г/кг, p=0.0003) по сравнению с сессиями с ограниченным доступом (4%, 0.7577±0.029 г/кг). По данным литературы, стабильное добровольное потребление раствора этанола приматами менее 1.0 г/кг рассматривается как легкое потребление этанола, свыше 3 г/к г– тяжелое потребление. Все прочее – умеренное потребление [13].

Многочисленные работы по изучению алкогольного поведения у приматов позволили выявить четкие параллели с формированием алкогольной мотивации и развитием зависимости у человека. При моделировании алкоголизма у приматов установлены индивидуальные особенности в потреблении алкоголя. Так, у яванских макак (*Macaca fascicularis*) различия в предпочтении этанола проявлялись уже после 10 дней потребления алкоголя, а через 3 месяца среднесуточное потребление этанола колебалось в пределах от 0.6 до 4.0 г/кг [14], что соотносится с данными, полученными в нашем эксперименте. Для воссоздания модели алкогольной зависимости была использована с модификациями методика, предложенная S.N. Katner [7] и основанная на использовании вкусовых добавок для индукции алкогольной мотивации, согласно которой потребление раствора этанола у животных колебалось в пределах 0.8-3.0 г/кг, что сопоставимо с полученными в нашем эксперименте результатами 0.8-9.04 г/кг. Исключение подсластителя из раствора после 161 сессии не вызвало снижение потребления (4%, 1.2059±0.049 г/кг), что подтверждает наличие сформировавшейся устойчивой алкогольной мотивации.

Полученные данные позволяют сделать заключение о существенной роли концентрации этанола, вкусовых добавок и пищевого подкрепления на этапе инициации алкогольной мотивации и преимущественном влиянии продолжительности доступа к раствору этанола на этапе формирования устойчивой алкогольной мотивации у взрослых самцов макаков резусов.

Список литературы

1. Распоряжение Правительства РФ от 30.12.2009 № 2128-р «Концепция реализации государственной политики по снижению масштабов злоупотребления алкогольной продукцией и профилактике алкоголизма среди населения Российской Федерации на период до 2020 года».
2. 2.Kozhechkin S.N., Kolik L.G., Mednikova Yu.S. Effects of naltrexone on firing activity of rat cortex neurons and its interactions with ethanol // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2013. - T. 155. - № 5. - C. 639-642.
3. Колик Л.Г., Надорова А.В., Козловская М.М. Эффективность пептидного анксиолитика селанка при моделировании синдрома отмены у крыс с устойчивой алкогольной мотивацией // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2014. - Т. 157. - № 1. - С. 61-65.
4. Lester D. Nonhuman primates in research on the problem of alcohol. In: Use of Nonhuman Primates in Drug Evaluation // Austin – London, Texas Univ. Press. – 1968. -p. 249-264.

5. 5.Чиркова С.К., Чирков А.М., Войт И.С., Кация Г.В., Пошивалов В.П. Психопатологические и гормональные проявления алкогольной интоксикации и эмоционального стресса у обезьян // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1987. - № 5. – С. 583-586.
6. Войт И.С. Поведенческие аспекты моделирования алкоголизма на обезьянах // Алкоголизм. – Москва. – 1988. – С. 61-64.
7. Katner S.N., Flynn C.T., Von Huben S.N., Kirsten A.J., Davis S.A., Lay C.C., Cole M., Roberts A.J., Fox H.S., Taffe M.A. Controlled and behaviorally relevant levels of oral ethanol intake in rhesus macaques using a flavorant-fade procedure // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. - 2004. - № 28. - P. 873–883.
8. Шмалий А.В., Павлова Л.Е., Цорин И.Б., Колик Л.Г., Лапин Б.А. Лабораторные приматы - объект для создания трансляционной модели алкоголизма // Материалы шестой Международной конференции «биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (9-13 ноября 2015 года, Москва-Клязьма). - 2015. –С. 65.
9. Carnicella S., Ron D., Barak S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse // Alcohol. - 2014. - V.48. - №3. - P.243-252.
10. Vengeliene V., Bilbao A., Spanagel R. The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice // Alcohol. - 2014. – Vol. 48. – P. 313–20.
11. Sinclair J.D. The alcohol-deprivation effect in monkeys // Psychonomic Science. - 1971. - 25. – P. 21–22.
12. Wills T.A., Knapp D.J., Overstreet D.H., Breese G.R. Differential dietary ethanol intake and blood ethanol levels in adolescent and adult rats: effects on anxiety-like behavior and seizure thresholds //Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 2008. – Vol. 32 (8). – P. 1350-60.
13. Grant K.A., Bennett A.J. Advances in nonhuman primate alcohol abuse and alcoholism research // Pharmacol. Ther. – 2003. – Vol. 100 (3). – P. 235-55.
14. Vivian J.A., Green H.L., Young J.E., Majerksy L.S., Thomas B.W., Shively C.A., Tobin J.R., Nader M.A., Grant K.A. Induction and maintenance of ethanol self-administrationin cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis): Long-term characterization of sex and individual differences // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. - 2001. - № 25. - P.1087–1097.

НАРУШЕНИЯ ГЛАЗОДВИГАТЕЛЬНОЙ И МАНИПУЛЯТИВНОЙ ФУНКЦИЙ У ОБЕЗЬЯН ПРИ РАЗВИТИИ МФТП-ИНДУЦИРОВАННОГО ПАРКИНСОНПОДОБНОГО СИНДРОМА

Терещенко Л.В., Шульговский В.В., Латанов А.В.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме

На 2-х обезьянах Macaca mulatta исследовали динамику латентных периодов зрительно вызванных и корректирующих саккад, а также мануальных реакций во время выполнения зрительно-моторной инструментальной задачи при развитии паркинсонподобного синдрома, вызванного пролонгированным введением малых доз нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП). Животных обучали выполнять саккады к периферическим стимулам, предъявляемым в пределах прямоугольного зрительного поля. Выявлено увеличение латентных периодов зрительно-вызванных саккад малых амплитуд и корректирующих саккад в предсимптоматической стадии МФТП-синдрома. Показано, что увеличение латентных периодов саккад возникает раньше и более выражено, чем аналогичное нарушение движений рук. При развитии МФТП-синдрома прекращение глазодвигательной деятельности наступает раньше, чем прекращение инструментальной деятельности. Полученные данные могут быть использованы при разработке методов ранней диагностики болезни Паркинсона.

OCULOMOTOR AND MANIPULATION SKILLS DISORDERS IN HEMIPARKINSONIAN MPTP-TREATED MONKEYS

Tereshchenko L.V., Shulgovsky V.V., Latanov A.V.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract

We studied the dynamics of latency of visually guided saccades, corrective saccades, and manual reaction during visiomotor instrumental task performance with development of hemiparkinsonian syndrome in two rhesus monkeys (Macaca mulatta). The monkeys were treated long term with neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in small doses. The animals were trained to execute the visually guided saccades within rectangular visual field. We revealed the lengthening of latencies of visually guided saccades with small amplitudes and corrective saccades in presymptomatic phase of MPTP-syndrome. The lengthening of saccadic latencies happened earlier and expressed in more extent than lengthening of manual reaction latencies. With the development of the MPTP-syndrome the termination of oculomotor activity occurred earlier than the termination of instrumental performance. The obtained results could be of great importance for developing practical methods of early diagnostics of Parkinsonism.

Введение

Изучение болезни Паркинсона вызывает необходимость использования экспериментальной модели для исследования аналогичной патологии на животных. В настоящее время в качестве такой модели активно используется паркинсонподобный синдром, развивающийся в результате введения нейротоксина МФТП (*1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетра-гидропиридин*). Эта модель воспроизводит не только повреждения дофаминэргической системы мозга, но и весь комплекс симптомов характерных для болезни Паркинсона (Brooks et al., 1986; Schneyder and Kovelowski, 1990; Benazzouz et al., 1992; Porras et al., 2012).

Исследования глазодвигательной функции на МФТП-модели показали увеличение латентных периодов (ЛП) зрительно-вызванных саккад, уменьшение амплитуды и ухудшение точности, а также уменьшение максимальной скорости движения глаз при их выполнении (Brooks et al., 1986; Shultz et al., 1989; Шульговский и др., 1994; Kori et al., 1995; Slovin et al., 1999; Терещенко и др., 2002; Porras et al., 2012, Tereshchenko et al., 2015).

Практически во всех проведенных исследованиях использовался крайне ограниченный набор возможных положений стимулов цели для выполнения зрительно-вызванных саккад. В большинстве работ изучались горизонтальные саккады, т.е. стимулы цели располагались вдоль горизонтальной оси на различном удалении от центрального фиксационного стимула (ЦФС). Количество используемых положений стимула цели также было невелико: десять (Brooks et al., 1986), восемь (Mosimann et al., 2005; MacAskill et al., 2012) и даже два – по одному слева и справа от ЦФС (Jones and DeJong, 1971; Chan et al., 2005; Briand et al., 2001).

В таких экспериментах зрительно-вызванные саккады выполняются к небольшому числу сравнительно легко запоминаемых и зачастую легко предугадываемых положений стимулов цели. Это сильно отличается от работы зрительно-моторной системы в естественных условиях, когда стимулы цели саккад появляются по всему зрительному полю. Таким образом, влияние пространственного фактора на выполнение зрительно-вызванных саккад недостаточно изучено как в МФТП-модели, так и для болезни Паркинсона. Дополнительный интерес представляет порядок и

степень проявления нарушений глазодвигательной и манипулятивной функций при развитии синдрома.

Методика

Две обезьяны *Macaca mulatta* (2 самца, весом 8 и 10 кг) были предварительно обучены выполнению зрительно-моторной инструментальной задачи. Обезьяны выполняли саккаду с ЦФС на целевой периферический стимул (ПС). Стимулы-цели предъявляли в узлах воображаемой прямоугольной решётки (7×5, с центром на ЦФС) с размером ячейки 6,5 град. по обеим координатам. Таким образом, ПС предъявляли в прямоугольной области зрительного поля в пределах ±19,5 град. по горизонтали и ±13,0 град. по вертикали от ЦФС. Выбор одного из 34-х положений ПС производили псевдослучайным образом для каждого предъявления зрительно-моторной задачи. Для поддержания необходимости выполнения зрительно-вызванных саккад к ПС подкрепляли инструментальные реакции движения обезьяны рукой за рычаг на себя в ответ на уменьшение яркости (пригашение) ПС. Животные успешно выполняли около 1000 предъявлений инструментальной задачи в день.

Движения глаз регистрировали методом электромагнитной регистрации (англ., *search-coil*), разработанным D. Robinson (Robinson, 1963) и адаптированным в нашей лаборатории (Терещенко и др., 2000). Регистрацию проводили с частотой 500 Гц и пространственной точностью в пределах 0,1 град. по обеим координатам. Во время экспериментов голову обезьяны жестко закрепляли. Движения рук регистрировали с частотой 100 Гц и пространственной точностью 0,1 мм амплитуды перемещения рычага.

После записи необходимого объёма данных в нормальном состоянии начинали запись данных на фоне введения МФТП. Гидрохлорид МФТП вводили в дозе 0,2 мг/кг внутримышечно через день. Всего было произведено 10 инъекций в течение 20 дней.

После начала введения МФТП состояние и поведение обезьян в клетке и экспериментальном приматологическом кресле ежедневно оценивали по балльной шкале разработанной J. Schneyder и C. Kovelowski (Schneyder and Kovelowski, 1990). Десять характерных симптомов МФТП-синдрома у обезьян оценивались экспериментаторами значениями от 0 (отсутствие выраженности симптома) до 2-х баллов (сильная степень выраженности). Таким образом, значения оценки проявления МФТП-синдрома по шкале могли изменяться от 0 (отсутствие проявлений МФТП-синдрома) до 20-ти (тяжелая степень МФТП-синдрома).

Содержание и экспериментальные процедуры с животными осуществлялись в соответствии с Директивой Совета Европы 2010/63/EU и Приказом Министерства Здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г.

Результаты

После предсимптоматической стадии развития МФТП-синдрома состояние обезьян начало заметно ухудшаться с 4-й или 5-й инъекции МФТП (при накопленной дозе 0,8-1,0 мг/кг). Стало проявляться общее уменьшение активности, ухудшение аппетита, нарушения и редкие случаи сгорбленности позы. Состояние животных оценивали в 2-3 балла по поведенческой шкале. С этого момента состояние обезьян неуклонно ухудшалось. При выполнении инструментальной задачи у обезьян увеличивалась доля отказов и после 9-й инъекции МФТП (накопленная доза 1,8 мг/кг) они полностью перестали выполнять задачу. На фоне ухудшения состояния животных отмечались отдельные случаи потери равновесия. Оценка по шкале составляла 5-6 баллов. Далее, с появлением видимого тремора весь комплекс симптомов паркинсонподобного синдрома проявился в полной мере при оценке состояния животных 7-8 баллов.

ЛП зрительно-вызванных саккад к периферическим стимулам увеличивались с развитием синдрома. После 4-й инъекции (доза 0,8 мг/кг) ЛП увеличились на 10-20 %% по сравнению со значениями при нормальном состоянии. Пресаккадические интервалы корректирующих саккад увеличились даже более значимо в предсимптоматической стадии МФТП-синдрома (Рис. 1А).

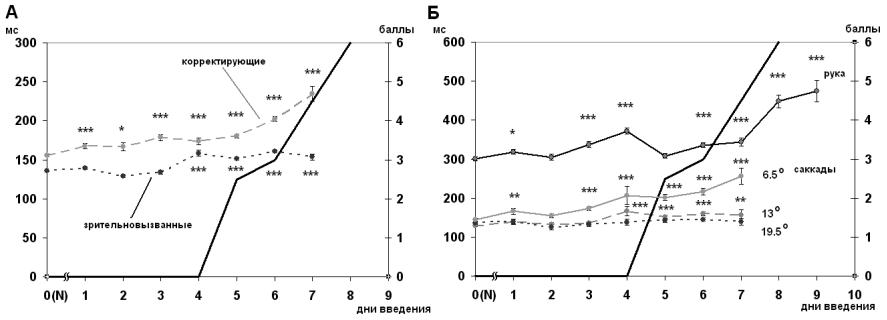


Рис. 1. А - Изменение средних значений ЛП зрительно-вызванных саккад и пресаккадических интервалов корректирующих саккад (в мс, слева) при развитии МФТП-синдрома; **Б** - Изменение ЛП зрительно-вызванных

саккад (в мс, слева) к стимулам с эксцентриситетом 6,5, 13 и 19,5 град. от ЦФС при развитии МФТП-синдрома, а также ЛП движений руки.

Толстой линией отложены значения по шкале оценки поведения (баллы, справа). 0(N) – значения нормального состояния.

Обозначения уровней значимости различий по сравнению со значениями нормы: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

После накопленной дозы нейротоксина 1,0 мг/кг длительности пресаккадических интервалов увеличивались на 30-50 %%. Длительности ЛП целенаправленных саккад к ПС различного эксцентриситета от ЦФС изменялись в разной степени. ЛП саккад малых амплитуд (6,5 град.) в предсимптоматической стадии развития синдрома увеличивались на 20-44 %% по сравнению со значениями при нормальном состоянии. У саккад средних амплитуд (13 град.) на этой стадии синдрома ЛП увеличивались в меньшей степени – на 5-17 %%. ЛП саккад больших амплитуд (19,5 град.) практически не отличались от таковых при нормальном состоянии даже на стадии явно видимого проявления МФТП-синдрома (Рис. 1Б).

Длительности ЛП саккад, совершаемых к ПС в пределах тестируемого поля зрения, увеличивались от 116-150 мс в норме до 126-218 мс при формировании синдрома. В относительных единицах эти изменения по сравнению со значениями нормы составляли 97–153 %% для саккад выполняемых к различным положениям ПС (рис. 2). Таким образом, наибольшие изменения наблюдались для саккад, выполняемых к ПС околоцентральной области зрительного поля независимо от их направления.

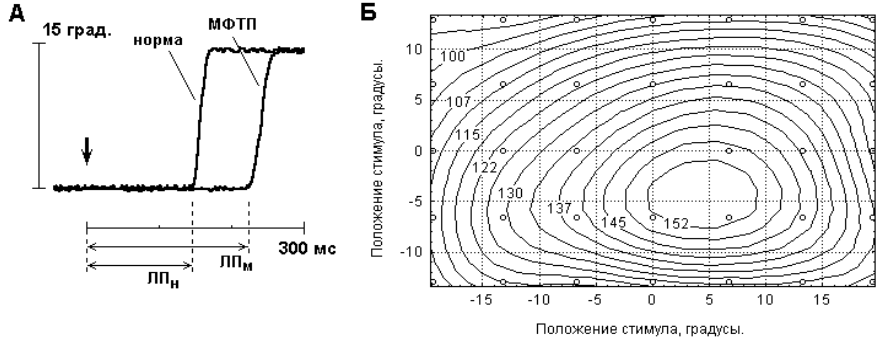


Рис. 2. А – пример записи двух саккад в норме и при развитии МФТП-синдрома, выполненных к одному и тому же ПС. Записи синхронизированы относительно момента предъявления ПС (отмечен стрелкой). ЛПн и ЛПм – латентные периоды саккад в норме и при развитии МФТП-синдрома.

Б - изменение ЛП саккад к различным ПС при развитии МФТП-синдрома по сравнению со значениями в норме (в %%). По осям отложено угловое положение ПС. Изменения ЛП саккад отображены изолиниями равных величин. Кружками отмечены положения ПС.

Зрительно-вызванные саккады при развитии МФТП-синдрома сопровождались последующими корректирующими саккадами в 55-60 %% успешно выполненных предъявлений инструментальной задачи. Это значение снизилось до 48% только после 7-й инъекции (доза 1,4 мг/кг) перед тем как животные полностью перестали выполнять зрительно-моторную задачу.

По мере развития синдрома доля дополнительных корректирующих саккад (мультисаккад) слабо увеличивалась в интервале 1-4 %% и достигла 9 % после той же 7-й инъекции нейротоксина.

ЛП движений рук в предсимптоматический период изменялись нестабильно, возвращаясь близко к значениям нормы после 2-й и 5-й инъекций. После 6-й инъекции длительности ЛП движений рук изменялись необратимо, достигнув увеличения по сравнению со значениями нормы на 40-50 %% на стадии средней тяжести проявления МФТП-синдрома (оценка по шкале состояния 6-8 баллов) непосредственно перед тем, как животные перестали работать в эксперименте.

Обсуждение

Изменения ЛП зрительно-вызванных саккад и длительностей пресаккадических интервалов корректирующих саккад, начавшиеся с введением нейротоксина, частично вернулись к значениям нормального состояния уже после 2-й инъекции (Рис. 1А,Б). Такое же явление наблюдается и у ЛП инструментальных движений рук после 2-й и 5-й инъекций (Рис. 1Б). Это можно объяснить включением компенсаторных механизмов дофаминэргической системы, которые откладывают проявление моторных симптомов на ранних стадиях болезни Паркинсона (Bezard et al., 2001; Mounayar et al., 2007; Boulet et al., 2008). Необратимый характер эти изменения приобретают после 3-й инъекции (доза 0,6 мг/кг) для зрительно-моторной и после 6-й (1,2 мг/кг) для манипулятивной функции.

Глазодвигательная функция при развитии синдрома страдает в большей степени, чем манипулятивная. Необратимые нарушения выполнения движений глаз начинаются раньше, чем движений рук. Прекращение выполнения зрительно-вызванных саккад в эксперименте наблюдается до прекращения работы животных в инструментальной задаче.

Резкий рост ЛП движений рук после прекращения целенаправленной зрительно-моторной деятельности (8-9-я инъекции, Рис. 1Б), вероятно, обуславливается тем, что в отсутствии саккад к ПС животным труднее определить момент появления пускового стимула инструментальной реакции.

Необходимо также отметить, что достоверные изменения (1) длительностей пресаккадических интервалов корректирующих саккад проявляются при накопленной дозе 0,2 мг/кг; (2) ЛП саккад малых амплитуд (к стимулам с эксцентриситетом 6,5 град.) проявляются при дозе 0,6 мг/кг; (3) ЛП саккад средних амплитуд (к стимулам на удалении 13 град.) проявляются при дозе 0,8 мг/кг на предсимптомной стадии развития МФТП-синдрома и предшествуют проявлению видимых нарушений в состоянии и поведении обезьян. Видимые симптомы МФТП-синдрома появляются только при дозе 1,0 мг/кг.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке практических методов ранней диагностики болезни Паркинсона у человека.

Список литературы

Терещенко Л.В., Кузнецов Ю.Б., Латанов А.В., Шульговский В.В. (2000). Методика хронической электромагнитной регистрации движений глаз и головы у обезьян. *Журн. высш. нервн. деят.им. И.П. Павлова. 50*(5), 889-894.

Терещенко Л.В., Юдин А.Г., Кузнецов Ю.Б., Латанов А.В., Шульговский В.В. (2002). Нарушения саккадических движений глаз при развитии МФТП-индуцированного синдрома у обезьян. *Бюлл. экспер. биол*., *133*(2), 215-218

Шульговский В.В., Латанов А.В., Петров Г.В. (1994). Дофаминергические механизмы глазодвигательного поведения приматов. *Вестник Российской Академии медицинских наук*, *1*(1), 49-52.

Benazzouz, A., Gross, C., Dupont, J., & Bioulac, B. (1992). MPTP induced hemiparkinsonism in monkeys: behavioral, mechanographic, electromyographic and immunohistochemical studies. *Experimental Brain Research*, *90*(1), 116-120.

Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., ... & Gross, C. E. (2001). Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *The Journal of Neuroscience*, *21*(17), 6853-6861.

Boulet, S., Mounayar, S., Poupard, A., Bertrand, A., Jan, C., Pessiglione, M., ... & Tremblay, L. (2008). Behavioral recovery in MPTP-treated monkeys: neurochemical mechanisms studied by intrastriatal microdialysis. *The Journal of Neuroscience*, *28*(38), 9575-9584.

Briand, K. A., Hening, W., Poizner, H., & Sereno, A. B. (2001). Automatic orienting of visuospatial attention in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, *39*(11), 1240-1249.

Brooks, B. A., Fuchs, A. F., & Finocchio, D. (1986). Saccadic eye movement deficits in the MPTP monkey model of Parkinson's disease. *Brain Research*, *383*(1), 402-407.

Chan, F., Armstrong, I. T., Pari, G., Riopelle, R. J., & Munoz, D. P. (2005). Deficits in saccadic eye-movement control in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, *43*(5), 784-796.

Jones, G. M., & DeJong, J. D. (1971). Dynamic characteristics of saccadic eye movements in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, *31*(1), 17-31.

MacAskill, M. R., Graham, C. F., Pitcher, T. L., Myall, D. J., Livingston, L., van Stockum, S., ... & Anderson, T. J. (2012). The influence of motor and cognitive impairment upon visually-guided saccades in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, *50*(14), 3338-3347.

Mosimann, U. P., Müri, R. M., Burn, D. J., Felblinger, J., O'Brien, J. T., & McKeith, I. G. (2005). Saccadic eye movement changes in Parkinson's disease dementia and dementia with Lewy bodies. *Brain*, *128*(6), 1267-1276.

Mounayar, S., Boulet, S., Tandé, D., Jan, C., Pessiglione, M., Hirsch, E. C., ... & Tremblay, L. (2007). A new model to study compensatory mechanisms in MPTP-treated monkeys exhibiting recovery. *Brain*, *130*(11), 2898-2914.

Porras, G., Li, Q., & Bezard, E. (2012). Modeling Parkinson’s disease in primates: The MPTP model. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, *2*(3), a009308.

Robinson, D. A. (1963). A method of measuring eye movemnent using a scieral search coil in a magnetic field. *Bio-medical Electronics, IEEE Transactions on*, *10*(4), 137-145.

Schneider, J. S., & Kovelowski, C. J. (1990). Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys. *Brain Research*, *519*(1), 122-128.

Schultz, W., Romo, R., Scarnati, E., Sundström, E., Jonsson, G., & Studer, A. (1989). Saccadic reaction times, eye-arm coordination and spontaneous eye movements in normal and MPTP-treated monkeys. *Experimental Brain Research*, *78*(2), 253-267.

Slovin, H., Abeles, M., Vaadia, E., Haalman, I., Prut, Y., & Bergman, H. (1999). Frontal cognitive impairments and saccadic deficits in low-dose MPTP-treated monkeys. *Journal of Neurophysiology*, *81*(2), 858-874.

Tereshchenko L.V., Anisimov V.N., Shul'govsky V.V., Latanov A.V. (2015) Early changes in saccadic eye movement in hemiparkinsonian MPTP-treated monkeys. *Perception*, *44*(8-9), 1054-1063.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АСИММЕТРИЯ ДВИЖЕНИЙ ГЛАЗ И РУК У ОБЕЗЬЯН В ЗРИТЕЛЬНО-МОТОРНОЙ ИНСТРУМЕНТАЛЬНОЙ ЗАДАЧЕ

Латанов А.В., Терещенко Л.В., Шульговский В.В.

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Резюме

В инструментальной задаче исследовали выполнение зрительновызванных саккад к стимулам в двумерном зрительном поле и моторную реакцию рукой в зависимости от положения пускового стимула в соответствующей половине поля зрения. Собраны данные по работе шести обезьян *Macaca mulatta* в эксперименте. Анализ латентных периодов саккадических движений глаз и моторных реакций позволил изучить профиль функциональной асимметрии выполнения движений глаз и рук в зрительномоторной задаче для каждого животного. Показано наличие достоверного преимущества в выполнении саккад в правую или левую половину поля зрения у животных. Обезьяны демонстрируют выраженную асимметрию в выполнении инструментальных движений той или иной рукой. Также показано, что у всех обезьян латентные периоды саккад в нижнюю половину поля зрения короче, чем в верхнюю. То же наблюдается у большинства обезьян в отношении латентных периодов инструментальных реакций в ответ на стимулы в нижней половине поля зрения.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу имеющихся литературных данных о проявлении у обезьян первого уровня функциональной асимметрии рук: индивидуальное использование одной (преимущественной или доминирующей) руки при повторяющемся выполнении определенного действия, в данном случае – зрительномоторной инструментальной задачи. Результаты могут быть взяты за основу для выработки критерия выявления предпочтительной руки у обезьян в условиях искусственного эксперимента.

FUNCTIONAL ASYMMETRY OF MONKEY EYE AND HAND MOVEMENTS IN VISUAL-MOTOR INSTRUMENTAL TASK

A.Latanov, L.Tereshchenko, V.Shul'govskiy

M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract

The visual evoked saccades to stimuli in the two-dimensional visual field and motor reaction arm depending on the position of the stimulus start in the corresponding half of the field of view were studied. Six monkeys (Macaca mulatta) were used in the experiment. Analysis of latent periods of saccadic eye movements and motor reactions allowed examining the profile of functional asymmetry of performing eye and hand movements in visual-motor task for each animal. The presence of significant advantages in performing saccades to the right or left side of vision fields of animals was shown. Monkeys have demonstrated a pronounced asymmetry in the implementation of hand instrumental movements. It also was shown that in all monkeys saccadic latencies in the lower half of the view field were shorter than to the upper one.

The same is observed in most monkeys with regards to latent periods of instrumental reactions in response to stimuli in the bottom half of the view field.

These results favor the existing literature data on the manifestation of the first level of functional asymmetry monkey hands: individual use of one hand (preferred or dominant) during repeated execution of a certain action, in this case – visual-motor instrumental tasks. The results can be used as a basis for the criteria development identifying the preferred hand of monkeys under experimental conditions.

Введение

Сравнение данных по изучению асимметрии функций у человека и результатов, полученных в экспериментах с низшими приматами, неизбежно поднимает вопрос о выявлении аналогичных асимметрий у обезьян. Наиболее часто исследователи обращаются к вопросу выявления предпочтительной руки у обезьян.

Многочисленные исследования поведения разных видов обезьян показали, что приматы при выполнении простых движений, таких как касание пищи, взятие кусочка пищи с ровной поверхности, кусочка пищи или сиропа из углубления капуцинами (Anderson et al., 1996; Panger, 1998; Garber et al., 2008), кормление и поиск пищи (Brooker et al., 1981) у макак не проявляют достоверно значимого предпочтения той или иной руки.

В то же время выполнение более сложных действий, в которых участвуют обе руки, например, доставание изюма или сиропа из глубокой трубки капуцинами (Anderson et al., 1996), манипулирование предметами (Panger, 1998; Garber et al., 2008) у макак позволяют выявить некоторое преимущество в использовании одной из рук.

У человека преимущество одной руки выделяют на трех уровнях (Oldfield, 1971; Warren, 1980; Ellis et al., 1988; Annett, 2004). Первый уровень – индивидуальное использование одной (доминирующей) руки при повторяющемся выполнении определенного действия. Второй уровень – индивидуальное использование доминирующей руки в большинстве поведенческих актов. И на третьем уровне в любой популяции большая часть людей используют ведущую правую руку при выполнении большинства действий.

Многие исследователи сходятся в том, что обезьяны могут проявлять преимущество одной из рук при выполнении некоторых действий. В то же время низшие приматы в целом не показывают второго и третьего уровня асимметрии при использовании рук (Deuel and Dunlop, 1980; Lehman, 1980; Annett and Annett, 1991; Mittra et al., 1997). Такая слабая выраженность асимметрии вызывает сложность в выработке методов определения преимущественной руки у низших приматов. Те немногие сложные действия, в которых проявляется асимметрия выбора активной руки, требуют научения для формирования соответствующего навыка. Исследователи считают, что крайне незначительное начальное преимущество одной из рук при научении многократно увеличивается. Животное начинает использовать ту руку, выполнение действия которой лучше получается, а при повторных выполнениях действия этой рукой выполняются все более успешно, что ведет к дальнейшему закреплению ее предпочтения.

В то же время в лабораторном эксперименте обезьяны обучаются выполнению довольно сложных инструментальных задач. Можно попытаться использовать их для выявления предпочтительной руки, если в такой задаче обезьяна будет выполнять инструментальные реакции той или иной рукой в зависимости от предъявляемых стимулов.

В разное время в нашей лаборатории были проведены эксперименты с использованием инструментальной задачи для изучения выполнения обезьянами зрительно-вызванных саккад в двумерном зрительном поле. Такая методика позволяет в дополнение к асимметрии рук исследовать и функциональную асимметрию движений глаз (зрительно-вызванных саккад), а также выявить взаимосвязь асимметрий глаз и рук у обезьян.

Методика

В работе обработан экспериментальный материал, полученный на шести обезьянах (далее обезьяны А, Б, Д, К, П и Т) *Macaca mulatta*. Все обезьяны - самцы в возрасте 7-12 лет.

В эксперименте определяли параметры движений глаз и рук при выполнении обезьянами предварительно выработанного сложного зрительно-моторного инструментального рефлекса, в котором ни пусковой стимул, ни инструментальная реакция (ИР) изначально не имели биологической значимости для обезьян.

На экране монитора обезьянам предъявляли зрительные стимулы. Животные совершали целенаправленные саккады на периферический стимул-цель (ПС) после предшествующей фиксации взора на центральном фиксационном стимуле (ЦФС) в центре экрана. ПС предъявлялись в двумерном зрительном поле. Для каждой реализации положение ПС выбиралось равновероятно в псевдослучайном порядке.

Обезьяны выполняли ИР (движение рычагом «на себя») в ответ на пусковой стимул - уменьшение яркости (пригашение) ПС. Конструкция приматологического кресла позволяла каждой рукой тянуть только за соответствующий ей рычаг. Для получения подкрепления обезьяна должна была потянуть правой рукой рычаг на себя в ответ на пусковой стимул в правой половине поля зрения или соответственно левой рукой в ответ на пусковой стимул (пригашение ПС) в левой половине. При появлении ПС и его последующим пригашении точно по центральному вертикальному меридиану подкрепляли использование обезьяной как правого, так и левого рычага. Контралатеральные ИР, когда животное тянуло за рычаг, не соответствующий относительному положению пускового стимула (например, движение левой рукой в ответ на пусковой стимул в правой половине экрана, и наоборот), не подкрепляли.

В эксперименте регистрировали траекторию глаза и рук с высоким временным и пространственным разрешением (Терещенко и др., 2012; Tereshchenko et al., 2015).

Результаты

По полученным в эксперименте траекториям глаза и рук определяли длительности латентных периодов (ЛП) движений глаза (саккады) к ПС и ЛП ИР рукой в ответ на пусковой стимул (пригашение ПС). В таблице 1 приведены усреднённые значения указанных параметров, разделённых по половинам зрительного поля, как по горизонтальной, так и по вертикальной осям.

Пространственные распределения ЛП саккад позволяют выявить сложную пространственно-временную асимметрию саккадических движений глаз для всех обезьян. У большинства животных в пределах исследованного зрительного поля выявлены области, к которым саккады выполняются с меньшими ЛП. В ряде случаев показаны области длиннолатентных саккад. Следует отметить, что такая асимметрия носит индивидуальный характер для каждого животного.

По полученным значениям вычисляли коэффициент горизонтальной асимметрии для ЛП движений глаз и рук:

$$K = -\frac{(ЛПп - ЛПл)}{(ЛПп + ЛПл)},$$

где К – коэффициент асимметрии, $ЛП_п$ и $ЛП_л$ – средние значения ЛП движения в правую и левую половину поля зрения, соответственно. Знак "–" используется в связи с тем, что преимущество в соответствующей половине поля зрения проявляется в виде меньших значений соответствующих ЛП. Аналогично вычисляли коэффициент вертикальной асимметрии.

Полученные коэффициенты функциональной асимметрии для движений глаза и рук по горизонтальной и по вертикальной осям для исследованных обезьян показаны на рисунке 1.

Таблица 1

Средние значения ЛП и ошибки среднего (в мс) для саккад выполненных в правую или левую, верхнюю или нижнюю половины поля зрения, а также ЛП движений рук, выполненных в ответ на пусковой стимул в соответствующей половине поля зрения для каждой обезьяны.

Глаз				
Обезьяны	**Влево**	**Вправо**	**Вверх**	**Вниз**
А	138 ± 1 **	142 ± 1	148 ± 2	128 ± 1 ***
Б	165 ± 6 ***	199 ± 6	194 ± 8	179 ± 5
Д	124 ± 1 ***	149 ± 1	144 ± 1	134 ± 1 ***
К	199 ± 2	178 ± 1 ***	213 ± 2	171 ± 1 ***
П	184 ± 11***	209 ± 12	192 ± 13	143 ± 7 **
Т	190 ± 3	168 ± 3 ***	189 ± 3	163 ± 3 ***
Рука				
Обезьяны	**Влево**	**Вправо**	**Вверх**	**Вниз**
А	386 ± 5	365 ± 5 ***	394 ± 6	354 ± 5 ***
Б	361 ± 5	339 ± 5 ***	335 ± 5 ***	372 ± 5
Д	243 ± 3	213 ± 3 ***	237 ± 3	230 ± 3 *
К	308 ± 2 ***	332 ± 2	338 ± 2	314 ± 2 ***
П	283 ± 4	288 ± 4	285 ± 4 *	297 ± 4
Т	342 ± 4	308 ± 4***	327 ± 4	319 ± 4

Фоном выделены достоверно меньшие значения ЛП, чем в противоположном поле с уровнями значимости: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001.

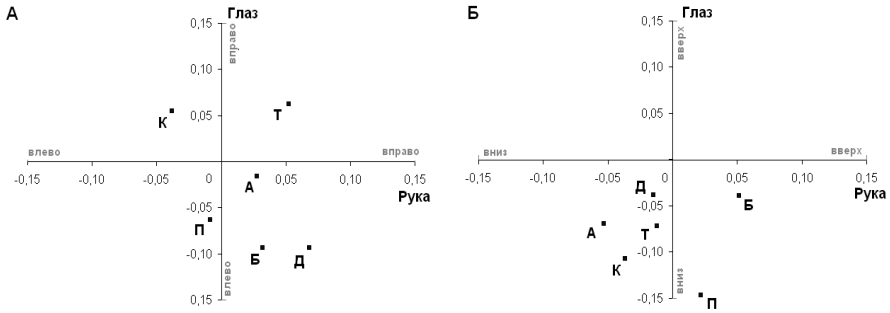


Рис. 1 Соотношение индивидуальных коэффициентов функциональной асимметрии движений глаз и рук обезьян по (А) горизонтальной и (Б) вертикальной осям зрительного поля. Данные для каждой обезьяны обозначены соответствующей ей буквой.

По горизонтальной оси каждого графика отложен коэффициент асимметрии движения руки (положительные значения – преимущество выполнения движений правой рукой, и наоборот на рис. 1А и преимущество выполнения движений руками на стимулы в верхней половине поля зрения, и наоборот на рис. 1Б), по вертикальной оси – коэффициент асимметрии движения глаза (положительные значения – преимущество выполнения саккад в правую половину поля зрения, и наоборот на рис. 1А и преимущество выполнения саккад в верхнюю половину поля зрения, и наоборот на рис. 1Б).

Обсуждение

На рисунке 1А видно, что коэффициенты горизонтальной асимметрии глаза и рук у трёх из шести обезьян имеют одинаковый характер (находятся в одном квадранте графика) – обезьяны А, Б и Д выполняют ИР с преимуществом правой руки, в то время как саккады с меньшими ЛП выполняются в левую сторону. У четырёх обезьян (с добавлением обезьяны К) наблюдается контралатеральное взаимодействие глаза и рук – саккады выполняются с меньшими ЛП в сторону противоположную предпочтительной руке в данной инструментальной задаче. У двух

оставшихся обезьян (П и Т) выполнение саккад облегчено в сторону преимущественной руки, своей у каждого из этих двух животных.

Обращает внимание, что у всех шести обезьян саккады в нижнюю половину поля зрения выполняются с меньшими ЛП (Рис. 1Б). Четыре обезьяны (А, Д, К и Т) и ИР на пусковые стимулы в нижней половине поля зрения выполняют с меньшими ЛП. Можно предположить, что это связано с тем, что в поведении обезьян биологически важные стимулы (еда, источники опасности и др.) как правило появляются в нижней половине поля зрения.

Рассмотрение принципиального вопроса асимметрии использования преимущественной руки в инструментальной задаче показывает (см. Таблицу), что пять из шести обезьян с высокой степенью достоверности имеют преимущественную руку при выполнении данной инструментальной задачи: у четырёх обезьян это правая рука, у одной - левая.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу имеющихся литературных данных о проявлении у обезьян первого уровня функциональной асимметрии рук: индивидуальное использование одной (преимущественной или доминирующей) руки при повторяющемся выполнении определенного действия, в данном случае – зрительномоторной инструментальной задачи.

Эксперимент, позволяющий выявить асимметрию выполнения движений рук может лечь в основу разработки метода определения преимущественной руки у обезьян в условиях лабораторного опыта с использованием искусственно выработанных двигательных навыков.

Список литературы

Терещенко Л.В., Молчанов С.А., Колесникова О.В., Латанов А.В. (2012). Функциональная асимметрия движений рук у обезьян (*Macaca mulatta*). *Журн. высш. нервн. деят.*, т. 62, №4, сс. 431-439.

Anderson J.R., Degiorgio C., Lamarque C., Fagot J. (1996). A multi-task assessment of hand lateralization in capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Primates*. 37(1): 97-103.

Annett M. (2004). Hand preference observed in large healthy samples: classifications, norms and interpretations of increased nonright-handedness by the right shift theory. *Br. J. Psychol.* 95: 339-353.

Annett M., Annett J. (1991). Handedness for eating in gorillas. *Cortex.* 27: 269-275.

Brooker R.J., Lehman R.A.W., Heimbuch R.C., Kidd K.K. (1981). Hand usage in a colony of bonnett monkeys (*Macaca radiata*). *Behav. Genet.* 11(1): 49-56.

Deuel R.K., Dunlop N.L. (1980). Hand preferences in the rhesus monkey. Implications for the study of cerebral dominance. *Arch. Neurol.* 37: 217-221.

Ellis S.J., Ellis P.J., Marshall E. (1988). Hand preference in a normal population. *Cortex.* 24: 157-163.

Garber P.A., Gomes D.F., Bicca-Marques J.C. (2008). Experimental field study of hand preference in wild black-horned (*Cebus nigritus*) and white-faced (*Cebus capucinus*) capuchins: evidence for individual and species differences. *Anim. Cogn.* 11(3): 401-411.

Lehman R.A. (1980). Persistence of primate hand preference despite initial training to the contrary. *Behav. Brain Res.* 1: 547-551.

Mittra E.S., Fuentes A., McGrew W.C. (1997). Lack of hand preference in wild hanuman langurs (*Presbytis entellus*). *Am. J. Physiol. Anthropol.* 103: 455-461.

Oldfield R.C. (1971). The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia.* 9: 97-113.

Panger M.A. (1998). Hand preference in free-ranging white-throated capuchins (*Cebus capucinus*) in Costa Rika. *Int. J. Primatol.* 19(1): 133-163.

Tereshchenko L.V., Anisimov V.N., Shul'govsky V.V., Latanov A.V. (2015) Early changes in saccadic eye movement in hemiparkinsonian MPTP-treated monkeys. *Perception*, *44*(8-9), 1054-1063.

Warren J.M. (1980). Handedness and laterality in humans and other animals. *Physiol. Psychol*. 8: 351-359.

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНА ЗРЕНИЯ И ЗРИТЕЛЬНЫХ ФУНКЦИЙ У ПРИМАТОВ

Туманова А.Л., Агрба В.З., Нестер Е.Н., Кондрашова Н.А., Шамсутдинова О.В.

Сочинский институт РУДН, Сочи, Россия

НИЦКиР ФФГБУ СКФНКЦ ФМБА России в Сочи

Резюме

У 30 макаков яванских было исследовано глазное дно и измерено глазное давление с применением фоторегистрации с помощью офтальмоскопа WelchAllyn 118 series, после расширения зрачка и под анестезией. В процессе обследования глазного дна были выявлены особенности : цвет сетчатки варьировал от ярко-розового до желто-розового, иногда желто-серого с выраженным рефлексом; перераспределение пигмента от густо пигментированного, рассеянной крапчатости до

депигментаций, иногда в виде белых полос похожих на стрии; разрежение хориокапиллярного слоя (местами видны сосуды хориоидеи); диск зрительного нерва чаще овальной формы, иногда темного цвета, иногда серого, чаще пигментирован вокруг, больше с височной стороны; артериолы и венулы не заходят на центральную зону, однако аваскулярная область несколько сужена, темного цвета с выраженным кольцевым рефлексом.

Полученные сведения предполагают продолжение начатых исследований с применением флюоресцентной ангиографии и флюорометрии, дающие возможность изучения скрытых дефектов, таких как – проницаемость роговицы, проницаемость сосудистых стенок, наличие точек фильтрации в пигментном эпителии и др.

FEATURES OF EYE AND VISUAL FUNCTION IN PRIMATES

A.Tumanova, V.Agrba, E.Nester, N.Kondrashova, O.Shamsutdinova, T. Gvozdik

Peoples' Friendship University of Russia, Sochi branch,Sochi, Russia

Research centre of balneology and rehabilitation, Sochi, Russia

Abstract

Ocular fundus was examined and intraocular pressure was measured in 30 Macaca fascicularis by photoregistration using WelchAllyn 118 ophthalmoscope, under the pupil expansion and anesthesia. The following features of ocular fundus are revealed: retina color ranged from bright pink to yellow-pink, sometimes yellow-gray with marked reflex; redistribution of pigment from the densely pigmented, diffuse mottling to depigmentation, sometimes in the form of white streaks; rarefaction of choroid capillary vacuum layer (sometimes making visible choroidal vessels); optic disc is often oval, sometimes dark color, sometimes gray, often round pigmented as a rule in the temporal side; arterioles and venules do not go to the central zone, however avascular area is narrowed, has dark color with a pronounced circular reflex.

The results suggest the necessity of continuation of initiated studies using fluorescent angiography and fluorometry, enabling the study of hidden defects, such as the permeability of corneal, permeability of vascular walls, the presence of filter points in the pigment epithelium, etc.

Последние несколько лет характеризуются увеличением использования приматов для исследования органа зрения и зрительных функций в фундаментальных научных исследованиях. Особой популярностью

пользуются изменения ряда зрительных функций и физиологических параметров органа зрения при научных исследованиях по воздействию на организм фармакологических препаратов. В первую очередь это касается жарактеристики переднего отрезка глаза – век, слизистых бульбарной конъюнктивы и век, размер глазной щели, состояние роговицы и её чувствительность, размер зрачка, симметричность и реакция на свет. Также стали появляться заинтересованности в измерении внутриглазного давления и осмотре глазного дна, то есть исследователей всё чаще интересуют детали зрительный нерв, сетчатка, сосуды сетчатки и др.

В мировой литературе представлены лишь единичные публикации, показывающие вариабельность морфологических и физиологических параметров органа зрения и зрительных функций. В качестве одного из аспектов сравнительного исследования зрительной системы, были проведены исследования вариаций морфологии сетчатки у разных видов приматов (Ordy, Massopust & Wolin, 1962). Некоторым авторам удалось собрать коллекцию фундус-фотографий разных приматов (на основе классификации Симпсона, 1945), так как они предвидели, что это будет представлять интерес, потому, что в литературе доступен только ограниченный выбор сетчатки приматов в фундус-фотографиях (Ordy, et al., 1962; Samorajski, Ordy & Keefe, 1966; Smith, Reynolds, Rane & Justice, 1964).

В 1967 году аналогичные исследования были проведены в лаборатории нейрофизиологии в психиатрическом Институте Кливленда, Огайо. Авторы отметили, что фундус-фотография - это не простая процедура. Исследования проводились на расширенном зрачке и животное находилось под анестезией, обычно с thiamylal натрия (Suritol). Фотографии глазного дна сделаны при помощи фундус – камеры Цейс на Кодаке. У некоторых видов приматов, имеющих высокую отражательную способность сетчатки, требовалось включать фильтр нейтральной плотности оптического пути камеры. Для проведения исследования были необходимы два - три лица, один для удержания головы, второй для поддержания правильной ориентации глаза, а третий человек манипулирует камерой. По мнению авторов в процессе съёмки глазного дна приматов необходимо использовать два основных ракурса, один показывает четко макулярную зону и ямку (fovea), а другой диск зрительного нерва и сосудистый пучок, без четкого отображения жёлтого пятна и ямки. В процессе исследования было обнаружено, что сосудистый рисунок сетчатки некоторых видов приматов, не подходит под общий шаблон включённых в исследования обезьян, гиббонов и человека. Нервные волокна в виде круглого или овального диска зрительного нерва и кровеносные сосуды сходятся на центральной области сетчатки с четко

определенными границами макулы. Макула в значительной степени без сосудов, немного отличается в пигментации от окружающей сетчатки, и образует кольцо ответного светового рефлекса. Фовеа легко визуализируется и часто показывает глубокий фокус и рефлекс с жёлтого пятна на яркий свет. Из-за разряжения хориокапиллярного слоя часто можно видеть сосуды хориоидеи. Наблюдались значительные вариации в структуре сосудистой внутри вида и разница между представителями различных видов, что, по мнению авторов не должно приниматься за отклонения от нормы. Общие закономерности дугообразные сосуды с ветками, оканчивающимися вокруг макулы или центральной области сетчатки характерно для всех приматов. По словам Джонсона (1901) этот сосудистый рисунок встречается также у многих хищников. Артериолы имеют преимущественно горизонтальную ориентацию, венулы вертикальную и у каждого вида индивидуальный рисунок. Также были отмечены индивидуальные различия в пигментациях, не только у разных видов, но и, встречались также в пределах одного вида. В отличии от человека, окраска сетчатки у разных видов варьирует, от зеленого до зеленовато-синего цвета с пигментом относительно не равномерно распределенным по сетчатке. Площадь возле макулы – чаще близка к натуральному цвету, а иногда от ярко-синего до фиолетового.

Основными отличия между некоторыми высшими видами приматов являются: размер и границы макулярной области, размер и форма диска зрительного нерва, рисунок и пигментация сетчатки.

У ряда видов, таких, как лемуры, Лори и землеройки имеются другие отличия. Диск зрительного нерва, сосудистый рисунок и аваскулярная зона центральной области сетчатки аналогичны высшим видам, однако, не определяется жёлтое пятно или ямка. В некоторых случаях есть разница в скоплении пигмента и поэтому отсутствует кольцевой рефлекс. У некоторых животных отмечался мозаичный ответный рефлекс сетчатки. Высокий отражающий рефлекс сетчатки создаёт трудности в фотографировании сетчатки, кровеносных сосудов и зрительного нерва. Сетчатка, у этих видов, в отличие от человека (Homo sapiens) может варьировать в цвете, от оранжево – желтого, до зеленовато-желтого цвета (Рис. 1).

Проводимые нами исследования на базе НИИ медицинской приматологии в г. Сочи включали в себя исследование органа зрения и зрительных функций у 30 приматов (вид макаки яванские). В процессе исследований мы также столкнулись с рядом вопросов, вызвавших у нас научный интерес, требующий дальнейших исследований. В первую очередь сведения по замеру внутриглазного давления (ВГД), который производился бесконтактным тонометром ТГДц-О1 ПРА (показатели варьировали от 16 и

до 24 у разных приматов), Для проверки достоверности был произведен замер ВГД тонометром Маклаков, но уже под анестезией, который показал более низкие цифры (разница до 3 мм рт. ст.). Следовательно, возник вопрос, является ли понижение ВГД следствием анестезии, или это естественная погрешность, между бесконтактным электронным и контактным методом замера ВГД.

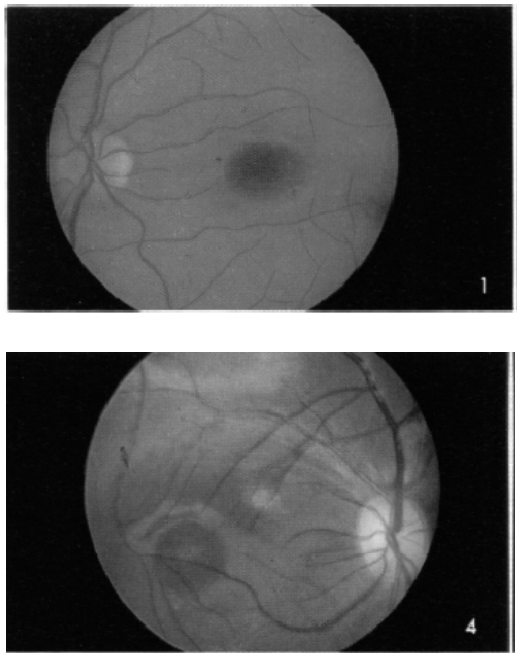


Рис. 1 1- Глазное дно человека.
4 - Глазное дно Rhesus monkey (Macaca mulatta).

Также проведены исследования глазного дна у нескольких приматов, с фоторегистрацией, офтальмоскоп WelchAllyn 118 series (Рис. 2), после расширения зрачка и под анестезией. В процессе исследования также столкнулись с определёнными трудностями, закрытые веки, закатывание глаз после анестезии, которые можно назвать преодолимыми при помощи двух-трёх помощников.

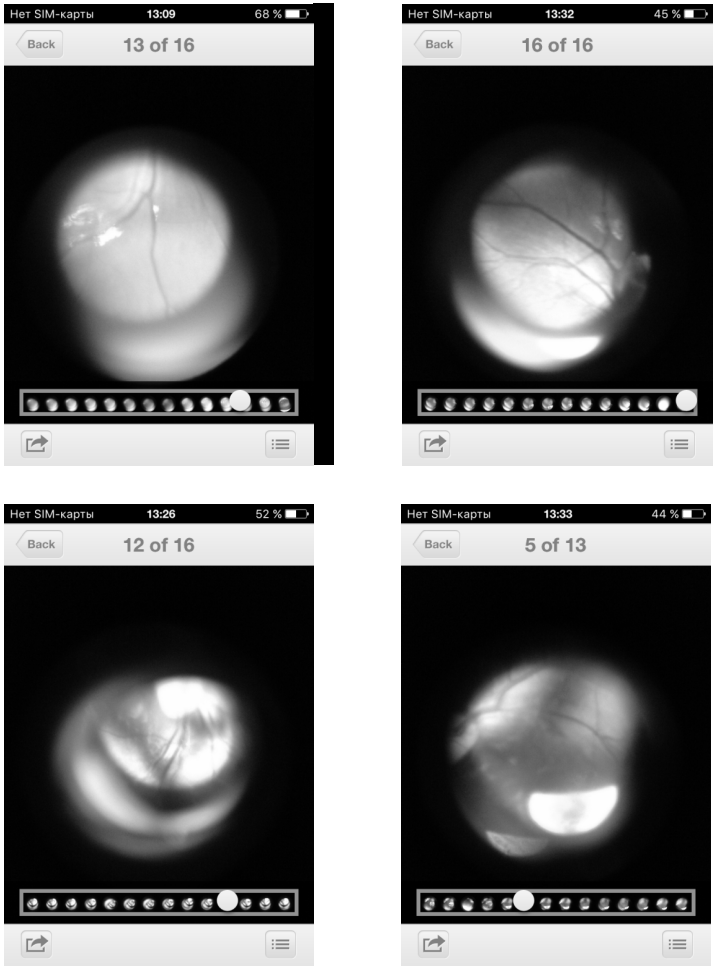


Рис. 2 Фотографии глазного дна макаки Яванские, полученные с помощь офтальмоскоп WelchAllyn 118 series

- В процессе обследования глазного дна были выявлены следующие особенности:
- цвет сетчатки варьировал от ярко-розового до жёлто-розового, иногда жёлто-серого с выраженным рефлексом;
- перераспределение пигмента от густопигментированного, рассеянной крапчатости до депигментаций, иногда в виде белых полос похожих на стрии;

- разрежение хориокапиллярного слоя (местами видны сосуды хориоидеи);
- диск зрительного нерва чаще овальной формы, иногда тёмного цвета, иногда серого, чаще пигментирован вокруг, больше с височной сторон;
- артериолы и венулы не заходят на центральную зону, однако аваскулярная область несколько сужена, тёмного цвета, с выраженным кольцевым рефлексом.

Таким образом, считаем важным и целесообразным, продолжение исследований по изучению физиологических параметров и зрительных функций приматов, для более правильного понимания патологических процессов, поставленных перед исследователем вопросов и наиболее адекватных и достоверных ответов. Предполагаем, в дальнейшем, углубление таких исследований, с применением флюоресцентной ангиографии и флюорометрии, дающие возможность изучения скрытых дефектов, таких как - проницаемость роговицы, проницаемость сосудистых стенок, наличия точек фильтрации в пигментном эпителии и др.. Такого рода исследования позволят значительно расширить возможности получения наиболее достоверной информации для разного рода исследований и исследователей, при достаточно распространённых патологиях с тяжёлым типом течения и прогнозом (диабет, гипертония, атеросклероз, вирусные, аллергические и др. патологии)

Список литературы

1. JOHNSON, G. L. (1901). Contributions to the comparative anatomy of the mammalian eye, chiefly based on opthalmoscopic examination. Phil. Trans. R. Soc. B, 194, 1-82.
2. LEE R. WOLIN AND L. C. MASSOPUST, JR. (September 1967) Characteristics of the ocular fundus in primates. J. Anat. 101 (Pt 4): 693–699.
3. MARTIN, R. D. (1966). Tree shrews: unique reproductive mechanism of systematic importance. Science N. Y. 152, 1402-1404.
4. ORDY, J. M., MAssOPUST, L. C., JR. & WOLIN, L. R. (1962). Postnatal development of the retina, electroretinogram, and acuity in the rhesus monkey. Expl Neurol. 5, 364-383.
5. SAMORAJSKI, T., ORDY, J. M. & KEEFE, J. R. (1966). Structural organization of the retina in the tree shrew (Tupaia glis).
6. SIMPSON, G. G. (1945). The principles of classification and a classification of mammals. Bull. Am. Mus. nat. hist. 85, New York.

7. SMITH, J. L., REYNOLDS, D. H., RANE, L. & JUSTICE, J., JR. (1964). The fundus oculi in the squirrel, owl and marmoset monkey. Am. J. Ophthal. 57, 431-434.

КОРРЕКЦИЯ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ПОЖИЛЫХ МАКАК С ПОМОЩЬЮ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Беляков А.В., Семенов Д.Г., Рыбникова Е.А., Самойлов М.О.

ФГБУН Институт физиологии им. И.П.Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Определенные режимы воздействия умеренных форм гипоксии обладают нейропротективной эффективностью. Этот факт неоднократно установлен на множестве экспериментальных моделей, использующих, в основном, крыс и мышей. В частности, механизмы благотворного действия барокамерной умеренной повторяющейся гипобарической гипоксии («высота» 5000 м, 2 часа, три раза с интервалом 24 часа) изучены в Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН на различных уровнях (от поведенческого до геномного). Эта немедикаментозная процедура проявляет свою нейропротективную эффективность как в режиме пре-, так и пост-кондиционирования. Остается не ясным, может ли такой подход быть применен в отношении коррекции когнитивных расстройств мозга и, в частности, стареющего. Для исследования в этом направлении был применен метод количественного анализа когнитивных функций макак-резусов в условиях поведенческого эксперимента по распознаванию зрительных образов. Одни и те же обезьяны были тестированы по единой методике дважды, с перерывом 10-15 лет. Установлены характеристики ухудшения познавательных способностей этих животных в старости. На этих особях была применена процедура умеренного гипобарического воздействия. Результаты последующего тестирования показали стойкое (месяцы) усиление мотивации и работоспособности животных, сокращение периода усвоения задачи, повышение скорости реакции, снижение процента ошибочных решений, улучшение кратковременной памяти и др.

Таким образом, применение указанной гипобарической процедуры может быть использовано на приматах и, вероятно, человеке, как ноотропное и нейропротективное средство в борьбе со старческими когнитивными расстройствами.

COGNITIVE FUNCTION CORRECTION OF ELDERLY MACAQUES USING HYPOBARIC HYPOXIA

Belyakov A.V., Semenov D.G., Rybnikov E.A., Samoylov M.O.

FSBRI "I.P. Pavlov Institute of Physiology", Saint-Petersburg, Russia

Abstract

Certain regiments of hypoxia moderate forms a neuroprotective efficiency. This fact was repeatedly established on a set of experimental models using primarily rats and mice. In particular, the beneficial mechanisms of pressure chamber repeated moderate hypobaric hypoxia ("height" 5000 m, 2 hours, three times with an interval of 24 hours) were studied on different levels (from behavioral to genomic) at the Pavlov Institute of Physiology. This non-pharmacological treatment exerts its neuroprotective efficacy both in pre- and post-conditioning regiments. It remains unclear whether this approach could be applied in respect of the correction of cognitive brain disorders, in particular aging brain. The quantitative analysis of rhesus monkey cognitive functions in behavior experiment of visual images recognition was carried out. The same monkeys were tested using the same methodology twice, with an interval of 10-15 years.

The deterioration of cognitive abilities characteristics of these animals in their old age was found. So the procedure of moderate hypobaric exposure was applied to these animals. The results of subsequent tests showed a persistent (months) increase in motivation and operability , the reduction of the period of the task learning, the increase of reaction speed, the decreased percentage of erroneous decisions, and the improve of short-term memory, etc.

Thus, this hypobaric procedure may be used in primates and probably, human as nootropic and neuroprotective remedy agent in combating senile cognitive disorders.

Познавательные функции мозга формируются в детстве, совершенствуются в зрелом возрасте и угасают в старости. Причины, приводящие к их ослаблению связаны с ухудшением трофики нейронов и, в конечном счете, сходятся на молекулярно-клеточном уровне организации мозговой ткани, вызывая дисбаланс внутриклеточных сигнальных механизмов и развитие нейродегенеративных процессов. На клеточном уровне механизмы деменции идентичны механизмам гипоксического (ишемического) повреждения нейронов, классические представления о которых общеизвестны. Вместе с тем известно, что гипоксические воздействия в умеренных «дозах», как и любой умеренный стресс, способны

активировать в организме адаптивные механизмы вплоть до молекулярно-клеточного уровня. С начала 90-х годов в нескольких лабораториях мира, включая лаб. Регуляции функций нейронов мозга Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, на различных уровнях (от поведенческого до геномного) ведутся исследования механизмов нейропротекции, индуцируемых в мозге умеренной гипоксией [1-4]. В настоящее время такие воздействия, как гипоксическое пре- или пост-кондиционирование, интервальная гипоксическая тренировка и др. не только интенсивно исследуются самыми современными методами, но и все шире применяются в медицинской практике. Исследования в этой области проводятся главным образом на грызунах в отношении защиты мозга от последствий острых патологических воздействий гипоксической (ишемической) природы. Вместе с тем остается не ясным, обладают ли методы нейропротективного умеренного гипоксического стресса эффективностью в отношении старческих когнитивных расстройств.

Очевидно, что лучшим объектом для проведения таких исследований являются приматы. В Институте физиологии им. И.П.Павлова РАН исследования когнитивных способностей макак и возможностей воздействия на них проводились с 90-х годов методами, разработанными К.Н.Дудкиным с сотрудниками [5,6]. Методика базируется на количественной оценке нескольких характеристик восприятия обезьяной пар зрительных образов, различающихся по определенным признакам. Протоколы старых экспериментов и соответствующие индивидуальные когнитивные характеристики нескольких молодых, тогда, обезьян были сохранены и использованы в качестве сравнительного материала в тестах на тех же животных, находящихся теперь в возрасте более 20 лет.

Задачей настоящего исследования было оценить изменения когнитивного статуса пожилых обезьян и скорректировать его определенным режимом умеренной гипобарической гипоксии, нейропротективная эффективность которого предварительно была установлена в экспериментах на крысах.

Методы. Процедуру умеренной гипобарической гипоксии (УГГ) проводили следующим образом. Животное, размещенное в приматологическом кресле, помещалось в гипаборическую камеру КГ6-760/450-«Таганай-2» проточного типа объемом 6 куб.м, в которой постепенно снижалось атмосферное давление с сохранением газообмена с внешней средой (Рис.1). Давление снижалось ступенчато так, чтобы в течение 20 мин разрежение воздуха в камере достигло уровня, соответствующего высоте 5000 м над уровнем моря. В этих условиях

животное выдерживалось 2 часа и затем плавно, «опускалось» до нормализации давления в камере. Скорость «подъема» и «спуска» не превышала 4 м/с. Процедуру проводили 3 раза с интервалом 24 ч.



Рис.1 Макака в приматологическом кресле помещена в барокамеру. Разрежение воздуха соответствует высоте 5000 м над уровнем моря.

До и после воздействия ЗУГГ перед животным располагали автоматизированный стенд, содержащий два одинаковых подвижных планшета, на экраны которых подавались пары изображений, различающиеся по ряду признаков, среди которых один был «условно значимым». Обезьяна, произвольно выбирая изображение, нажимала на один из планшетов и автоматически получала питьевое подкрепление в случае, если значимый признак был ею случайно угадан. В ходе обучения выбор животного становился осознанным и заданный признак считался обнаруженным и запомненным, если вероятность его выбора достигала 85 – 90%. На следующем этапе предъявлялись иные пары образов с другим «значимым» признаком и обучение продолжалось вплоть до усвоения животным новых условий, и т.д. При формировании пар образов использовалась библиотека «проблем узнавания Бонгарда». Очередной этап обучения включал усложнение, заключающееся в том, что на стадии сформированного правильного выбора во время очередных предъявлений образов перед дисплеями поднималась прозрачная заслонка, не позволяющая животному реализовать свой навык. Затем изображения гасли, но заслонка опускалась лишь несколько секунд спустя (от 1 до 4). После этого животное имело возможность реализовать свой выбор «по памяти». Анализ когнитивных функций заключался в количественной оценке нескольких поведенческих характеристик, среди которых: число попыток для достижения 85% уровня правильного выбора (в условиях свободной или отсроченной реализации),

время двигательной реакции от предъявления до нажатия, количество отказов от выполнения задачи, устойчивость правильного ответа после осознания задачи и др.

Результат. В экспериментах на нескольких обученных пожилых макаках обоего пола было установлено, что процедура УГГ существенно снижает время реакции животного, число отказов и общее время работы с тестами до заметного снижения результативности, что свидетельствует о повышении рабочей мотивации и работоспособности в целом. Кроме этого увеличивалась доля правильных ответов, в том числе с применением отсрочки реализации, что свидетельствует об улучшении кратковременной памяти. Следует отметить, что оцениваемые характеристики пожилых обезьян, подвергнутых УГГ существенно приближались к уровням, определенным для них в молодости. При повторных тестированиях этих животных было определено, что позитивный эффект воздействия УГГ поддерживался от 2 до 6 месяцев. Рис. 2 представляет немедленное и отдаленное влияние УГГ на два показателя работоспособности и показатель кратковременной памяти одной из обезьян.

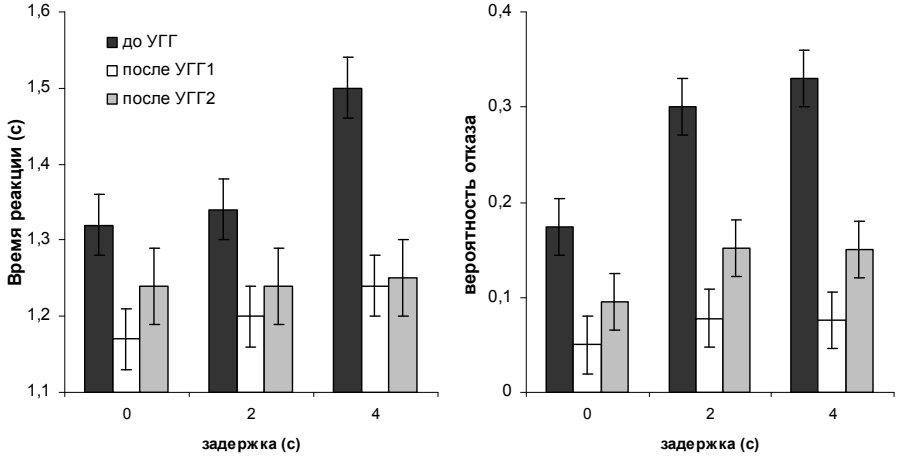


Рис. 2 Немедленный - через сутки («после УГГ1») и следовой - через 2 месяца («после УГГ2») эффект процедуры УГГ на когнитивные характеристики пожилой обезьяны в сравнении с характеристиками, измеренными перед воздействием («до УГГ»). Слева – влияние УГГ на время реакции животного; справа – вероятность отказа от работы. Группы по горизонтальной оси – характеристики, измеренные при неограничиваемой возможности ответа (0) и при ее ограничении на 2 или 4 с, соответственно.

В планы дальнейших исследований входит применение гипобарических процедур на молодых обезьянах с целью воздействия на процессы становления когнитивных функций их мозга. Кроме этого планируется оценить профилактический (гипобарическое прекондиционирование) и лечебный (гипобарическое посткондиционирование) эффекты УГГ на обезьянах, подвергнутых негативному воздействию определенных психотропных препаратов, включая средства вызывающие развитие болезни Альцгеймера.

Список литературы

1. Рыбникова и др. Морфология, 2004,125(2):10-15
2. Баранова и др. РФЖ им. Сеченова 2009, 94(4): 405-416
3. Самойлов М.О., Рыбникова Е.А. РФЖ им. Сеченова 2012 98(1): 108-126
4. Semenov D.G. et al. Neurochem Res. 2015 40(11): 2200-2210
5. Дудкин К.Н. и др. Доклады АН. 1993, 333(4): 543-545.
6. Дудкин К.Н. И.П. Павлов и нейрофизиология познавательных процессов. СПб. ИФРАН. 2007. 295 с.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 13-04-90433, 14-04-00516

АГРЕГАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЭРИТРОЦИТОЗАХ.

Ахуба Л.О., Ершова Л.И.**, Баркая В.С.*, Сабекия Ж.Дж.**

* *Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии*

** *ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ*

Резюме

Роль реологических свойств крови установлена при многих заболеваниях, в том числе и гематологических. Значимость гемореологических нарушений в развитии патологического процесса, а также механизмы, их вызывающие, могут отличаться, несмотря на универсальный неспецифический характер изменений реологических свойств крови. Целью нашей работы являлось изучение агрегационного потенциала эритроцитов, макро- и микрореологических свойств крови при первичном наследственном эритроцитозе. Исходя из литературных данных, среди факторов,

способствующих агрегации эритроцитов, можно выделить три основные группы: плазматические, эритроцитарные, гемодинамические.

В наше исследование включены данные обследования 15 пациентов с диагнозом эритроциоз. Определяли следующие парметры: вязкость крови на разных скоростях сдвига; Т1 – время образования линейных агрегатов, «монетных столбиков» (с); Т2 – время образования крупных агрегатов, (с); Ia2,5 – прочность самых крупных агрегатов, %; β– гидродинамическая прочность агрегатов, с -1; вязкость; агрегация эритроцитов в аутоплазме(АЭ); скорость оседания эритроцитов (СОЭ).

Показатели вязкости крови на разных скоростях сдвига достоверно отличались в двух группах. Так у больных вязкость крови на скоростях сдвига менее 1,2с $^{-1}$ в два раза выше, чем у доноров, при этом отличия сглаживаются с увеличением скорости сдвига более 80с$^{-1}$ (асимптотическая вязкость крови). Показателями, характеризующими плазматический агрегационный потенциал, в нашей работе являются скорость оседания эритроцитов и вязкость плазмы, так как эти два показателя определяются содержанием крупномолекулярных белков и находятся в прямой зависимости от соотношения белковых фракций. СОЭ достоверно снижена, а ВП находится в пределах нормы, что свидетельствует о том, что плазматические факторы агрегационного потенциала у больных эритроцитозом снижены либо соответствуют таковым у доноров. Эритроцитарные факторы агрегационной составляющей эритроцитов в нашей работе оценивались по времени образования линейных агрегатов, «монетных столбиков» и крупных агрегатов, а также по прочности самых крупных агрегатов и гидродинамической прочности агрегатов. Все эти показатели не отличаются достоверно от таковых у донорских, что позволило нам сделать вывод о том, что эритроцитарный агрегационный потенциал у больных эритроцитозом неизменен. Третья составляющая агрегационного потенциала эритроцитов – гемодинамические факторы. Увеличение склонности эритроцитов к агрегации на низких скоростях сдвига находится в положительной корреляции с вязкостью сдвига на низких скоростях, характеризуется повышением показателя агрегации эритроцитов в аутоплазме (АЭ) в среднем на 70% у больных эритроцитозом. В результате нашей работы ясно, что агрегационный потенциал эритроцитов при первичном наследственном эритроцитозе не зависит от плазматических и эритроцитарных факторов и связан лишь с гемодинамическими процессами. Что увеличивает риск возникновения тромбозов в микроциркуляторном русле, находящийся в корреляционной зависимости от уровня гематокрита,

вязкости крови на низких скоростях сдвига и агрегации эритроцитов в аутоплазме (при скорости сдвига, стремящейся к нулю).

AGGREGATION POTENTIAL OF ERYTHROCYTES AT ERYTHROCYTOSIS

Akhuba L.O., Ershova L.I.**, Barkaya V.S.*, Sabekia Zh. Dzh.**

** Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the Abkhazian Academy of Sciences*

*** FSBI Hematological research center of Ministry of Healthcare of the Russian Federation*

Abstract

The role of blood rheological properties is determined at many diseases including hematological ones. The importance of hemorheological disorders in the development of the pathological process and mechanisms causing these disorders can be different in spite of the universal nonspecific character of changes of blood rheological properties. The goal of our work was the study of aggregation potential of erythrocytes, macro- and microrheological properties of blood at primary inherited erythrocytosis. On the basis of literature data, among factors promoting erythrocyte aggregation three main groups can be distinguished: plasmatic, erythrocytic and hemodynamic. In our research the data of examination of 15 patients diagnosed with erythrocytosis are included. The following parameters were determined: the blood viscosity at various shear rates; T1 – the time of linear aggregate formation, “rouleaux”, (s); T2 – the time of large aggregate formation, (s); $I_a^{2.5}$ – the stability of the most stable aggregates, %; β – hydrodynamic stability of aggregates, s $^{-1}$; viscosity; erythrocyte aggregation in autoplasma; the erythrocyte sedimentation rate (ESR). Coefficients of blood viscosity at various shear rates were meaningfully different in two groups. At shear rates lower than 1.2s $^{-1}$ the blood viscosity in patients was the double of one in donors. Differences were smoothed with the shear rate increase to more than 80s^{-1} (asymptotic blood viscosity). In our work, factors characterizing the plasma aggregation potential are the erythrocyte sedimentation rate and the plasma viscosity, because these two coefficients are defined by the level of large-molecule proteins and directly depend on the ratio of protein fractions. ESR is meaningfully decreased and plasma viscosity is normal, showing that plasmatic factors of the aggregation potential in patients ill with erythrocytosis are decreased or accord with ones in donors. In our work, erythrocyte factors of the erythrocyte aggregation component were assessed

by the time of formation of linear aggregates, rouleaux and large aggregates, and also by the stability of the largest aggregates and the aggregate hydrodynamic stability. All these factors don't definitely differ from ones in donors allowing us to make a conclusion that the erythrocyte aggregation potential is unchanged in patients ill with erythrocytosis. Hemodynamic factors are the third component of erythrocyte aggregation potential. The increase of erythrocyte tendency to aggregation at low shear rates directly correlates with the shear viscosity at low rates and is characterized by the average 70% increase in the factor of erythrocyte aggregation in autoplasma in patients ill with erythrocytosis. From our work it is clear that at the primary inherited erythrocytosis the aggregation potential of erythrocytes doesn't depend on plasmatic and erythrocytic factors and is connected only with hemodynamic processes. This increases the risk of thrombosis appearance in the microcirculatory bloodstream correlating with the hematocrit level, blood viscosity at low shear rates and erythrocyte aggregation in autoplasma (at the shear rate tending to zero)

Роль реологических свойств крови установлена при многих заболеваниях, в том числе и гематологических. Значимость гемореологических нарушений в развитии патологического процесса, а также механизмы, их вызывающие, могут отличаться, несмотря на универсальный неспецифический характер изменений реологических свойств крови. И, несмотря на важную роль последних в патогенезе развития непосредственно нозологии и осложнений многих гематологических заболеваний, в литературе встречаются лишь отдельные сообщения, касающиеся реологических свойств крови при некоторых гематологических заболеваний (эритремия, миеломная болезнь) (1,2). Исходя из этого, мы решили проанализировать роль реологических изменений при эритроцитозе - мало изученном с точки зрения реологии патологическом состоянии, при котором в единице объема крови, количество эритроцитов значительно превышает физиологические нормы. Первичный наследственный эритроцитоз – это заболевание, вызванное генетическим дефектом в молекуле гемоглобина, вследствие которого затруднена отдача кислорода тканям. В результате развивается гемическая гипоксия, ведущая к повышенному выделения эритропоэтина, стимулирующего усиление эритропоэза (3,4,5). Целью нашей работы являлось изучение агрегационного потенциала эритроцитов, макро- и микрореологических свойств крови при первичном наследственном эритроцитозе. Исходя из литературных данных, среди факторов, способствующих агрегации эритроцитов, можно выделить три основные группы (6,7,8):

1. Плазматические, характеризуются содержанием крупномолекулярных белков и соотношением белковых фракций.
2. Эритроцитарные факторы агрегационной составляющей характеризуются при определении скорости образования эритроцитарных агрегатов различных размеров и их прочности.
3. Гемодинамические факторы могут быть причиной агрегации эритроцитов при замедлении тока крови в микроциркуляторном русле.

В нашей работе мы дали полную оценку агрегационного потенциала эритроцитов при эритроцитозе.

Материалы и методы

В наше исследование включены данные обследования 15 пациентов с диагнозом эритроцитоз, поступивших в Гематологический научный центр в период с 1998 по 2012 гг. Реологические показатели определялись в лаборатории патофизиологии крови.

Обследование проводилось по следующим параметрам:

-- Измерение вязкости крови асимптотической, на разных скоростях сдвига от 0,1 до 117 $с^{-1}$ на приборе Low Contraves (LSC);

-- Показатели агрегации и дезагрегации определяли на аппарате ЛАДЭ-5 по параметрам; Т1 – время образования линейных агрегатов, «монетных столбиков» (с); Т2 – время образования крупных агрегатов, (с); Ia2,5 – прочность самых крупных агрегатов, %; β-гидродинамическая прочность агрегатов, с -1.

-----измерение вязкости плазмы на АКР – 2 (ВП);

-- Определяли так же агрегацию эритроцитов в аутоплазме(АЭ);

-- Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) определяли по методу Панченкова.

Результаты

При изменении вязкости крови на различных скоростях сдвига в группе доноров и больных эритроцитозом были построены две вискозиметрические кривые, представленные на рисунке 1. Анализ этих кривых показал, что вязкость крови на низких скоростях сдвига достоверно отличается в двух группах. Так у больных вязкость крови на скоростях сдвига менее 1,2 $с^{-1}$ в два раза выше, чем у доноров, при этом отличия сглаживаются с увеличением скорости сдвига более 80 $с^{-1}$ (асимптотическая вязкость крови). Асимптотическая вязкость крови больных незначительно повышена относительно донорских показателей ($p \leq 0,05$).

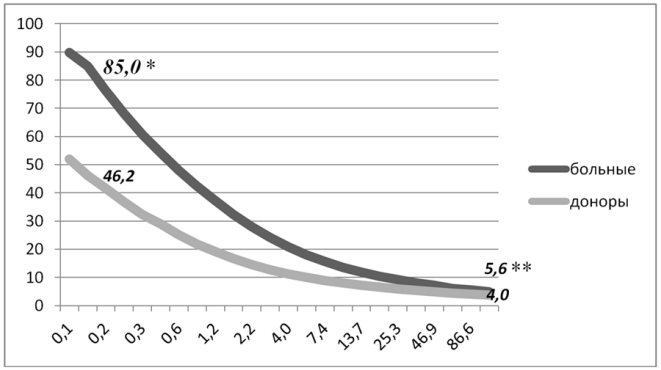


Рис. 1 Вискозиметрические кривые в зависимости от скорости сдвига (* - p < 0,001 в сравнении с показателями крови доноров; ** - p < 0,05 в сравнении с показателями крови доноров).

Картина реологических параметров была бы неполной без изучения агрегационно - дезагрегационного потенциала эритроцитов и их способности к деформации. С этой целью мы использовали максимальное количество тестов, дающих полную характеристику агрегационного потенциала эритроцитов при эритроцитозах. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели агрегации и дезагрегации эритроцитов при эритроцитозе

показатели	Доноры	Больные
Гематокрит, л/л	0,45± 0,05	***0,64±0,25****
ВП, мПА*с	1,4±0,16	1,3±0,23
СОЭ, мм	6±1,12	***2±0,25****
Т 1, с	7,81±0,32	7,6±0,45
Т 2, с	37,97±0,45	39,7±0,65
β, $с^{-1}$	32,9±1,02	39,3±4,15
$I_a^{2,5}$,%	-13,7±0,28	-13,4±6,58
АЭ, мм	53±0,5	***91,2±4,32****

Примечание: * - p <0,001 в сравнении с показателями крови доноров.

Показателями, характеризующими плазматический агрегационный потенциал, в нашей работе являются скорость оседания эритроцитов и вязкость плазмы, так как эти два показателя определяются содержанием крупномолекулярных белков и находятся в прямой зависимости от соотношения белковых фракций. Из таблицы видно, что показатель СОЭ достоверно снижен, а ВП находится в пределах нормы, что свидетельствует о том, что плазматические факторы агрегационного потенциала у больных эритроцитозом снижены либо соответствуют таковым у доноров. Эритроцитарные факторы агрегационной составляющей эритроцитов в нашей работе оценивались по времени образования линейных агрегатов, «монетных столбиков» и крупных агрегатов, а также по прочности самых крупных агрегатов и гидродинамической прочности агрегатов. Все эти показатели не отличаются достоверно от таковых у донорских, что позволяет нам сделать вывод о том, что эритроцитарный агрегационный потенциал у больных эритроцитозом неизменен. Рассмотрим последнюю составляющую агрегационного потенциала эритроцитов – гемодинамические факторы. Увеличение склонности эритроцитов к агрегации на низких скоростях сдвига находится в положительной корреляции с вязкостью сдвига на низких скоростях (рис. 1), характеризуется повышением показателя агрегации эритроцитов в аутоплазме (АЭ) в среднем на 70% (табл.1) у больных эритроцитозом. Такая картина объяснима увеличением количества форменных элементов при эритроцитозе (уровень гематокрита), в частности эритроцитов.

Таким образом, в результате нашей работы ясно, что агрегационный потенциал эритроцитов при первичном наследственном эритроцитозе не зависит от плазматических и эритроцитарных факторов и связан лишь с гемодинамическими процессами. Что увеличивает риск возникновения тромбозов в микроциркуляторном русле, находящийся в корреляционной зависимости от уровня гематокрита, вязкости крови на низких скоростях сдвига и агрегации эритроцитов в аутоплазме (при скорости сдвига, стремящейся к нулю).

Список литературы

1. Pearson TC. Hemorheologic considerations in the pathogenesis of vascular occlusive events in polycythemia vera / Semin Thromb Hemost. - 1997 - 23(5) - 433-9 - Review.

2. Reinhart WH, Lutolf O, Nydegger UR, Mahler F, Straub PW. Plasmapheresis for hyperviscosity syndrome in macroglobulinemia Waldenstrom / J Lab Clin Med.- 1992 Jan - 119(1) - 69-76.
3. Фред Дж. Шиффман, ред. Патофизиология крови, М.-СПб.: «Издательство БИНОМ» - «Невский диалект», 2000.
4. Воробьев А.И. Гемобластозы. - Справочник терапевта, 1999, ч.2, глава 17, 403-404.
5. Френкель М.А. Современная диагностика миелопролиферативных новообразований (классификация ВОЗ 2008 г.). Клиническая лабораторная диагностика; 2011,1: 43-49.
6. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. – М.: Медицина; 1982.
7. Муравьева Л.П., Муравьев В.В., Мурыгина С.В. Факторный анализ реологических свойств крови и микроциркуляции у больных истинной полицитемией. /II Международная конференция «Микроциркуляция и гемореология» - Ярославль-Москва – 1999 – с.206-207.
8. А.В. Бердников, М.В. Семко, Ю.А. Широкова Медицинские приборы, аппараты, системы и комплексы. Часть I. Технические методы и аппараты для экспресс-диагностики: Учебное пособие / Казань: Изд-во Казан. гос. техн. ун-та, 2004. 176 с.

РОЛЬ ЯДРЫШКОВОГО БЕЛКА НУКЛЕОФОЗМИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ALK -ПОЗИТИВНОЙ АНАПЛАСТИЧЕСКОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ

Букаева И.А.,Райхлин Н.Т., Пробатова Н.А., Поддубная И.В., Семенова А.А.,Смирнова Е.А., Шабанов М.А.

НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им.Н.Н.Блохина», Минздрава России , Москва , РФ

ROLE OF NUCLEOPHOSMIN IN THE PATHOGENESIS OF ALK-POSITIVE ANAPLASTIC LARGE-CELL LYMPHOMA

Bukaeva I., Raikhlin N., Probatova N., Poddubnaya I., Semenova A.,Smirnova E.,Shabanov M.

Blokhin Russian Cancer Research Center,Moscov, Russia

Abstract

Nucleophosmin (NPM) also known as B23, NO38 and numatrin is an abundant, highly conserved nucleolar phosphoprotein which belong to the family of nucleolar chaperons. NPM has several interacting partners and diverse cellular functions, including the processing of ribosomal RNA, centrosomal duplication and control of cellular processes to ensure genomic stability. NPM is more highly expressed in proliferating cells than in quiescent ones. NPM overexpression has been reported in carcinomas of different origin: ovarian, prostate, colon and bladder. In bladder cancer NPM overexpression is a prognostic marker for recurrence and progression. The *NPM* gene is a common target for genetic alteratrion in hematological malignancies (lymphomas and leukemias). The genetic alteration include frameshift mutations, translocation, and deletions.About 70-80% of ALK+ALCL carry the t(2;5)(p23;;q35) chromosomal translocation in whch the *ALK* gene on chromose 2 is fused with the *NMP* gene on chromosome 5.The chimeric gene encodes for a fusion protein comprising the amino-terminal portion of NPM, containing the oligomerization domain and the entire cytoplasmic region of ALk, containing the tyrosine kinase domain which accounts for the oncogenic properties of ALK- fusion protein in ALK+ALCL.. The role of NPM moiety in the chimeric product is not fully chasracterized and it is conceivable that ,while the tyrosine kinase property of the ALK domain leads to the activation and transformation, the NPM moiety may also have an important role in the NPM-ALK induced transformation.

The aim of our study was to evaluate the expression of NPM , Ag-NOR-proteins, NPM- ALK fusion protein and antigene Ki-67 by using corresponding monoclonal antibodies. The study comprised 14 cases of ALK+ALCL. The ALK+ALCL have been diagnosed according to the Real classification. Our data revealed a high level of NPM and Ag-NOR-proteins expression in majority of tumor cells NPM is overexpressed in 21% of tumor cells; high expression was observed in 65% and 11% of cell were with moderate expression.Tumor cells of ALK+ALCL contain the NPM-ALK fusion protein and the wild-type NPM protein. . The mean number of proliferating cells determined by Ki-67 index was 66,7±3,74% (range 49-80%).There was statistical correlation between NPM, Ag-NOR-proteins and Ki67 expression ($r=0,966$; $p< 0,001$ and $r=0,698$; $p<0,05$ respectively).We believe that high level of wild –type NPM in spite of the loss of one functional allele of the NPM gene ,due to chromosomal translocation, may be regulated in cells of ALK+ALCL at the level of gene transcription, and also via posttranslational modification affecting protein stability. The aberrant expression of NPM promote cell growth through enhancement of ribosome machinery and by inhibiting programmed cell death. In these conditions NPM may function as an

oncogene and promote tumorigenesis. Moreover when NPM expression is increased NPM could be involved in the regulation and activation of Ras-ERK, PI3K/Akt and STAT3 –pathways and intensify tumorigenic behavior of ALK+ALCL tumor cells. These data show that NPM might play an important role in the pathogenesis of ALK+ALCL.

Введение

Нуклеофозмин (NPM) ,также известный как B23, NO38 и нуматрин, является высококонсервативным ядрышковым фосфопротеином, который относится к семейству ядерных шаперонов. Ген *NPM* содержит 12 экзонов и локализован на хромосоме 5q35. На белковой молекуле NPM картированы три функционально-значимых домена, играющих важную роль в проявлении и регуляции его активности: N-концевой,-центральный- и С-концевой домены. N-концевой домен (а.о. 1-120) является ответственным за олигомеризацию молекул NPM. Этот домен также важен для проявления шаперонной активности белка. Расположенные в N-концевом домене два лейцин-богатых участка (а.о. 42-49 и 94-102) содержат сигналы ядерного экспорта (NES), регулирующие ядерно-цитоплазматическую миграцию NPM, а также транспорт пре-рибосомных единиц из ядра в цитоплазму (а.о. 42-49) и экспорт NPM из ядра и его локализацию в центриолях. В центральной части молекулы белка (а.о. 119-188) расположены два кислых домена, необходимые для связывания гистонов, сборки центросом и для регуляции эндорибонукклеазной активности NPM . В этой области молекулы содержатся сигналы ядерной локализации (NLS), которые, как и сигналы ядерного экспорта (NES), регулируют ядерно-цитоплазматическую миграцию NPM. С-концевая часть молекулы NPM (а.о. 117-294) содержит РНК- и ДНК -связывающие домены, а также домены, связывающие ряд белков, в том числе белки p53, c-Myc, FOXM1, AKT, pRb. С-концевой домен играет исключительно важную роль в обеспечении ядрышковой локализации NPM; именно в этом участке молекулы NPM, внутри РНК-связывающего домена, находятся сигналы ядрышковой локализации (NuLS). Ядрышковая локализация NPM обеспечивается двумя аминокислотными остатками триптофана (а.о. 288 и 290). NES, NLS и NuLS -сигналы являются важными для функциональной активности NPM, поскольку определяют миграцию, локализацию и аккумуляцию белка в клетке. NPM подвергается ряду пост-трансляционных модификаций (фосфорилирование, ацетилирование, рибозилирование, убиквитинирование), оказывающих существенное влияние на его функциональную активность. Строение белковой молекулы NPM, его способность связываться с большим числом белков-партнеров отражает

сложность и многообразие выполняемых NPM функций, благодаря чему NPM является ключевым белком в целом ряде клеточных процессов. NPM включается в регуляцию биогенеза рибосом и пролиферативной активности клеток; участвует в репликации, транскрипции и репарации ДНК, в контроле клеточного ответа на апоптогенные и онкогенные стимулы. Среди других важнейших функций NPM следует отметить его участие в дупликации центросом, где он выполняет роль «молекулярного блока», благодаря которому дупликация центросом осуществляется только один раз в течение клеточного цикла, что предотвращает возможность амплификации центросом и образования многополюсных митозов. Утрата контролирующей функции NPM приводит к неограниченной дупликации центросом , генетической нестабильности и повышенному риску злокачественной трансформации клеток. В условиях сверхэкспрессии NPM функционирует как онкоген. В клетках опухолей разного гистогенеза отмечена повышенная экспрессия NPM и для ряда опухолей, таких как рак желудка, молочной железы, яичников, предстательной железы, а также колоректального рака повышенная экспрессия NPM рассматривается как биомаркер. Экспрессия NPM увеличивается при рецидивах опухолей и по мере нарастания степени злокачественности новообразований. Онкогенные свойства NPM реализуются через механизмы регуляции биогенеза рибосом и пролиферативной активности клеток. В лимфомах и лейкозах ген *NPM* часто подвергается генетическим изменениям, в частности транслокациям. При транслокации t(2;5)(p23;q35), наблюдающейся в 70-80% анапластических крупноклеточных лимфом, часть гена, кодирующего NPM , сливается с частью гена, кодирующего киназу анапластической лимфмы (*ALK*), при этом «молчащий» в лимфоидных клетках ген *ALK* переходит под контроль мощного промотора гена *NPM,* что приводит к повышенной и нерегулируемой экспрессии химерного гена, продуктом которого является онкогенный слитный белок NPM-ALK (или ALK). Онкогенный NPM-ALK активирует сигнальные пути- Ras-ERK(Ras-extracellular signal-regulated kinase), PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase) и STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). Полагают, что онкогенные свойства NPM -ALK определяются главным образом активностью тирозинкиназного домена цитоплазматической области белка ALK, тогда как роль NPM в этом процессе ограничена и заключается лишь в запуске транскрипционной активности «молчащего» гена *ALK* и в образовании гомодимеров NPM-ALK,ответственных за аутофосфорилирование и активацию тирозинкиназного домена. В клетках ALK-положительной анапластической крупноклеточной лимфомы (ALK+АККЛ) в основном исследовались

экспрессия слитного белка и активность Ras-ERK, PI3K/Akt и STAT3-путей. Экспрессия белка NPM в клетках ALK+АККЛ остается недостаточно изученной.

Задача исследования

Задачей данной работы явились исследования в клетках ALK+АККЛ экспрессии слитного белка NPM-ALK, белка нуклеофозмина (NPM) и Ag-ОЯОР-белков, значительную часть которых составляет NPM . Для более полной характеристики пролиферативной активности наряду с исследованиями экспрессии NPM и Ag-ОЯОР-белков, характеризующих скорость клеточной пролиферации, проводили исследование экспрессии антигена Ki-67 (индекс Ki-67),отражающего количество пролиферирующих клеток.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили 14 наблюдений классического варианта ALK+АККЛ. Диагноз ALK+АККЛ устанавливался на основании морфологических и иммуногистохимических исследований в соответствии с требованиями Real классификации лимфом. Для выявления слитного белка NPM-ALK использовали моноклональные антитела к ALK (фирма "Dako", клон ALK-1). Белки Ag-ОЯОР выявляли с применением гистохимической реакции с нитратом серебра. Интенсивность реакции оценивали по числу гранул серебра, образующихся в ходе реакции. Гранулы подсчитывали в 100 клетках в каждом случае и оценивали среднее число гранул на ядро в каждом случае. Иммуногистохимическое исследование NPM проводили с применением моноклональных антител- nucleophosmin n/23 (фирма "Labvision", клон mouse mAb23). Оценку иммуногистохимической реакции проводили визуально с учетом интенсивноси окрашивания и устанавливали как низкую (+), умеренную (++), высокую (+++), очень высокую (++++). Иммуногистохимическое исследование экспрессии антигена Ki-67 проводили с применением антител к антигену Ki-67 (фирма "Dako, клон MIB-1). Результаты реакции оценивали в 500 клетках и определяли процент окрашенных клеток. Статистический анализ проводили на основе линейного корреляционного анализа с использованием пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 17. Силу связи между изученными показателями оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Корреляцию принимали значимой на уровне $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

В клетках всех исследованных ALK+АККЛ выявлялась экспрессия слитного белка NPM-ALK, при этом в 8 случаях иммуногистохимическая реакция определялась только в цитоплазме опухолевых клеток и в 6 случаях отмечалась ядерно-цитоплазматическая реакция. Наблюдаемая экспрессия слитного белка в ядрах опухолевых клеток свидетельствует об образовании гетеродимеров, состоящих из слитного белка и белка NPM дикого типа, в молекулах которого остаются сохранными сигналы ядерной локализации , вследствие чего гетеродимеры NPM/NPM-ALK могут поступать в ядро при постоянной их циркуляции в клетке (Рис.1.А). В подавляющем большинстве опухолевых клеток отмечалась интенсивная экспрессия Ag-ОЯР-белков и NPM (Рис.1.Б, В). Разрастание опухолевых клеток с высокой интенсивностью экспрессии белков приводило к полному или частичному стиранию рисунка лимфатического узла и формированию широких полей или скоплению клеток в синусах, паракортикальной зоне, вокруг сохранившихся фолликулов; иногда опухолевые клетки располагались дискретно среди реактивного компонента, а также вокруг сосудов и в просвете сосудов. При гистохимическом исследовании Ag-ОЯОР-белков в ядрах клеток ALK+АККЛ было обнаружено в среднем 28,4 ± 1,18 гранул серебра на ядро. При иммуногистохимическом исследовании NPM в подавляющем большинстве клеток отмечена очень высокая (21%) и высокая (68%) экспрессия белка; в 11% клеток зарегистрирована умеренная экспрессия белка. Иммуногистохимическое исследование антигена Ki-67 показало, что количество Ki-67-положительных клеток (индекс Ki-67) составляло в среднем 66,7 ± 3,74 %. Количество Ki-67 –положительных клеток находилось в пределах от 49 до 80 %. Между экспрессией NPM и Ag-ОЯОР, отражающих скорость клеточной пролиферации, и ндексом Ki-67, характеризующим количество пролиферирующих клеток (пролиферативный пул) , была выявлена четкая достоверная корреляция ($r=0,966$; $p<0,001$ и $r=0,698$; $p<0,05$ соответственно).

Наблюдаемая в клетках ALK+АККЛ высокая экспрессия NPM, несмотря на утрату одного функционального аллеля гена *NPM* в результате хромосомных транслокаций, возможно, связана с тем, что регуляция экспрессии белка NPM в клетках этой лимфомы является комплексной и осуществляется как на транскрипционном уровне, так и на уровне посттрансляционных модификаций. Известно, что промотор гена *NPM* содержит респонсивные элементы для транскрипционных факторов c- Мус, HIF1 и STAT3, которые связываются с промоторной областью гена *NPM* и инициируют его экспрессию. Повышенной экспрессии гена *NPM*

способствует также c-Myc-Ras активированный путь, специфической мишенью которого является NPM. Не исключена также и стабилизация его молекул в результате антиапоптотическо действия Ras и стабилизирующего действия Akt. Высокая экспрессия NPM и Ag-ОЯОР-белков, отражающих скорость клеточной пролиферации и высокие значения индекса Ki-67, отражающие пролиферативный пул, свидетельствуют о высоком пролиферативном потенциале клеток ALK+АККЛ, интенсивной транскрипции рибосомных генов и интенсивной репликации ДНК. Способность NPM в условиях высокой экспрессии подавлять апоптоз через разные механизмы и усиливать репарацию поврежденной ДНК наряду с высокой пролиферативной активностью создают в клетках ALK+АККЛ условия для опухолевой прогрессии. В литературе широко была представлена точка зрения, согласно которой N-концевые домены слитных белков кроме олигомеризации и активации киназных доменов, никаких дополнительных функций, важных для онкогенеза, не имеют. Однако исследование лимфом, экспрессирующих X –ALK –слитные белки, где в качестве белка-партнера ALK наряду с NPM были представлены белки TPM3, TFG, CLTC или ATIC выявило различия X-ALK вариантов, заключающиеся в скорости клеточной пролиферации, способности к инвазии, миграции, степени агрессивности. Биологическое поведение лимфом зависело от характера активированного сигнального пути. Эти результаты свидетельствуют о том, что как и тирозинкиназная активность ALK-домена слитного белка, так и N –концевые домены NPM или других белков-партнеров участвуют в активации сигнальных путей, влияют на характер активированных путей и степень их активирования. В ряде последующих работ было показано участие NPM дикого типа (его полноразмерной молекулы) в реализации онкогенного действия ключевых молекул сигнальных путей Ras-ERK, PI3K/Akt и STAT3. Сообщается, что NPM является одним из регуляторов белков K-Ras, ключевых молекул Ras-ERK пути, и играет важную роль в усилении сигналов, передаваемых с мембранносвязанных рецепторов по MAP-киназному пути. NPM взаимодействует с локализованными на внутренней стороне плазматической белками K-Ras , среди которых представлены активные формы (связанные с GTP, K-Ras-GTP) и неактивные формы (связанные с GDP, K-Ras-GDP), что способствует стабилизации уровня K-Ras белков на клеточной мембране. Кроме того NPM способствует образованию нанокластеров K-Ras,что является важным для усиления сигналов, проводимых по MAP-киназному пути. Важно подчеркнуть, что образованию нанокластеров способствует олигомеризационный домен N-концевой части молекулы NPM.

Взаимодействие NPM с Akt, ключевой молекулой PI3K/Akt пути, повышает выживаемость опухолевых клеток, их пролиферативную активность и стимулирует Akt-зависимый биогенез рибосом. Комплекс NPM-Akt называют « онкогенной единицей», через которую Akt осуществляет онкогенное действие. NPM также вовлекается в реализацию онкогенного действия ключевой молекулы STAT3- сигнального пути. Связывание NPM с активированным белком STAT3 вызывает транслокацию STAT3 в ядро, где он функционирует как транскрипционный фактор, что сопровождается экспрессией ряда белков, регулирующих опухолевый рост, в том числе фактора HIF1, который играет важную роль в патогенезе ALK+АККЛ. Ядерную транслокацию STAT3 усиливают димерные комплексы,образованные между активированным STAT3 и NPM (p STAT3-NPM-комплексы), нарушения которых, а также низкие уровни экспрессии NPM препятствуют ядерной локализации STAT3 и подавляют его транскрипционную активность, что подтверждает существенную роль NPM в регуляции транскрипционной активности STAT3 и в реализации его онкогенного действия. Уровень фосфорилирования и соответственно степень активирования STAT3 зависит от уровня экспрессии NPM, в свою очередь уровень экспрессии NPM зависит от степени активирования STAT3 и таким образом NPM и STAT3 контролируют экспрессию и активность друг друга посредством регуляторной петли обратной связи. NPM также способствует STAT3 осуществлять инактивацию опухолевого супрессора *SHP1*. Утрата гена *SHP1* является патогенетически важным событием для ALK+АККЛ, поскольку сопровождается неконтролируемым ростом опухолевых клеток. В клетках ALK+АККЛ NPM также может усиливать онкогенное действие Ras-ERK, PI3K/AKT и STAT3-сигнальных путей, вступая в функциональную кооперацию с их ключевыми и эффекторными молекулами.

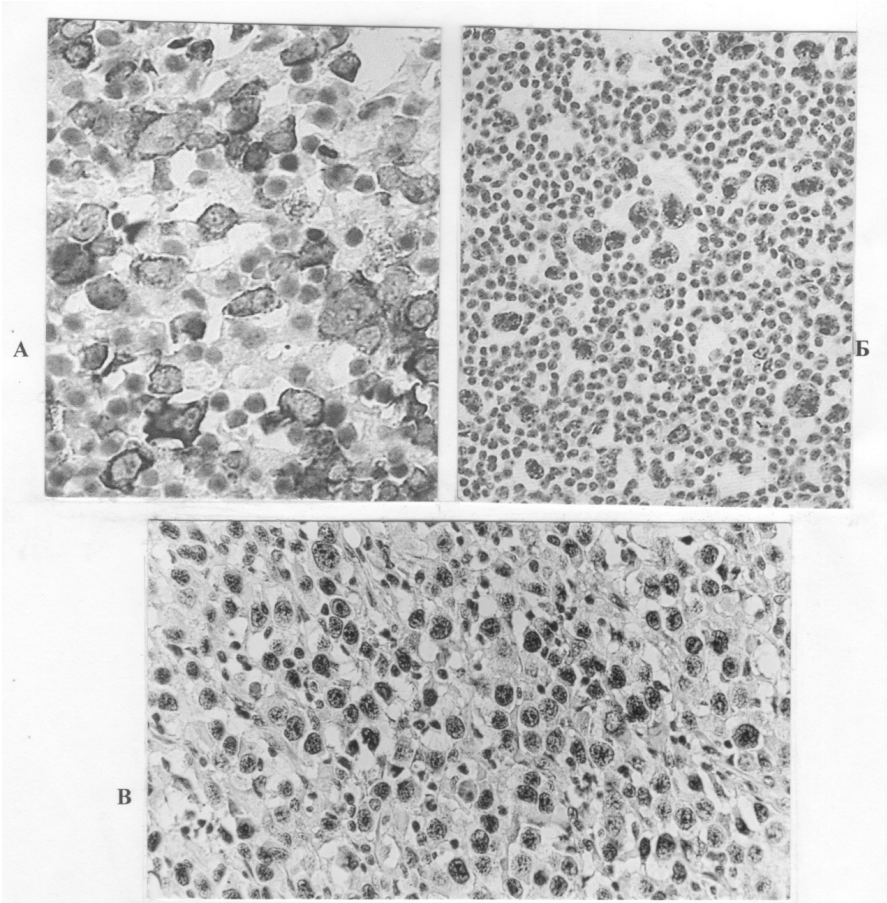


Рис.1(А,Б,В). ALK- позитивная анапластическая крупноклеточня лимфома. А.Экспрессия опухолевыми клетками слитного NPM-ALK (ALK) белка. Цитоплазматическая локализация белка (иммуногистохимическая реакция , х 800).Б.Высокая экспрессия Ag(ОЯОР)-белков . В ядрах всех опухолевых клеток много гранул серебра (гистохимическая реакция с азотнокислым серебром, х 400).В .Высокая и очень высокая экспрессия нуклеофозмина в ядрах опухолевых клеток (иммуногистохимичекская реакция , х 400).

Заключение

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что NPM в клетках ALK+АККЛ не только обладает самостоятельной онкогенной активностью, повышая пролиферативную активность и выживаемость опухолевых клеток, но также может потенциировать онкогенные действия

«молчащего» в лимфоидных клетках гена ALK. В клетках ALK+АККЛ NPM включается в реализацию и усиление онкогенного действия ключевых молекул Ras-ERK, PI3K/Akt и STAT3-сигнальных путей через разные механизмы: стабилизация уровня регуляторных белков на плазматической мембране и усиление проводимых сигналов; регуляция ядерной локализации и транскрипционной активности; образование функционально-активных комплексов с ключевыми молекулами сигнальных путей. Вступая в взаимодействие с ключевыми и многими эффекторными молекулами и являясь непосредственной мишенью PI3K/Akt и STAT3 –сигнальных путей, NPM таким образом является их компонентом Эти данные вносят вклад в понимание роли NPM в патогенезе ALK+АККЛ.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Райхлин Н.Т., Букаева И. А., Карселадзе А. И.

НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва, РФ

Резюме

Рак предстательной железы одно из наиболее частых онкологических заболеваний у мужчин. В развитых странах он занимает 2-3 место после рака легких и желудка. Клиническое течение рака предстательной железы значительно варьирует и колеблется от медленно текущего (латентного) до высоко агрессивного с быстрым развитием метастазов и наступлением летального исхода. Знание клинических особенностей течения рака предстательной железы (способность к инвазии, метастазированию, степень злокачественности, прогноз и др.) необходимо для выбора наиболее адекватного метода лечения конкретного больного – радикальная хирургия, лучевая терапия, химиотерапия, гормональное лечение, адъювантная, неадъювантная терапия и др. Для характеристики клинических особенностей рака предстательной железы широко используют такие критерии как градация по Глисону, клиническая стадия, гистологическое строение, уровень простатического специфического антигена (PSA) в сыворотке крови, количество пролиферирующих клеток (Ki-67, PCNA), ряд молекулярных маркеров, однако эти данные часто недостаточны для определения клинического течения рака предстательной железы. Важным диагностическим маркером различных особенностей клинического течения опухолей является их пролиферативная активность, определяемая двумя

главными параметрами- количеством пролиферирущих клеток (антиген Ki-67) и скоростью прохождения фаз митотического цикла (аргирофильные белки областей ядрышковых оранизаторов- B23/нуклеофозмин и C23/нуклеолин), которая может колебаться в широких пределах в различных типах клеток в норме и патологии, в опухолях в зависимости от локализации, гистогенеза, степени злокачественности и других признаков. Эти белки контролируют механизмы вступления клеток в митотический цикл и регулируют скорость прохождения его фаз. При их транслокации из ядрышка на плазматическую мембрану они способствуют подавлению клеточной адгезии и развитию инвазии и метастазирования.

В соответствии с изложенным задачей данной работы явилось исследование роли аргирофильных белков области ядрышковых организаторов (Ag-ОЯОР-белков) – B23/нуклеофозмина (B23/НФ) и C23/нуклеолина (C23/НЛ), а также количества пролиферирующих опухолевых клеток (индекс Ki-67) в дифференциальной диагностике доброкачественной гиперплазии (ДГПЖ) и рака предстательной железы (РПЖ) и определение степени злокачественности последних.

Материалом для исследования послужило 27 случаев доброкачественной гиперплазии и рака предстательной железы (ДГПЖ, РПЖ), в том числе: 5 наблюдений ДГПЖ (I группа), 14 случаев РПЖ, локализованных только в пределах предстательной железы (II группа), 5 случаев с инвазией за пределы предстательной железы (III группа) и 3 случая с наличием метастазов (IV группа).

В результате проведения гистохимического исследования Ag-ОЯОР-белков в клетках ДГПЖ (I группа) было обнаружено в среднем 4,5± 0,23 гранулы серебра на ядро. В ядрах опухолевых клеток РПЖ количество гранул серебра варьировало в зависимости от степени прогрессии новообразований в каждой группе. В среднем оно составляло при локализации опухоли в пределах предстательной железы (II группа) 8,7 ± 0,45 гранул серебра на ядро, в раках с инвазией за пределы капсулы простаты (III группа) 18 ,8±0,69 гранул серебра и при наличии метастазов (IV группа) количество гранул серебра на ядро опухолевых клеток равнялось 17,9±0.28. Экспрессия Ag-ОЯОР-белков возрастала в клетках РПЖ II, III и IV групп по сравнению с ДГПЖ (I группа) соответственно в 1,9; 4,2 и 3,9 раза и она была выше 2,2 раза в III и IV группах РПЖ, чем во II группе. Иммуногистохимическое исследование B23/НФ и C23/НЛ подтвердило различный уровень экспрессии этих белков в клетках ДГПЖ и РПЖ и в клетках раковых опухолей, локализованных только в пределах предстательной железы (II группа) и в опухолях с инвазией за ее пределы (III

группа) или с наличием метастазов (IV группа). Исследование антигена Ki - 67 показало, что количество Ki-67 –положительных клеток в РПЖ (II - IV группа) было выше, чем в ДГПЖ. Была обнаружена транслокация Ag-ОЯОР-белков, главным образом C23/нуклеолина, из ядрышка на плазматическую мембрану. Транслокация была наиболее выражена в III и IV группах РПЖ. Локализованный на плазматической мембране C23/нуклеолин способствует подавлению клеточной адгезии и развитию инвазии и метастазирования.

Таким образом, на основании проведенного исследования установлено, что при РПЖ определение ядрышковых и локализованных на клеточной плазматической мембране Ag-ОЯОР-белков имеет важное значение для дифференциальной диагностики ДГПЖ и РПЖ, установления степени злокачественности, способности к инвазии и метастазированию, определения клинических особенностей течения РПЖ и наиболее оптимальных способов лечения.

PROGNOSTIC MARKERS IN PROSTATE CANCER

Raikhlin N., Bukaeva I., Karceladze A.

Blokhin Russian Cancer Research Center , Moscow , Russia

Abstract

The important diagnostic marker of clinical peculiarities of tumor behavior is proliferative activity identified by proportion of cells committed to cell cycle (index Ki-67) and the speed of the cell cycle (argyrophilic proteins associated with nucleolar organizer regions (AgNOR-proteins)-B23/nucleophosmin (B23/NPM) and C23/nucleolin (C23/NL).These proteins control the mechanisms of entering cells in the cycle and regulate the cell cycle speed. Translocation AgNOR-proteins from nucleolus onto plasma membrane contributes to suppress of the cell adhesion and the development of invasions and metastases. Based on this we carried out a study aimed at refining role of AgNOR-proteins (B23/NPM and C23/NL) as well as proportion of cells committed to cell cycle (index Ki-67) in differential diagnosis of benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PC) and determining the malignancy grade of the later. 27cases of BPH and PC were included in this study. They were divided into four groups:I-BPH (5 cases) II-PC with localization only inside the gland (14 cases); III- extraprostatic PC with invasion outside the gland capsula (5cases);IV–PC with metastases (3 cases). The present study of AgNOR-protens showed at mean 4,5 ± 0,23 silver grains per nucleus (sg/n) in BPH cells (group I).In the nucleus of PC cells the number of silver grains was variable and was connected with the malignancy grade revealed

in each group. It was at mean 8,7 ± 0,45 sg/n, 18,8 ± 0,69 sg/n, 17,9 ± 0,28 sg/n in PC cell of group II (localized PC), group III (extraprostatic PC) and group IV (metastatic PC) respectively. AgNOR expression increased in PC cells of II, III and IV groups by1,9 fold,4,2 fold and 3,9 fold respectively when compared to BPH cells and it was higher by 2,2 fold in group III and IV compared to group II. Immunohistochemical study confirmed the different level of B23/NPM and C233/NL expression in the cells of BPH and PC and in the cells of cancer tumors with only prostate localization (group II) and in tumors with extraprostatic invasion (group III) or with metastases (group IV). Along with, it was found translocation AgNOR-proteins, mainly C23/NL, from nucleolus onto plasma membrane.Our study revealed that the number Ki-67-positive PC cells observed in groups II-IV was more than the number of positive BPH cells.As a result our findings provide evidence to make a conclusion that the examination of AgNOR-proteins localized within the nucleolus or on the plasma membrane may be important for differential diagnosis, determining the malignancy grade, the ability to invasion and to arising of metastases , as well as for determining the clinical peculiarities of PC behavior.

Введение

Рак предстательной железы одно из наиболее частых онкологических заболеваний у мужчин. В развитых странах он занимает 2-3 место после рака легких и желудка, а в США первое. Заболевание раком предстательной железы неуклонно увеличивается. Так, в России в структуре онкологической заболеваемости мужского населения она составляла в 1989 г 2,8%, а в 2000 г уже 5,4%. Число первично диагностированных случаев рака предстательной железы за 1989-2000 г. увеличилось в 2 раза – с 5500 до 11600 больных) и продолжает расти. Клиническое течение рака предстательной железы значительно варьирует и колеблется от медленно текущего (латентного) до высоко агрессивного с быстрым развитием метастазов и наступлением летального исхода. Знание клинических особенностей течения рака предстательной железы (способность к инвазии, метастазированию, степень злокачественности, прогноз и др.) необходимо для выбора наиболее адекватного метода лечения конкретного больного – радикальная хирургия, лучевая терапия, химиотерапия, гормональное лечение, адъювантная,неадъювантная терапия и др. Для характеристики клинических особенностей рака предстательной железы широко используют такие критерии как градация по Глисону, клиническая стадия, гистологическое строение, уровень простатического специфического антигена (PSA) в сыворотке крови, количество пролиферирующих клеток (Ki-67, PCNA), ряд

молекулярных маркеров, однако эти данные часто недостаточны для определения клинического течения рака предстательной железы. Так, например, наблюдается 1/3 различий при градации по Глисону между исследованием биопсийного и операционного материала у одного и того же больного. При игольчатой биопсии ацинарная аденокарцинома часто диагностируется как доброкачественная опухоль. Важным диагностическим маркером различных особенностей клинического течения опухолей является их пролиферативная активность, определяемая двумя главными параметрами- количеством пролиферирущих клеток (антиген Ki-67) и скоростью прохождения фаз митотического цикла, регулируемой аргирофильными белками областей ядрышковых оранизаторов - (Ag-ОЯОР-белками)- B23/нуклеофозмином и C23/нуклеолином, которая может колебаться в широких пределах в различных типах клеток в норме и патологии, в опухолях в зависимости от локализации, гистогенеза, степени злокачественности и других признаков. Например, для популяции плазматических клеток скорость прохождения митотического цикла равна 9 часам, для клеток эпидермиса уха составляет 30-100 часов, а для клеток коры надпочечника 1875 часов. Те же закономерности наблюдаются в различных опухолях, длительность митотического цикла в асцитной опухоли Эрлиха составляет 18 часов, а в опухоли молочной железы мышей 84 часа. Аргирофильные белки области ядрышковых организаторов (Ag-ОЯОР-белки) – нуклеофозмин и нуклеолин, обозначаемые так же соответственно как NPM, B23, NO38, нуматрин, B23/НФ и NCL, C23, C23/НЛ являются многофункциональными белками, играющими ключевую роль в основных клеточных процессах. Эти белки контролируют механизмы вступления клеток в митотический цикл и регулируют скорость прохождения его фаз. В многочисленных работах установлено, что чем выше экспрессия Ag-ОЯОР-белков (B23/НФ и C23/НЛ), тем быстрее скорость прохождения фаз митотического цикла. Регуляцию пролиферативной активности B23/НФ и C23/НЛ осуществляют главным образом через механизмы контроля разных стадий биогенеза рибосом, включая транскрипцию рибосомных генов (рДНК), процессинг пре-рРНК, сборку рибосомных частиц и экспорт их в цитоплазму, а также через взаимодействия с белками-регуляторами митотического цикла: p53, белком ретинобластомы pRb, ДНК-полимеразой ά, GADD45ά {Growth Arrest and DNA Damage inducible ά, Arf, онкобелками c-Myc и MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog). B23/НФ может ускорять прохождение митотического цикла, подавляя транскрипционный фактор IRF-1 и стимулируя транскрипционные факторы FOXM1 и E2F и регулируемые ими гены. Кроме регуляции пролиферативной активности и биогенеза

рибосом B23/НФ и C23/НЛ участвуют в дупликации ДНК и центросом, ДНК-репарационых процессах, обеспечивают генетическую стабильность, ингибируют апоптоз, взаимодействуют с другими факторами, влияющими на пролиферативную активность клеток, их рост, выживаемость, дифференцировку. B23/НФ и C23/НЛ локализованы преимущественно в ядрышке, вместе с тем они постоянно циркулируют между ядрышком, нуклеоплазмой, цитоплазмой и плазматической мембраной и их функция зависит от локализации в клетке. При транслокации на плазматическую мембрану Ag-ОЯОР-белки г.о. C23/нуклеолин способствуют подавлению клеточной адгезии и развитию инвазии и метастазирования. Экспрессия B23/НФ и C23/НЛ возрастает при действии митогенных и онкогенных стимулов, факторов роста, гормонов, включая андрогены. Сверхэкспрессия этих белков вызывает неконтролируемый рост клеток. B23/НФ и C23/НЛ являются мишенью для таргетной терапии, разработаны соответствующие препараты.

Задача исследования

В соответствии с изложенным задачей данной работы явились гистохимическое и иммуногистохимическое исследования роли аргирофильных белков области ядрышковых организаторов (Ag-ОЯОР-белков) – B23/нуклеофозмина (B23/НФ) и C23/нуклеолина (C23/НЛ), а также количества пролиферирующих опухолевых клеток (индекс Ki-67) в дифференциальной диагностике доброкачественной гиперплазии (ДГПЖ) и рака предстательной железы (РПЖ) и определение степени злокачественности последних.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили 27 наблюдений, которые были разделены на четыре группы..I группа- 5 случаев доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ).II группа – 14 наблюдений рака предстательной железы (РПЖ), который локализовался только в самой предстательной железе или прорастал в капсулу, но не проникал за ее пределы.III группа- 5 случаев РПЖ, в которых имелась инвазия за пределы капсулы железы в окружающую жировую ткань, периневральное пространство, семенные пузырьки, в стенку мочевого пузыря, лимфатические сосуды. IV группа – 3 наблюдения РПЖ с наличием метастазов в лимфатических узлах. Было проведено гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование. Для гистологического исследования парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Выявление Ag-

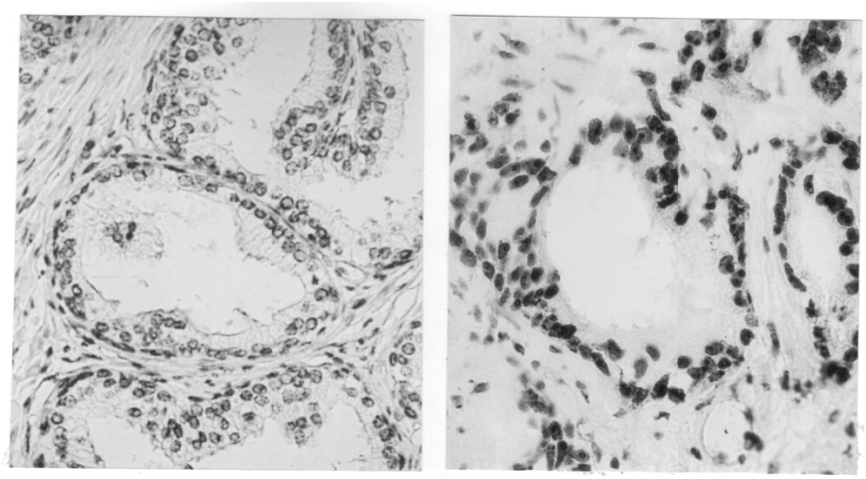
ОЯОР-белков проводили с применением гистохимической реакции с нитратом серебра [20]. Интенсивность реакции оценивали по количеству гранул серебра, образующихся в ходе реакции, которые подсчитывали в 500 клетках в каждом случае и затем оценивали среднее количество гранул серебра на одно ядро в каждой группе опухолей. Иммуногистохимическое исследование B23/НФ и C23/НЛ проводили с применением моноклональных антител- nucleophosmin/23, клон mouse mAbB23 (фирма “Labvision”). Для выявления C23/НЛ использовали моноклональные антитела nucleolin/4E2, клон mouse mAb4E2 фирма Äbcam”) Оценку иммуногистохимической реакции проводили визуально с учетом интесивности окрашивания и устанавливали как низкую (+), умеренную (++), высокую (+++), очень высокую (++++). Иммуногистохимическое исследование экспрессии антигена Ki-67 проводили с применением антител к этому антигену (фирма “Dako”, клон MIB-1). Результаты реакции оценивали в 500 клетках и определяли процент окрашенных клеток. Статистическую обработку данных и определение достоверности проводили по Стьюденту с использованием критерия t.

Результаты (Рис.1).

Гистологическое исследование. I группа. ДГПЖ в основном имеет аденоматозно-кистозное строение. Ацинусы различного размера, неправильной, округлой или овальной формы. Они выстланы призматическими или кубическими клетками, часто со светлой цитоплазмой. В отдельных участках ацинусы расширены и образуют кистозные структуры. Реже в ацинусах видны папиллярные разрастания. Между железистыми образованиями располагается развитая в различной степени фиброваскулярная строма. II, III и IV группы РПЖ. Во всех трех группах опухоли имеют строение аденокарциномы. На большом протяжении они состоят из мелких железистых структур, образованных светлыми или темными клетками иногда с пенистой цитоплазмой. Изредка встречаются папиллярные структуры. Градация по Глисону во II группе в 9 случаях из 14 равнялась 6, в 3 случаях 7 и в 1 случае 5. В III группе из 5 РПЖ в 4 наблюдениях градация по Глисону равнялась 4 и в 1 случае 5. В IV группе во всех 3 случаях градация по Глисону равнялась 7.

При гистохимическом исследовании Ag-ОЯОР-белков в клетках ДГПЖ было обнаружено в среднем 4,5± 0,23 гранулы серебра на ядро. Количество гранул колебалось, но в большинстве ядер было до 5. В ядрах опухолевых клеток РПЖ количество гранул серебра варьировало в зависимости от степени прогрессии новообразований в каждой группе. В

среднем оно составляло при локализации опухоли в пределах предстательной железы (II группа) 8,7 ± 0,45 гранул серебра на ядро, в раках с инвазией за пределы капсулы простаты (III группа) 18 ,8±0,69 гранул серебра и при наличии метастазов (IV группа) количество гранул серебра на ядро опухолевых клеток равнялось 17,9±0.28. Выявленные различия в уровне экспрессии Ag-ОЯОР-белков в клетках ДГПЖ и в клетках РПЖ с разной интенсивностью инвазии (II – IV группы) были статистически достоверны ($p<0,001$). Достоверными были различия и в уровне экспрессии белков в клетках опухолей II и III, IV групп ($p <0,001$). В ядрах многих опухолевых клеток II -IV групп РПЖ наряду с мелкими гранулами серебра наблюдались крупные аргирофильные ядрышки. В каждой группе РПЖ до 80-95% клеток содержали максимальное количество гранул серебра. При иммуногистохимическом исследовании B23/НФ и С23/НЛ в ядрах клеток ДГПЖ (I группа) была обнаружена низкая экспрессия этих белков, лишь в отдельных клетках она была умеренной. В ядрах опухолевых клеток РПЖ экспрессия B23/НФ и С23/ НЛ при локализации опухоли в пределах предстательной железы (II группа) в 80-85% клеток была высокой, в 15-20% очень высокой. При инвазии опухоли за пределы капсулы (III группа) и при наличии метастазов (IV группа) экспрессия этих белков была в 90-95% клеток очень высокой и в 5-10% высокой. В некоторых участках РПЖ, особенно III и IV группы, наблюдалась транслокация исследованных белков, г.о. С23/НЛ на плазматическую мембрану опухолевых клеток. Иммуногистохимическое исследование антигена Ki -67 показало, что количество Ki-67 –положительных клеток в ДГПЖ (I группа) составляло в среднем 6.2 ±0,8%, в РПЖ II группы 14,2 ± 0,69%, III группы 26± 0,88% и IV группы 25,3 ±0.71% .Экспрессия антигена Ki-67 в РПЖ II - IV группы была достоверно выше, чем в ДГПЖ ($p<0.001$). Различия экспрессии Ki-67 в РПЖ II и III также были достоверны ($p<0,001$).



А Б

Рис.1 (А,Б) Иммуногистохимическое исследование B23/нуклеофозмина в клетках доброкачественной гиперплазии и рака предстательной железы.
А. I группа. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы . Иммуногистохимическое вывявление B23/нуклеофозмина. Низкая экспрессия B23/нуклеофозмина. X 200. Б.III группа. Рак предстательной железы. Иммуногистохимическое выявление B23/нукулеофозмина. Экспрессия B23/нуклео-фозмина во всех клетках очень высокая. X400.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что экспрессия Ag-ОЯОР-белков в клетках при ДГПЖ и РПЖ, а также в РПЖ в зависимости от степени инвазии различаются. Так, при гистохимическом исследовании Ag-ОЯОР-белков количество гранул серебра в ядрах раковых клеток II группы (локализация опухоли в пределах капсулы), III группы (инвазия за пределы капсулы) и IV группы (наличие метастазов) было существенно выше, чем в клетках ДГПЖ соответственно в 1,9; 4,2 и 3,9 раза ($p<0,001$). Количество гранул серебра в опухолевых клетках III и IV группы (с инвазией за пределы капсулы предстательной железы или с наличием метастазов) достоверно превышало в 2,2 раза количество гранул серебра в клетках опухолей II группы (с локализацией в пределах капсулы) ($p<0,001$). Иммуногистохимическое исследование B23/НФ и С23/НЛ подтвердило различный уровень экспрессии этих белков в клетках ДГПЖ и РПЖ и в клетках раковых опухолей, локализованных только в пределах предстательной железы (II группа) и в опухолях с инвазией за ее пределы (III группа) или с наличием метастазов (IV группа). Следовательно, уровень

экспрессии Ag-ОЯОР-белков не только показатель пролиферативной активности (совместно с индексом Ki-67), что является крайне важным для характеристики клинических особенностей опухолевого процесса, но может быть и маркером дифференциальной диагностики ДГПЖ и РПЖ и определения степени злокачественности опухоли, ее способности к инвазии и метастазированию. B23/НФ и C23/НЛ, локализованные на клеточной поверхности, являются рецепторами многих лигандов, регулирующих опухолевый рост. Так, C23/НЛ, соединяясь с молекулами адгезии, факторами роста, белками внеклеточного матрикса, такими как мидкин, L селектин, ламинин, лактоферрин, передает соответствующие сигналы к разным эффекторным молекулам, включаясь в механизмы регуляции адгезии, миграции, метастазирования. Взаимодействие C23/НЛ с молекулами адгезии приводит к ослаблению межклеточных и клеточно-мембранных адгезивных связей. Вместе с тем C23/НЛ может регулировать экспрессию матриксной металлопротеиназы-9, разрушающей внеклеточные матриксные барьеры, что в целом способствует росту, миграционной и инвазивной активности опухолевых клеток и их метастазированию. Кроме того, как было показано, B23/НФ и C23/НЛ могут усиливать инвазивную и миграционную активность опухолевых клеток через механизмы активации МАРК (mitogen-activated protein kinase)-пути. Локализованные на клеточной поверхности B23/НФ и C23/НЛ стабилизируют и активируют белки RAS, рецептор эпидермального фактора роста и эффекторные молекулы серин-треониновых киназ ERK1/2, что приводит к усилению сигналов, проводимых по МАРК-пути. Активированные ERK1/2 стимулируют киназу легких цепей миозина, калпаин, паксилин. и как следствие усиливают миграцию клеток. Известно также, что в опухолевых клетках, в том числе в клетках рака предстательной железы, локализованный на клеточной поверхности C23/НЛ взаимодействует со всеми членами семейства белков ERbB (ErbB-1, Neu/HER-2/ErbB-2, HER-3/ErbB-3 и HER-4/ErbB-4) и активирует их, что приводит к усилению клеточной пролиферации и стимуляции опухолевого роста. B23/НФ и C23/НЛ играют важную роль в процессах распространения опухоли и, в частности, как следует из полученных нами результатов, при РПЖ. Проведенные экспериментальные исследования клеточных линий рака предстательной железы подтверждают данный вывод; авторы показали, что подавление экспрессии B23/НФ вызывает значительное снижение инвазивных и миграционных свойств опухолевых клеток. Дифференциально-диагностическое значение между ДГПЖ и РПЖ могут иметь и обнаруженные нами в некоторых раковых клетках при гистохимическом выявлении Ag-ОЯОР-белков крупные аргирофильные ядрышки,что

свидетельствует об интенсивном биогенезе рибосом и , как следствие, активном синтезе белков, необходимых для роста и размножения этих клеток. Крупные аргирофильные ядрышки чаще наблюдались в раковых клетках опухолей с инвазивным ростом или наличием метастазов (III, IV) группы), что позволяет рассматривать их как показатель степени злокачественности опухоли.

Заключение

Таким образом, на основании проведенного исследования установлено, что при раке предстательной железы определение ядрышковых и локализованных на клеточной поверхности Ag-ОЯОР-белков (B23/ нуклеофозмина и C23/нуклеолина) имеет важное значение для дифференциальной диагностики доброкачественной гиперплазии и рака этого органа, установления степени злокачественности, способности к инвазии и метастазированию, определению клинических особенностей течения рака предстательной железы.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО НАРКОЗА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДЛИТЕЛЬНЫХ ХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА ОБЕЗЬЯНАХ МАКАК РЕЗУС НА ОСНОВЕ КЕТАМИНА И ЗОЛЕТИЛА.

Гордеев Ю.В., Стогова К.С.

ГНЦ - РФ ИМБП РАН, Москва, Россия

Не МЫ выбираем ПУТЬ, а ПУТЬ выбирает нас…
Дао Дэ Цзин, Лао Цзы

Резюме

В докладе показана возможность использования золетила или кетамина в комплексе с рядом лекарственных препаратов при операциях на приматах, требующих длительного хирургического вмешательства.

THE KETAMINE AND ZOLETILE COMBINATION-BASED ANESTHESIA FOR RHESUS MONKEY LONG-TERM SURGERY.

Y. V. Gordeev, K.S. Stogova

SRC RF - IMBP of RAS, Moscow, Russia

Tactics and technique of anesthesia of primates and other experimental animals is influenced by many factors of economic, technical, instrumental and laboratory supply factors. The training and knowledge of the anesthesiologist who conducts anesthesia, define the anesthesia methodology in many ways.

The healthy rhesus monkeys were used for experiments. All physiological parameters of animals were within normal limits (Lapin BA et al, 1987).

It should be noted, modern inhalation anesthetics are less toxic, more effective and more manageable in comparison to drugs used to maintain anesthesia by intravenous or intramuscular administration. However, the inhalation anesthesia requires fairly expensive equipment. The oxygen used for this type of anesthesia, also requires special equipment. Furthermore, tracheal intubation provides for certain skills of the anesthesiologist. Therefore, the use of less costly means and methods makes it possible to carry out surgery which required the complex and prolonged anesthesia (more than 4 hours).

This study was conducted to test the possibility of using Ketamine and Zoletile in combination with other drugs. Current legislation refers the Ketamine as psychotropic drug. Its use requires the special storage conditions, records management and staff training. (Russian Federation Government regulation, № 644, 2006.).

Injection of 5% Ketamine solution, intramuscularly at a dose of 7-10 mg / kg results in anesthesia and immobilization of monkeys and lasted for 15-20 minutes. Zoletil - drug used in veterinary practice for general anesthesia animals comprises as active principles tiletamine hydrochloride and zolazepam hydrochloride. Intramuscular administration of Zoletile at a dose of 5.4 mg / kg causes anesthesia of dogs lasting 10-20 minutes.

Our report shows the possibility of using Zoletile or Ketamine in combination with a number of other drugs for monkey surgery lasting prolonged time.

Тактика и техника проведения наркоза на приматах и экспериментальных животных обусловлена многими факторами экономического, технического, инструментального и лабораторного обеспечения. Знания специалиста, проводящего анестезию, во много, определяют методику проведения наркоза (Практическое руководство по анестезиологии, под редакцией В.В.Лихванцева, 1998).

В экспериментах использовались здоровые животные. Обезьяны - вида макак резус, в данных исследованиях имели показатели клинико-физиологического состояния, соответствующие нормативным величинам (Лапин Б.А. и др. 1987 г.).

Надо отметить, современные ингаляционные анестетики менее токсичны, гораздо более эффективны и управляемы в сравнении с средствами лекарств, применяемых для поддержания анестезии при внутривенном и внутримышечном введении.

Для проведения ингаляционного наркоза необходимо довольно дорогостоящее оборудование и кислород, использование которого требует специального оснащения. Мало того, интубация трахеи предусматривает определенные навыки экспериментатора. Поэтому применение менее дорогостоящих средств и методик дает возможность выполнить задачи исследований, требующих по сложности оперативного вмешательства длительного наркоза (более 4-х часов).

В данном исследовании было проверено возможность использования кетамина и золетила в комбинации с рядом лекарственных средств. Современное законодательство относит кетамин к средствам, вызывающим психотропные эффекты. Использование его требует особых условий хранения, ведения документации и образования специалиста. (Постановление Правительства Российской Федерации от 4 ноября 2006 года, № 644.).

Введение 5% раствора кетамина обезьяне, внутримышечно, в дозе 7-10 мг/кг массы вызывает обездвиживание и анестезию животного продолжительностью 15-20 минут (3). Золетил – препарат, применяемый в ветеринарной практике для общей анестезии животных, содержит в качестве действующих начал тилетамин гидрохлорид и золазепам гидрохлорид. Внутримышечное введение его собакам в дозе 4-5 мг/кг массы вызывает у животного анестезию, продолжительностью 10-20 минут (4).

Методика

На первом этапе исследований была проведена серия экспериментов с внутримышечным введением золетила. В качестве премедикации вводили подкожно атропин сульфат (5) 0,5 мл на животное, за 15 минут до анестезии (см. таблица №1).

Обезьяны вида макак резус, одного года рождения, самцы, массой 5-6 кг, практически здоровые, были обследованы по клинико-физиологическим показателям, проверены на носительство патогенной и условно-патогенной микрофлоры и гельминты. Во время проведения исследований регистрировали время и дозу введенных препаратов. Визуально контролировали реакцию века глаза на прикосновение, изменение формы зрачка и непроизвольные мышечные сокращения. Отмечали первые признаки

выхода обезьяны из наркоза и время постепенного возвращение сознания (осознанные действия примата).

Во время второй серии экспериментов и проведения хирургических вмешательств, применяли анестезию, вводя внутримышечно и внутривенно растворы золетила или кетамина. С целью премедикации за 15 минут до основного анестетика делали инъекции растворов лекарств, предназначенных для пролонгирования наркоза и уменьшения дозы основного анестетика. В комбинацию веществ входили растворы лекарств в дозах, предназначенных для детей. 1. – атропин сульфат, раствор для инъекций, доза 0,01 мг/кг, подкожно (5); 2. – димедрол, раствор для внутривенного и внутримышечного введения, доза 5-10 мг/кг, внутримышечно (6); 3. – рометар 20 мг/мл, раствор для инъекций, доза 1-2 мг/кг ксилазина гидрохлорида, внутримышечно (7); 4. – церукал, раствор для внутривенного и внутримышечного введения, доза 0,1 мг/кг, внутримышечно (8); 5. – в отдельных случаях использовался сульфокамфокаин, доза 0,5 мл на животное, внутримышечно (9); 6. – в отдельных случаях использовался дексаметазон, доза 0,5-1,0 мл на животное, внутримышечно (10). Золетил вводился перед операцией, сначала внутримышечно из расчета 1-2 мг/кг, затем после обездвиживания примата добавлялась оставшаяся расчетная часть – порционно, но не более 20 мг/кг в сумме. В других случаях, после предварительного введения препарата внутримышечно в дозе 1-2 мг/кг, выполняли анестезию с внутривенным введением рабочего раствора золетила, порционно по 0,5-2,5 мг, в зависимости, от степени наркоза и болевого синдрома на этапах хирургического вмешательства. Во время операции обезьяне ставили катетер и проводили внутривенное вливание физиологического раствора капельно в количестве 20-30 мл/кг массы примата. После операции в зависимости от состояния животного приходилось вводить физиологический раствор подкожно до 150 мл на примата. При необходимости вводили внутримышечно сульфокамфокаин и дексаметазон, иногда была необходимость внутривенного введения раствора 5% глюкозы или полиреоглюкина с добавками витаминов в растворах.

Кетамин вводили внутримышечно, в ряде случаев порционно, в других – сразу все количество (см. таблицу № 2). Приготовление раствора кетамина проводилось следующим образом: во флакон с кетамином добавляли 20 мл физиологического раствора. При этом в зависимости от количества препарата во флаконе (золетил 50/100), концентрация действующего анестетика в полученном растворе будет, соответственно, 12,5 мг/мл или 25 мг/мл. Для приготовления рабочего раствора, берется 1-2 мл первичного раствора и разводится, в зависимости от задач операции, 9 или 19 мл

физраствора. Таким образом, в рабочем растворе будет содержаться 1,25 или 2,5 мг/мл действующего начала при разведении, соответственно, 9 мл или 19 мл раствора Рингера. При фоновом обследовании, а также во время проведения операций и в экспериментах (не во всех случаях) с применением кетамина и золетила, регистрировали показатели гемодинамики (АД: систолическое, диастолическое и среднее), а также ректальную температуру.

Как видно из таблицы № 2 анестезия в этих экспериментах приводит к значительному снижению показателей гемодинамики и температуры тела животных. Все это требует внимательного отношения к пациенту и выполнению ряда лечебных процедур по поддержанию гемодинамики и температуры тела животного. Ранее приводились лекарственные препараты, примененные во время наркоза и в послеоперационном периоде, что положительно сказалось на состоянии приматов и сокращение времени реабилитации. Таким образом, использование золетила и кетамина в длительных операциях и экспериментах, требующих глубокой анестезии, вполне приемлемо для приматов.

Таблица № 1. ЭКСПЕРИМЕНТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА «ЗОЛЕТИЛ»

Дата	№ обезьяны	Масса животного	Атропин п/к	Золетил мг/кг	Время наркоза, степень			Особенности
					Глубокий	Начало мышечной деятельности	Постепенный выход из наркоза	
30.10.07	739	6,1	0,5	12	1,5-2 часа	1,5-2 часа	2-3 часа	Отказ от пищи, воды
30.10.07	336	6,25	0,5	12	1,5-2 часа	1,5-2 часа	2-3 часа	Отказ от пищи, воды
31.10.07	740	6,76	0,5	6	50-60 мин.	1 час	1.5-2 часа	Отказ от пищи, воды
31.10.07	770	5,6	0,5	6	50-60 мин.	1 час	1.5-2 часа	Отказ от пищи, воды
01.11.07	855	4,6	0,5	3	30-40 мин.	30-40 мин., резко встает	1,5 часа	Отказ от пищи
07.11.07	862	4,9	0,5	3	30-40 мин.	30-40 мин., резко встает	1,5 часа	Отказ от пищи
14.11.07	106	6,5	0,5	1,2-1,5	20-30 мин.	30 мин.	1,5 часа	Вялый интерес к пище, воде
15.11.07	233	6,4	0,5	1,2-1,5	20-30 мин.	30 мин.	1,5 часа	Вялый интерес к пище, воде
19.11.07	106	6,5	0,5	1,0-1,2	20 мин.	20-30 мин.	1,5 часа	Вялый интерес к пище, воде
21.11.07	233	6,4	0,5	1,2-1,5	20 мин.	20-30 мин.	1,5 часа	Вялый интерес к воде и пище

Таблица № 2. НАРКОЗ ОБЕЗЬЯН С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *ЗОЛЕТИЛА* И *КЕТАМИНА*

Дата	№ обезьяны, процедуры	Масса	Время введения	Выход из наркоза	Золетил	Кетамин	Атропин	Димедрол	Рометар	Церукал	Сульфокамфокаин	Дексаметазон	Время наркоза	Т ректальная грС	ЧСС	АД систолическое	АД диастолическое
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
28. 01.14	38351 вживление дополнительных винтов	7.5	11ч.17.м.	15ч.10.м	в/м 12 мг/кг (90мг)		0,4 мл п/к	0,4 в/м	0,8	0,5	0,5	0,5	4ч.	38.3 36,8	122 102	114 82	65 38
11.02.14	38410 вживление винтов	9,7кг	10.ч. 47.м.	14.ч.45. м.	в/м, 12 мг/кг (107мг)		0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	0,5	4 ч.	38,6 36,4	145 117	136 62- 66.	95 23-29
13.05.14	38351 эксперимент	8,2	11.ч. 15.м	14.ч. 37.м.		1,2 мл	0,5	0,5	1,0	0,5			3ч. 20м.	38 34,8	128 81-85	135 39-44	96-82 33-39
21.05.14	38313 эксперимент	6,9	10ч. 15м. 12 40.	13.ч. 50.		0,7 + 0,7 мл	0.4	0.4	0.6	0. 45.			2ч. 1ч.	38.4 35.7	147 119	118 84	72 60
27.05.14	38379 эксперимент	8,75	10ч. 25м.	12 .ч 10.		1.2 мл	0.5	0.5	0.8	0.4			2ч.	39 36.3	134 104	116 96	90 75
470	38470 эксперимент	8.2	10ч.25м.	13.ч. 50.		1.5 мл (10 мг/кг)	0.5	0.5	1.2	0.5			3ч. 25м.	38.3 35.3	147 80-81	118 76-75	68 44-48
04.06.14	38316 эксперимент	8.5	10ч. 30м.	13.ч. 25.		1.5 мл (10 мг/Кг)	0.4	0.7	1.2	0.5	0.4	0.5	3ч.	38 35.3	138 93	130 81-85	94 46-52
09.07.14	38410 ремонт кольца	12.3	12.ч. 25	13.ч. 30		1.5 мл	0.5	0.5	0.4		0.4	0.5	55м.				
12.08.14	38410 лечение	12.3	12.ч 18	13.ч 40		1.6 мл	0.5	0.5	0.4	0.5	0.25	1.0	80 м.				

Дата	№ обезьяны, процедуры	Масса	Время введения	Выход из наркоза	Золетил	Кетамин	Атропин	Димедрол	Ромэтар	Церукал	Сульфокамфокаин	Дексаметазон	Время наркоза	Т ректальная грС	ЧСС	АД систолическое	АД диастолическое
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
14.08.14	38410 лечение	12.3	11 47	12 12		2.2	0.3			0.5			25 м.				
20.01.15	38410 удаление остатков кольца	13.6	11 15	12 30		1.5 мл	0.5	0.6	0.7				1ч. 15м.				
21.10.15	40014 вживление каркаса на голове	4.0	10 47	15 40	в/м 12.5мг, в/в по 1,25- 2.5 мг при операции, (всего 46.25мг)		0.2	0.2	0.4	0.2	0.2	0.2	4ч 50м.	39.4 35.7			
27.11.14	38351 ремонт кольца	9.0	11 15	13 15		0.6 мл	0.5	0.6	0.6				70 м.				
24.09.15	38351 ремонт кольца	10	11. 20	12		1.6 мл	0.5						40 м.				
17.11.15	40184 вживление каркаса на голове	4.2	12 45	17 45	в/м 12.5мг, в/в по 0.5-2.5 мг (всего 40 мг)		0.2	0.2	0.4	0.2	0.1	0.2	5ч.	38.7 35.9			
14.04.16	38351 забор костного мозга (20мл.)	10.3	1312	15, 20		1,6+0,4 +0,5+ 0,5+1,0 мл, в/м	0,4			0,5			2ч 8м.	39,0 37,5			

Примечания: Время: верхняя цифра – часы, нижняя – минуты; Графы АД: верхняя цифра – начало наркоза, нижняя – наибольшее снижение показателя во время анестезии. Графы ректальная Т: верхняя цифра – начало наркоза, нижняя – наибольшее снижение показателя во время анестезии.

Список литературы

1. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии / АМН СССР. – М.: Медицина, 1987. – 192 с.: ил.
2. Практическое руководство по анестезиологии /Под ред. В.В.Лихванцеваю/ – М.:Медицинское иформационное агенство,1998. – 288 с.; ил.
3. Кетамин - 5% раствор для инъекций. «Общая анестезия кетамином: клиника, гемодинамика, дыхание». Экспериментальная хирургия и анестезиология.,1973,№4, с.38-48.
4. Virbac, Laboratoires Virbac. D.P. 27 – CARROS Cetdex – FRANCE, «ЗОЛЕТИЛ», наставление по применению препарата.
5. Атропина сульфат. Инструкция по медицинскому применению препарата; регистрационный номер: ЛСР-002829/08.
6. Димедрол. Инструкция по применению препарата для медицинского применения. Раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 10 мг/мл; Код АТХ R06AA02
7. Рометар, 20 мг/мл. 394/PI/RUS/3. Инструкция по применению ветеринарного лекарственного средства (седативного, миорелаксантного, обезболивающего, анестезирующего действия, для животных), стерильное.
8. Церукал, инструкция по медицинскому применению препарата, рег. удостоверение № П NO12812/02 от 26/05/2006.
9. Сульфокамфокаин. Инструкция лекарственного препарата для медицинского применения. рег. Номер: ЛРС-008053/08, раствор для инъекций, Код АТХ: R07AB.
10. Дексаметазон, раствор для инъекций (синтетический гормональный препарат), инструкция лекарственного препарата для медицинского применения.

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ТЯЖЕЛЫХ ЧАСТИЦ НА КОРУ И ПОДКОРКОВЫЕ ОБРАЗОВАНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ОБЕЗЬЯН ВИДА МАКАК РЕЗУС

Гордеев Ю.В., Штемберг А.С., Беляева А.Г.

ГНЦ РФ-ИМБП РАН, Москва, Россия

Путь – это пустота…
Дао Дэ Цзин, Лао Цзы

Просите, и дано будет вам;
ищите, и найдёте;
стучите, и отворят вам.
Евангелие от Матфея VII, 7

Резюме

Воздействие тяжелых частиц (протонов и углерода-14) на кору и подкорковые образования головного мозга обезьян вызвало, через 14 месяцев после облучения, достоверное увеличение массы тела макак по сравнению с приматами контроля.

SOME PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF HEAVY PARTICLES RADIATION ON RHESUS MONKEY CORTEX AND SUBCORTICAL CEREBRAL BRAIN FORMATIONS.

Y. V. Gordeev, A.S. Shtemberg, A.G. Belyaeva

SRC RF - IMBP of RAS, Moscow, Russia

Abstract

Space flight combined factors affecting biological objects include ionizing radiation from cosmic and galactic space, as well as solar activity. If the mechanisms of ionizing radiation action on the organism are now fairly well understood, the biological effects of cosmic heavy particles on the central brain structures are, in many respects, are not disclosed. The study on irradiation of monkey head by heavy particles (protons and carbon-14) was carried out. Three rhesus monkeys were irradiated by heave particles. The affected areas included the cortex and subcortical brain formations. The changes on cell the genetic level and neurohormonal shifts in peripheral blood were studied. The disturbances in higher nervous system activity (on the basis of conditioned reflex reactions) were evaluated together with simultaneously conducted surveillance of hemodynamics, rectal temperature, the dynamics of body mass, the skin and mucous membrane lesions and hair. Also, the irregularities of behavior and physiological functions and changes food and liquid intakes were estimated.

In 14 months the cortex and subcortical brain formation irradiation by heavy particles (protons and carbon-14) caused a significant increase in body weight compared to control monkeys.

Комбинированные факторы космического полета, воздействующие на биологические объекты, включают в себя и ионизирующее излучение

космического, галактического пространства, и активности солнечной энергии.

Если механизмы воздействия ионизирующего излучения на организм в настоящее время достаточно хорошо изучены, то биологические эффекты тяжелых частиц космического характера на центральные структуры мозга, остаются, во многом, не раскрыты.

Проведены исследования по облучению головы обезьяны тяжелыми частицами (протоны, углелод-14).

В литературе имеется значительное количество данных о физиологических эффектах и механизме воздействия радиации на биологические объекты, в том числе на человека, мелких животных и приматов (Федоренко Б.С., 2006; Ушаков И.Б., 2005; Ушаков И.Б., Штемберг А.С., Шафиркин А.В., 2007; Игнатова И.Е., 2012).

Данные, полученные в экспериментах при радиационных воздействиях на биологические объекты, во многом изучены на разных уровнях многоклеточных животных.

В эксперименте на 3-х обезьянах вида макак резус проведены исследования по влиянию воздействия тяжелых частиц на кору и подкорковые образования головного мозга. При этом изучались вопросы изменений: на генетическом уровне клеток, нейрогормональных сдвигов в периферической крови. Оценивались нарушения в деятельности высшей нервной системы (на основе условно-рефлекторных реакций), одновременно проводилось наблюдение за показателями гемодинамики, ректальной температурой, динамикой массы тела, отмечали состояние кожных, слизистых и волосяного покровов, оценивали нарушения в поведении животных, состояние физиологических отправлений и изменение в потреблении корма и жидкостей.

Обезьяны 2009 года рождения находились под наблюдением на протяжении нескольких лет, при этом регистрировали основные физиологические показатели гемодинамики (АД, ЧСС), ректальную температуру, показатели картины крови, динамику массы тела, оценивали состояние кожных, слизистых и волосяного покровов, интенсивность окраски кожи в местах, гормонально-зависимых от активности желез внутренней секреции.

Животные были разбиты на две группы: первая группа – приматы, облученные ионизирующим излучением (обезьяны №№ 38343, 38344, 38257), вторая – контроль (приматы №№ 38311, 38347, 38275).

Начиная с 2012 года, животные прошли многократную адаптацию к системам фиксации с многодневным пребыванием в этих устройствах

(приматологическое кресло, кресло ложемент). В этих системах приматы выполняли свои физиологические отправления, осуществляли прием пищи и жидкости, выполняли операторскую деятельность по игровым программам.

Перед облучением животного тяжелыми частицами, для ограничения движения головы изготовили плоские ограничители из оргстекла, которые затрудняли поворот головы примата в горизонтальной и вертикальной плоскости. К этому моменту обезьяны обеих групп были адаптированы и к этим системам. В ложементе обезьяна крепилась нагрудником с ремнями, фиксирующие плечевой пояс и грудную клетку, а малый таз и бедра нижних конечностей прижимал специальный столик. Этот ложемент вместе с приматом легко можно было перенести и поставить в специальный ящик, на который надевали чехол из синтетической ткани (для сохранения тепла).

Транспортировка животных проводилась автотранспортом к месту облучения (Объединенный Институт ядерных исследований, город Дубна, 120 км.). Кроме 3-х обезьян опытной группы, для исключения транспортного стресса, одно животное контроля № 38311 было транспортировано к месту облучения и прошло все процедуры данного мероприятия, исключая радиацию.

Облучение протонами провели на медицинской диагностическо-лечебной установке. Центр луча протонов приходился на переносицу животного с диаметром пучка 80 мм. Время экспозиции 300 сек. Энергия протонов 170 МЭВ. Поглощенная доза 3 Гр.

Время в пути из Дубны в ИМБП – 4-е часа.

После доставки животных в виварий ИМБП, у облученной обезьяны № 38257 отмечалось: синюшность кожных покровов лица, которая постепенно исчезла, отсутствие аппетита, отказ от воды. Обезьяна № 38343: отмечено беспокойство, невротические реакции, настороженно испуганный взгляд. У обезьяны № 38344 наблюдалось: периодическое усиление двигательной активности, отказ от пищи и жидкости. Контрольное животное № 38311: несколько заторможено, аппетит без особенностей.

На следующий день было проведено плановое обследование животных опытной и контрольной групп. Исследование проводилось с использованием психотропного средства (раствор кетамина 5%, для инъекций). Выполнены: забор венозной крови на запланированные исследования и регистрация физиологических показателей. Надо отметить: ректальная температура у всех животных практически не отличалась от фоновых величин. Показатели гемодинамики (АД, ЧСС) – в пределах фоновых величин (Лапин Б.А., Джекидзе Э.К., Фридман Э.П.,1987). Визуально: у всех экспериментальных животных отмечена некоторая синюшность и желтизна кожных покровов

лица и склер глазных яблок. У обезьяны № 38257 зарегистрировано повышение порога чувствительности к кетамину. В контрольной группе у обезьяны № 38311 (транспортный стресс) отмечена повышенная двигательная активность.

В течение месяца произошла нормализация отмеченных выше явлений у всех животных.

Облучение углеродом С-14 выполнено через 40 суток на циклотроне Объединенного института ядерных исследований, г. Дубна. Условия проведения облучения и транспортировка животных автотранспортом не изменилась.

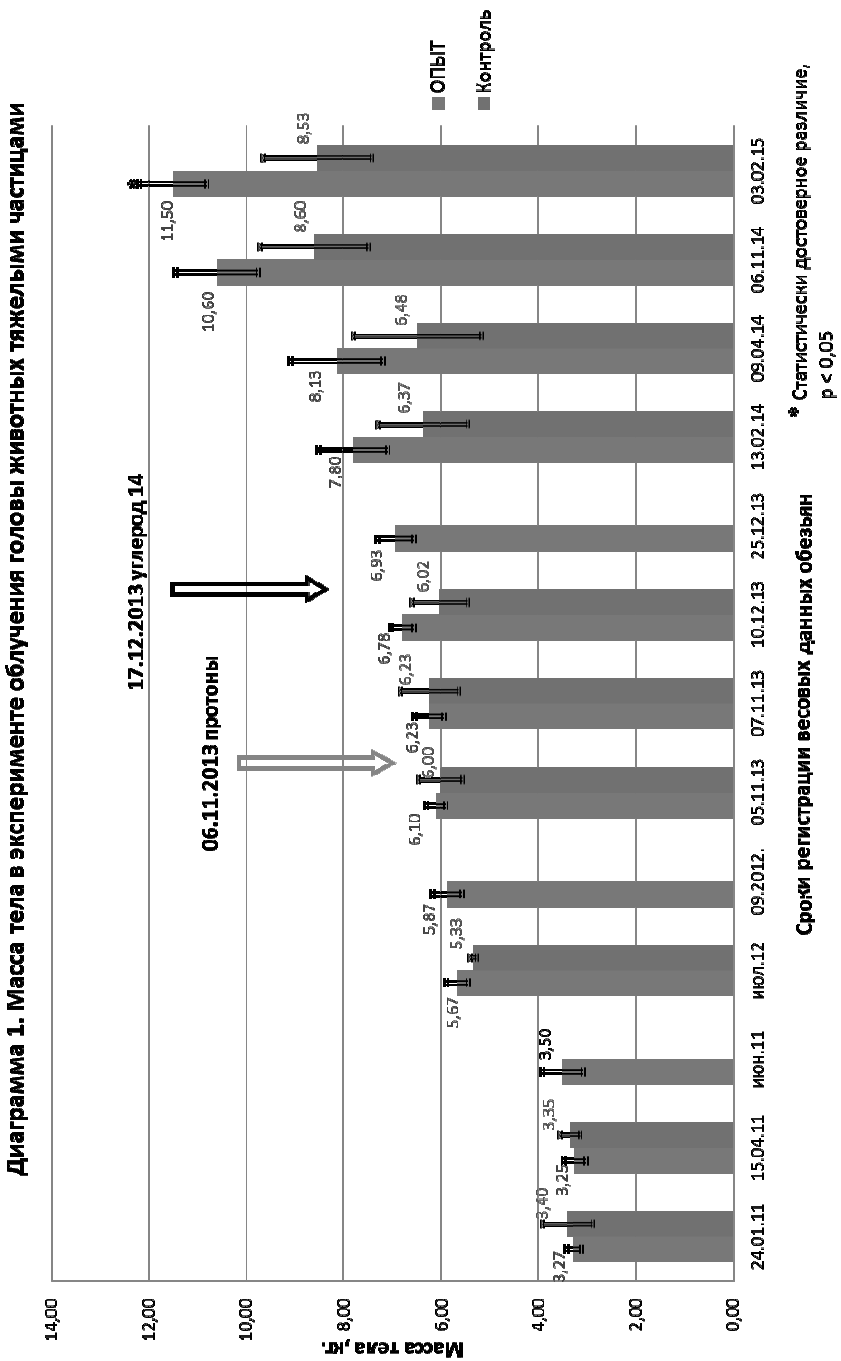
В дальнейшем обследования проводились с частотой раз в два месяца. В качестве средства для обездвиживания обезьян во всех случаях применялся кетамин в дозе 7-10 мг. на кг. массы тела, в/м. В обеих группах наблюдали некоторое снижение показателей гемодинамики (АД) и ЧСС, ректальная температура оставалась в пределах фоновых величин.

На 5-ом месяце после последнего воздействия тяжелых частиц визуально отмечены некоторые особенности у животных экспериментальной группы: снижение волосяного покрова кожи, частичное облысение конечностей, стали более выражены элементы активации желез половых гормонов (ярко-красная окраска промежности и бедер нижних конечностей). В контрольной группе элементы гормональной активности были выражены в меньшей степени.

В это же время у животных, подвергнутых воздействию тяжелых частиц, проявилась тенденция, выражавшаяся в ускоренном наборе массы тела. Это выразилось в более значительном увеличении веса приматов опытной группы по сравнению с контролем (см. диаграмму 1).

Год спустя после облучения у животных экспериментальной группы зафиксировано изменение кожных покровов в области промежности, нижней трети живота, мошонки, выразившееся в появлении мелкоточечных геморрагических петехий, что, возможно, связано со снижением иммунитета и возникновением воспалительных процессов в коже от стафилококковой или стрептококковой инфекции

.



Для оценки динамики массы тела между экспериментальными животными и животными контрольной группы использовался статистический метод малых выборок по t-критерию Стьюдента.

Последнее обследование было выполнено через 14 месяцев после облучения. На этот момент масса тела облученных животных статистически достоверно превысила вес обезьян контроля в среднем на 2,5 кг. (см. диаграмму 1). Статистически достоверное различие ($p < 0,05$).

На основании полученных данных, можно предположить, что раздражение структур подкорки (гипоталамическая область, ядра желудочков и гипофиза) тяжелыми частицами ионизирующего излучения вызвало активацию секреторной функции гипофиза, в том числе увеличение продукции соматотропного гормона, который и вызвал такое различие массы тела у обезьян.

Список литературы

1. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии / АМН СССР. – М.: Медицина, 1987. – 192 с.: ил.
2. Ушаков И.Б. Комбинированные воздействия в экологии человека и экстремальной медицине. – М.: ИПЦ «Издатцентр», 2003. – 442 с.
3. Ушаков И.Б. Реактивность и резистентность организма млекопитающих / И.Б. Ушаков, А.С. Штемберг, А.В. Шафиркин; [отв. ред. А.И. Григорьев]; Государственный научный цент Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН; Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ. – М.: Наука, 2007. – 493 с.
4. Ушаков И.Б. Малые радиационные воздействия и мозг [Текст]: монография / И.Б. Ушаков, В.П. Федоров; [под редакцией профессора А.С. Штемберга]. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2015. – 536 с.
5. Федоренко Б.С. Радиобиологические эффекты корпускулярных излучений: радиационная безопасность космических полетов / Б.С. Федоренко; отв. ред. В.В. Шиходыров; ГНЦ РФ – Ин-т мед.-биол. проблем. – М: Наука, 2006. – 189 с.
6. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. Принято Советом международных научных организаций (СМНО) в 1985 г. // Хроника ВОЗ. 1985. Т. 39. С. 3-8.
7. Игнатова И.Е. Воздействие малых доз гамма-облучения на иммунную систему в модельном эксперименте на приматах [Текс]: автореферат дис. на

соиск. учен. степ. канд. мед. наук / Игнатова Инна Евгеньевна; ФГБУ Медицинский радиологический научный центр Минздравсоцразвития России. – Обнинск, 2012.
8. Белкания Ю.Г. Анализ возрастной динамики изменений массы тела и роста у макак резусов // Отчет по хоздоговорной теме между Институтом медико-биологических проблем и Институтом медицинской приматологии за 1981 г. 1982. Глава I. Раздел I. С. 11-21.

ВЛИЯНИЕ ФЕНИЛГИДРАЗИНА НА НЕКОТОРЫЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА ОБЕЗЬЯНАХ

Ж. Д. Сабекия, В. С. Баркая, Л. И. Ершова, Ж. В. Елистратова, Л. О. Ахуба, В. Н. Фоменко.

НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, Сухум, Абхазия.

Резюме

Несмотря на то, что индуцированная ФГ анемия распространена реже других видов гемолитических анемии (ГА), она приобретает все больший удельный вес в связи с ростом загрязнения среды обитания человека.

Исследование действия фенилгидразина на организм изучается многие десятилетия, однако все они выполнены на мелких лабораторных животных (мыши, крысы, кролики, собаки), что затрудняет экстраполяцию результатов на человека. И в этом плане наиболее комплементарными являются данные, полученные на приматах, поскольку общеизвестно биологическое родство человека и обезьяны по целому ряду фундаментальных физиологических параметров.

В пробах венозной крови определяли основные гематологические показатели: КАК (клинический анализ крови). Пунктат костного мозга брали под наркозом из губчатых структур костей животных (плечевая, подвздошная). Измеряли вязкость крови (ВК), уровень гематокрита (Hct) и некоторые показатели гемостаза.

В эксперименте были использованы 7 половозрелых самцов *macaca mulatta* – в возрасте 7 – 13 лет, весом 12 – 14 кг, содержавшихся на типовом рационе, разработанном в НИИЭПиТ г. Сухум. Пробы крови получали из локтевой вены в утренние часы до кормления животных.

Сроки наблюдения за подопытными животными – фоновые показатели, на 1-е, 3-е, 6-е, 8-е, 10-е, 14-е, 20-е, 24-е и 30-е сутки после инъекции препарата.

В работе изучен эффект однократного внутримышечного введения солянокислого фенилгидразина в дозе 50 мг/кг. Воспроизведена заметная продолжительная (до 1-го месяца) анемия у обезьян без выраженных нарушений соматического состояния животных. Наиболее ранним признаком действия ФГ у опытных животных было снижение содержания Hb с первых суток − на 22%,с прогрессивным падением на 8-е сутки (40%). В то же время количество эритроцитов достоверно убывало лишь с 3-х суток при максимальном снижении на 10-й день, приближаясь к начальным значениям к 30-му дню. В соответствии с динамикой снижения эритроцитов повышалось количество ретикулоцитов с преобладанием их молодых форм. Введение ФГ сопровождалось лейкоцитозом с пиком на восьмой день, который носил скорее рефлекторный характер, поскольку признаков активации белого ряда в костном мозге не отмечалось (митотическая активность равна фоновым значениям). В количестве тромбоцитов существенных отклонении не выявлено.

Анализ миелограмм отразил высокую функциональную активность костного мозга, которая прослеживалась уже в первые сутки. Особенно ярко это проявилось на пике анемии (8 – 10 сутки). Динамика показателей гуморального гемостаза указывает на активацию с 3-х суток протромбинового, тромбинового времени и на увеличение концентрации фибриногена. Этот же процесс – снижение числа эритроцитов – сказывается на вязкости цельной крови. Разрушенные эритроциты, а точнее их микрочастицы, усиливают внутрисосудистое свертывание крови, повышается количество фибриногена, что обусловлено увеличением уровня цитокинов – IL-1, IL-6 и др. Повышение числа лейкоцитов также связано с изменением уровня провоспалительных цитокинов. По-видимому, это и объясняет их выброс из депо.

Таким образом показано, что однократное введение метгемоглобинообразователя ФГ (50 мг/кг веса в/м) ведет к заметной и сравнительно протяженной анемии (более одного месяца). Снижение количества эритроцитов на 48%, общего гемоглобина на 40%, гематокрита на 32%. Примененная доза ксенобиотика не вызывала заметных отклонений в соматическом состоянии животных: сохранялась двигательная активность, отсутствовали диспептические явления и нарушения желудочно-кишечного тракта, потеря массы тела и т.д. Функциональная взаимосвязь отмеченных показателей позволяют полнее оценить соматический статус обезьян, и использовать данную модель для разработки способов терапевтических коррекций анемических состояний, вызванных метгемоглобинообразователями. Имеется в виду применение антиоксидантов, мембранопротекторов в плане возможного их практического использования.

Продолжается изучение модели по ряду других важных лабораторных показателей, а также с целью выбора эффективных средств терапии ГА. Это позволит с большей обоснованностью экстраполировать результаты исследования на человека.

INFLUENCE OF PHENYLHYDRAZINE ON SOME HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN EXPERIMENT ON MONKEYS

Sabekia Zh. D, Barkaya V.S., Ershova L.I., Elistratova Zh.V., Akhuba L.O., Fomenko V.N.

Scientific Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of the

Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia

Abstract

Despite the fact that induced phenylhydrazine anemia is less common than other types of hemolytic anemia (HA) its specific gravity becomes higher and higher because of increasing pollution of human environment.

Research of the phenylhydrazine influence on the organism is continued for many decades, but all experiments were performed on small laboratory animals (mice, rats, rabbits, dogs) that makes difficult to extrapolate results to humans. In this respect, data obtained on primates are the most complementary due to the known biological similarity of the whole range of fundamental physiological parameters of human and monkeys.

In venous blood samples the main hematological parameters were determined: complete blood count (CBC). Bone marrow aspirate was collected from spongy bone substance of anaesthetized animals (humerus, flank bone). Blood viscosity (BV), hematocrit level (Hct) and some hemostatic factors were measured.

In the experiment, 7 sexually mature *macaca mulatta* males aged 7 – 13 years, weight of 12 – 14 kg, were used. They were fed with a standard diet developed in RIEPaT, Sukhum. Blood samples were collected from the median cubital vein before morning feeding.

The background factors were determined on 1, 3 , 6, 8, 10, 14, 20, 24 and 30 days after injection of the preparation.

In our work the effect of single intramuscular injection of phenylhydrazine hydrochloride in a dose of 50 mg/kg was studied. The discernible long anemia (up to 1 month) in monkeys without expressed disorders of the somatic state of animals was reproduced. The earliest sign of FH effect in animals was the decrease of the Hb level by 22% on the 1st day and its progressive fall on the 8th day (40%). At the same time, the quantity of erythrocytes meaningfully decreased only from the 3rd day, the minimal number of erythrocytes was found on the 10th day, and the initial value was reached by the 30th day. In accordance with the dynamic of erythoricyte decrease the quantity of reticulocytes increased and their young forms prevailed. The FH introduction was accompanied by leucocytosis with the peak on the 8th day, which was mainly of reflective character, because signs of the white blood cell activation in a bone marrow were not found (the mitotic activity was equal to background values). Significant changes in the number of thrombocytes were not detected.

The analysis of myelograms revealed the high functional activity of bone marrow, which was found already in the first day. Especially clear it was detected at the peak of anemia (8 – 10 day). The dynamics of humoral hemostasis parameters shows the activation of prothrombin and thrombin time from the 3rd day, and the increase in fibrinogen concentration. The same process – the decrease in a number of erythrocytes – influences on the whole blood viscosity. Destroyed erythrocytes, more precisely, their microparticles, intensify the inopexia, fibrinogen quantity increases due to increase in levels of cytokines IL-1, IL-6 etc. Rise in a number of leucocytes is also caused by change in the anti-inflammatory cytokine level. Seemingly, this explains their release from the depot.

Thus, it was shown that the single injection of methemoglobin former FG (50 mg / kg of weight, i.m.) leads to discernible and comparatively long anemia (longer than 1 month). Decreases in a number of erythrocytes by 48%, total hemoglobin by 40%, hematocrit by 32% were found. The used dose of xenobiotic didn't cause noticeable changes in the somatic state of animals: motion activity remained, dyspeptic symptoms, gastro-intestinal tract disorders, body weight loss, etc, were absent. The functional interrelation of mentioned parameters allows to access the somatic status of monkeys in more details and to use this model for the development of ways of therapeutic corrections of anemic states caused by methemoglobin formers having in mind the possible practical application of antioxidants and membrane protectors.

Research of the model is continued to study other important laboratory parameters and also to choose the effective HA therapy treatment. This will allow to extrapolate obtained results to humans with the greater certainty.

Несмотря на то, что индуцированная ФГ анемия распространена реже других видов гемолитических анемии (ГА) [1], она приобретает все больший удельный вес в связи с ростом загрязнения среды обитания человека.

Исследование действия фенилгидразина на организм изучается многие десятилетия, однако все они выполнены на мелких лабораторных животных (мыши, крысы, кролики, собаки) [2, 3, 4, 5], в доступной литературе не найдено

ни одного сообщения о работе, выполненных на обезьянах, что затрудняет экстраполяцию результатов на человека. И в этом плане наиболее комплементарными являются данные, полученные на приматах, поскольку общеизвестно биологическое родство человека и обезьяны по целому ряду фундаментальных физиологических параметров [6, 7, 8, 9, 10, 11]. Это явилось стимулом для проведения настоящего исследования: изучение особенности действия на ряд гематологических, гемостазиологических показателей и вязкости крови обезьян.

Материалы и методы

В пробах венозной крови определяли:

- количество гемоглобина эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов (HGB, RBC, WBC, PTC) на анализаторе PCE-210, Япония;
- лейкоцитарная формула подсчитывалась общепринятым методом в окрашенных мазках по Романовскому [12];
- содержание ретикулоцитов (RET) – в мазках крови, окрашенных бриллиант крезиловым синим;
- пунктат костного мозга под наркозом из губчатых структур костей животных (плечевая, подвздошная).

Показатели реологии и гемостаза [13,14] определяли в венозной крови с использованием соответствующих стабилизаторов:

- уровень гематокрита (Hct) СМ-70 (Латвия);
- асимптотическую вязкость крови (ВК) на приборе АКР-2;
- протромбиновое время (ПВ) – по методу Квика;
- концентрацию фибриногена (ФГ)– коагуляционной пробой (по Р.А. Рутберг);
- тромбиновое время (ТВ) – по Э. Сирмаи.

В эксперименте были использованы 7 половозрелых самцов *macaca mulatta* – в возрасте 7 – 13 лет, весом 12 – 14 кг, содержавшихся на типовом рационе, разработанном в НИИЭПиТ г. Сухум. Пробы крови получали из локтевой вены в утренние часы до кормления животных.

Сроки наблюдения за подопытными животными – фоновые показатели, на 1-е, 3-е, 6-е, 8-е, 10-е, 14-е, 20-е, 24-е и 30-е сутки после инъекции препарата. Статистическую обработку материала выполняли с помощью параметрического критерия Стьюдента.

Результаты

В работе изучен эффект однократного внутримышечного введения солянокислого фенилгидразина в дозе 50 мг/кг. Воспроизведена заметная продолжительная (до 1-го месяца) анемия у обезьян без выраженных нарушений соматического состояния животных. Как видно из табл.1 наиболее

ранним признаком действия ФГ у опытных животных было снижение содержания Hb с первых суток − на 22%,с прогрессивным падением на 8-е сутки (40%). В то же время количество эритроцитов достоверно убывало лишь с 3-х суток при максимальном снижении на 10-й день, приближаясь к начальным значениям к 30-му дню. В соответствии с динамикой снижения эритроцитов повышалось количество ретикулоцитов с преобладанием их молодых форм. Максимальный их выброс наблюдался на протяжении 2 недель.

Анализ миелограмм отразил высокую функциональную активность костного мозга, которая прослеживалась уже в первые сутки. Особенно ярко это проявилось на пике анемии (8 – 10 сутки). В препарате наблюдается явное преобладание элементов красного ряда (ЛЭИ= 1:2). При этом эритроидные элементы прослеживаются в виде островков, вокруг ретикулярных клеток (явление рофеоцитоза, что характерно для гемолитического состояния). Более того активность эритропоэза наблюдалась и в поздние сроки, когда количественный состав эритроцитов и концентрация гемоглобина достигали исходных значений, но в мазках крови все еще встречались молодые формы ретикулоцитов.

Динамика показателей гуморального гемостаза указывает на активацию с 3-х суток протромбинового (15,8±0,3 с, $p<0,001$), тромбинового (14,25±0,25с, $p<0,05$) времени и на увеличение концентрации фибриногена (9,0±0,5г/л, $p<0,05$) (рис 3). С восьмого дня наблюдается тенденция к нормализации показателей гемостаза.

Этот же процесс – снижение числа эритроцитов – сказывается на вязкости цельной крови (табл. 2). В первые трое суток выявлено незначительное ее снижение, максимально же низкий уровень наблюдался на 8-й день. И лишь с 20-х суток прослеживалось восстановление этого показателя. Аналогичная картина отмечалась и в изменении гематокритной величины.

Введение ФГ сопровождалось лейкоцитозом с пиком на восьмой день, который носил скорее рефлекторный характер, поскольку признаков активации белого ряда в костном мозге не отмечалось (митотическая активность равна фоновым значениям). В количестве тромбоцитов существенных отклонении не выявлено.

Таблица 1

Некоторые гематологические показатели крови у обезьян Macaca mulatta до и после введения фенилгидразина (M±m) (n=7)

Время, сут P <	Hb г/л	RBC •10^{12}/л),	RET %,	WBC •10^{9}/л
Фон	137,1±1,7	5,1±0,3	1,9±0,2	9,5±0,9
1-е	106,3±5,9* < 0,001	5,03±0,2	1,8±0,2	9,7±0,9
3-е	92,6±6,0* < 0,001	4,2±0,2* < 0,05	3,5±0,4* < 0,001	14,9±1,6* < 0,01
6-е	86,9±5,3** < 0,05	3,5±0,3** < 0,001	6,3±1,1* < 0,001	19,1±1,3** < 0,001
8-е	83,1±5,4** < 0,01	3,3±0,4** < 0,001	10,0±1,8* < 0,001	30,2±5,7** < 0,001
10-е	94,9±7,1* < 0,001	3,2±0,5** < 0,001	15,4±3,2* < 0,001	26,2±4,7** < 0,001
14-е	109,4±5,8* < 0,02	3,3±0,3** < 0,001	15,9±4,0* < 0,001	22,8±4,1** < 0,001
16-е	120,4±4,9* < 0,02	3,7±0,3** < 0,001	11,9±2,9* < 0,001	15,6±3,1* < 0,001
20-е	125,4±3,3* < 0,02	4,2±0,2** < 0,01	7,0±1,3* < 0,001	10,3±1,6
24-е	128,9±2,3* < 0,01	4,6±0,2	5,3±0,8** < 0,001	9,3±1,3
30-е	133,4±1,1	4,9±0,3	1,9±0,2	8,1±0,6

Примечание: *- в сравнении с фоном, **- в сравнении с 1-ми сутками.

Таблица 2

Показатели гематокрита и вязкости крови у обезьян Macaca mulatta (M±m) (n=7)

	Время после введения ФГ, сутки.						
Показатели	Фон	3-е	6-е	8-е	14-е	20-е	28-е
ВК мПа. с p<	4,9±0,06	4,5±0,09* 0,001	3,9±0,18* 0,001	3,5±0,15** 0,001	3,7±0,17** 0,001	4,1±0,11** 0,001	4,8±0,08
НсТ л/л p<	0,41± 0,013	0,36±0,011* 0,01	0,31±0,018* 0,001	0,28±0,021** 0,02	0,33±0,021* 0,02	0,36±0,017* 0,05	0,41±0,012

Примечание: * - в сравнении с фоном, ** - в сравнении с 3-ми сутками.

Обсуждение

Главной мишенью фенилгидразина является гемоглобин – ксенобиотик окисляет его в метгемоглобин (metHb) [16]. Эти качественно неполноценные эритроциты, во многом определяющие кислородный статус организма, не способны больше выполнять свою жизненно важную функцию, дальнейшее изменение структурных и функциональных свойств их мембраны ведет к эриптозу [17] в просвете сосудов. Этим и объясняется, по нашим данным, падение концентрации Hb уже через 24 часа после инъекции и снижение количества эритроцитов на третий день. В эти же сроки (3-и сут.) в периферии, в ответ на гипоксию, процент ретикулоцитов также нарастает. Ясно, что продукты распада эритроцитов активизируют костномозговое кроветворение [18], на это указывает, прежде всего, его клеточный состав: преобладание элементов красного ряда, наличие в них фигур митоза, а также повышенное содержание в мазках периферической крови регенераторных эритроцитов – ретикулоцитов. Активность красного ростка костного мозга прослеживается даже в сроки, когда количественно восстанавливается клеточный состав периферии (гемоглобин, эритроциты и др.). Поэтому можно полагать, что 30-е сутки не является периодом полного восстановления гемопоэза до исходной функции.

Сходство изменения динамики показателей Ht и ВК отражает состояние вязкости вцелом. Разрушенные эритроциты, а точнее их микрочастицы, усиливают внутрисосудистое свертывание крови, повышается количество фибриногена, что обусловлено увеличением уровня цитокинов – IL-1, IL-6 и др. [18, 19, 20, 21]. Повышение числа лейкоцитов также связано с изменением уровня провоспалительных цитокинов. По-видимому, это и объясняет их выброс из депо [23].

Таким образом показано, что однократное введение метгемоглобинообразователя ФГ (50 мг/кг веса в/м) ведет к заметной и сравнительно протяженной анемии (более одного месяца). Снижение количества эритроцитов на 48%, общего гемоглобина на 40%, гематокрита на 32%. Примененная доза ксенобиотика не вызывала заметных отклонений в соматическом состоянии животных: сохранялась двигательная активность, отсутствовали диспептические явления и нарушения желудочно-кишечного тракта, потеря массы тела и т.д.

Функциональная взаимосвязь отмеченных показателей позволяют полнее оценить соматический статус обезьян, и использовать данную модель для разработки способов терапевтических коррекций анемических состояний, вызванных метгемоглобинообразователями [22]. Имеется в виду применение

антиоксидантов, мембранопротекторов в плане возможного их практического использования.

Продолжается изучение модели по ряду других важных лабораторных показателей, а также с целью выбора эффективных средств терапии ГА. Это позволит с большей обоснованностью экстраполировать результаты исследования на человека [7, 10].

Список литературы

1. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva: World Health Organization. – 2001.
2. Н.А. Григорович, БЭБиМ, Т. 2, (1966), с. 29 – 31.
3. Г.Н. Зюзьков, Е.В. Абрамов, Е.В. Дыгай, БЭБиМ, Т.138(№10) с. 378 – 381 (2004).
4. И.А. Шперлинг, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева и др., Бюллетень сибирской медицины, Т.4(№3), с. 48 – 52, (2005).
5. И.А. Шперлинг, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий и др., Вопросы биол., медиц. и фармац. химии, №1, с. 14 – 18 (2008).
6. И.И. Мечников, Этюды о природе человека, ГИЗ, Москва (1923).
7. Б.А. Лапин (ред.), Обезьяна – объект медицинских и биологических экспериментов, Сухуми (1963), с. 96 – 97.
8. Л.Ф. Семенов, В кн.: Вопросы физиологии, экспериментальной патологии и радиобиологии, Сухум (1965), с. 311 – 317.
9. Н.П. Гончаров, В.И. Воронцов, Г.В. Кация и др., Вестник акад. мед. наук, Медицина, Москва (1977), с. 13 – 20.
10. М.И. Куксова, Кроветворная система обезьян в норме и патологии, Медицина, Москва (1972).
11. Т.Г. Урманчеева, Материалы всесоюзной Конференции, Медицина, Москва (1980), с. 211 – 212.
12. А.И. Воробьев. Руководство по гематологии, Т. 2, Медицина, Москва (1985), с. 94 – 111.
13. З.С. Баркаган, А.П. Момот, Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза, Ньюдиамед, Москва (2008).
14. Н.А. Добровольский, Ю.М. Лопухин, А.С. Парфенов, А.В. Пешков, Реологические исследования в медицине, Вып. 1, РНЦХ РАМН (1997), с. 45 – 51.
15. Э. Бойтлер, Нарушение метаболизма эритроцитов и гемолитическая анемия, Медицина, Москва (1981).
16. М.С. Кушаковский, Клинические формы повреждения гемоглобина, Медицина, Ленинград (1968).

17. K.S. Lang, and P.A. Lang, and C. Bauer at al, Cell Physiol. Biochem, V. 5, No. 5, 195 – 202(2005).
18. Я.Г. Ужанский, Физиологические механизмы регенерации крови, Медицина, Москва, (1968), с. 124.
19. Д.М. Зубаиров, Свертываемость крови, Издательство Казанского университета, Казань (1966).
20. Б.И. Кузник, Н.В. Васильев, Н.Н. Цыбиков, Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма, Медицина, Москва (1989).
21. Е.И. Белевич, Д.Г. Костин, Успехи современной биологии, Т134, №2, 149 – 157(2014).
22. О.Г. Шевченко, Л.Н. Шишкина, Успехи современной биологии, Т. 134, №2, 133 – 148 (2014).
23. С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. Цитокины, Фолиант (2008).