**Термометрия интактных самцов
мышей и опухоленосителей:
зависимость от генотипа и
социального статуса**
**Thermometry of intact and tumor-
bearing male mice: dependence on
genotype and social status**

Аронов Д.А.
г.Москва

DOI CrossRef: 10.30917/ATT-VK-1814-9588-2018-6-11

УДК 57.084.1:616-006.66

Ключевые слова: гипертермия, пирогенал, гипотермия, рак, модель

Key words: hyperthermia, pyrogenal, hypothermia, cancer, model

Резюме. Целью исследования было выявить ключевые факторы, влияющие на создание мышинной модели гипертермии с помощью пирогенала. Терморегуляторная реакция организма на введение пирогенала зависела от дозы, способа введения, генотипа и социального статуса самцов. У опухоленосителей, в противоположность клиническим данным, постепенно проявлялась гипотермия, наиболее выраженная на конечных стадиях опухолевого роста. Поэтому, результаты, полученные на моделях гипертермии, следует с осторожностью экстраполировать в клинику.

Summary. Thermometry is an obligatory procedure for monitoring the health condition of veterinary patients. Several factors that influence thermometry are described and should be taken into account when developing models of hyperthermia. The aim of this study was to reveal the significance of the genotype and social status of intact mice in a model of pyrogenal-induced hyperthermia and tumor-bearing mice. Male mice of four

Аронов Д.А., асп., ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова" Министерства Здравоохранения РФ, aronov.mml@gmail.com

Шубернецкая О.С., с.н.с., ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова" Министерства Здравоохранения РФ, olgasb21@gmail.com

Молчанов И.А., студ., ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, mitw.9.23@gmail.com

Комизерко Л.А., студ., ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, tigersrash@yandex.ru

Семущина С.Г., н.с., ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН semushina@mail.ru

Моисеева Е.В., к.б.н., н.с., ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, evmoise@gmail.com

Aronov D.A., Shubernetskaya O.S., Molchanov I.A., Komizerko L.A., Semushina S.G., Moiseeva E.V.

genetically different strains were used in the study: BALB/c, A/ Sn, CBA, C57BL/6. Pyrogenal solution was administered to mice over a wide dose range (0.0005-10 µg/mouse) subcutaneously, intraperitoneally and intravenously. Colon cancer cell line C 26 were inoculated to the BALB/c males subcutaneously. The body temperature was measured by an electronic thermometer in the area of the inguinal skin fold. In each group, the dominant and subordinate males were determined. As a result, both hyperthermia and hypothermia were found as the reaction of the body to pyrogenal depending on the mode of administration, the dose, the genotype and social status of male mice. The tumor-bearing mice with transplanted colon cancer gradually developed hypothermia, the most pronounced during the final stages of tumor growth as opposed to clinical data. Thus, the results obtained in the mouse models of hyperthermia should be carefully extrapolated to clinics.

Вступление

У здоровых теплокровных животных диапазон изменений температуры тела довольно узок, в то время как многие системные заболевания сопровождаются нарушением терморегуляции и, как следствие, повышением температуры тела. Поэтому в клинике термометрия является обязательной процедурой для мониторинга состояния пациентов. Известны модели гипертермии на лабораторных мышах, крысах и кроликах [1]. Описаны факторы, которые влияют на термометрию и должны быть учтены в эксперименте. В первую очередь, это температура в помещении. Согласно российским и международным руководствам рекомендуется содержать лабораторных мышей при средней температуре 22–23 °C [2]. Однако было показано, что это вызывает у мышей состояние хронического холодового стресса и повышает уровень катехоламинов, влияя на регистрируемые параметры [2]. При содержании мышей-опухоленосителей при 22 °C скорость роста перевиваемой опухоли увеличивается (при подавлении противоопухолевого иммунного ответа) в сравнении с содержанием мышей при 30

°C [2]. При создании модели гипертермии также следует учитывать метод введения препарата, дозу препарата и стресс, вызванный экспериментальной процедурой. Известно, стресс сильно влияет на состояние здоровья мышей, особенно самцов линий с наиболее агрессивным поведением. Целью настоящего исследования было выявить значение генотипа и социального статуса интактных самцов при создании модели гипертермии с помощью фармакопейного препарата пирогенала и мышей-опухоленосителей

Материалы и методы

В работе использовали самцов мышей четырех генетически различных линий: BALB/cJcItMoise (B/c), A/ WySnJMoise(A/Sn) [3] и CBA/Calac (CBA), C57BL/6 (B6) в возрасте 24 нед., которых содержали в конвенциональных условиях вивария ИБХ РАН. Все самцы имели индивидуальные прижизненные метки и рассматривались как ветеринарные пациенты. Температуру тела измеряли электронным термометром в области паховой кожной складки. Фармакопейный препарат пирогенал перед введением растворяли в физрастворе. Раствор пирогенала вводили мышам экспериментальных групп в широком диапазоне доз (от 0,0005 мкг/мышь до 10 мкг/мышь) подкожно, внутрибрюшинно и внутривенно в хвостовую вену в объеме 100 мкл при температуре в помещении 24–26 °C. Контрольным самцам вводили таким же образом физраствор, а также для сравнения использовали контрольных интактных самцов. Количество самцов в группе составляло от 3 до 10 особей. Температуру тела и массу тела самцов измеряли один раз в час в течение первых 4х часов после введения препарата, и далее один раз в день в течение 3х дней. С целью получения перевиваемой опухолевой модели использовали самцов В/св возрасте 24 нед. Опухолевые клетки рака кишечника С26, любезно предоставленные Свирцевской Е.В. (ИБХ РАН), вводили самцам подкожно в количестве 1×10^6 /мышь в объеме 200 мкл/мышь. Социальный статус самцов В/с (линия с наиболее выраженной иерархической структурой) в возрасте 24 нед. определяли визуально по наличию ран в области гениталий и хвоста. Для оценки степени выраженности повреждения кожи использовали бальную систему оценки, как было описано ранее [4]. В каждой группе выделяли доминирующих (менее выраженные повреждения кожи, до 10 баллов) и подчиненных (субмиссивных) самцов (наибольшая степень повреждений, более 10 баллов). Сравнивали температуру тела доминирующих и субмиссивных самцов в группе, а также опухоленосителей по сравнению с интактными самцами в зависимости от их социального статуса. Одновременно с термометрией, определяли средний диаметр опухоли каждой мыши (СДО) в соответствии с описанной ранее методикой [5]. Самцов на конечной стадии заболевания (СДО более 20 мм и/или потерей массы тела более 15% и/или отказ от пищи) подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации. Статистическую значимость различий определяли с помощью параметрического критерия Стьюдента (для несвязанных и связанных выборок) и непараметрических критериев Манна-Уитни и Вилкоксона.

Результаты

Термометрию после введения пирогенала (индуктора гипертермии у человека) в широком диапазоне доз у самцов четырех линий в возрасте 24 нед. проводили с целью создать модель гипертермии. Наибольший эффект при одинаковой дозе был выявлен при внутрибрюшинном введении, введение физраствора вызывало кратковременную гипотермию. У самцов самой агрессивной из использованных линий В/с лекарственная гипертермия (выше 38 °C) оказалась маскированной физиологической гипертермией вследствие агрессии доминирующих особей по отношению к субмиссивным. Эксперименты на самцах менее агрессивных линий (CBA и A/Sn) выявили только гипотермию при применении высоких доз пирогенала (данные не показаны). Гипертермию после введения пирогенала наблюдали только у самцов линии В6 в течение 1,5 часов при дозах 1 мкг/мышь и 0,1 мкг/мышь, соответственно (Рис.1). Высокая доза 10

Рис. 1. Динамика температуры тела интактных самцов C57BL/6, после внутрибрюшинного введения различных доз пирогенала.

Рис. 2. Температура тела самцов BALB/c с выраженными опухолями C26 в зависимости от доминирующего или субмиссивного статуса. Прерывистая линия – средняя температура тела интактных самцов.

мкг/мышь, по-видимому, оказалась токсичной и привела к выраженной гипотермии. Аналогичные эксперименты на самцах В/с того же возраста даже привели к гибели некоторых животных, причем во всех случаях это были исключительно субмиссивные особи (данные не показаны). Полученные нами данные на самцах В6 в целом соответствовали результатам, опубликованным ранее [1].

В модели перевитой опухоли С 26 в среднем по группе мы не обнаружили достоверных изменений температуры тела опухоленосителей на ранних стадиях опухолевого роста (5–8 й день после перевивки, диаметр опухоли до 5 мм) по сравнению с интактным контролем. Однако, при разделении опухоленосителей на подгруппы (согласно 3С-парадигме проведения биомедицинского исследования [6]) было обнаружено, что у субмиссивных самцов наблюдалось снижение температуры тела по сравнению с доминирующими, при этом падение температуры для субмиссивных было выражено сильнее (рис. 2), поскольку подчиненный социальный статус усиливает иммунологические последствия социального стресса [7]. По мере роста рака у опухоленосителей проявлялась гипотермия, наиболее выраженная на конечных стадиях (данные не показаны), в то время как у пациентов в онкологической клинике отмечается хроническая гипертермия [8].

Выводы

Физиологическая реакция организма в ответ на введение пирогенала с целью индукции гипертермии зависела не только от способа введения и дозы, но и от генотипа и социального статуса самцов мыши. У самцов с перевитым раком кишечника постепенно развивалась гипотермия, за-

висающая от социального статуса и усиливающаяся по мере приближения опухоленосителей к терминальной стадии. По-видимому, ухудшение состояния здоровья лабораторной мыши сопровождается гипотермией, и эти существенные отличия от человека важно учитывать при моделировании гипертермии.

Литература

1. Rudaya A.Y., Steiner A.A., Robbins J.R., Dragic A.S., Romanovsky A.A. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005. Vol. 289. № 5. P. R1244-1252.
2. Hylander B.L., Eng J.W., Repasky E.A. The Impact of Housing Temperature-Induced Chronic Stress on Preclinical Mouse Tumor Models and Therapeutic Responses: An Important Role for the Nervous System. *Adv Exp Med Biol*. 2017. Vol. 1036. P. 173-189.
3. International index of laboratory animals. 6th edition. Compiled by M.F.W. Festing. 1993. Leicester, United Kingdom.
4. Моисеева Е.В., Устюгова Е.А., Семушина С.Г., Аронов Д.А., Стоянова Л.Г. Влияние культуры *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* 194-k на проявление симптомов спонтанного хронического дерматоза // Фундаментальные исследования. 2012. № 6-2. С. 333-337.
5. Moiseeva E. Anti-breast cancer drug testing. *Original Approaches. Novel Set of Mouse Models*. 2009. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany. P. 211.
6. Moiseeva E. Towards personalized paradigm of experimental anticancer research with "3S" concept. *EPMA Journal*. 2011. Vol. 2. № suppl. 1. P. S114-S115.
7. Avitsur R., Kinsey S.G., Bidor K., Bailey M.T., Padgett D.A., Sheridan J.F. Subordinate social status modulates the vulnerability to the immunological effects of social stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2007. Vol. 32. № 8-10. P. 1097-1105.
8. Luft F.C., Rissing J.P., White A., Brooks G.F. Infections or neoplasm as causes of prolonged fever in cancer patients. *Am J Med Sci*. 1976. Vol. 272. № 1. P. 65-74.