

Научная статья

УДК 57.083.226

EDN: MUPROS

Куриный эмбрион как экспериментальная модель

Ирина Евгеньевна Валамина✉, **Анастасия Евгеньевна Кознова**,
Елена Максимовна Угрюмова, **Дилай Илметтиновна Аксой**,
Екатерина Дмитриевна Бакай

Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

✉ ivalamina@mail.ru

Аннотация. Куриный эмбрион (КЭ) представляет собой многогранную экспериментальную модель, предоставляющую аналитические данные для нескольких подходов к тестированию веществ. Многие отчеты исследований были сосредоточены на токсичности или эффективности лекарств с помощью этой модели, доказывая, что КЭ является отличной альтернативной моделью для таких целей. Основными преимуществами такой модели становятся экономическая и биоэтическая составляющие.

Ключевые слова: куриный эмбрион, экспериментальная модель, тестирование веществ

Для цитирования: Куриный эмбрион как модель тестирования новых веществ / И. Е. Валамина, А. Е. Кознова, Е. М. Угрюмова [и др.] // Вестник УГМУ. 2023. № 1. С. 58–65.

Original article

Chicken Embryo as an Experimental Model

Irina E. Valamina✉, **Anastasia E. Koznova**, **Elena M. Ugryumova**,
Dilay I. Aksoy, **Ekaterina D. Bakai**

Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

✉ ivalamina@mail.ru

Abstract The chicken embryo is a multifaceted experimental and alternative model providing analytical data for several approaches to testing substances. Many research reports have focused on toxicity and drug efficacy using this model, proving that CE is excellent alternative model for such purposes. Main the advantages of this model are economic, bioethical components. day — before the formation of the neural tube.

Keywords: chick embryo, experimental model, substance testing

For citation: Valamina IE, Koznova AE, Ugryumova EM, Aksoy DI, Bakai ED. Chick-en embryo as an experimental model. *Bulletin of USMU*. 2023;(1):58–65. (In Russ.)

Введение. Тестирование новых лекарственных препаратов и веществ *in vivo* является обязательным доклиническим этапом исследования, что позволяет предотвратить возможные неблагоприятные и биоагрессивные эффекты на организм. Поиск новых альтернативных и более экономичных моделей для тестирования веществ является актуальным. Одним из таких альтернативных вариантов предлагается модель куриного эмбриона (КЭ).

Цель работы — анализ литературы о применении экспериментальной модели КЭ для тестирования различных веществ.

Материалы и методы. Проведен обзор и анализ русскоязычной и англоязычной литературы за последние 10 лет (2002–2022 гг.) с использованием наукометрических баз данных: PubMed, eLibrary.Ru, «КиберЛенинка».

Результаты исследования и их обсуждение. Начиная с 2006 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (*англ.* The United States Food and Drug Administration, USFDA) стало рассматривать модель КЭ как альтернативу применения экспериментальных моделей на позвоночных для доклинической оценки фармацевтических разработок. Модель КЭ широко использовалась для анализа системы доставки лекарств (СДЛ), тестирования веществ на токсичность, а также для оценки ангиогенеза и антиангиогенеза, фармакокинетики новых веществ, восстановления тканей и заживления ран [1–3]. Различные СДЛ, включая липосомы, наноэмульсии, наночастицы и гидрогели были успешно оценены с помощью КЭ как модели *in vivo* [4]. Недавно на КЭ были получены результаты тестирования мезопористых наночастиц кремнезема, функционализированных антагонистом фолатов, метотрексатом и нацеленных на инвазивные клетки рака щитовидной железы. Также на КЭ проводилось исследование с использованием полимерных наночастиц с инкапсулированным лекарственным препаратом, угнетающим опухолевый ангиогенез при раке кожи [5].

В целом исследования подтвердили универсальность, жизнеспособность, простоту в обращении и надежность модели КЭ для анализа нанотоксичности и активности *in vivo* СДЛ по сравнению с традиционными моделями на млекопитающих [6]. Токсичность лекарств на КЭ была оценена при различных периодах инкубации: 0, 1, 3, 4 и 10 эмбриональных инкубаци-

онных дней (ЭИД) при различных путях введения. Использовали введение в яичный желток (ЯЖ) [7], желточный мешок (ЖМ) [8], мембрану оболочки (МО) [9], а также при введении через воздушную камеру (ВК) и хориоаллантаоидную мембрану (ХАМ). Кроме того, существуют различные параметры, которые могут быть проанализированы для оценки токсичности веществ: эмбриональная смертность, вес яиц, вес эмбрионов, показатели окислительного стресса, биохимические показатели сыворотки крови, аллантаоида и амниотической жидкости, цитологические показатели крови и органов кроветворения, структурные повреждения органов, пороки развития эмбрионов [7–11]. При разных путях введения тестируемое вещество достигает различных тканей КЭ, что должно учитываться при планировании эксперимента и выборе оптимальных путей введения в зависимости от целей и задач. На ранних стадиях инкубации у КЭ полностью отсутствует развитая иммунная, почечная и печеночная системы, ферменты поджелудочной железы, кишечник и гематоэнцефалический барьер [12, 13]. В целом функциональная активность органов формируется и значительно возрастает после 12 ЭИД и становится максимально активной на 18 ЭИД. Таким образом, смерть или повреждение эмбриона на ранних стадиях вызвана прямым повреждением тестируемого препарата или исследуемых микроорганизмов без участия эмбриональной иммунной системы или органов эмбриона [14, 15]. По этой причине необходимо заранее определить наиболее подходящий эмбриональный возраст для конкретного *in vivo* анализа с учетом физико-химических свойств тестируемых препаратов и особенностей пути введения. Например, для тестирования лекарственных веществ, которые используются перорально, оптимальным путем предлагается введение через аллантаоисную или амниотическую жидкости, т. к. при таких путях введения КЭ будет поглощать и переваривать тестируемые образцы. Введение в яичный желток — идеальный путь для тестирования препаратов с кишечной абсорбцией. Вещества, которые необходимо вводить парентерально, можно тестировать с помощью введения через хориоаллантаоидную мембрану, т. к. в ней большое обилие сосудов [16–19].

Актуальным также является оценка эмбриотоксичности различных веществ. Например, с помощью такой модели проведена оценка противосудорожного препарата Лакосамида (LCM), который может назначаться беременным женщинам. Под зародышевые диски КЭ инокулировали различные концентрации LCM. Также с помощью модели КЭ можно оценивать прохождение веществ через плацентарный барьер [20].

Плацента — это провизорный орган, осуществляющий физиологическую связь между плодом и матерью. Зная структурные и функциональные особенности плаценты, можно найти аналогичную структуру у КЭ. Аналогом плаценты млекопитающих у КЭ является хориоаллантаоисная оболочка — результат срастания участков серозы и наружной стенки аллантаоиса. Аллантаоис выполняет самые разнообразные функции. Он служит резервуаром для

аллантаической жидкости, являющейся продуктом выделения почек; в ней содержатся мочевая кислота и другие вредные вещества.

Также необходимо отметить, что использование КЭ внесло вклад в экспериментальное изучение физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Именно на КЭ изучалась роль клеток эндокарда в закладке коронарных сосудов во время трабекуляции миокарда и механизм образования аорты, а также формирование проэпикарда и эпикарда. Эксперименты на КЭ способствовали пониманию ключевых механизмов развития сердечного клапана на ранних стадиях морфогенеза и выявили гетерогенность эндокардиальных клеток в эмбриональном сердце [21].

Помимо этого, существует возможность применения КЭ в качестве модели для исследований как в области эмбриологии, так и в онкологии. Механизмы, обеспечивающие выживаемость клеток и их подвижность в процессе эмбриогенеза, во многом совпадают с механизмами канцерогенеза и метастазирования [22]. Определение генов и факторов транскрипции, регулирующих эпителиально-мезенхимальное перемещение облегчило понимание механизмов гастрюляции, миграции клеток нервного гребня, а в итоге и метастазирования. В экспериментальной онкологии КЭ показал себя как уникальная модель, которая позволяет обойти многие ограничения при изучении канцерогенеза *in vivo* [23].

Среди основных преимуществ модели КЭ, в сравнении с экспериментальными моделями на млекопитающих, следует отметить экономическую и биоэтическую составляющие. Однако в вопросе использования модели КЭ не все решено, в т. ч. требуют дальнейшей отработки протоколы и алгоритмы выведения из эксперимента КЭ при использовании такой модели, экстраполяция полученных результатов на млекопитающих и человека.

Обзор литературы показал, что при использовании КЭ как экспериментальной модели применяются 6 классических методов введения веществ в КЭ. Наиболее часто используют введение в аллантаическую полость и на хорионаллантоическую оболочку (ХАО), реже — в амниотическую полость и желточный мешочек, совсем редко — в тело зародыша и кровеносные сосуды ХАО. Введение на хорионаллантоическую оболочку является наиболее оптимальным для оценки эмбриотоксичности.

Вывод из эксперимента модели должен осуществляться в срок 6 и 13 инкубационных дней. Консультативный комитет по исследованиям на животных США (*англ.* Institutional Animal Care and Use Committees, IACUC) утверждает, что нервная трубка развивается в функциональный мозг примерно в срок, составляющий 60 % эмбрионального периода. По этой причине эмбрион в этот срок, вероятно, уже воспринимает боль. Экстраполируя эти рекомендации на эмбриональный период развития цыпленка (21 день), можно предположить, что фаза между 13 и 18 ЭИД является критической для использования этой модели, т. к. на 13 день эмбрионального развития из нерв-

ной трубки цыпленка формируется функциональный мозг. В связи с этим при использовании модели КЭ старше этого срока все процедуры должны проводиться под протоколами анестезии [24].

Выводы. Куриный эмбрион представляет собой многогранную экспериментальную модель *in vivo*, позволяющую получить аналитические данные при тестировании веществ с использованием разных подходов. Многие отчеты исследований были сосредоточены на токсичности или эффективности лекарств, оцененных с помощью этой модели. Это свидетельствует о том, что КЭ является отличной альтернативной моделью для таких целей. Имеющиеся работы предполагают, что планирование экспериментов с использованием КЭ в качестве биологической модели для получения надежных данных о токсичности или эффективности веществ должно учитывать физико-химические свойства и биокинетику веществ, пути инокуляции, эмбриональный возраст, адекватный набор инструментальных и лабораторных показателей.

Список источников

1. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs / C. S. Kue, K. Y. Tan, M. L. Lam, H. B. Lee // *Experimental animals*. 2015. Vol. 64, No. 2. P. 129–138. DOI: <https://doi.org/10.1538/expanim.14-0059>.
2. Effects of lacosamide “a novel antiepileptic drug” in the early stages of chicken embryo development / M. Mete, B. Gurcu, F. Collu [et al.] // *Child’s Nervous System*. 2016. Vol. 32. P. 1715–1719. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00381-016-3181-4>.
3. Evaluation of the *in vivo* antioxidative activity of redox nanoparticles by using a developing chicken egg as an alternative animal model / C. Abe, Y. Uto, A. Kawasaki [et al.] // *Journal of Controlled Release*. 2014. Vol. 182. P. 67–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.015>.
4. Chick embryo chorioallantoic membrane as a suitable *in vivo* model to evaluate drug delivery systems for cancer treatment: A review / F. D. Victorelli, V. M. de O. Cardoso [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020. Vol. 153. P. 273–284. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.06.010>.
5. *In vivo* evaluation of antitumoral and antiangiogenic effect of imiquimod-loaded polymeric nanoparticles / M. F. Dias, B. C. P. de Figueiredo, J. Teixeira-Neto [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018. Vol. 103. P. 1107–1114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.079>.
6. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems / A. Vargas, M. Zeisser-Labouèbe, N. Lange [et al.] // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2007. Vol. 59, Iss. 11. P. 1162–1176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.019>.

7. Gebhardt D. O. E., van Logten M. J. The chick embryo test as used in the study of the toxicity of certain dithiocarbamates // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1968. Vol. 13, Iss. 3. P. 316–324. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(68\)90105-1](https://doi.org/10.1016/0041-008X(68)90105-1).
8. Embryonic toxico-pathological effects of meglumine antimoniate using a chick embryo model / A. Khosravi, I. Sharifi, H. Tavakkoli [et al.] // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, Iss. 5. P. e0196424. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196424>.
9. Reproductive toxicity of fluoroquinolones in birds / H. Hrubá, E. E. E. Abdelsalam, N. Anisimov [et al.] // *BMC veterinary research*. 2019. Vol. 15. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1957-y>.
10. Korhonen A., Hemminki K., Vainio H. Application of the chicken embryo in testing for embryotoxicity: thiurams // *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 1982. Vol. 8, Iss. 1. P. 63–69. DOI: <https://doi.org/10.5271/sjweh.2495>.
11. The developmental toxicity of cottonseed extraction on chicken embryo / P. Sadighara, J. S. Amoli, J. Ashrafihelan [et al.] // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2011. Vol. 21, Iss. 3. P. 560–563. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000070>.
12. Effect of in ovo vaccine delivery route on herpesvirus of turkeys / SB-1 efficacy and viremia / P. S. Wakenell, T. Bryan, J. Schaeffer [et al.] // *Avian diseases*. 2002. Vol. 46, No. 2. P. 274–280. DOI: [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0274:EOIOVD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0274:EOIOVD]2.0.CO;2).
13. Williams C. J., Hopkins B. A. Field evaluation of the accuracy of vaccine deposition by two different commercially available in ovo injection systems // *Poultry science*. 2011. Vol. 90, Iss. 1. P. 223–226. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00759>.
14. Non-antibiotics strategies to control Salmonella infection in poultry / J. M. Ruvalcaba-Gómez, Z. Villagrán, J. J. Valdez-Alarcón [et al.] // *Animals*. 2022. Vol. 12, Iss. 1. P. 102. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani12010102>.
15. Effects of lacosamide “a novel antiepileptic drug” in the early stages of chicken embryo development / M. Mete, B. Gurcu, F. Collu [et al.] // *Child’s Nervous System*. 2016. Vol. 32. P. 1715–1719. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00381-016-3181-4>.
16. Строганова И. Я. Куриные эмбрионы и их использование в вирусологии. Красноярск, 2013. 19 с.
17. Gabrielli M. G., Accili D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010. Vol. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/940741>.

18. Moran E. T. Jr. Nutrition of the developing embryo and hatchling // Poultry science. 2007. Vol. 86, Iss. 5. P. 1043–1049. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1043>.
19. Importance of albumen during embryonic development in avian species, with emphasis on domestic chicken / E. Willems, E. Decuypere, J. Buyse, N. Everaert // World's Poultry Science Journal. 2014. Vol. 70, Iss. 3. P. 503–518. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043933914000567>.
20. Reizis A., Hammel I., Ar A. Regional and developmental variations of blood vessel morphometry in the chick embryo chorioallantoic membrane // Journal of Experimental Biology. 2005. Vol. 208, Iss. 13. P. 2483–2488. DOI: <https://doi.org/10.1242/jeb.01662>.
21. Куриный эмбрион как объект эксперимента для изучения развития сердечно-сосудистой системы / А.Х. Каде, А.И. Трофименко, А.Ю. Туровая [и др.] // Российский медико-биологический вестник имени академика ИП Павлова. 2018. Т. 26, №. 4. С. 538–546. DOI: <https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2018264538-546>.
22. A cell-based computational model of early embryogenesis coupling mechanical behaviour and gene regulation / J. Delile, M. Herrmann, N. Peyri ras, R. Doursat // Nature communications. 2017. Vol. 8. P. 13929. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms13929>.
23. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction / A. Zijlstra, R. Mellor, G. Panzarella [et al.] // Cancer research. 2002. Vol. 62, No. 23. P. 7083–7092.
24. Aleksandrowicz E., Herr I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo // ALTEX-Alternatives to animal experimentation. 2015. Vol. 32, No. 2. P. 143–147. DOI: <https://doi.org/10.14573/altex.1410031>.

Информация об авторах

Ирина Евгеньевна Валамина — кандидат медицинских наук, доцент, заведующий гистологической лабораторией Центральной научно-исследовательской лаборатории, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: ivalamina@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7387-5287>.

Анастасия Евгеньевна Кознова — младший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: aisha12_95@mail.ru.

Елена Максимовна Угрюмова — студент педиатрического факультета, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: domrissimo@yandex.ru.

Дилай Илметтиновна Аксой — студент педиатрического факультета, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: dilay.aksoy@mail.ru.

Екатерина Дмитриевна Бакай — студент педиатрического факультета, Уральский государственный медицинский университет (Екатеринбург, Россия). E-mail: bakai.1999@mail.ru.

Information about the authors

Irina E. Valamina — Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor, Head of the Histological Laboratory of the Central Research Laboratory, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: ivalamina@mail.ru. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7387-5287>.

Anastasia E. Koznova — Junior Research Officer of the Central Research Laboratory, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: ivalamina@mail.ru.

Elena M. Ugryumova — Student of the Pediatric Faculty, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: domrissimo@yandex.ru.

Dilay I. Aksoy — Student of the Pediatric Faculty, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: dilay.aksoy@mail.ru.

Ekaterina D. Bakai — Student of the Pediatric Faculty, Ural State Medical University (Ekaterinburg, Russia). E-mail: bakai.1999@mail.ru.