

УДК 167.33:616.36-004+599.323.41

СИСТЕМНОЕ ПОРАЖЕНИЕ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ОТРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

В.А. КОРДЮМ, Д.М. ИРОДОВ, М.В. ДРАГУЛЯН, Т.П. ГУЛЬКО, П.В. БУЧЕК

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150
e-mail: kordium@imbg.org.ua

***Цель.** Поражение с помощью CCl_4 вызывает каскад реакций и состояний, характерных для системных нарушений, вызванных большинством внешних техногенных факторов окружающей среды. Для дальнейшей отработки технологий восстановления, использующих стволовые клетки и цитокины, были отработаны условия получения модели системного поражения организма. **Методы.** В качестве модели были выбраны мыши высококорактовой линии ICR. Системное поражение вызывали многократным внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода. **Результаты.** Были найдены оптимальные дозы и длительность нагрузки, превышение которых приводит к необратимым изменениям в организме, которые уже не поддаются самовосстановлению. **Выводы.** Полученная модель может быть использована для изучения различных технологий восстановления системных поражений.*

***Ключевые слова:** системные поражения, модель, четыреххлористый углерод.*

Введение. Основные заболевания человека в последнее время приводят к хроническим нарушениям функциональности организма хронического характера. Поиск новых способов лечения, основываясь на новых достижениях в сферах биологии и медицины, является одной из первоочередных задач. Наиболее перспективны технологии, использующие стволовые клетки и сигнальные молекулы, которые потенциально могут восстановить те системные поражения организма, которые лежат в основе хронических нарушений. Для изучения и разработки таких технологий необходима реальная, достигнутая практически, адекватная модель. Один из вариантов создания такой модели анализируется в данной статье. В качестве агента, вызывающего системные поражения организма, используется четыреххлористый углерод CCl_4 , а в качестве модельных животных выбраны мыши. Проведенный анализ научной литературы показывает, что хотя поражения за счет CCl_4 хорошо отработаны, но не всегда воспроизводимы в достаточной мере. Общеизвестной моделью поражения CCl_4 является цирроз печени и только у крыс. Изменяя объект исследования (другой тип животных или исследование поражения других органов организма) исследователь меняет схему модели. В результате проведенных опытов авторами исследований разработана методика системного поражения организма мышей с использованием CCl_4 .

Обычно повреждения организма связывают с нарушениями, вызванными термическими, химическими, механическими и отравляющими воздействиями. Стандартизированные лечебные процедуры, используемые медициной, защищают от таких повреждений.

На сегодняшний день понятие «медицина» все больше расширяется и объединяет в себе разные области деятельности, так появляются новые направления: различные варианты биотехнологий человека, биомедицина, нетрадиционная медицина, наномедицина и так далее. Однако, хотя все эти направления имеют разнообразные методологические, концептуальные подходы к реализации задачи, все они имеют общий объект — здоровье человека (восстановление и его укрепление).

© В.А. КОРДЮМ, Д.М. ИРОДОВ, М.В. ДРАГУЛЯН, Т.П. ГУЛЬКО, П.В. БУЧЕК, 2016

Использование стволовых клеток и сигнальных молекул позволяет смоделировать в «большом» организме действия, которые происходят у «здорового» человека. Организм «сам» указывает стволовым клеткам куда идти и что делать, а клеткам поврежденных тканей, что активировать, синтезировать, блокировать и прочее.

В тоже время сигнальные молекулы настраивают ткань, органы на их восстановление, своими внутриклеточными возможностями готовя для стволовых клеток «поле деятельности» в зонах поражения. Под таким воздействием поврежденная ткань становится восприимчивой к действию стволовых клеток, позволяя им реализовать свои функции. Для того чтобы перейти от «пролечивания» к технологии «излечивания», при моделировании системных поражений необходимо реализовать именно такой комплекс процессов.

Анализ имеющихся в литературе данных показал, что всем этим требованиям к моделям, отвечает то, что известно в литературе, как «цирроз» вызванный четыреххлористым углеродом, но не на крысах, а на мышах. Проанализировав патологические процессы, возникающие при действии CCl_4 , становится понятным выбор этого агента при моделировании.

Сам по себе CCl_4 малоактивен и, попав в клетку, он, как первый уровень поражения, обладает очень слабым повреждающим действием. Его токсические действия для организма создает сам организм [1–3]. Путь этот начинается с клетки (рис. 1), по отношению к которой проникший в неё CCl_4 является внешним агентом (ксенобиотиком) который требует устранения (рис. 1).

Но преобразования, которые производит с CCl_4 «его» монооксидаза, идут не по пути дезактивации, а по пути нарастающей активации. Для устранения ксенобиотиков и промежуточных продуктов нормального метаболизма в клетке существует сложная многоцелевая и многоуровневая система детоксикации. Её первой линией являются цитохромы P450. Их известно уже до сотни. По своему действию – это ферменты, переводящие различные (для природных продуктов – любые) органические соединения в энергетически «подвижную» форму. После такой активации, ферменты второй линии защиты могут их разрушить до состава, который клетке уже не опасен и может

быть из нее (а затем из организма) выведен вовне. Каждый такой фермент реагирует с определенной химической группой на молекуле ксенобиотика. CCl_4 подпадает под действие того цитохрома P450, который имеет обозначение 2E1 (CYP2E1). Первой реакцией является образование трихлорметил радикала. Но далее может вступать в действие кислород и переводить трихлорметил радикал в значительно более энергонапряженный трихлорметилперокси радикал, обладающий особо высоким разрушительным потенциалом. Оба эти радикала атакуют «всё», но в первую очередь полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран, которые наиболее чувствительны к действию этих радикалов. Повреждение фосфолипидов приводит к локальным разрушениям мембран клетки, что приводит к дезорганизации мембраносвязанных процессов. Так возникает второй, теперь уже ярко выраженный уровень поражения, вызываемый вторичным токсическим действием (свободными радикалами, образовавшимися из первичного агента – CCl_4).



Рис. 1. Воздействие CCl_4 на клетку (схематически)

Двойной эффект разрушения мембран клеток организма имеет разнонаправленное проявление. Вследствие нарушения цитоплазматической мембраны, в клетку извне начинает не контролируемо поступать Ca^{2+} . Он (теперь уже бесконтрольно) активирует Ca^{2+} – зависимые протеазы, фосфатазы, эндонуклеазы и прочее. В тоже время, изнутри клеточных, окруженных мембранами компартментов, под общим названием «микросомы» (лизосомы, пероксисомы, эндосомы и пр), выходят локализованные в них ферменты (оксидазы, пероксидазы, гидролазы и пр), образующие в содержащихся в клетке молекулах высокорекреакционные центры. Кроме того, из микросом высвобождаются также ферменты, деградирующие макромолекулы. Вследствие разрушения мембран свободными радикалами, образовавшимися из CCl_4 , возникает третий уровень поражения, обусловленный продуктами, образуемыми ферментами, вышедшими из микросом, (Ca^{2+} – активированных и Ca^{2+} – независимых). Защита в клетке от реактивных форм кислорода и от вызываемых ими повреждений существует в виде системы глутатиона, для инактивации реактивных форм (любой природы и происхождения), и репарации – для восстановления от повреждений в геноме. Они активируются и снижают токсическое действие всех уровней поражений.

Однако при моделировании CCl_4 поступает непрерывно, и поражающие факторы образуются теперь уже массово на всех уровнях и постоянно. Повреждения от них идут непрерывные и наступает истощение систем защиты и восстановления.

При постоянном введении CCl_4 происходит постоянная стимуляция потребности в устранении его эффектов. В кратковременном действии стимуляция, как правило, высокоэффективна. Но при хроническом непрерывном режиме, она приводит к неизбежному истощению того, на повышение активности чего она направлена. Так происходит и при хроническом введении CCl_4 . В результате, через определенное время наступает падение активности защитных и восстанавливающих систем. Высокорекреакционноспособные промежуточные метаболиты образуются практически на всех (кроме конечных) этапах метаболизма организма. Так работают метаболические цепи обмена веществ. Но в них предусмотрена передача про-

межуточных метаболитов непосредственно в активный центр другого. Это происходит с высокой точностью. Но какая-то часть высокопродуктивных метаболитов, в результате различных случайных процессов, уходит в внутриклеточное пространство. И часто процент таких несанкционированных выходов очень мал, с учетом интенсивности и массовости элементарных актов ферментативных реакций общего метаболизма клетки. Таких, потенциально опасных, продуктов в клетке образуется много [4]. В норме, их количество, при всем совершенстве метаболизма, существенно превышает то вредное, что (тоже в норме) попадает в клетки организма извне. Такие высокорекреакционноспособные промежуточные продукты и являются основной целью действия систем защиты и восстановления. Развитие трех уровней поражения под действием CCl_4 , приводит к истощению систем защиты и восстановления. Миграция не проактивированных высокорекреакционных промежуточных продуктов нормального метаболизма превращается в четвертый уровень поражения. Лишенный необходимого уровня активности защитных систем, организм разрушает сам себя. Наступает сигнал – клетки гибнут.

Развивающееся системное поражение организма становится следствием взаимозависимых и взаимосвязанных механизмов. Первый, описанный выше, – клеточный. Он в той или иной мере работает во всех клетках организма. Второй связан с особенностями функционирования организма как системы. Организм, как система, описан и изучен, «по крупному», по отдельным метаболическим цепям, сигнальным каскадам и пр. Это все детально нарисовано и продолжает изучаться и дорисовываться в бесчисленных публикациях. Но пока абсолютно непонятными продолжают оставаться механизмы пространственно-временной динамики совокупного процесса. Один из ее элементов входит в число основных механизмов, определяющих системность поражения. Он связан с тем, что, по аналогии с внутриклеточными процессами, можно назвать «домашним хозяйством». Таким «домашним хозяйством» на уровне организма является некий двуединый процесс. Это – обеспечение всех клеток продуктами питания (тем, что в них, после всех промежуточных процессов попадает из «вкусной и здоровой пищи», как первый этап всего после-

дующего метаболизма). И одновременно – удалением выделяемых клетками «отходов» – того, что клетка сама уже не может разрушить и реутилизировать, но, накапливаясь, может привести к сбоям функций и гибели.

Фактически кровеносная система является «сточной канализацией» организма и его «артерией жизни» в одной структуре, одновременно и совместно. А кровь – это не имеющая аналогов динамическая смесь продуктов «первой жизненной необходимости» – кислорода, питательных веществ, воды и одновременно и совместно всех видов отходов клеточной жизнедеятельности, выбрасываемого из клеток молекулярного мусора, остатков деградирующих погибших клеток, вредных газов и летучих веществ. Все это растворено в водной фазе крови и сосуществует в виде такой всеобъемлющей смеси и тоже одновременно и вместе. И сосуществует такое – в очень сложной динамике.

Организовано такое обеспечение настолько, в общем, «просто», что понять его на уровне первичных механизмов пока не представляется возможным. Такая «простота» и непостижимость детализации заключается в том, что и «пища» для клеток и их отбросы равномерно распределены в общей системе, которой является кровотоки. В кровь непрерывно поступает все, из межклеточного пространства, выбросы всех клеток организма. Поступающее от каждой клетки в отдельности объединяется, непрерывно перемешивается и обобщается. По мере выхода клеточных отходов во внеклеточное пространство формируется поток всех выбросов от всех клеток в виде той их смеси, которая называется лимфой. Лимфа непрерывно поступает в кровотоки. И в ту же самую кровь из кишечника поступает то, что, пройдя клетки кишечника, а затем и печень, становится «питательными веществами» для всех клеток организма. Это вся смесь отходов и «продуктов питания» непрерывно циркулирует по всему организму.

Все это одновременно очищается (в каком-то только небольшом проценте за каждый цикл «прокачки») в основном в печени. Как клетки печени отличают весь тот спектр «отходов», которые надо поглощать (избирательно) из всей смеси «всего» – описывают только «в общем виде». Сквенджер-рецепторы известно уже более десятка, но как происходит ими «выборка», предпочитают не

детализировать т. к. изучение поглощения проводят пока только на индивидуальных продуктах, а все остальное является экстраполяцией и обобщениями. Одновременно «питательные вещества» (тоже во всем их спектре – от металлов микроэлементов до сложных молекул «незаменимых» компонентов, например витаминов) каким-то способом избирательно проникают, поглощаются (тоже только в небольшом проценте за каждый цикл «прокачки») через стенки капилляров, распределяясь между всеми клетками тканей всего организма. А клетки, в свою очередь, выбирают из своего межклеточного пространства, из того, что они в него выбросили, как отходы, поступающую из капилляров «пищу» – питательные вещества. Отходы же постепенно мигрируют в лимфатические сосуды и выбрасываются в кровь и т. д.

Но под действием CCl_4 начинаются и развиваются описанные выше каскады поражений. По функциональному предназначению, у млекопитающих основным органом детоксикации всех вредных продуктов является печень, структурной единицей которой являются гепатоциты. Они и принимают на себя основную функцию по преобразованию четыреххлористого углерода. В них образуется больше всего его высоконеактивных производных. Поэтому наиболее повреждаемыми являются гепатоциты. Активность «очистной» функции печени падает. В крови начинает расти и уровень непрерывно поступающего CCl_4 и уровень «недоочистки», собственных отходов. Цитохромы P450 имеются во всех клетках организма. Они необходимы для детоксикации собственных, множественных, высокореакционных продуктов своего нормального метаболизма. Поэтому поступающий в организм CCl_4 метаболизирует во всех клетках. При росте его уровня, (по мере разрушения им же, в первую очередь гепатоцитов) растет всеобщее (хотя и в неодинаковой мере) поражающее действие как каскадов разрушения от CCl_4 , так и от накапливаемых собственных отходов. Организм начинает многоуровнево разрушать сам себя. Вызывание сосудистых поражений организма при использовании CCl_4 как агента [5] свидетельствует о системности поражения при его введении.

Внутриклеточно это происходит за счет уровней разрушения, инициированных CCl_4 . Системно – за счет повышения концентрации CCl_4 во всех клет-

ках, вследствие снижения его детоксикации разрушающимися гепатоцитами и через кровоток, за счет нарастания отходов (всех видов перемешанных вместе) вследствие того же падения активности гепатоцитов. На все это накладывается нарастание «системного воспаления» за счет активации провоспалительных цитокинов, роста уровня провоспалительных простагландинов и пр. Так развивается процесс системного поражения организма. По своей природе, степень восприимчивости, чувствительности, реагируемости на все это у разных тканей, разных органах, не одинаковая. Поражения в них будут и разные и в разной степени. Но так происходит при любых поражениях, всегда. При любом системном поражении повреждается «все», но в очень разной мере. В этом плане описываемая модель достаточно адекватна происходящему в жизни. В выбранной модели имеется одно «универсальное достоинство». Оно обусловлено тем, что поражения вызывает не непосредственно сам токсический агент CCl_4 . Поражения (клеток, тканей, органов) вызывают повреждающие агенты каскадов, которые реализуются при всех системных поражениях, возникающих «в обычной жизни». Степенью поражения модели легко управлять. Для этого достаточно выбрать нужную схему эксперимента. Но следует учитывать, что при фактически общем мнении о том, что модель поражения организма введением CCl_4 хорошо изучена и в деталях методически описана, это, к сожалению, не так.

В кратком виде оценку ситуации в этой области можно изложить цитатой из обзора, список авторов которого возглавляет представитель Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C. US: «Большое количество исследований (приблизительно 50) было проведено на системах млекопитающих после применения CCl_4 *in vivo*. Большинство из них дало отрицательные результаты, которые обсуждены ниже. Отрицательные результаты были видны почти во всех исследованиях, в которых генотоксический эффект определяли в нецелевых (т.е. не печеночных) тканях» [3].

Самым полным в плане описания рекомендаций как надо ставить эксперименты является модель получения «цирроза». Некоторые из них настолько скрупулезны, что расписывают в деталях

все, вплоть до фирмы, выпускающей шприцы, которые надо использовать в таких экспериментах [6]. А почти во всех последующих работах всеми авторами используется все иначе (и у каждого автора – свое). Такое бывает только в том случае, если рекомендованные методы работают только у их авторов в их конкретных постановках (хотя рекомендуются, как универсальные). Так, в сводке Marques с соавт. [7], из приведенного ими перечня экспериментов по изучению токсического действия CCl_4 на крысах (в период от 2008 по 2009 гг.), следует, что ставили опыты во временном диапазоне от 36 ч до 18 недель, а иногда даже без указания срока. А уж схемы и дозы были самые разные. При всей странности ситуации, получается, что в масштабных, с длительной историей, исследованиях по токсическому воздействию CCl_4 , надежная, конкретно воспроизводимая для использования, как общепринятая, стандартизированная, дающая надежные результаты процедура, получена не была. При этом следует отметить, что из всех возможных поражений CCl_4 почти все и всегда изучали только события в печени. Это объясняется тем, что исходили из того, что CCl_4 вызывает цирроз, и важен в основном (или даже) только как модель цирроза печени у человека. Очень скоро стало понятно, что именно как цирроз – моделью такого поражения (достаточно адекватной), является развитие поражения печени только у крыс. И в тех опытах, которые были поставлены так, что ожидаемое воспроизводилось (и на которые и ссылаются в литературе) этот процесс изучили достаточно детально.

Под действием CCl_4 у крыс установлено возникновение цирроза печени, но у мышей он не возникает [6]. И это дает основания и создает предпосылку для того, чтобы отработать на них модель системного поражения всего организма. Идея настолько привлекательная, что в этом направлении работы ведутся все время (хотя публикации об успешных результатах весьма редки). Как удачный пример решения можно привести публикацию Das с соавт. [5]. В ней показано поражение и печени, и легких. Высказана также идея, что это может быть хорошей моделью. Но поражения почек у мышей (в данном исследовании), вызывали не чистым CCl_4 , а своеобразным комплексом – предварительным недельным, а затем в течение всего

эксперимента (12-недельным), сопровождением фенобарбиталом. Он стимулирует активность цитохромов P450 и таким образом усиливает действие CCl_4 . Но это уже дополнительное и непредсказуемое действие. И как особенность полученных результатов, авторы отмечают, что в легких (в отличие от печени) не были обнаружены перекисленные липиды. В то же время в экспериментах на крысах, без использования фенобарбитала, перекисленные липиды в легких присутствовали. Авторы делают вывод, что поскольку поражение легких при действии CCl_4 в их экспериментах не сопровождалось каскадом перекисного окисления липидов, то имеет место какой-то другой механизм их поражения. Но это уже меняет весь процесс, так как выводит из системы поражающих эффектов центральный пункт – разрушение мембран. Возможно, это следствие использования фенобарбитала. Но сам факт поражения не только печени, но и легких весьма показателен (хотя главными критериями в цитируемой работе была гипертензия и изменения в сосудах).

Материалы и методы

С учетом проведенного нами анализа литературных данных были спланированы эксперименты по получению модели системного поражения организма у мышей.

В работе были использованы мыши линии ICR 2-х и 3-месячного возраста, весом 20 и 25 г, соответственно. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Для поиска оптимальной схемы получения системного поражения исследовался широкий круг доз CCl_4 , частот его введения и длительности эксперимента. Были поставлены более десяти независимых экспериментов. Наиболее результативной оказалась доза в 1,5 мкл (30 % раствора CCl_4 на оливковом масле) на грамм веса животного, два раза в неделю, внутривентрально в течение от 10 до 13 недель непрерывных инъекций 2 раза в неделю. Контрольным животным аналогичным методом вводили идентичный объем физиологического раствора. После прекращения введения CCl_4 часть животных выводили из эксперимента для определения степени достигнутых нарушений, а часть выдерживали на нормальном рационе от 3 до 13 недель для самовосстановления. Клиническое наблюдение за животными ве-

лось ежедневно. На начало эксперимента у всех контрольных и опытных мышей были зафиксированы исходные биологические и физиологические параметры такими методами: подсчет лейкоцитарной формулы, определение АЛТ, АСТ и СОЭ. На момент выведения животных из эксперимента фиксировали те же показатели крови, а также проводили и морфолого-анатомическое описание печени, селезенки, легких и почек.

Результаты и обсуждение

Таким образом, в наших экспериментах использовалось только воздействие с помощью CCl_4 . Продолжительность нагрузки определялась таким образом, чтобы возникшие поражения самостоятельно полностью не восстанавливались. Это необходимо для дальнейшего изучения восстановительного влияния изучаемых агентов. В этом «физиологическом окне» заданной и контролируемой степени поражения была отмечена возрастающая с увеличением длительности воздействия гетерогенность индивидуальных реакций организма отдельных животных. При увеличении времени введения CCl_4 и последующем более длительном самовосстановлении увеличиваются как различия в поражении разных органов, так и индивидуальные различия повреждений у разных особей. Общую закономерность можно продемонстрировать на простом тесте изменения относительной массы внутренних органов, с учетом индивидуальной восприимчивости к CCl_4 . Данные демонстрируют существенные различия в индивидуальной чувствительности по отношению к четыреххлористому углероду (рис. 2).

Анализ скорости оседания эритроцитов (СОЭ) крови животных (рис. 3) показывает, что патологический процесс, регистрируемый по этому показателю идущего воспаления, продолжается и после окончания введения четыреххлористого углерода. Процесс поражения органов можно довести до любого уровня, продолжая вводить CCl_4 , или прекращая такую процедуру. Но только через 10–12 недель, процесс системного поражения развивается до критической стадии – необратимости.

Интересные данные получены при анализе белой крови. Определение её отдельных фракций в разных схемах опытов оказалась неинформативной. Но интегральный показатель – абсолютное

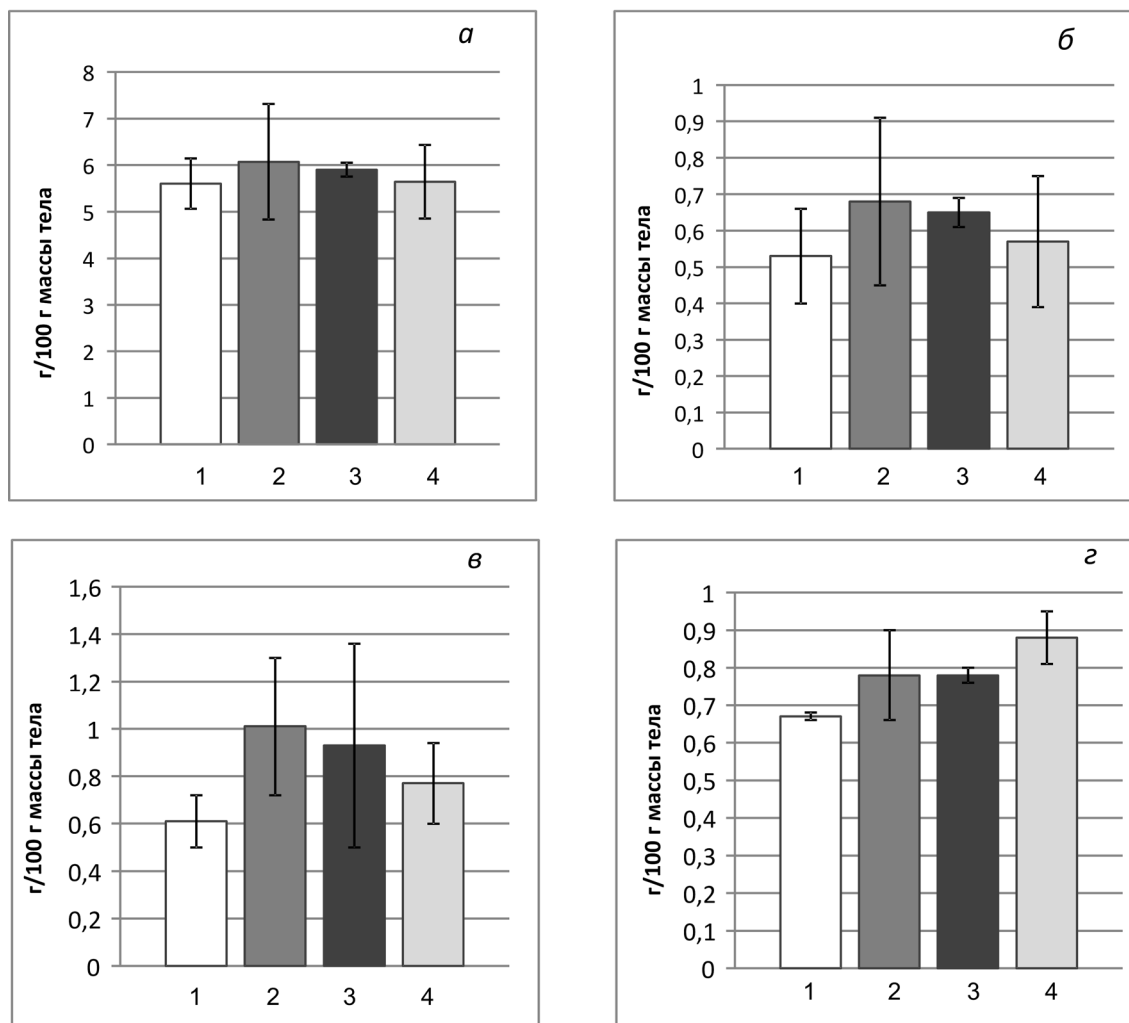


Рис. 2. Изменение относительной массы органов мышей в эксперименте: а – печень; б – селезенка; в – легкие; г – почки; 1 – здоровая мышь; 2 – 10 недель CCl_4 ; 3 – + 3 недели CCl_4 ; 4 – + 3 недели самовосстановления

количество лейкоцитов, демонстрирует продолжающийся патологический процесс и после прекращения введения CCl_4 . (рис. 4).

Существенным моментом, на который следует обратить внимание, является то, что CCl_4 подавляет защитную реакцию организма. Через 10 недель после начала нагрузки CCl_4 концентрация лейкоцитов в крови практически оставалась на уровне контроля. Еще через 3 недели наблюдалось почти двукратное повышение их концентрации. Но после того, как действие CCl_4 прекращается, восстановительная защитная реакция организма приводит к резкому повышению числа клеток белой крови.

Анализ патолого-морфологических данных эксперимента показывает, что имеет место выраженная индивидуальная реакция у животных на повреждающие факторы обуславливаемых CCl_4 . Такая индивидуальность охватывает как абсолютную чувствительность, так и степень и особенности повреждений разных органов.

Наиболее сильно повреждается печень. Это представляется совершенно очевидным, исходя из функции печени, согласно описанному выше механизму действия CCl_4 и хорошо видно на гистологических срезах (рис. 5).

Почти так же сильно (хотя по времени развития и несколько позднее) поражаются лёгкие (рис. 6).

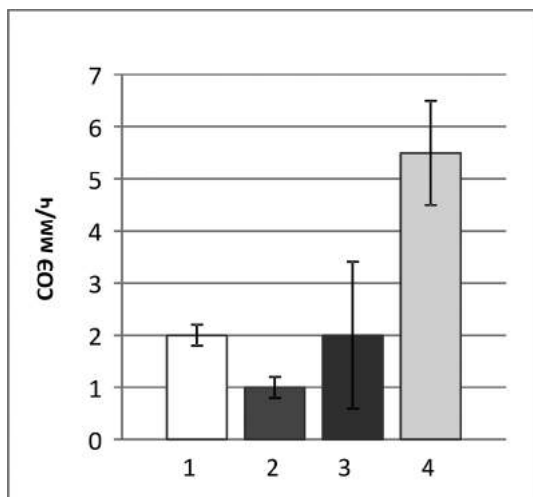


Рис. 3. Изменение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) экспериментальных животных по отношению к СОЭ у здоровых животных: 1 – здоровая мышь; 2 – 10 недель CCl₄; 3 – + 3 недели CCl₄; 4 – + 3 недели самовосстановления

Значительные изменения имеют место и в селезёнке. Ближе к терминальной стадии, наступает поражение поджелудочной железы.

В небольшой мере повреждаются почки. А в сердце вообще не видно сколько-нибудь зна-

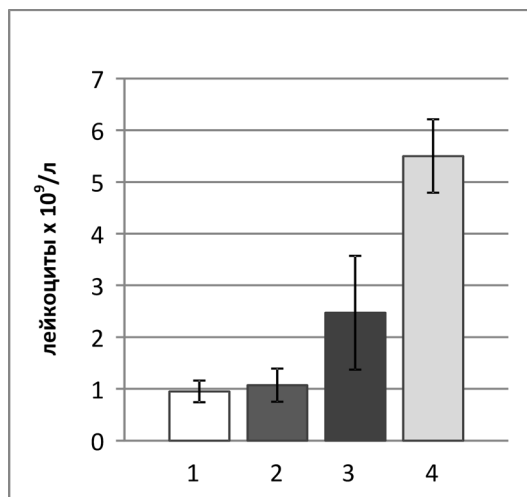


Рис. 4. Изменение количества лейкоцитов у экспериментальных животных по отношению к здоровым животным: 1 – здоровая мышь; 2 – 10 недель CCl₄; 3 – + 3 недели CCl₄; 4 – + 3 недели самовосстановления

чительных нарушений. Однако это лишь «статистическая» картина. Индивидуальная же восприимчивость и характер поражений органов у разных животных могут различаться очень сильно.

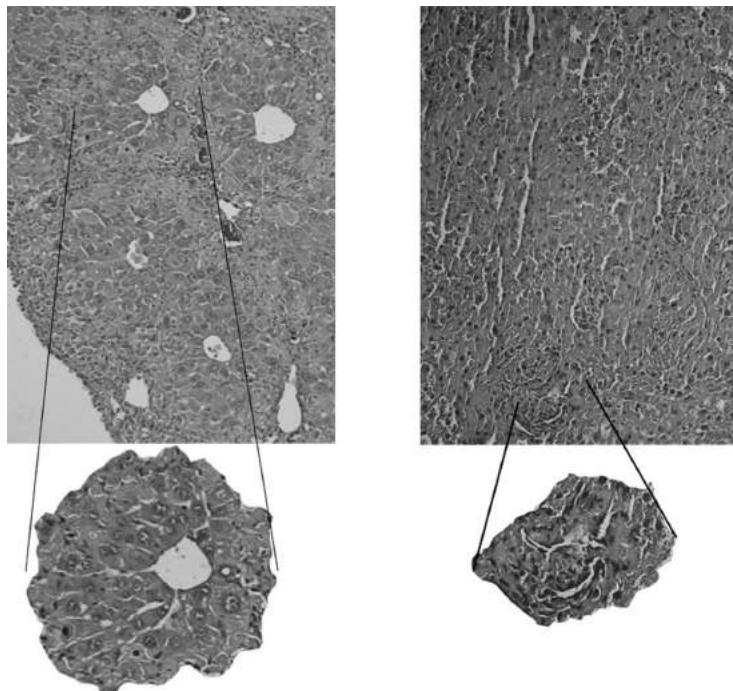


Рис. 5. Изменения структуры печени при поражениях CCl₄: а – радиально-балочная структура нормальной печени; б – исчезновение радиально-балочной структуры долек печени при поражениях, вызванных 12-недельной нагрузкой CCl₄

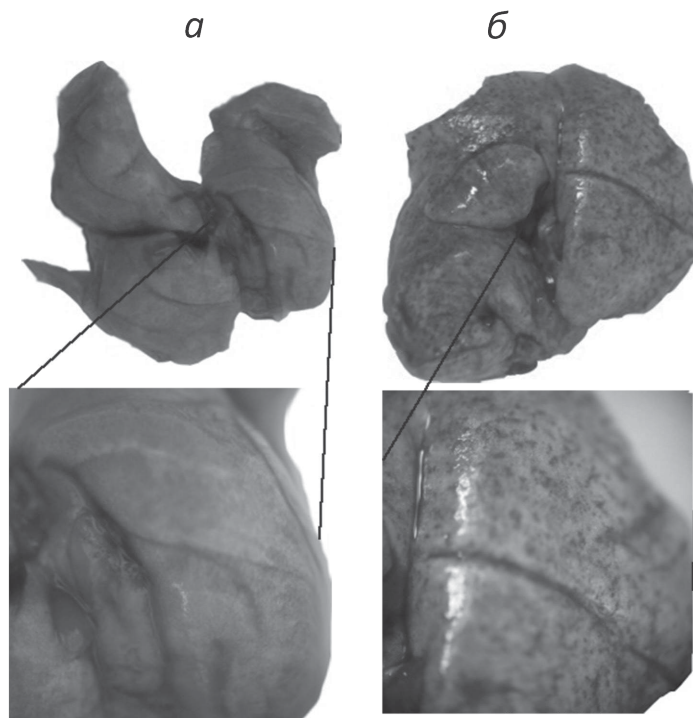


Рис. 6. Общий вид легочной ткани: *а* – Легкие здорового животного. Легкие розового цвета, средней консистенции; *б* – Поврежденные легкие мыши после 12-недельной нагрузки CCl_4 . Легкие вздутые, бугристые, сероватого или кирпичного цвета

При всей значимости обычных общепринятых методов оценки состояния опытных животных (АЛТ, АСТ, вес органов и их статистическая обработка для получения «надежных средних величин» и пр.) они не дают адекватной картины т. к. усреднение при индивидуальной восприимчивости не соответствует реальности.

Такая индивидуальность реакции у разных мышей одной линии, на первый взгляд, может быть крайне странной. Но анализ особенности линейности животных показывает, что иначе и не может быть. Линейность животных (и соответствующая селекция на линейность) проводится по ограниченному числу маркеров. Это генетические (и, соответственно, фенотипические) идентичности по тем свойствам, которые характеризуют линию, а также периодические контрольные тесты на идентичность животных линии по приживляемости пересаженной кожи от одной особи к другой. Кроме того, само размножение идет внутри линии, что предотвращает попадание чужого генетического материала и способствует усреднению всех остальных генов популяции. Но в отношении гене-

тически определяемых процессов, участвующих в каскадах развития системного поражения, такой отбор при селекции на линейность не только не производится, но и не детектируется. В тоже время в него вовлечено значительное количество индивидуальных молекулярных, биохимических и сложных комплексных системных процессов. Такие процессы обусловлены как индивидуальными, так и взаимосвязанными событиями, в которых участвуют продукты значительной части генов всего генома. Ещё более сложно и многогранно последующее системное поражение всего организма.

В разных линиях такой разброс индивидуальных различий может быть разным, но, как таковой, он неизбежен. В то же время в литературе он не обсуждается. Возможно, это объясняется тем, что, во-первых, основные работы по влиянию CCl_4 проводились на крысах и весьма ограниченные на мышах. И почти всегда предметом исследования была печень. Поскольку же цирроз у мышей четыреххлористым углеродом не вызывается, то кроме констатации этого факта и обычной оценки пора-

жений печени, заканчивающихся гибелью животных, исследования не проводились. Имеются работы и по механизму действия CCl_4 , но и они ограничивались ранними стадиями.

Отличаются между собой по абсолютным величинам и независимые постановки экспериментов. Можно предполагать, что это связано с тем, что в разные сезоны, при крутых погодных изменениях, животные по своим физиологическим, биохимическим и прочим свойствам будут отличаться. Поскольку же у мышей циклы репродукции относительно короткие, то молодняк разных (по времени) пометов будет по физиологическим количественным показателям не идентичен. Анализ органов здоровых животных (контролей к опытам) такое предположение подтверждают. Соответственно норме будут происходить изменения и при патологии. Не идентичность животных разных по времени пометов не может не влиять и на абсолютные величины показателей в опытных вариантах. Но при всех таких отличиях, общая направленность процессов поражения вызываемых CCl_4 , в опытных группах имеет одинаковый характер.

Если теперь кратко суммировать основные результаты экспериментов, то из проведенной работы и анализа полученных результатов можно сформулировать следующие положения.

Выводы

Разработанная схема получения системного поражения у мышей за счет длительного введения им четыреххлористого углерода дает хорошо воспроизводимые, по общей направленности процесса, состояния. Но их воспроизводимость требует точного соблюдения схемы эксперимента. При этом следует учитывать, что мыши разных линий могут отличаться по чувствительности к CCl_4 . Количественно единой схемы (доза, интервалы, циклы) для всех линий быть не может. Поэтому и абсолютизированные разработки протоколов не используют. Можно дать только некую базовую схему. Но предварительно целесообразно проверить восприимчивость выбранной линии. Для этого можно взять за основу предлагаемую схему с вариантом большей и вариантом меньшей дозы CCl_4 . А общее время введения CCl_4 выбирается уже под задачу.

Имеет место неоднородность даже линейных животных по их реакции на поражающие факто-

ры индуцируемые CCl_4 . Это приводит к тому, что в опытных группах абсолютные величины показателей поражений разных органов у разных индивидуальных животных могут значительно различаться. Это необходимо учитывать. Но, несмотря на такие индивидуальные различия статистическая направленность и характер системного поражения, вызываемые CCl_4 , сохраняется.

Не идентичность абсолютных величин показателей системного поражения в разных независимых экспериментах требует для сравнительного количественного анализа эффектов использования только данных каждого отдельного эксперимента. Сравнить результаты количественно можно только между группами внутри его постановки. Сравнение (но не качественное, а количественное) разных независимых экспериментов может привести к некорректным выводам.

При недалеко зашедшем поражении (малые дозы, недостаточная продолжительность, редкие введения), индивидуальные различия могут привести к такому разбросу данных, которое повлечет за собой искажение общей картины поражений и приведет к неадекватным выводам (что иногда имеет место в литературе)

У животных, с наследственной предрасположенностью к опухолям, под действием CCl_4 , на терминальной стадии процесса образуются опухоли. Но на промежуточных стадиях опухоли регистрируются редко. Поскольку в опыт брались молодые мыши, а детерминированность онкогенеза реализуется к годовалому возрасту, то это дает основание предполагать, что наличие генетической предрасположенности не влияет существенно на ее реализацию при системном поражении ксенобиотиками.

Список литературы

1. Recknagel R.O., Glende E.A., Dolak J.A., Waller L. Mechanisms of carbontetrachloridetoxicity // *Pharmacol. Ther.* – 1989. – Vol. 43, No. 1. – P. 39–54.
2. McGregor D., Lang M. Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action // *Mutat. Res.* – 1996. – Vol. 366, No. 3. – P. 81–95.
3. Manibusan M.K., Odin M., Eastmond D.A. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review // *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* – 2007. – Vol. 25, No. 3. – P. 185–209.
4. Kordium V. The concept of «origin» – problem definition and attempt of analysis // *Biopolym. Cell.* – 2013. – Vol. 29, No. 5. – P. 428–440.

5. Das M., Boerma M., Goree J.R., Lavoie E.G., Fausther M., Gubrij I.B., Pangle A.K., Johnson L.G., Dranoff J.A. Pathological changes in pulmonary circulation in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhotic mice // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, No. 4. – P. 39–43.
6. Constantinou C., Henderson N., Iredale J.P. Modeling liver fibrosis in rodents // Methods Mol. Med. – 2005. – Vol. 11. – P. 37–50.
7. Marques T.G., Chaib E., da Fonseca J.H., Lourenço A.C.R., Silva F.D., Ribeiro M.A.F., Galvão F.H.F., D'Albuquerque L.A.C. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection // Acta Cir. Bras. – 2012. – 27, No. 8. – P. 89–94.

Представлена В.А. Кунахом
Поступила 10.03.2016

СИСТЕМНЕ УРАЖЕННЯ ЯК МОДЕЛЬ ДЛЯ ВІДПРАЦЮВАННЯ ТЕХНОЛОГІЙ ГЕННОЇ І КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ

В.А. Кордюм, Д.М. Іродов, М.В. Драгулян, Т.П. Гулько,
П.В. Бучек

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: kordium@imbg.org.ua

Мета. Ураження за допомогою CCl₄ викликає каскад реакцій і станів, характерних для системних порушень, викликаних більшістю зовнішніх техногенних факторів навколишнього середовища. Для подальшого відпрацювання технологій відновлення, що використовують стовбурові клітини і цитокіни, були відпрацьовані умови отримання моделі системного ураження організму. **Методи.** В якості моделі були обрані миші високоракової лінії ICR. Системне ураження викликали багаторазовим внутрішньочеревним введенням чотирьоххлористого вуглецю. **Результати.** Були знайдені оптимальні дози і тривалість навантаження, перевищення яких призводить до незворотних змін в організмі, які вже не піддаються самовідновленню. **Висновки.** Отримана модель може бути використана для вивчення різних технологій відновлення системних поразок.

Ключові слова: системні ураження, модель, чотирьоххлористий вуглець.

SYSTEMIC DISEASE AS A MODEL FOR DEVELOPMENT OF THE GENETIC AND CELL THERAPY TECHNOLOGIES

V.A. Kordium, D.M. Irodov, M.V. Drahulian, T.P. Gulko,
P.V. Buchek

Institute of molecular biology and genetics of NAS of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 150
e-mail: kordium@imbg.org.ua

Aim. Injury using CCl₄ triggers a cascade of reactions and conditions specific for systemic lesions caused by most external anthropogenic environmental factors. Conditions for obtaining a model of systemic injury of an organism have been developed for further performing of restoration technologies with the use of stem cells and cytokines. **Methods.** Tumor predisposed ICR mice were chosen as the model. Systemic damage was caused with multiple intraperitoneal administration of carbon tetrachloride. **Results.** The optimal doses and load duration, excess above which leads to irreversible changes in the body that are not amenable to self-healing, were found. **Conclusions.** The model obtained can be used to study various recovery technologies of systemic damages.

Keywords: systemic disease, model, carbon tetrachloride.