ISSN 2072-2419

№ 3

Международный вестник ветеринарии

INTERNATIONAL BULLETIN OF VETERINARY MEDICINE

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ- 2014

www.gavm.spb.ru

Международный вестник ветеринарии 3.2014

Редакционный совет
А.А. Стекольников – гл. ред., член-корр. РАСХН, д.в.н., проф., СПб
В.Д. Соколов – зам. гл. ред. д.в.н. проф., СПб
А.И. Ятусевич – зам. гл. ред. д.в.н. проф., Витебск
Редакционная коллегия
А.А. Алиев, д.в.н., проф., СПб.
Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.
Л.М. Белова, д.б.н., проф., СПб.
М.И. Гулюкин, акад. РАСХН, д.в.н., проф. Москва.
Н.В. Зеленевский, д.в.н., проф., СПб.
Л.Ю.Карпенко, д.б.н., проф., СПб.
С.П. Ковалев, д.в.н., проф., СПб.
А.А. Кудряшов, д.в.н., проф., СПб.
В.А. Кузьмин, д.в.н., проф., СПб.
М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.
К.В. Племяшов, д.в.н., проф., СПб.
Б.С. Семенов, д.в.н., проф., СПб.
А.М. Смирнов, акад. РАСХН, д.в.н., проф., Москва.
А.А. Сухинин, д.б.н., проф., СПб.
А.Н. Шиков, д.ф.н., проф., СПб.
Редакционно-технический отдел
В.Д. Соколов, д.в.н. проф., СПб.
Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.
М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.
А.В. Рыбакова , к.в.н., СПб.
Сдано в набор 18.01.2016
Подписано к печати 18.01.2016
Формат 70×100 1/16.
Бумага глянцевая № 1. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 5,2+1,63 цв. вкл.
Усл. Кр.-отт. 18,2. Тираж 1001 экз.

Editor –in– chief
A.A. Stekolnikov professor, DVM, Corresponding Member of the Russian Academy of Agricultural Sciences
Managing Editor
V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg
A.I. Yatusevich - professor, DVM, Vitebsk
Editorial Board
A.A. Aliyev - professor, DVM, St. Petersburg
N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg
L.M. Belova - professor, DBS, St. Petersburg
M.I. Gulyukina - Academician of the Agricultural Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM, professor, Moscow
N.V. Zelenevski - professor, DVM, St. Petersburg
L.Y. Karpenko - professor, DBS, St. Petersburg
S.P. Kovalev - professor, DVM, St. Petersburg

A.A. Kudryashov - professor, DVM, St. Petersburg
V.A. Kuzmin - professor, DVM, St. Petersburg
M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg .
K.V. Plemyshov - professor, DVM, St. Petersburg
B.S. Semenov - professor, DVM, St. Petersburg
A.M. Smirnov - Academician of the Agricultural Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM, professor, Moscow
A.A. Sukhinin - professor, DVM, St. Petersburg
A.N. Shikov - professor, DFS, St. Petersburg
Technical Department
V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg
N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg
M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg
A.V. Rybakova - PhD, St. Petersburg
Sent to 03/14/2014
Signed for printing 14/03/2014
The format of 100 × 70 1/16 .
Glossy paper number 1. Offset printing.
Conv. Pec. liter. 5.2 1.63 fl. incl.
Conv. Cr. - ott . 18.2 . Circulation 1001 copies.

На 1 странице обложки расположено: **Атлантический ветеринарный колледж** (AVC), который является аккредитованным и всемирно признанным ветеринарным колледжем в университете о. Принц Эдуард, Канада. Атлантический ветеринарный колледж был построен в 1985 году. В колледже располагаются различные научно-исследовательские центры, такие как центр ветеринарной эпидемиологии, научный центр изучения водной среды и др.

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

Номер госрегистрации СМИ ПИ № ФС 77-28268 от 18 мая 2007 г. Подписной индекс в агентстве Роспечать 82393.

Учредитель — Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (ФГОУ ВПО «СПбГАВМ»)

Журнал основан в январе 2004 года в Санкт-Петербурге и входит в список ведущих лицензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Журнал распространяется по всем регионам России и Республике Беларусь (ВУЗЫ, НИИ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ ОТДЕЛЫ).

Журнал выходит не менее 4 раз в год. В нем публикуются работы по всем основным вопросам ветеринарии и смежным дисциплинам.

В этот журнал Вы можете поместить рекламу Вашей фирмы. Объявления и коммерческая реклама публикуются после оплаты. Срок исполнения – в течение 3 месяцев.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных объявлений.

При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Мнение авторов и редакции по отдельным вопросам может не совпадать.

Плата с аспирантов за публикацию рукописи не взимается.

Справки и технические возможности типографии, в которой печатается журнал, оговариваются по телефону (812) 387-11-58.

Адрес редакции: 196084, СПб, ул. Черниговская дом 5, СПбГАВМ, редакция журнала «Международный вестник ветеринарии» (МВВ).

RESEARCH AND PRODUCTION JOURNAL

State registration number media PI № FS 77-28268 on May 18, 2007. Subscription Index Rospechat 82393.

Founded in January 2004 by Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Saint - Petersburg State Academy of Veterinary Medicine " (FSEI-HPE " SPbGAVM")

International Bulletin of Veterinary an academic international peer-reviewed journal that publishes original research articles as well as review articles in veterinary sciences and related academic disciplines. It covers all the scientific and technological aspects of veterinary sciences in general, anatomy, physiology, biochemistry, pharmacology, microbiology, pathology, public health, parasitology, infectious diseases, clinical sciences, alternative veterinary medicine and other biomedical fields.

The manuscripts submitted to this journal must be previously unpublished and not be under consideration for publication elsewhere. Manuscripts that are found to have been plagiarized from a manuscript by other authors, whether published or unpublished, will incur plagiarism sanctions.

This journal, including all individual contributions and illustrations published therein, is legally protected by copyright. Any use, exploitation or commercialisation is illegal and liable to criminal prosecution.

Requests about legal photocopy reproduction, copyright or duplication processing should be addressed to the editorial office:

196084, St. Petersburg, ul . Chernihiv house 5 SPbGAVM, Editorial Board of "International Bulletin of Veterinary Medicine" (IBVM), phone +7-812- 3871158 .

СОДЕРЖАНИЕ

Инфекционные болезни

- Экспертная оценка формирования заразной патологии в популяции домашних плотоядных и других видов животных. ***Пашкин А.В., Пашкина Ю.В., Горин М.А., Фадеева А. Н., Атрохова С.В., Картушина Л.Н., Карелкин Д.В.*** 7
- Электронная микроскопия в комплексной диагностики микоплазмозов у коз Зааненской породы. ***Данко Ю.Ю., Рублёв А.Л.*** 12

Хирургия

- Лечение кожных экспериментальных ран у лошадей с применением тромбоцитарной аутоплазмы. ***Семёнов Б.С., Кузнецова Т.Ш., Гусева В.А.*** 19
- Структурные изменения тканей копытец при глубоких некрозах. *Симонов Ю.И.* 24
- Обоснование применения биодеградируемого покрытия титановых имплантов, предназначенных для протезирования зубов у собак. ***Красников А.В., Анников В.В., Морозова Д.Д., Фомин А.А., Заярский Д.А., Петрова Н.В.*** 28

Фармакология, токсикология, фармация

- Влияние стресс-факторов на заболеваемость телят диспепсией. ***Винникова С.В., Донская Т.К., Батраков А.Я., Кириллов А.А.*** 32
- Определение антимикробной активности Фураргента при длительном хранении. ***Лунегов А.М.*** 36
- Эффективные лекарственные средства при лечении повреждений тканей. ***Фисенков Н.Н.*** 40
- Адаптогенные и ростостимулирующие свойства некоторых иммуностимуляторов. ***Войтенко В.Д., Андреева Н.Л.*** 44

Зоогигиена, Санитария, Кормление

- Применение естественных метаболитов в рационах свиноматок. ***Лунегова И.В.*** 49
- Изменение показателей живой массы и сохранности кур при добавлении в корм кремнеземистого мергеля. ***Жилочкина Т.И.*** 53

Биохимия, анатомия, физиология

- . Коррекция иммунной недостаточности у собак. ***Бобрицкая О.Н.*** 58
- Ультраморфология гемомикроциркуляторного русла молочной железы коз Зааненской породы. ***Щипакин М.В.*** 63
- Возрастная морфология артерий области бедра рыси Евразийской (LYNX EUROASIAN). ***Былинская Д.С.*** 68

Экспериментальная фармакология

- Принципы работы службы контроля качества биомедицинских исследований с участием животных. ***Селезнева А.И, Макарова М.Н, Ходько С.В, Шиков А.Н.*** 73
- Половые различия при моделировании алкогольной нейропатии у крыс. ***Шекунова Е.В., Кашкин В.А.*** 82
- Влияние фиксирующих жидкостей на микроскопическую структуру органов мелких лабораторных животных. ***Гущин Я.А., Мужикян А.А.*** 88
- Анализ мутагенной активности. Тест по учету доминантных летальных мутаций у млекопитающих. ***Бекетова Д.Д., Крышень К.Л., Касторнова А.Е., Ацапкина А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г.*** 95

Информация

- Решение Третьего Международного конгресса 105

CONTENTS

Infectious diseases

- *The expert estimation formation of infectious pathology in the population domestic carnivores and other kinds of animals. A. Pashkin, Ju. Pashkina, M. Gorin, A. Fadeeva, S. Atrochova, L. Kartushina, D. Karelkin.* 7
- *Electron microscopy in the diagnosis of complex mycoplasmoses zaanenskoj breed goats. A. Rublev, Yu. Danko.* 12

Surgery

- *Treatment of skin experimental wounds in horses using Thrombocytic autoplasma. B. Semenov, T. Kuznetzova, V. Guseva.* 19
- *Struktural changes in the tissues of the hoofs with deep necrosis.U. Simonov.* 24
- *Justification of use of biodegradable coatings on titanium implants, used for dental prosthetics for dogs. A.V. Krasnikov, V. Annikov, D. Morozova, A. Fomin, D. Zayarsky, N. Petrova.* 28

Pharmacology, toxicology, pharmacy

- *Influence a stress factors on incidence of calves of a dispepsiya. S. Vinnikova, T. Donskaya, A. Batrakov, A. Kirillov.* 32
- *Determination of antimicrobial activity furargent during prolonged storage. A. Lunegov.* 36
- *Effective medicines at treatment of damages of fabrics. N. Fisenkov.* 40
- *Adaptogenic and growth-promoting properties of some immunostimulators. V. Voytenko, N. Andreeva.* 44

Zoohygiene, Sanitation, Feeding

- *The use of natural metabolites in the diets of sows. I. Lunegova.* 49
- *Change indicators of live weight and safety when added to chicken feed siliceous marl. T. Zhilochkina.* 53

Biochemistry, anatomy, physiology

- *Correction of immune deficiency in dogs. O. Bobritskaya.* 58
- *Ultramorphology og the haemo-microcirculatory course of the mammary gland of goats of Zaanenskaya breed. M. Shchipakin.* 63
- *Age-river rift morph dynamics arteries hip area of the Eurasian lynx (LYNX EUROASIAN). D. Bylinskaya.* 68

Experimental pharmacology

- *Principles of the quality management system in biomedical experiments on animals. A. Selezneva, M. Makarova, S. Khodko, A. Shikov.* 73
- *Sex different of experimental alcohol neuropathy in rats. E. Shekunova, V. Kashkin.* 82
- *Effect of fixing liquids on microscopic structure of small laboratory animals. Ya. Gushchin, A. Muzhikyan.* 88
- *Mutagenic activity analysis. Dominant lethal assay in mammals. D. Beketova, K. Kryshen, A. Kastornova, A. Atsapkina, M. Makarova, V. Makarov.* 95

Information

- *Solution: Third International Congress* 105

selected fixatives to obtain full and accurate histological findings in experiments on small laboratory animals.

ЛИТЕРАТУРА

1.Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника М.: Советская наука, 1957. – 476 с.

2.Микроскопическая техника. Под редакцией Саркисов Д.С. Перов Ю.Л. /М.: Медицина, 1996. 544 с.

3.Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гущин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных. Международный вестник ветеринарии, №2, 2014 г., С.103-109

4. Войно-Ясенский М.В., Жабонский К.М. Источники ошибок при морфологических исследованиях. /Л.: Медицина, 1970. 319 с.

УДК: 614

АНАЛИЗ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ. ТЕСТ ПО УЧЕТУ ДОМИНАНТНЫХ ЛЕТАЛЬНЫХ МУТАЦИЙ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Бекетова Д.Д. - м.н.с., Крышень К.Л.– с.н.с, Касторнова А.Е.- м.н.с,
Ацапкина А.А.- м.н.с, Макарова М.Н.– д.м.н., профессор, Макаров В.Г. - д.м.н., профессор, Санкт-Петербургский институт фармации

РЕФЕРАТ

Доминантные летальные мутации – это генетические изменения, индуцированные в родительских зародышевых клетках и приводящие к гибели первое поколение потомков на эмбриональных стадиях развития. Тест по учету доминантных летальных мутаций у млекопитающих широко используется более 50 лет для оценки мутагенных эффектов химических веществ и включен во многие руководства и рекомендации. Однако методические подходы по выполнению теста варьируют. В обзоре рассматриваются ключевые требования и варьируемые параметры методологии при проведении теста, представлены обобщенные экспериментальные данные по воздействию стандартных мутагенов на отдельные стадии сперматогенеза при разных режимах введения и схемах эксперимента.

Общая схема эксперимента включает в себя обработку самцов грызунов исследуемым веществом и последующим спариванием их с интактными виргинными самками. Самцов спаривают определенное число раз с разными самками для того, чтобы оценить воздействие исследуемого вещества на половые клетки в разных стадиях зрелости. В середине беременности самок эвтаназируют, вскрывают матку и определяют количество живых и мертвых эмбрионов, производят сравнение с контрольной группой. Увеличение количества мертвых эмбрионов на самку в группе, получавшей тестируемый препарат, по сравнению с количеством мертвых эмбрионов в контрольной группе отражает вызванную тестируемым веществом постимплантационную смертность, которая является основным показателем уровня доминантных летальных мутаций. Варьируемыми параметрами доминантного летального теста являются: вид животных, количество животных, режим введения исследуемого препарата, режим спаривания, а также оцениваемые в итоге исследования биометрические параметры.

По итогам проведенного обзора оптимальным сроком ссадки животных для тестирования потенциальных мутагенов можно считать 3 недели. Самцов рекомендуется подсаживать к самкам на период эстрального цикла (4 дня). Наиболее распространенным ана-

лизируемым параметром является постимплантационная смертность.

Ключевые слова: мутагенность, доминантные летальные мутации, доминантный летальный тест у млекопитающих.

ВВЕДЕНИЕ

Возникновение изменений в структуре ДНК называется мутагенезом. Образующиеся в результате этого мутации могут охватывать единичный ген, хромосомы или геном. Тестирование лекарственных средств на мутагенность является одним из основных этапов при оценке безопасности химических веществ и лекарственных субстанций. Тестированию на мутагенную активность подвергаются новые оригинальные фармакологические средства, а также новые фиксированные комбинации фармакологических средств, имеющие в своем составе компоненты, структурно сходные с уже известными мутагенами [1].

Проблемой изучения химического мутагенеза является отсутствие единого универсального метода для тестирования веществ на мутагенность, поэтому для этой цели используют набор методов - метод учета микроядер в соматических клетках млекопитающих, учет генных мутаций с использованием в качестве тест-объекта микроорганизмов и дрозофилы и др. Одним из основных методических подходов является тест по определению доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках грызунов (доминантный летальный тест, ДЛТ).

Несмотря на наличие различных регулирующих стандартов по проведению ДЛТ, условия проведения теста могут существенно отличаться. В обзоре рассматриваются ключевые требования и варьируемые параметры методологии при проведении ДЛТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Доминантные летальные мутации. Регулирующие стандарты

Доминантные летальные мутации – это генетические изменения, индуцированные в родительских зародышевых клетках и приводящие к гибели первое поколение потомков на эмбриональных стадиях развития. Большая часть доминантных леталей представляет собой численные и структурные аберрации хромосом, частично они могут быть представлены генными мутациями [1].

Долгое время существовало ложное предубеждение, что половые клетки человека надежно защищены [2,3]. Это же предубеждение стало причиной того, что между открытием мутагенного эффекта химических веществ и развитием исследовательских программ по тестированию на мутагенность прошло 20 лет.

Эффективность гемато-тестикулярного барьера [2,4] часто является ложным доводом в пользу того, что метод исследования доминантных летальных мутаций является нечувствительным. По сути же, ДЛТ является одной из немногих тест -систем, которая способна предоставить информацию о веществах, которые проникают через гемато-тестикулярный барьер, и эта информация представляет особую значимость для оценки потенциальной мутагенной угрозы химического вещества.

Впервые ДЛТ был применен для оценки мутаций, вызванных радиацией, в 1953 -1954 годах [5,6], а в 1966 году был рекомендован для исследований на мутагенность [7]. Далее последовал ряд сообщений о наличии доминантных летальных эффектов и, возможно, мутагенных эффектов в семьях анастезиологов и работников, контактирующих с винилхлоридом [8,9,10], что возобновляло вопрос о включении ДЛТ в ряд рутинных исследований на мутагенность. В наши дни наиболее вероятными причинами мутагенеза может стать загрязнение окружающей

среды и сточных вод [11,12], что может влиять на фертильность мужчин [13], а также применение фармакологических агентов [12]. Поэтому по сей день ДЛТ остается одним из важнейших методов, применяемых для тестирования мутагенных веществ [14].

Неоднократно принимались меры по стандартизации методов исследования на мутагенность. Значительным итогом многолетнего обобщения результатов разработки и стандартизации испытаний на мутагенность явилось выпущенное в 1989 г. ВОЗ «Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ», а также материалы 2-го Международного рабочего совещания в Мельбурне 1994 года. Фармакологический комитет МЗ и МП Российской федерации в 1994 г. опубликовал нормативный документ — методические рекомендации «Оценка мутагенности новых лекарственных средств». В рамках курируемой ВОЗ Международной программы по химической безопасности (International Programme on Chemical Safety, IPCS) были разработаны методические рекомендации для мониторинга генотоксических влияний на организм человека мутагенов и канцерогенов.

Рекомендации по проведению доминантного летального теста можно найти в таких регулирующих документах как OECD (Draft Rodent Dominant Lethal Test 478) [15], методические рекомендации по исследованию мутагенов и канцерогенов Международной программы по химической безопасности [2]. Отечественным регулирующим документом по тестированию на мутагенность является Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова [1].

Тестирование. Схема эксперимента. Варьируемые параметры

Общая схема эксперимента включает в себя обработку самцов грызунов исследуемым веществом и последующим спариванием их с интактными виргинными самками. Самцов спаривают определенное число раз с разными самками для того, чтобы оценить воздействие исследуемого вещества на половые клетки в разных стадиях зрелости. Спустя определенное время (как правило, в середине беременности, то есть на 12-й день) после спаривания самок эвтаназируют, вскрывают матку и определяют количество живых и мертвых эмбрионов, производят сравнение с контрольной группой. Увеличение количества мертвых эмбрионов на самку в группе, получавшей тестируемый препарат, по сравнению с количеством мертвых эмбрионов в контрольной группе отражает вызванную тестируемым веществом постимплантационную смертность, которая является основным показателем уровня доминантных летальных мутаций [15]. Варьируемыми параметрами являются: выбор вида животных, количество животных, режим введения исследуемого препарата, режим спаривания, а также оцениваемые в итоге исследования биометрические параметры.

Режим введения исследуемого препарата

Для проведения ДЛТ могут быть использованы различные режимы введения тестируемого объекта, но наиболее распространенным является однократное введение [15]. Можно использовать и другие режимы введения, например пятикратное ежедневное введение, но в любом случае выбор режима введения должен быть научно обоснован. Все исследователи сходятся во мнении, что необходима индивидуальная дозировка исследуемого препарата (индивидуальный объем введения с учетом массы каждого отдельно взятого животного) [2, 8, 15].

Животные

Исследование проводят на мелких лабораторных грызунах (мыши, крысы). Выбор животных должен быть научно

обоснован (например, необходимостью корреляции или необходимостью объединения с другими токсикологическими исследованиями) [15]. Предпочтительно использование генетически однородных животных. Чаще всего, однако, для проведения ДЛТ используют мышей, так как это менее затратно в плане расхода препаратов и с ними легче осуществлять манипуляции в силу их размера.

Оптимальный возраст животных – 8-12 недель. Более взрослых животных для проведения ДЛТ использовать не рекомендуется, так как количество спонтанных доминантных летальных мутаций у таких животных может быть повышенным [16].

Погибшие в ходе эксперимента животные не должны заменяться резервными, так как данные, полученные от вновь включенных животных, не будут соответствовать биометрическим требованиям [8].

Количество животных, используемых в эксперименте, может зависеть от множества биологических и статистических факторов [8]. Количество животных должно обеспечивать необходимую статистическую мощность [15]. В публикации Ehling et al. [8] рекомендуется использовать соотношение самцов к подсаживаемым самкам 1:1, брать 50 самок на группу на каждый период ссадки и, учитывая соотношение, 50 самцов. В Руководстве по проведению доклинических исследований [1] рекомендуется использовать соотношение самцов к самкам 1:3, брать не менее 15 самцов в каждую группу и, следовательно, по 45 самок на каждый период ссадки.

Режим спариваний

Поскольку тест определяет влияние мутагена на фертильность мужских особей, необходимо представлять временные рамки, в которых половые клетки определенной стадии зрелости находятся в эякуляте (таблица 1 [17]). Варьируемыми параметрами в литературных данных являются число ссадок, временной интервал между ними и количество подсаживаемых к самцам самок.

Таблица 1

Периоды стадий сперматогенеза

Дни	Стадия половых клеток
1-7	сперматозоиды
8-21	сперматиды
22-35	сперматоциты
36-41	дифференцированные сперматогонии
более 42 дней	A_s сперматогонии (стволовые клетки)

1. Число ссадок зависит от режима введения тестируемого средства и утверждается исследователем при подготовке к эксперименту [15]. В соответсвии с протоколом OECD длительность эксперимента обязательно должна охватывать весь период сперматогенеза [2,8,15], поэтому рекомендуемым режимом спаривания после однократного введения тестируемого вещества является 8 ссадок с недельным интервалом для мышей и 10 ссадок с недельным интервалом для крыс. В случае многократного введения исследуемого вещества количество ссадок можно сократить пропорционально увеличению периода введения. Например, при хроническом исследовании препарата (восьминедельное введение) достаточно провести лишь одну садку после курса введения [15]. Однако накопленный опыт тестирования широкого спектра мутагенов показывает, что доминантные летальные мутации индуцируются в основном на постмейотических стадиях сперматогенеза, то есть в первые три недели после введения мутагена [18,19]. Поэтому с целью оптимизации эффекта и экономии животных, период спаривания можно сократить до 2-3 недель.

2. В публикации Ehling et al. [8] указывается, что оптимальным интервалом между садками являются четверо суток, так

как большинство актов спаривания происходят именно в эти дни (этот интервал также соответствует длительности эстрального цикла у мышей). В последующие три дня (к концу недели) оплодотворение самок практически не происходит. Это приводит к отсутствию полноты информации о возможных мутагенных эффектах. Для того, чтобы исследовать все потенциальные мутагенные эффекты, необходимо добиться равномерного темпа оплодотворения в течение всего периода спаривания. Опыт показывает, что этого можно добиться при четырехдневном периоде спаривания. Более того, для исследования прямого воздействия потенциального мутагена на определенные стадии сперматогенеза можно сократить период ссадки до одного дня [8]. В связи с уменьшением интервала между ссадками (4 дня) количество ссадок увеличивается до двенадцати для учёта мутагенных эффектов в течение всего цикла сперматогенеза.

В соответствии с Руководством [1] исследование доминантных летальных мутаций проводят в течение трех недель на постмейотических стадиях сперматогенеза, подсадки самок проводятся еженедельно.

3. Рекомендуемым соотношением числа самцов к числу подсаживаемых самок является 1:1, то есть одна самка подсаживается к одному самцу в течение каждого периода ссадки. Такой режим ссадки имеет преимущество, поскольку достигается максимальный уровень оплодотворения и, кроме того, при подсадке нескольких самок к одному самцу число оплодотворенных самок каждым самцом из группы может варьировать, что негативно скажется на релевантности результатов по группам и затруднит статистическую обработку данных. Тем не менее, соотношение самцов к самкам 1:2 и 1:3 допустимо, и, более того, широко применяется в исследовании доминантных летальных мутаций [8]. Соотношение 1:3 также рекомендуется использовать в соответствии с руководством [1].

2.4 Измеряемые показатели

Как уже упоминалось, одним из важнейших показателей доминантных летальных мутаций является постимплантационная смертность (или уровень постимплантационных потерь), которая служит индикатором геномных повреждений, приводящих к смерти эмбриона или плода [20]. Уровень постимплантационных потерь вычисляют как отношение числа мертвых эмбрионов к сумме живых и мертвых эмбрионов (рисунок 1,2).

Недостатком этого показателя является то, что при этом не учитываются преимплантационные потери. Поэтому достаточно часто при оценке доминантных летальных мутаций используют показатель частоты доминантных леталей, который можно определить формуле [8]. Этот

Рис. 1. Живой эмбрион (слева) и мертвый эмбрион (справа)

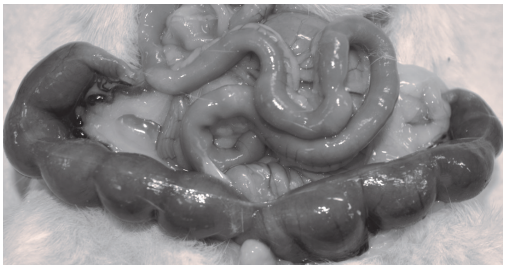

Рис. 2. Наличие 9 живых эмбрионов

фактор отражает как преимплантационную, так и постимплантационную смертность [19]. Преимуществом использования этого показателя является также то, что спонтанный летальный эффект, индивидуальный для каждой линии животных, в данном случае не учитывается, то есть фактор доминантных леталей отражает летальные эффекты, спровоцированные только введением тестируемого препарата. Недостатком определения частоты доминантных леталей является отсутствие данных о состоянии матки каждого животного, что необходимо для статистического анализа.

Кроме того, измеряемыми параметрами помимо мертвых и живых эмбрионов могут быть число желтых тел или число имплантаций в каждой матке животных (для расчета преимплантационных потерь).

Статистический анализ

В случае оценки доминантных летальных мутаций по уровню постимплантационной смертности, для оценки значимости увеличения этого показателя по сравнению с контрольными животными используют критерий χ^2 для соотношения сумм живых и мертвых эмбрионов. В связи с тем, что при таком подходе будет игнорироваться индивидуальная чувствительность мышей, для снижения доли ложнопозитивных результатов, решение о наличии мутагенного эффекта стоит принимать при 1% уровне значимости [1].

В целом выбор статистического метода обусловлен основным определяемым параметром в ДЛТ. Например, Salsburg [21], основываясь на преположении, что число мертвых и живых эмбрионов подчиняются биномиальному распределению, применил регрессионную модель с пределами толерантности, полученными на основе измерений в контрольной группе. Среди других методов – дисперсионно -аналитический подход, MANOVA, пробит-анализ, тест Армитажа и другие [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Положительные контроли

В качестве положительного контроля при проведении ДЛТ используют вещества, заведомо обладающие мутагенной активностью, как правило, алкилирующие агенты: циклофосфамид [22,23], триэтиленмеламин [16], этилметансульфонат [24], блеомицин [15], фотрин [25].

Циклофосфамид – цитостатический химиотерапевтический лекарственный препарат алкилирующего типа действия, иммуносупрессант, широко применяющийся в клинической практике. Известно, что он обладает канцерогенными и тератогенными свойствами и способностью индуцировать хромосомные абберации [26].

Этилметансульфонат (ЭМС) также является известным мутагеном и используется в качестве положительного контроля в исследованиях канцерогенности для оценки повреждающего потенциала химических веществ отношении ДНК, хромосом и в исследованиях мутагенности [27].

Триэтиленмеламин (ТЭМ) обладает способностью индуцировать доминантные летальные мутации и транслокации. Этот мутаген интересен тем, что является радиомиметиком, то есть его мутагенный эффект сходен с эффектом радиационного воздействия [16].

В таблице 2 представлены обобщенные данные доминантных летальных эффектов. Можно видеть, что дизайны исследований сильно отличаются друг от друга режимом и путем введения мутагена, режимом ссадки. При этом, все описанные мутагены оказывают эффект на половые клетки (в большей степени на сперматозоиды и сперматиды) самцов в течение первых трех недель после введения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, необходимо подчеркнуть, что наиболее часто для ДЛТ исполь-

Таблица 2

Результаты ДЛТ после введения различных мутагенов

Мутаген, путь введения	Доза, мг/кг	Дни ссадки (спустя последнего введения)	Фертильность, %	Постимпланта-ционные поте-ри, %	Источник
Циклофос-фмид, интраперито-неально	0	1-5 (сперматозоиды)	90,0	5,7±1,4	Krishna et al., 1995 [22]
	5x40		90,0	55,5±3,4	
	0	8-12 (поздние сперматиды)	94,0	7,2±1,3	
	5x 40		95,8	71,1±2,9	
	0	15-19[1] (ранние сперматиды)	98,0	6,0±1,2	
	5x 40		100,0	33,9±3,4	
Циклофосфа-мид, интраперитоне ально[2]	0	1-5 (сперматозоид)	83,3	11,97±6,15	Oliveira et al., 2014 [20]
	50		83,3	41,20±21,05	
Циклофосфа-мид, интрапе-ритонеально	0	1-7 (сперматозоиды)	92,5	4,91	Sram, 1976 [23]
	5x10		87,5	20,43	
	5x20		70,0	40,80	
	5x30		47,5	49,07	
	100		85,0	16,34	
	0	8-14 (поздние и средние сперматиды)	92,5	3,89	
	5x10		97,5	10,97	
	5x20		72,5	27,95	
	5x30		27,5	34,14	
	100		87,5	29,87	
	0	15-21 (ранние сперматиды)	85,0	3,24	
	5x10		85,0	4,31	
	5x20		85,0	9,85	
	5x30		67,5	20,18	
	100		87,5	18,01	

Мутаген, путь введения	Доза, мг/кг	Дни ссадки (спустя последнего введения)	Фертильность, %	Постимплантационные потери, %	Источник
Этилметансульфонат, интраперитонеально	0	6,5-7,5 (ранние сперматозоиды)	100,0	7,1	Generoso et al., 1974 [24]
	100		88,0	7,3	
	150		100,0	18,5	
	200		92,6	45,3	
	250		51,7	71,2	
	300		4,8	100,0	
	0	8,5-9,5 (поздние сперматиды)	100,0	8,5	
	100		94,1	11,6	
	150		94,4	25,0	
	200		81,8	54,4	
	250		40,0	60,7	
	300		7,1	40,0	
Этилметансульфонат, перорально	0	3-10 (сперматозоиды и поздние сперматиды)	60,9	21,07	Favor, Krenshaw, 1978 [27]
	150		77,3	41,05	
	225		45,8	62,36	
	300		11,1	100,0	
Триэтиленмеламин, интраперитонеально	0	4,5-7,5 (ранние сперматозоиды)	95,5	4,9	Matter, Generoso, 1974 [16]
	0,035		100,0	9,4	
	0,05		91,3	13,5	
	0,1		97,7	25,7	
	0,2		98,0	51,1	
	0,3		81,8	71,5	
	0,4		56,4	79,2	
	0,8		10,0	66,7	
	0	11,5-15,5 (средние сперматиды)	96,7	5,5	
	0,035		100,0	11,1	
	0,05		98,2	17,6	
	0,1		94,5	36,9	
	0,2		94,4	64,2	
	0,3		46,3	75,9	
	0,4		26,8	74,6	
	0,8		4,0	- [3]	

Примечание: [1] – всего в исследовании осуществляли восемь ссадок с недельным интервалом, но в таблице представлены данные по первым трем неделям, поскольку эти результаты наиболее показательны); [2] – введение мутагена осуществляли в течение 5 недель; [3] – расчет постимплантационных потерь не производился, так как в эксперименте была только одна беременная самка

зуют мышей в силу удобства проведения манипуляций и экономии препарата (химического вещества, потенциального мутагена). Поскольку большинство мутагенов оказывают действие на постмейотических стадиях сперматогенеза оптимальным сроком ссадки животных для тестирования потенциальных мутагенов можно

считать 3 недели (период развития сперматид и сперматозоидов). Самцов рекомендуется подсаживать к самкам на период эстрального цикла (4 дня). Наиболее распространенным анализируемым параметром является постимплантационная смертность. Для снижения доли ложнопозитивных результатов, решение о наличии мутагенного эффекта стоит принимать при 1% уровне значимости.

Mutagenic activity analysis. Dominant lethal assay in mammals

D. Beketova, K. Kryshen, A. Kastornova, A. Atsapkina, M. Makarova, V. Makarov.

ABSTRACT

Dominant lethal mutations are genetic changes induced in parental germ cells which lead to death of the first generation of offsprings on embryonic stage of development. Dominant lethal assay in mammals is widely used for more than 50 years for chemicals mutagenic effects assessment and is included in many guidelines and methodic recommendations. Test fulfillment approaches can vary. In this review main requirements and variable parameters of test execution are considered and experimental data summary on how separate stages of spermatogenesis may be affected by standard mutagens at different mutagen administration modes and experimental schemes is presented.

The general experimental scheme includes administration of test substance to rodents males and their subsequent mating to virgin intact females. Rodent males are mated several times to explore test substance action on various spermatogenesis stages. In mid-pregnancy realize females euthanasia, dams autopsy and determine the number of live and dead embryos comparing to control group. Increased number of dead embryos per each female in experimental group compared to such in control group characterizes post-implantation loss which is the main index of dominant lethal mutations. Variable parameters in dominant lethal test fulfillment are: animal species, animal number, test substance administration mode, mating regimen and analyzed biometrical parameters.

As a result may conclude that optimal total mating duration is three-week period. Males and females should stay together for 4 days (length of oestrus cycle). Post-implantation loss is prevalent analyzed parameter.

Key words: mutagenicity, dominant lethal mutations, dominant lethal assay in mammals**.**

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств // ФГБУ “НЦЭМСП” Под редакцией Миронова А.Н. том.1. 2012. 942 с.
2. Int. Comission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Int. Programme on Chemical Safety, UN Environment Programme, In. Labour Org., WHO. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals / prepared for the IPCS by the International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Environmental health criteria 51. Geneva : World Health Organization. 1985.
3. Neel J.V. & Schull W.J. Human heredity, Chicago, The University of Chicago Press. 1958.
4. Setchell B.P. Testicular blood supply, lymphatic drainage, and secretion of fluid. In: Johnson, A.D. The testis, New York, London, Academic Press, 1970. Vol. 1, pp. 101-239.
5. Kaplan W.D., Lyon M.F. Failure of mercaptoethylamine to protect against the mutagenic effects of radiation. II. Experiments with mice. Science, Vol. 118. 1953. P. 777-778.
6. Russell W.L., Russell L.B., Kimball A.W. The relative effectiveness of neutrons from a nuclear detonation and from a cyclotron in inducing dominant lethals in the mouse. Am. Nat. Vol. 88. 1954. P. 269-286.

7. Bateman A.J. Testing chemicals for mutagenicity in a mammal. Nature (Lond.). Vol. 210. 1966. P. 205-206.
8. Ehling U.H., Machemer L. and all. Standard protocol for the dominant lethal test on male mice. Set up by the Work Group "Dominant lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. Toxicol. 39, 173-185 (1978).
9. American Society of Anesthesiologists: Occupational disease among operating room personnel: A national study. Anesthesiology. Vol. 41. 1974. P. 321-340.
10. Infante P. F., Wagoner, J. K., Waxweiler, R. J.: Carcinogenic, mutagenic and teratogenic risks associated with vinyl chloride. Mutation Res. 41, 131-142 (1976)
11. Методические указания по изучению мутагенной активности химических веществ при обосновании их ПДК в воде. № 41110-86, утв. Минздравом СССР 12.26.86.
12. Oliveira R.J., Pesarini J.R., and all. Effects of glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to ceclophosphamide. Genet Mol Biol. 2014 Mar;37(1):111-9.
13. Lipshultz L.I. and Fisch H. Diagnosing male factors of infertity. Arch Pathol Lab Med 1992. Vol.116. P. 398-405.
14. Shively C.A., White D.M. Dominant lethal testing of theobromine in rats. Toxicol Lett 20:325-329.
15. OECD guideline for the testing of chemicals № 478. Genetic toxicology: Rodent Dominant Lethal Test // 1984;
16. Matter B. E., Generoso W. M. Effects of Dose on the Induction of dominant-lethal mutations with triethylenemelamine in male mice. Genetics. 1974 August; 77(4): 753–763.
17. Oakberg E.F. Irradiation damage to animals and its effect on their reproductive capacity. J. dairy Sci. 1960. Vol. 43(Suppl.). P. 54-67.
18. Bateman A.J. Testing chemicals for mutagenicity in a mammal. Nature. 1966 Apr 9. Vol. 210(5032). P. 205-206.
19. Adler I.D. Dominant lethal effects after inhalation exposure to 1,3-butadiene. 1994 Sep 1;309(2):295-7.
20.Krishna G., Petrere J. Use of ceclophosphamide as a positive control in dominant lethal and micronucleus assays. Mutat Res. 1995. Vol. 335(3). P. 331-337.
21. Srám R. J. Relationship between acute and chronic exposures in mutagenicity studies in mice. Mutat Res. 1976. Vol. 1(41). P. 25-42.
22.Generoso W.M., Russell W.L., Sandra W. Huff, Sandra K. Stout, D. G. Gosslee. Genetics. Effects of Dose on the Induction of dominant-lethal mutations with triethylenemelamine in male mice. 1974. Vol. 77(4). P.741–752.
23.Revazova Iu.A., Radchenko L.U. Induction of dominant lethals in mice by fotrin. Genetika. 1976 Vol.12(2):165-7.
24. Doherty A.T. Chromosome aberration frequency in rat peripheral lymphocytes increases with repeated dosing with hexamethylphosphoramider cyclophosphamide. Mutagenesis. 2012. Vol. 27(5). P. 533-539.
25.Favor J, Crenshaw J.W. EMS-induced dominant lethal dose response curve in DBA/1J male mice. Mutat Res. 1978. Vol. 53(1). P. 21-27.