

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

ПАТОГЕНЕЗ

Научно-практический журнал

Основан в 2003 году
Выходит 4 раза в год

Том 15, №4, 2017

ОКТАБРЬ—ДЕКАБРЬ

Главный редактор
КУБАТИЕВ А.А. (Москва)

Соредакторы
Дыгай А.М. (Томск), Корнева Е.А. (Санкт-Петербург), Морозов С.Г. (Москва)

Ответственный секретарь
Карганов М.Ю. (Москва)

Редакционная коллегия

Арчаков А.И. (Москва), Афтанас Л.И. (Новосибирск), Баранов В.М. (Москва), Береговых В.В. (Москва), Бобрышев Ю.В. (Сидней, Австралия), Гинтер Е.К. (Москва), Грачев С.В. (Москва), Дауни Г.Ф. (Форт-Уэрт, США), Кашкин К.П. (Москва), Кжишковска Ю.Г. (Гейдельберг, Германия), Колесников С.И. (Москва), Кушлинский Н.Е. (Москва), Манухина Е.Б. (Форт-Уэрт, США), Нинкина Н.Н. (Кардифф, Великобритания), Новицкий В.В. (Томск), Пальцев М.А. (Москва), Панченко Л.Ф. (Москва), Петров В.И. (Волгоград), Пузырев В.П. (Томск), Ревивили А.Ш. (Москва), Репин В.С. (Москва), Сандриков В.А. (Москва), Софронов Г.А. (Санкт-Петербург), Сухих Г.Т. (Москва), Тутельян В.А. (Москва), Угрюмов М.В. (Москва), Франк Г.А. (Москва), Черешнев В.А. (Екатеринбург), Чехонин В.П. (Москва), Шабалин В.Н. (Москва), Швец В.И. (Москва), Шляхто Е.В. (Санкт-Петербург), Юрков В.А. (Москва)

Зав. редакцией Иришкин Д.А.
Научный редактор Панкова Н.Б.
Технический редактор Комарова А.К.

Внимание авторов и читателей: рукописи и иллюстрации не возвращаются. При перепечатке материалов согласование с редакцией журнала «Патогенез» обязательно.
За содержание рекламных публикаций ответственность несет рекламодатель.
Журнал зарегистрирован в Федеральном агентстве по печати и массовым коммуникациям. Регистрационный номер ПИ № 77-12736 от 27 мая 2002 г. ISSN 2310-0435
Почтовый адрес редакции: 125315, Москва, а/я 9. e-mail: genius-media@mail.ru; тел.: +7 (495) 518-1451.
Формат 210x290 мм. Бумага офсетная.
Подписано в печать 17.11.2017. Тираж 300 экз. Отпечатано в типографии «ПКФ «СОЮЗ-ПРЕСС», Ярославль.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
ООО Издательство «Гениус Медиа».

Federal State Budgetary Scientific Institution
«Institute of General Pathology and Pathophysiology»

PATHOGENESIS

Journal of Basic and Applied Medicine

Founded in 2003
Quarterly issue

Volume 15, №4, 2017

October—December

Editor-in-Chief
A.A. KUBATIEV (Moscow)

Co-editors
A.M. Dygay (Tomsk), E.A. Korneva (Saint-Petersburg), S.G. Morozov (Moscow)

Secretary
M.Yu. Karganov (Moscow)

Editorial board

Archakov A.I. (Moscow), Aftanas L.I. (Novosibirsk), Baranov V.M. (Moscow), Beregovykh V.V. (Moscow), Bobryshev Y.V. (Sydney, Australia), Ginter E.K. (Moscow), Grachev S.V. (Moscow), Downey H.F. (Fort Worth, USA), Kashkin K.P. (Moscow), Kzhyshkowska J.G. (Heidelberg, Germany), Kolesnikov S.I. (Moscow), Kushlinskii N.E. (Moscow), Manukhina E.B. (Fort Worth, USA), Ninkina N.N. (Cardiff, United Kingdom), Novitskiy V.V. (Tomsk), Paltsev M.A. (Moscow), Panchenko L.F. (Moscow), Petrov V.I. (Volgograd), Puzyrev V.P. (Tomsk), Revishvili A.Sh. (Moscow), Repin V.S. (Moscow), Sandrikov V.A. (Moscow), Sofronov G.A. (Saint-Petersburg), Sukhikh G.T. (Moscow), Tutelian V.A. (Moscow), Ugriumov M.V. (Moscow), Frank G.A. (Moscow), Chereshev V.A. (Ekaterinburg), Chekhonin V.P. (Moscow), Shabalin V.N. (Moscow), Shvets V.I. (Moscow), Shliakhto E.V. (Saint-Petersburg), Yurkiv V.A. (Moscow)

Publish Department chief Irishkin D.A.
Scientific editor Pankova N.B.
Technical editor Komarova A.K.

СОДЕРЖАНИЕ

CONTENTS

ОБЗОРЫ

Мыльникова А.Н., Колесов Д.В., Московцев А.А., Соколовская А.А., Юркив В.А., Кубатиев А.А.
Клеточные микрофлюидные технологии для биомоделирования патологических процессов 4

Чернов А.Н., Баранцевич Е.П., Галимова Э.С., Галагудза М.М.
Культуры клеток злокачественных новообразований человека в разработке новых противоопухолевых препаратов 13

Белканиа Г.С., Диленян Л.Р., Багрий А.С., Рыжаков Д.И., Пухальская Л.Г.
Общие подходы в антропологической характеристике возрастной динамики кровообращения человека 24

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г., Андреевская С.Г., Черкасова М.Н.
Гистологические изменения печени и почек при экспериментальном сепсисе в аспекте специфики строения их микроциркуляторного русла 32

Алчинова И.Б., Полякова М.В., Сабурин И.Н., Карганов М.Ю.
Размеры внеклеточных везикул, секретлируемых разными видами стволовых клеток 38

Шрамко Ю.И., Кубышкин А.В., Давыдова А.А., Фомочкина И.И., Алиев Л.Л., Чегодарь Д.В.
Коррекция морфофункциональных нарушений в экспериментальном метаболическом синдроме у крыс полифенолами винограда 43

Кит О.И., Котиева И.М., Францьянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитак Л.К., Бандовкина В.А., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Бликян М.В.
Нейромедиаторные системы головного мозга самок мышей в динамике роста злокачественной меланомы, воспроизведенной на фоне хронической боли 49

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Шатохина С.Н., Кузнецова Н.А., Шабалин В.Н.
Твёрдофазные структуры спинномозговой жидкости в диагностике раннего асимптомного нейросифилиса 56

Богданенко Е.В., Власов А.В., Нурбеков М.К.
Поиск связи носительства различных вариантов гена COMT с проявлением некоторых черт личности и успешностью в бизнесе 62

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ

Мезенцева Л.В.
Компьютерное моделирование степени хаотичности процесса фибрилляции желудочков у человека и собак 69

ЛЕКЦИИ

Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б.
О регенерации мозга (Лекция I) 74

ИЗ ИСТОРИИ МЕДИЦИНЫ

Копаладзе Р.А.
Основные моменты становления медицинского эксперимента. Биоэтика 81

ИНФОРМАЦИЯ

Правила оформления статей в журнале «Патогенез» 90

REVIEWS

Mylnikova A.N., Kolesov D.V., Moskovtsev A.A., Sokolovskaya A.A., Yurkiv V.A., Kubatiev A.A.
Cell microfluidics technologies for biomodeling of pathological processes 4

Chernov A.N., Barantsevich E.P., Galimova E.S., Galagudza M.M.
Cell cultures of human malignant tumors in development of new anticancer therapies 13

Belkaniya G.S., Dilenyani L.R., Bagrii A.S., Ryzhakov D.I., Puchalska L.G.
General approaches to anthropophysiological characterization of age-related changes in human circulation 24

EXPERIMENTAL RESEARCHES

Borovaya T.G., Zhukhovitsky V.G., Andreevskaya S.G., Cherkasova M.N.
Histological changes of the liver and kidneys in experimental sepsis related with structural features of their microvasculature 32

Alchinova I.B., Polyakova M.V., Saburina I.N., Karganov M.Yu.
The size of extracellular vesicles secreted by different types of stem cells 38

Shramko Yu.I., Kubyshkin A.V., Davydova A.A., Fomochkina I.I., Aliev L.L., Chegodar D.V.
Correction of morphofunctional disorders with grapes polyphenols in rats with experimental metabolic syndrome 43

Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A., Blikyan M.V.
Neurotransmitter systems of female mouse brain during growth of malignant melanoma modeled on the background of chronic pain 49

CLINICAL RESEARCHES

Shatokhina S.N., Kuznetsova N.A., Shabalin V.N.
Solid-phase structures of cerebrospinal fluid in diagnosis of early asymptomatic neurosyphilis 56

Bogdanenko E.V., Vlasov A.V., Nurbekov M.K.
Search for associations of carrying different variants of the COMT gene with manifestations of some personality traits and success in business 62

EXPERIMENTAL MODELS

Mezentseva L.V.
Computer modeling of chaoticity degree of ventricular fibrillations in humans and dogs. 69

LECTURES

Paltsyn A.A., Sviridkina N.B.
About regeneration of the brain (Lecture I) 74

THE HISTORY OF MEDICINE

Kopaladze R.A.
The milestones in development of medical experiments. Bioethics 81

INFORMATION

Guidelines for Authors 90

УДК 616-092 + 576.7
DOI:

Клеточные микрофлюидные технологии для биомоделирования патологических процессов

Мыльникова А.Н.^{1,2}, Колесов Д.В.¹, Московцев А.А.^{1,3}, Соколовская А.А.¹, Юркив В.А.⁴, Кубатиев А.А.^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва, Миусская площадь, д. 9

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

⁴ Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 111123, Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а

Стремительный технический прогресс способствует появлению все новых подходов в клеточной биологии, одним из них является клеточная микрофлюидика. Применение технологий микрофлюидики открыло новые возможности по культивированию, прецизионному анализу и манипулированию как популяциями клеток, так и отдельными клетками. Основой новой технологии является микрофлюидный чип — миниатюрное устройство, содержащее систему микро- и наноканалов, полостей, мембран и других элементов. Возможность прецизионного управления пространственным расположением клеток и их микроокружением предоставляет уникальные и беспрецедентные возможности для биомоделирования *in vitro* функциональных элементов органов и тканей. В данном обзоре приведены примеры построения и применения таких трехмерных микрофлюидных клеточных моделей для анализа протекающих в них физиологических и патологических процессов. Особое внимание уделено влиянию клеточного микроокружения клетки на её функционирование.

Ключевые слова: микрофлюидика, биомоделирование, клеточные технологии.

Для цитирования: Мыльникова А.Н., Колесов Д.В., Московцев А.А., Соколовская А.А., Юркив В.А., Кубатиев А.А. Клеточные микрофлюидные технологии для биомоделирования патологических процессов. Патогенез. 2017; 15(4): 4–12

Для корреспонденции: Колесов Дмитрий Валерьевич, maedros@bk.ru

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ), проект 16-04-01807.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 18.09.2017

Cellular microfluidic technologies for biomodeling of pathological processes

Mylnikova A.N.^{1,2}, Kolesov D.V.¹, Moskovtsev A.A.^{1,3}, Sokolovskaya A.A.¹, Yurkiv V.A.⁴, Kubatiev A.A.^{1,3}

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Miusskaya Ploshchad 9, Moscow, 125047, Russian Federation

³ Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

⁴ Central Research Institute of Epidemiology, Novogireevskaya str. 3a, Moscow 111123, Russian Federation

Significant technological progress has brought new approaches to cell biology. Using microfluidic technologies has opened new opportunities for cultivation, analysis, and manipulation of both individual cells and their populations. The basis of the new technology is a microfluidic chip, a miniature device containing a system of micro- and nanochannels, cavities, membranes, and other elements. The precise control of spatial arrangement of cells and their microenvironment opens new prospects for *in vitro* biomodeling of functional elements of organs and tissues. This review shows examples for construction and application of such three-dimensional microfluidic cellular models for analysis of physiological and pathological processes. Particular attention is paid to the influence of cellular microenvironment on cell functioning.

Key words: microfluidics, biomodeling, cell technologies.

For citation: Mylnikova A.N., Kolesov D.V., Moskovtsev A.A., Sokolovskaya A.A., Yurkiv V.A., Kubatiev A.A. Cell microfluidics technologies for biomodeling of pathological processes. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15(4): 4–12 (in Russian)

For correspondence: Kolesov Dmitry, maedros@bk.ru

Funding. This study was supported by grant of the Russian Foundation for Basic Research, Project 16-04-01807.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 18.09.2017

Введение

В последние десятилетия в науке и технике большую актуальность приобретают технологии, разрабатываемые с применением эффективной миниатюризации, т.е. уменьшением размеров аналитических и (или) синтетических устройств, сопровождаемым улучшением их рабочих характеристик. Одной из наиболее активно развивающихся в этом направлении областей знания является микрофлюидика — междисциплинарная наука, включающая в себя целый ряд направлений, таких, как гидродинамика, теплофизика, химическая кинетика, биохимия, инженерное дело, электроника. С понятием *микрофлюидика* обычно связывают технологию, позволяющую манипулировать маленькими объемами жидкости (мкл, нл, пл) в искусственно созданных микросистемах — микрофлюидных устройствах (МФУ). Микрофлюидика нашла множество практических приложений в различных отраслях хозяйственной деятельности: микрофлюидные устройства могут выступать в качестве охлаждающих систем в высокопроизводительных микросхемах, микрореакторов для смешивания реагентов; биочипов для экспресс-диагностики с возможностью определения одновременно нескольких веществ с использованием экстремально малых количеств исследуемого вещества и т.п.

Микрофлюидные технологии оказались чрезвычайно востребованными в биомедицине. Применение микрофлюидики дало начало ряду новых направлений исследований [1]. С точки зрения клеточной биологии микрофлюидика — это прежде всего возможность эффективно приближения исследований *in vitro* к реальным процессам, протекающим в организме, а, значит, возможность получать более точные данные об этих процессах при уменьшении затрат на проведение экспериментов.

Многие важные аспекты использования микрофлюидных систем в клеточной биологии уже были рассмотрены в работах иностранных авторов [1, 2]. *Целью данного обзора* является познакомить ученых, работающих в областях нормальной и патологической физиологии с возможностями биомоделирования на основе микрофлюидных клеточных технологий. Кроме того, в обзоре будет уделено особое внимание преимуществам, которые может предоставить микрофлюидный формат при изучении физиологических и патофизиологических процессов.

Что такое МФУ?

Микрофлюидные устройства представляют собой точные жидкостные системы с размерами структур от единиц до сотен и тысяч микрометров. МФУ содержат множество компонентов, и МФУ по функциональности могут быть сопоставимы с целой лабораторией [3, 4]. Базовым элементом МФУ является стеклянная или полимерная пластина — одноразовый сменный модуль с многоуровневой системой каналов, микрополостей, клапанов и насосов, оперирующая с фемто- и пиколитрами жидкости. Микрофлюидные биоаналитические системы позволяют реализовать важнейшие методы современной аналитической химии, использовать преимущества ламинарных потоков, оптимизировать соотношение объема к поверхности в микрореакторах и др. [5]. Структура МФУ может быть разработана таким образом, чтобы обеспечить контроль за поведением клеток в простран-

стве чипа. Также взаимодействия между популяциями клеток могут контролироваться посредством использования различных элементов МФУ — каналов, мембран, клапанов, включенных в эти системы [4].

Учитывая большой спектр преимуществ, в сфере биомедицинских исследований микрофлюидика имеет огромный потенциал в моделировании физиологических и патологических состояний в сложных биологических системах [6, 7]. В частности, микрофлюидные устройства используются для решения таких научных задач клеточной биологии, как изучение клеточной адгезии, цитотоксичности, подсчет и сортировка клеток, клеточная миграция, механизмы сигнализации, электрофизиологические изменения и ряд других процессов. Такой широкий спектр решаемых задач может способствовать охвату в формате МФУ всех возможных потребностей в клеточной биологии и созданию полностью интегрированной системы для клеточных исследований, схематично представленной на рис. 1 [7].

Культивирование клеток в микрофлюидных чипах

Выращивание клеток в микрофлюидных чипах имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным культивированием во флаконах, чашках Петри или многолуночных планшетах. Так, например, жидкость во флаконах для культивирования обычно статична или турбулентно подвижна, в то время как клетки в реальных живых тканях находятся в потоке интерстициальной жидкости, крови или других биологических жидкостей, причем, в частности, для гидродинамики мелких сосудов характерен ламинарный характер тока. Кроме того, клетки в статичной культуре растут в присутствии своих собственных метаболитических «отходов», что приводит к изменениям pH ростовой среды, тогда как в естественных условиях происходит постоянное удаление метаболитов, что поддерживает pH на необходимом уровне [6]. Также немаловажно, что в большинстве традиционных методов мониторинг живых клеток в реальном времени ограничен. Из-за динамической природы биологических процессов часто при таких исследованиях теряется значительная доля информации. МФУ проектируются с широкими возможностями по прижизненному мониторингу клеток, в частности, с ис-

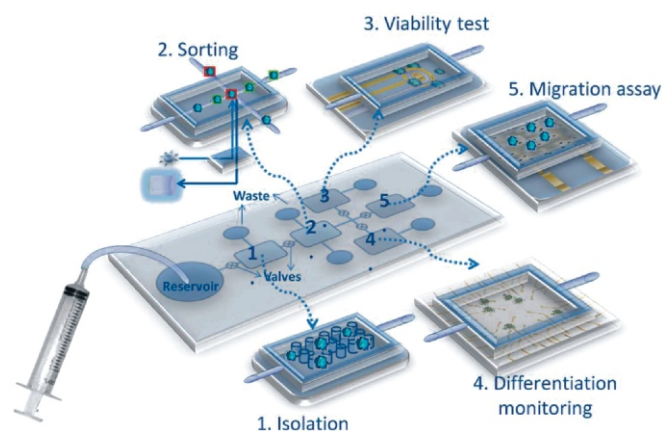


Рис. 1. Пример модульной лаборатории на чипе для исследований стволовых клеток. Несколько микрофлюидных компонентов и модулей интегрированы вместе для комплексного исследования процессов жизнедеятельности клеток [7].

пользованием конфокальной микроскопии. Кроме того, конструкция микрофлюидных чипов весьма разнообразна и может быть специально адаптирована под конкретный вид клеток и проводимых исследований. Культивирование клеток в МФУ предполагает значительно меньший расход реагентов, снижение риска контаминации, больший уровень автоматизации и повышение производительности анализа.

Как было отмечено выше, при культивировании клетки находятся в ростовой среде, состоящей из множества растворимых факторов, необходимых для обеспечения функционирования как внутриклеточных процессов, так и для межклеточных взаимодействий. Эта клеточная среда обладает определенными физико-химическими свойствами (рН, содержание кислорода, температура, осмоляльность) [8]. Так как большинство клеток в организме не циркулирует и зависит от прикрепления к окружающим клеткам и к внеклеточному матриксу (ЕСМ), формирование матрикса в МФУ и его правильная организация имеет первостепенное значение.

Физическое воздействие со стороны внеклеточной среды постоянно передается клеткам, которые, в свою очередь, вырабатывают ответ на это воздействие [9]. Помимо этого клетки испытывают механическое воздействие от соседних клеток, находящихся в непосредственном контакте. Иными словами, каждая отдельная клетка и вся ткань в целом постоянно испытывает динамическое экзогенное механическое воздействие, влияющее на состояние ее жизнедеятельности [8].

Таким образом, все силы, действующие на клетку, в том числе механические воздействия, в сочетании с другими физическими, физико-химическими и биохимическими факторами создают динамичную трехмерную микросреду, параметры которой должны учитываться при моделировании тканей в МФ чипе [8, 10]. Для воспроизведения как можно более точной картины процессов, протекающих в ткани, необходимо оценить потенциальные ключевые механизмы воздействия на клетку в ткани и последующие за ними эффекты, опосредуемые передачей биохимических сигналов, установить сопутствующие изменения в клеточной микросреде, а также провести оценку предполагаемого клеточного ответа. Важнейшие составляющие клеточного микроокружения, которые дол-

жны быть учтены при разработке микрофлюидных устройств, представлены на рис. 2 [10].

Ключевыми компонентами клеточного микроокружения, как уже было отмечено ранее, являются цитокины, факторы роста, гормоны и ряд других биологически активных молекул, которые в совокупности образуют сложный «информационный фон», способный активировать множество сигнальных путей. Эксперименты в клеточной и молекулярной биологии часто направлены на определение биохимических эффектов, а затем уточнение механизмов, с помощью которых определенные растворимые факторы регулируют процессы в клетке. В то время как «сигнальным» свойствам клеточного микроокружения в экспериментальной биологии уделено особо пристальное внимание, влияние изменения его физико-химических свойств на клетки изучено в меньшей степени. В частности, аномальные уровни рН и содержания кислорода связаны с развитием различных патологий, поэтому важно учитывать эти параметры при разработке и использовании искусственно созданного микроокружения для исследуемых клеточных культур [8]. МФУ благодаря используемому проточному принципу позволяют более точно контролировать клеточное микроокружение в режиме реального времени. Это обеспечивает большую эффективность основанным на МФУ методам моделирования патологических состояний, связанных с нарушением физико-химических свойств. Так, исследователям из Техасского Технологического Университета удалось создать прецизионную микрофлюидную клеточную модель поврежденных кардиомиоцитов в результате ишемии/реперфузии, индуцируемых контролируемо с высокой точностью гипоксией в течение 4 часов с последующей нормоксией [11].

Парциальное давление кислорода является существенным фактором для процессов клеточного роста, миграции и, соответственно, гомеостаза ткани и ее регенерации. Падение парциального давления может запускать адаптивные процессы в ткани, ангиогенез.

При выращивании клеток с использованием традиционных методов («статического» культивирования) в клеточном микроокружении поддерживается высокий уровень кислорода, соответствующий его содержанию в воздухе (21%). Между тем, в микроциркуляторном звене сосудистого русла уровень кислорода редко превышает 10%. Клетки, содержащиеся при высоких уровнях кислорода, могут иметь окислительные повреждения ДНК и экспрессировать маркеры фенотипа клеточного старения. При исследовании *in vitro* функций эндотелия или патологий, связанных с окислительным стрессом (например, атеросклероза), следует стремиться к приближению уровня кислорода к естественным условиям [12], что может эффективно достигаться построением соответствующих МФУ.

Градиенты концентраций играют ключевую роль в жизнедеятельности клеток в организме человека, определяя такие процессы, как миграция, пролиферация и дифференцировка в онтогенезе, заживление ран, воспаление и онкогенез [13].

Важно заметить, что понятие «градиент» применимо не только к химическим веществам, но также и к механическим свойствам ЕСМ или лигандов, связанных с поверхностью. Химические градиенты концентраций, как правило, образуются в результате диффузии, в то время как

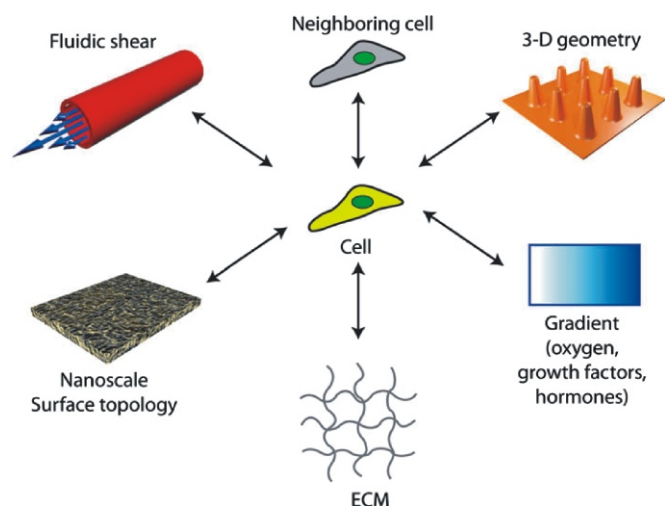


Рис. 2. Важнейшие факторы клеточного микроокружения [10].

механические градиенты образуются в результате неоднородности окружающей матрицы. Микрофлюидные технологии являются идеальным инструментом для воссоздания различных градиентов концентраций, которые могут подчиняться линейным, логарифмическим законам или их комбинациям. В простейшем случае потоки от двух отдельных источников могут быть объединены вместе в одном микроканале, и, в связи с ламинарным характером потока, их смешивание почти полностью определяется диффузией.

В микрофлюидных устройствах с каналами специальной формы могут быть воспроизведены химические градиенты концентраций факторов роста при непрерывном потоке, индуцирующие ответ, сопоставимый с традиционными клеточными культурами. МФУ могут быть использованы для создания градиентов растворенных газов — в частности, кислорода, путем контролируемого добавления поглотителя кислорода в среду для культивирования [13].

В МФУ также возможна интеграция нескольких градиентов, однако, такие интегрированные системы имеют ряд проблем, которые затрудняют их практическое использование в биологических исследованиях. Прежде всего — это сложная конструкция таких устройств, в особенности в случае, когда необходимо создавать одновременно разнородные градиенты, например, газов и растворенных твердых веществ.

Потоки жидкостей в организме человека обеспечивают активный массоперенос, который облегчает связи между всеми компонентами организма. Одним из естественных преимуществ микрофлюидики является контроль за поведением жидкости и точное управление потоком. В МФУ для достижения высокоинтенсивного механического воздействия потоком на клетки могут использоваться небольшие объемы проб. Возникающая при действии потока на клетки сдвиговая деформация, играющая важную роль в функционировании эндотелия, может исследоваться с использованием и более простых традиционных систем, таких, как проточные камеры — в них можно исследовать характеристики потока, но управление потоком в пространстве и времени при этом будет сильно ограничено простой геометрией устройства. Геометрия МФУ контролируется с несопоставимой гибкостью, при этом элементы МФУ могут создаваться в широчайшем диапазоне размеров, охватывающем 7 порядков.

Ключевым способом управления физико-химическими условиями в МФУ является контроль проходящего через МФУ потока жидкости. В отличие от жестко задаваемой на этапе проектирования геометрии МФУ, потоком можно управлять динамически с использованием помп, имеющих различный принцип действия — таких, как шприцевые или перистальтические. В микрофлюидных экспериментах часто применяются многоканальные помпы, управляемые с помощью компьютера. Прецизионное управление потоком позволяет создавать необходимые физические и химические градиенты, с помощью которых становится возможным изучение широчайшего спектра процессов в организме — от неинвазивного мониторинга формирования сердечной ткани до анализа субклеточных структур и направленной миграции аксонов нервных клеток [14]. Более того, могут использоваться замкнутые контуры циркуляции жидкости, обратные связи по потоку и даже устройства «потоковой» логики.

МФУ предоставляют широкие возможности для изучения действия механических сил и физических полей на клетки. Некоторые типы клеток, такие, как, например, остециты и фибробласты, являются механочувствительными и способны формировать специфические ответы на механические воздействия. Деформация в результате механического сжатия может распространяться по цитоскелету клеток и приводить к развитию в том числе и аномальных ответов у разных клеточных типов. Патологически измененные клетки часто демонстрируют модифицированную способность к деформации при сжатии. В соответствии с этим были разработаны специальные микрофлюидные устройства-цитометры, направленные на выявление потенциально опухолевых клеток на основе их ответов на деформацию [10].

Другим интересным примером исследования влияния деформации на функционирование клеток является модель повреждения легких при искусственной вентиляции за счет циклического растяжения и сжатия альвеолярных эпителиальных клеток. Для изучения подобных явлений могут быть использованы микрофлюидные устройства на основе гидрогелей [15]. Пример такого устройства показан на рис. 3. Созданная в этом исследовании модель «легких-на-чипе» была также использована для систематического изучения воздействия бактериальной инфекции и наночастиц на ткань легких. Использование такого устройства выявило корреляцию между циклической механической деформацией и воспалительными реакциями в тканях легочного эпителия. В связи с этим следует отметить немаловажный этический аспект, что при использовании подобных микрофлюидных моделей объем проводимых экспериментов на животных может быть существенно сокращен.

Перечисляя области применения МФУ для исследования физических воздействий на живые системы, нельзя не отметить, что одной из методически сложных областей патофизиологии является мониторинг в режиме реального времени гомеостаза ткани при ее механическом повреждении. Помимо необходимости соблюдения временных параметров, выбранное воздействие должно быть

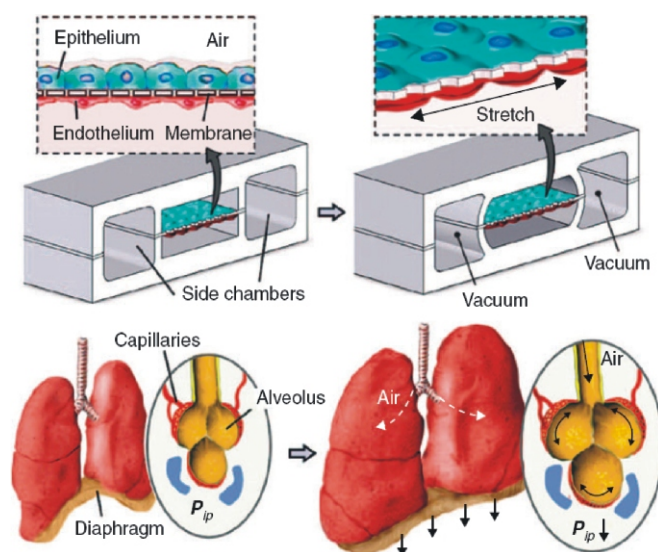


Рис. 3. Микрофлюидная альвеолярная модель с тонкой мембраной для стимуляции деформации присоединенных на ней эпителиальных клеток [15].

точным в чрезвычайно малом диапазоне сил. Классические методы нанесения травмы часто не отличаются достаточной точностью и не дают хорошо воспроизводимую картину. Для решения этой проблемы было создано специальное микрофлюидное устройство для контролируемого повреждения ткани. Его использование способствовало уточнению посттравматических механизмов регенерации, роста и транспорта первичных нейронов гиппокампа [16].

Важным для ряда специализированных типов клеток механическим воздействием является сдвиговая деформация. Механическое воздействие со стороны потока крови является ключевым фактором в нормальном функционировании эндотелиоцитов. Величина действующей на эндотелиоцит сдвиговой деформации зависит от гидродинамики, во многом определяемой геометрией сосудистого русла, которая часто бывает очень сложной из-за наличия многочисленных ветвлений и обилия нелинейных извитых участков. Использование МФУ для моделирования сосудистой системы является чрезвычайно эффективным и весьма распространенным подходом в связи с фундаментальным принципом микрофлюидики — использования активного массопереноса в системе микроканалов. Ту же задачу решает и кровеносная система, пронизывая различные ткани и органы и обеспечивая основу процессов жизнедеятельности [17].

Эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, непрерывно подвергаются действию напряжения сдвига и в ответ на него секретируют вещества, которые ингибируют свертывание крови, регулируют просвет кровеносных сосудов [18]. Напряжение сдвига также модулирует клеточную адгезию, проницаемость мембран и миграцию клеток [10]. Развитие экспериментальных методов исследования клеточных культур с использованием различных профилей напряжения сдвига имеет высокую фундаментальную значимость как для биомедицины в целом, так и для ангиологии и фармакотерапии [18].

Эндотелиальная дисфункция — ключевой патофизиологический механизм, который может вызывать тромбоз, атеросклероз и воспаление [19]. Предпринималось несколько попыток выяснить механизмы возникновения эндотелиальной дисфункции и обусловленных ей заболеваний на микрофлюидных моделях сосудов, однако из-за значительного числа факторов, вовлеченных в этот сложный процесс, пока не удалось этого сделать в полной мере [20—22]. Тем не менее, с использованием сосудов-на-чипе ряд исследователей определил, что воспалительная эндотелиальная активация, опосредованная фактором некроза опухоли альфа (TNF- α) и нарушенным потоком [23, 24], приводит к росту проницаемости эндотелия и протромботическим состояниям [25]. Ким и др. путем анализа транспорта наночастиц через монослой эндотелия в МФУ также подтвердил, что повышенная его проницаемость обусловлена воспалительной активацией [26]. Другие исследования с использованием МФУ продемонстрировали, что атеросклеротические поражения или образование тромбов происходят на участках эндотелия, экспрессирующих маркеры воспаления [27].

Важным аспектом исследования сосудистой системы и связанных с ней патологий является изучение процессов васкуляризации. Сосуды в основном формируются

в результате двух процессов: васкулогенеза и ангиогенеза. В первом, клетки эндотелиальных предшественников путем дифференцировки и ассоциации образуют новый сосуд [28], при ангиогенезе наблюдается разрастание существующих кровеносных сосудов [29]. Существует три основных фактора, индуцирующих рост сосудов: механический, химический и биологический [30, 31]. Недавние эксперименты по изучению ангиогенеза в микрофлюидных устройствах показали, что напряжения сдвига, создаваемые потоком жидкости, ослабляют ангиогенез в присутствии VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста) и кроме того, продемонстрировали, что интерстициальный поток регулирует морфологию сосудистых клеток в зависимости от направления градиента VEGF [32].

Исследования механизмов развития онкологических заболеваний — еще одна область, для которой *in vitro* моделирование сосудистых сетей имеет решающее значение. В этой связи можно рассмотреть два ключевых аспекта: ангиогенез в опухоли и метастазирование.

В ходе своего развития опухоль воздействует на близлежащие сосуды, изменяя их микроокружение путем механического воздействия и химических факторов. Так как опухолевые клетки снабжаются кислородом и другими питательными веществами преимущественно через кровеносные сосуды [33], понимание ангиогенеза в опухоли имеет важное значение для лечения онкологических заболеваний. В ряде исследований микрофлюидные устройства использовались для изучения ангиогенеза в опухолях путем совместного культивирования опухолевых клеток и эндотелия [34]. Так, Буканан и соавторы изучали корреляцию между напряжением сдвига и уровнем ангиогенных факторов, продуцируемых опухолью в трехмерной микрофлюидной модели [35]. Так как изменение pH является одним из признаков опухолевого роста в связи с переключениями метаболизма, измерялась также миграция эндотелиоцитов в МФУ при различных значениях pH в коллагеновом геле, содержащем несколько различных комбинаций клеток [36].

Процесс метастазирования опухолей является одним из ключевых событий опухолевого роста ввиду того, что около 90% смертности от рака приходится на последствия образования метастаз [37]. Полиорганный микрофлюидный чип, разработанный Ксу и коллегами, успешно воспроизводил инвазивный рост, метастазирование и пролиферацию клеток рака легких в целевом модельном органе [38]. Повреждение этих органов экстравазировавшими клетками рака легкого подтверждали по уровням соответствующих белков-маркеров. Берсини и соавторы имитировали процесс метастазирования рака молочной железы в костную и костномозговую ткань путем воспроизведения микроокружения с помощью мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека (BM-hMSC) [39]. Была показана более высокая скорость метастазирования для таких условий, что подтверждает важность микроокружения для развития метастатических сайтов. Кроме того, воспроизведение трехмерных микрососудистых сетей в микроокружении, имитирующем кости или мышцы, позволило *in vitro* провести исследование органоспецифического метастазирования опухолевых клеток [40].

Кровеносная система не является единственной сосудистой системой в организме. Важную роль играет также лимфатическая система, и ее нарушение может быть свя-

зано с различными заболеваниями, такими, как воспаление или метастазирующий рак. Ким и др. контролировали прорастание лимфатических эндотелиальных клеток в матрицу из фибрина путем управления рядом ростовых факторов и интерстициальным потоком в микрофлюидном устройстве, которое содержало фибробласты, помещенные в фибриновый гель [41].

Важным применением культивирования клеток в микрофлюидном формате является разработка и тестирование лекарственных препаратов [42]. С одной стороны, микрофлюидика предоставляет перспективные модели целевых тканей и органов для фармакотерапии, с другой, имеет огромный потенциал для автоматизации, создания градиентов концентраций и повышения производительности анализа [43]. Разработаны микрофлюидные чипы как для кратковременного культивирования клеток в присутствии фармакологических препаратов, так и для длительных исследований их действия на клетки.

Анализ единичных клеток

Применение микрофлюидных технологий внесло существенный вклад в такую перспективную область, как анализ отдельных клеток. Уже хорошо известно, что гетерогенность на уровне отдельных клеток является универсальным свойством живых организмов. В пределах одной ткани присутствуют клетки, по отдельности экспрессирующие разные маркеры данной ткани [44]. Традиционные «объемные» методы исследования предоставляют усредненные характеристики популяции, что может приводить к выпадению из внимания уникальных индивидуальных клеточных событий или даже неверным выводам. Так, например, некий средний уровень экспрессии определенного белка клетками может свидетельствовать как о приблизительно равном уровне экспрессии всеми клетками популяции, так и о существовании двух или более субпопуляций со значительно отличающимися уровнями экспрессии. Существует ряд методов, таких как проточная цитометрия, различные виды микроскопии, пэтч-клямп, метод оптического или магнитного пинцета, которые могут предоставить информацию о некоторых аспектах состояния отдельных клеток. Однако получение генетической информации о единичных клетках было сильно затруднено. Новая микрофлюидная технология позволяет упаковывать клетки в индивидуальные микрокапсулы, взвешенные в масле и пометать их специальным молекулярным «штрихкодом». После этого можно лизировать клетки и проводить ПЦР, частичное или полное секвенирование или другие манипуляции [45].

Отличительной особенностью микрофлюидного подхода к изучению отдельных клеток является высокая производительность. Такая методика открывает новые возможности как для изучения клеточной гетерогенности в норме, так и механизмов, связанные с развитием различных заболеваний. Так, например, секвенирование ДНК отдельных клеток выявило заметную гетерогенность внутри каждой опухоли, что способствовало значительному пересмотру модели клональной эволюции [46], тогда как секвенирование РНК пролило новый свет на роль микроокружения опухоли в прогрессировании заболевания и лекарственной устойчивости [47].

Выводы

Применение микрофлюидных чипов для исследований в области биологии и медицины является чрезвычайно перспективным. Основными преимуществами микрофлюидного формата являются возможность управления пространственным расположением клеток и прецизионный контроль параметров клеточного микроокружения. В обзоре приведен ряд примеров успешного трехмерного клеточного биомоделирования физиологических и патологических процессов *in vitro* с применением микрофлюидных чипов, позволивших выявить новые закономерности в исследуемых явлениях. Кроме того, использование микрофлюидных чипов открывает такие новые направления, как генетический анализ единичных клеток. Помимо фундаментальных преимуществ, микрофлюидный формат позволяет достигнуть высокой производительности, автоматизации и существенно снизить расход реагентов. Авторы считают, что внедрение микрофлюидики в биомедицинские исследования в дальнейшем будет только расширяться.

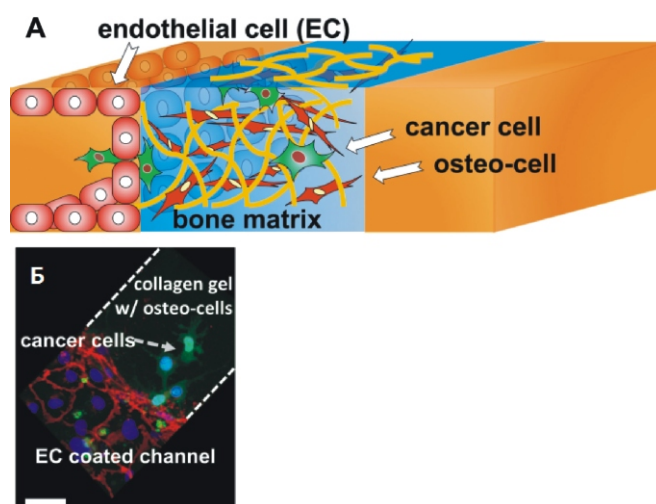


Рис. 4. Модель микрофлюидного чипа для изучения проникновения клеток рака груди в кость (А); трехмерная конфокальная реконструкция внедрения опухолевых клеток MDA-MB-231 через монослой эндотелиальных клеток в колагеновый гель, содержащий остеодифференцированные стволовые клетки (BM-hMSC) (Б) [39].

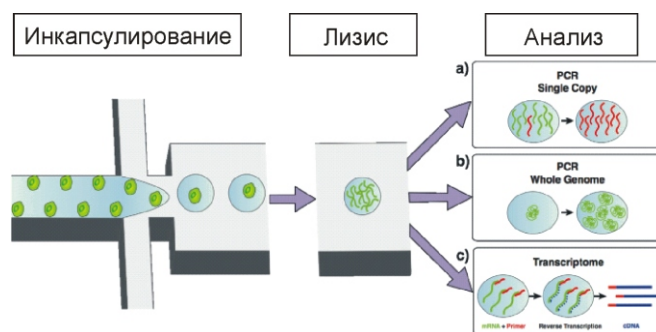


Рис. 5. Стадии анализа отдельных клеток с помощью технологии инкапсулирования в микрофлюидном чипе [45].

Список литературы

1. Xiong B., Ren K., Shu Y., Chen Y., Shen B., Wu H. Recent developments in microfluidics for cell studies. *Adv. Mater.* 2014; 26(31): 5525-32. DOI: 10.1002/adma.201305348
2. Halldorsson S., Lucumi E., Gomez-Sjoberg R., Fleming R.M. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 218-31. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.029
3. Erickson D., Li D. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta.* 2004; 507: 11-26
4. Inamdar N.K., Borenstein J.T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology.* 2011; 22: 681-9. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.05.512
5. Рубцов Н.Б., Попик В.М., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А. *Микрофлюидные устройства в биологии и конструирование биосенсоров.* Новосибирск: 2004.
6. Webster A., Greenman J., Haswella S.J. Development of microfluidic devices for biomedical and clinical application. *Chem. Technol. Biotechnol.* 2011; 86: 10-7. DOI: 10.1002/jctb.2482
7. Primiceri E., Chiriac M.S., Rinaldi R., Maruccio G. Cell chips as new tools for cell biology — results, perspectives and opportunities. *Lab. on a Chip.* 2013. DOI: 10.1039/c3lc50550b
8. Young E.W., Beebe D.J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem. Soc. Rev.* 2010; 39(3): 1036-48. DOI: 10.1039/b909900j
9. Московцев А.А., Колесов Д.В., Мыльникова А.Н., Зайченко Д.М., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Ответы эндотелиальных клеток на деформацию сдвига: Механотрансдукция, клеточный стресс и адаптация. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(4): 112-25.
10. Sung J.H., Shuler M.L. Microtechnology for Mimicking In Vivo Tissue Environment. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40(6): 1289-300. DOI: 10.1007/s10439-011-0491-2
11. Khanal G., Chung K., Solis-Wever X., Johnson B., Pappas D. Ischemia/Reperfusion Injury of Primary Porcine Cardiomyocytes in a Low-Shear Microfluidic Culture and Analysis Device. *Analyst.* 2011; 136(17): 3519-26. DOI: 10.1039/c0an00845a
12. Keith H.K., Wong J., Chan M., Kamm R.D., Tien J. Microfluidic Models of Vascular Functions. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2012; 14: 205-30.
13. Chang C.W., Cheng Y.J., Tu M., Chen Y.H., Peng C.C., Liao W.H., Tung Y.C. A polydimethylsiloxane-polycarbonate hybrid microfluidic device capable of generating perpendicular chemical and oxygen gradients for cell culture studies. *Lab. Chip.* 2014; 14: 3762-72. DOI: 10.1039/c4lc00732h
14. Bhatia S.N., Ingber D.E. *Microfluidic organs-on-chips.* Nature biotechnology; 2014.
15. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science.* 2010; 328:1662-8. DOI: 10.1126/science.1188302
16. Taylor A.M., Blurton-Jones M., Rhee S.W., Cribbs D.H., Cotman C.W., Jeon N. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods.* 2005; 2(8): 599-605. DOI: 10.1038/nmeth777
17. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473: 298-307. DOI: 10.1038/nature10144
18. Hattori K., Munehira Y., Kobayashi H., Satoh T., Sugiura Sh., Kanamori T. Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function. *J. Biosci. Bioeng.* 2014; 118 (3): 327-32. DOI: 10.1016/j.jbi-osc.2014.02.006
19. Barakat A.I. Blood flow and arterial endothelial dysfunction: Mechanisms and implications. *C. R. Phys.* 2013, 14, 479-96.
20. Hansen R.R., Wufsus A.R., Barton S.T., Onasoga A.A., Johnson-Paben R.M., Neeves K.B. High content evaluation of shear dependent platelet function in a microfluidic flow assay. *Ann. Biomed. Eng.* 2013; 41: 250-62.
21. Shen F., Kastrop C.J., Liu Y.; Ismagilov R.F. Threshold response of initiation of blood coagulation by tissue factor in patterned microfluidic capillaries is controlled by shear rate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 2035-41.
22. Kim S.K., Moon W.K., Park J.Y., Jung H. Inflammatory mimetic microfluidic chip by immobilization of cell adhesion molecules for T cell adhesion. *Analyst.* 2012; 137: 4062-8. DOI: 10.1039/c2an35424a
23. Tsai M., Kita A., Leach J., Rounsevell R., Huang J.N., Moake J., Ware R.E., Fletcher D.A., Lam W.A. *In vitro* modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology. *J. Clin. Investig.* 2012; 122: 408-18.
24. Thomas A., Daniel Ou-Yang H., Lowe-Krentz L., Muzykantov V.R., Liu Y. Biomimetic channel modeling local vascular dynamics of pro-inflammatory endothelial changes. *Biomed. Microfluidics.* 2016; 10: 014101
25. Zheng Y., Chen J., Craven M., Choi N.W., Totorica S., Diaz-Santana A., Kermani P., Hempstead B., Fischbach-Teschl C., Lopez J.A., Stroock A.D. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109: 9342-7. DOI: 10.1073/pnas.1201240109
26. Kim Y., Lobatto M.E., Kawahara T., Lee Chung B., Mieszawska A.J., Sanchez-Gaytan B.L., Fay F., Senders M.L., Calcagno C., Becraft J., Tun Saung M., Gordon R.E., Stroes E.S., Ma M., Farokhzad O.C., Fayad Z.A., Mulder W.J., Langer R. Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 1078-83. DOI: 10.1073/pnas.1322725111
27. Estrada R., Giridharan G.A., Nguyen, M.D., Prabhu, S.D., Sethu P. Microfluidic endothelial cell culture model to replicate disturbed flow conditions seen in atherosclerosis susceptible regions. *Biomed. Microfluidics.* 2015.
28. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6: 389-96. DOI: 10.1038/74651
29. Adams R.H., Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 464-78. DOI: 10.1038/nrm2183
30. Abaci H.E., Drazer G., Gerech S. Recapitulating the vascular microenvironment in microfluidic platforms. *Nano LIFE.* 2013; 3: 1340001
31. Resnick N., Yahav H., Shay-Salit A., Shushy M., Schubert S., Zilberman L.C.M., Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: For better and for worse. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003; 81: 177-99.
32. Young E.W. Advances in Microfluidic Cell Culture Systems for Studying Angiogenesis. *J. Lab. Automation.* 2013; 18(6): 427-37. DOI: 10.1177/2211068213495206
33. Gimbrone M.A., Cotran R.S., Leapman S.B., Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 52: 413-27.
34. Cross V.L., Zheng Y., Won Choi N., Verbridge S.S., Suter-master B.A., Bonassar L.J., Fischbach C., Stroock A.D. Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabrication for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis *in vitro.* *Biomaterials.* 2010; 31: 8596-607. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.072
35. Buchanan C.F., Verbridge S.S., Vlachos P.P., Rylander M.N. Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model. *Cell Adhes. Migr.* 2014; 8: 517-24. DOI:10.4161/19336918.2014.970001.
36. Chung S., Sudo R., Mack P.J., Wan C.-R., Vickerman V., Kamm R.D. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab. Chip.* 2009; 9: 269-75.
37. Weigelt B., Peterse J.L., Van't Veer L.J. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5: 591-602. DOI: 10.1039/b807585a
38. Xu Z., Li E., Guo Z., Yu R., Hao H., Xu Y., Sun Z., Li X., Lyu J., Wang Q. Design and construction of a multi-organ microfluidic chip mimicking the in vivo microenvironment of lung cancer metastasis. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016; 8: 25840-7. DOI: 10.1021/acsami.6b08746
39. Bersini S., Jeon, J.S., Dubini G., Arrigoni C., Chung S., Charest J.L., Moretti M., Kamm R.D. A microfluidic 3D in vitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials.* 2014; 35: 2454-61. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.050.
40. Jeon J.S., Bersini S., Gilardi M., Dubini G., Charest J.L., Moretti M., Kamm R.D. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112: 214-9. DOI: 10.1073/pnas.1417115112.
41. Kim S., Chung M., Jeon N.L. Three-dimensional biomimetic model to reconstitute sprouting lymphangiogenesis in vitro. *Biomaterials.* 2016; 78: 115-28. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.019

42. Wu M.H., Huang S.B., Lee G B. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab. Chip.* 2010; 10: 939-56. DOI: 10.1039/b921695b

43. Hung P.J., Lee P.J., Sabounchi P., Lin R., Lee L.P. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 89: 1-8. DOI: 10.1002/bit.20289

44. Walling M.A., Shepard J.R.E. Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chem. Soc. Rev.* 2011; 40:4049-76. DOI: 10.1039/c0cs00212g

45. Reece A., Xia B., Jiang Z., Noren B., McBride R., Oakey J. Microfluidic Techniques for High Throughput Single Cell Analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 40: 90-6. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.02.015

46. Wang Y., Waters J., Leung M.L., Unruh A., Roh W., Shi X., Chen K., Scheet P., Vattathil S., Liang H., Multani A., Zhang H., Zhao R., Michor F., Meric-Bernstam F., Navin N.E. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature.* 2014; 512: 155-60. DOI: 10.1038/nature13600

47. Tirosh I., Izar B., Prakadan S.M., Wadsworth M.H. 2nd, Treacy D., Trombetta J.J., Rotem A., Rodman C., Lian C., Murphy G., Fallahi-Sichani M., Dutton-Regester K., Lin J.R., Cohen O., Shah P., Lu D., Genshaft A.S., Hughes T.K., Ziegler C.G., Kazer S.W., Gaillard A., Kolb K.E., Villani A.C., Johannessen C.M., Andreev A.Y., Van Allen E.M., Bertagnolli M., Sorger P.K., Sullivan R.J., Flaherty K.T., Frederick D.T., Jane-Valbuena J., Yoon C.H., Rozenblatt-Rosen O., Shalek A.K., Regev A., Garraway L.A. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science.* 2016; 352:189-96. DOI: 10.1126/science.aad0501

References

1. Xiong B., Ren K., Shu Y., Chen Y., Shen B., Wu H. Recent developments in microfluidics for cell studies. *Adv. Mater.* 2014; 26(31): 5525-32. DOI: 10.1002/adma.201305348

2. Halldorsson S., Lucumi E., Gomez-Sjoberg R., Fleming R.M. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 218-31. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.029

3. Erickson D., Li D. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta.* 2004; 507: 11-26. DOI: 10.1016/j.aca.2003.09.019

4. Inamdar N.K., Borenstein J.T. Microfluidic cell culture models for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology.* 2011; 22: 681-9. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.05.512

5. Rubtsov N.B., Popik V.M., Pel'tek S.Ye., Kolchanov N.A. [Microfluidic devices in biology and design of biosensors]. Novosibirsk; 2004. (in Russian)

6. Webster A., Greenman J., Haswella S.J. Development of microfluidic devices for biomedical and clinical application. *Chem. Technol. Biotechnol.* 2011; 86(1): 10-7. DOI: 10.1002/jctb.2482

7. Primiceri E., Chiriac M.S., Rinaldi R., Maruccio G. Cell chips as new tools for cell biology — results, perspectives and opportunities. *Lab. on a Chip.* 2013. DOI: 10.1039/c3lc50550b

8. Young E.W., Beebe D.J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. *Chem. Soc. Rev.* 2010; 39(3): 1036-48. DOI: 10.1039/b909900j

9. Moskovtsev A.A., Kolesov D.V., Myl'nikova A.N., Zaychenko D.M., Sokolovskaya A.A., Kubatiyev A.A. [Endothelial cell responses to shear strain: Mechanotransduction, cellular stress and adaptation]. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy]*. 2017; 61(4): 112-25. (in Russian)

10. Sung J.H., Shuler M.L. Microtechnology for Mimicking In Vivo Tissue Environment. *Ann. Biomed. Eng.* 2012; 40(6): 1289-300. DOI: 10.1007/s10439-011-0491-2

11. Khanal G., Chung K., Solis-Wever X., Johnson B., Pappas D. Ischemia/Reperfusion Injury of Primary Porcine Cardiomyocytes in a Low-Shear Microfluidic Culture and Analysis Device. *Analyst.* 2011; 136(17): 3519-26. DOI: 10.1039/c0an00845a

12. Keith H.K., Wong J., Chan M., Kamm R.D., Tien J. Microfluidic Models of Vascular Functions. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2012; 14: 205-30.

13. Chang C.W., Cheng Y.J., Tu M., Chen Y.H., Peng C.C., Liao W.H., Tung Y.C. A polydimethylsiloxane-polycarbonate hybrid microfluidic device capable of generating perpendicular chemical and oxygen gradients for cell culture studies. *Lab. Chip.* 2014; 14: 3762-72. DOI: 10.1039/c4lc00732h

14. Bhatia S.N., Ingber D.E. *Microfluidic organs-on-chips*. Nature biotechnology; 2014.

15. Huh D., Matthews B.D., Mammoto A., Montoya-Zavala M., Hsin H.Y., Ingber D.E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science.* 2010; 328:1662-8. DOI: 10.1126/science.1188302

16. Taylor A.M., Blurton-Jones M., Rhee S.W., Cribbs D.H., Cotman C.W., Jeon Li N. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods.* 2005; 2(8): 599-605. DOI: 10.1038/nmeth777

17. Carmeliet P., Jain R.K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011; 473: 298-307. DOI: 10.1038/nature10144

18. Hattori K., Munehira Y., Kobayashi H., Satoh T., Sugiura Sh., Kanamori T. Microfluidic perfusion culture chip providing different strengths of shear stress for analysis of vascular endothelial function. *J. Biosci. Bioeng.* 2014; 118 (3): 327-32. DOI: 10.1016/j.jbioso.2014.02.006

19. Barakat A.I. Blood flow and arterial endothelial dysfunction: Mechanisms and implications. *C. R. Phys.* 2013, 14, 479-96.

20. Hansen R.R., Wufsus A.R., Barton S.T., Onasoga A.A., Johnson-Paben R.M., Neeves K.B. High content evaluation of shear dependent platelet function in a microfluidic flow assay. *Ann. Biomed. Eng.* 2013; 41: 250-62.

21. Shen F., Kastrop C.J., Liu Y.; Ismagilov R.F. Threshold response of initiation of blood coagulation by tissue factor in patterned microfluidic capillaries is controlled by shear rate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28: 2035-41.

22. Kim S.K., Moon W.K., Park J.Y., Jung H. Inflammatory mimetic microfluidic chip by immobilization of cell adhesion molecules for T cell adhesion. *Analyst.* 2012; 137: 4062-8. DOI: 10.1039/c2an35424a

23. Tsai M., Kita A., Leach J., Rounsevell R., Huang J.N., Moake J., Ware R.E., Fletcher D.A., Lam W.A. *In vitro* modeling of the microvascular occlusion and thrombosis that occur in hematologic diseases using microfluidic technology. *J. Clin. Investig.* 2012; 122: 408-18.

24. Thomas A., Daniel Ou-Yang H., Lowe-Krentz L., Muzykantov V.R., Liu Y. Biomimetic channel modeling local vascular dynamics of pro-inflammatory endothelial changes. *Biomicrofluidics.* 2016; 10: 014101

25. Zheng Y., Chen J., Craven M., Choi N.W., Totorica S., Diaz-Santana A., Kermani P., Hempstead B., Fischbach-Teschl C., Lopez J.A., Stroock A.D. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109: 9342-7. DOI: 10.1073/pnas.1201240109

26. Kim Y., Lobatto M.E., Kawahara T., Lee Chung B., Mieszawska A.J., Sanchez-Gaytan B.L., Fay F., Senders M.L., Calcagno C., Becraft J., Tun Saung M., Gordon R.E., Stroes E.S., Ma M., Farokhzad O.C., Fayad Z.A., Mulder W.J., Langer R. Probing nanoparticle translocation across the permeable endothelium in experimental atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111: 1078-83. DOI: 10.1073/pnas.1322725111

27. Estrada R., Giridharan G.A., Nguyen, M.D., Prabhu, S.D., Sethu P. Microfluidic endothelial cell culture model to replicate disturbed flow conditions seen in atherosclerosis susceptible regions. *Biomicrofluidics.* 2015.

28. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 2000; 6: 389-96. DOI: 10.1038/74651

29. Adams R.H., Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8: 464-78. DOI: 10.1038/nrm2183

30. Abaci H.E., Drazer G., Gerecht S. Recapitulating the vascular microenvironment in microfluidic platforms. *Nano LIFE.* 2013; 3: 1340001

31. Resnick N., Yahav H., Shay-Salit A., Shushy M., Schubert S., Zilberman L.C.M., Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: For better and for worse. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2003; 81: 177-99.

32. Young E.W. Advances in Microfluidic Cell Culture Systems for Studying Angiogenesis. *J. Lab. Automation.* 2013; 18(6): 427-37. DOI: 10.1177/2211068213495206

33. Gimbrone M.A., Cotran R.S., Leapman S.B., Folkman J. Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974; 52: 413-27.

34. Cross V.L., Zheng Y., Won Choi N., Verbridge S.S., Suter-master B.A., Bonassar L.J., Fischbach C., Stroock A.D. Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabricati-

on for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis *in vitro*. *Biomaterials*. 2010; 31: 8596-607. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.072

35. Buchanan C.F., Verbridge S.S., Vlachos P.P., Rylander M.N. Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model. *Cell Adhes. Migr.* 2014; 8: 517-24. DOI:10.4161/19336918.2014.970001.

36. Chung S., Sudo R., Mack P.J., Wan C.-R., Vickerman V., Kamm R.D. Cell migration into scaffolds under co-culture conditions in a microfluidic platform. *Lab. Chip*. 2009; 9: 269-75.

37. Weigelt B., Peterse J.L., Van't Veer L.J. Breast cancer metastasis: Markers and models. *Nat. Rev.Cancer*. 2005; 5: 591-602. DOI: 10.1039/b807585a

38. Xu Z., Li E., Guo Z., Yu R., Hao H., Xu Y., Sun Z., Li X., Lyu J., Wang Q. Design and construction of a multi-organ microfluidic chip mimicking the *in vivo* microenvironment of lung cancer metastasis. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016; 8: 25840-7. DOI: 10.1021/acsami.6b08746

39. Bersini S., Jeon, J.S., Dubini, G., Arrigoni C., Chung S., Charest J.L., Moretti M., Kamm R.D. A microfluidic 3D *in vitro* model for specificity of breast cancer metastasis to bone. *Biomaterials*. 2014; 35: 2454-61. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.050.

40. Jeon J.S., Bersini S., Gilardi M., Dubini G., Charest J.L., Moretti M., Kamm R.D. Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112: 214-9. DOI: 10.1073/pnas.1417115112.

41. Kim S., Chung M., Jeon N.L. Three-dimensional biomimetic model to reconstitute sprouting lymphangiogenesis *in vitro*. *Biomaterials*. 2016; 78: 115-28. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.019

42. Wu M.H., Huang S.B., Lee G.B. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab. Chip*. 2010; 10: 939-56. DOI: 10.1039/b921695b

43. Hung P.J., Lee P.J., Sabounchi P., Lin R., Lee L.P. Continuous perfusion microfluidic cell culture array for high-throughput cell-based assays. *Biotechnol. Bioeng.* 2005; 89: 1-8. DOI: 10.1002/bit.20289

44. Walling M.A., Shepard J.R.E. Cellular heterogeneity and live cell arrays. *Chem. Soc. Rev.* 2011; 40:4049-76. DOI: 10.1039/c0cs00212g

45. Reece A., Xia B., Jiang Z., Noren B., McBride R., Oakey J. Microfluidic Techniques for High Throughput Single Cell Analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016; 40: 90-6. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.02.015

46. Wang Y., Waters J., Leung M.L., Unruh A., Roh W., Shi X., Chen K., Scheet P., Vattathil S., Liang H., Multani A., Zhang H., Zhao R., Michor F., Meric-Bernstam F., Navin N.E. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature*. 2014; 512: 155-60. DOI: 10.1038/nature13600

47. Tirosh I., Izar B., Prakadan S.M., Wadsworth M.H. 2nd, Treacy D., Trombetta J.J., Rotem A., Rodman C., Lian C., Murphy G., Fallahi-Sichani M., Dutton-Regester K., Lin J.R., Cohen O., Shah P., Lu D., Genshaft A.S., Hughes T.K., Ziegler C.G., Kazer S.W., Gailard A., Kolb K.E., Villani A.C., Johannessen C.M., Andreev A.Y., Van Allen E.M., Bertagnolli M., Sorger P.K., Sullivan R.J., Flaherty K.T., Frederick D.T., Jane-Valbuena J., Yoon C.H., Rozenblatt-Rosen O., Shalek A.K., Regev A., Garraway L.A. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016; 352:189-96. DOI: 10.1126/science.aad0501

Сведения об авторах:

Мыльникова Алёна Николаевна — аспирант².

Колесов Дмитрий Валерьевич — научный сотрудник лаборатории функциональной ангиопротеомии и метаболомики¹.

Московцев Алексей Александрович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови¹, доцент кафедры общей патологии и патофизиологии³.

Соколовская Алиса Анатольевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови¹.

Юрков Василий Андреевич — доктор медицинских наук, академик РАН, главный научный сотрудник⁴

Кубатиев Аслан Амирханович — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель¹, заведующий кафедрой общей патологии и патофизиологии³.

УДК 616-006.4:615.28
DOI:

Культуры клеток злокачественных новообразований человека в разработке новых противоопухолевых препаратов

Чернов А.Н., Баранцевич Е.П., Галимова Э.С., Галагудза М.М.

Институт экспериментальной медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, ул. Акkuratова, д. 2

Современный эффективный скрининг новых противоопухолевых химиопрепаратов и биологических препаратов на доклиническом этапе невозможен без применения моделей культур опухолевых клеток. К таким моделям относят первичные культуры клеток и клеточные линии опухолей человека, культивируемые в двумерной (2D) и трехмерной (3D) системах. В обзоре обсуждаются различные аспекты применения моделей клеточных культур неоплазий человека, их актуальность в исследованиях противоопухолевой эффективности препаратов.

Ключевые слова: рак, культура клеток, противоопухолевая активность, скрининг *in vitro*, панель линий клеток рака, двумерная (2D) модель культуры клеток, трехмерная (3D) модель культуры клеток.

Для цитирования: Чернов А.Н., Баранцевич Е.П., Галимова Э.С., Галагудза М.М. Культуры клеток злокачественных новообразований человека в разработке новых противоопухолевых препаратов. Патогенез. 2017; 15(4): 13—23

Для корреспонденции: Баранцевич Елена Петровна, e-mail: lenabara2003@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 03.10.2017

Cell cultures of human malignant tumors in development of new anticancer therapies

Chernov A.N., Barantsevich E.P., Galimova E.S., Galagudza M.M.

V.A. Almazov National Medical Research Center, Akkuratova Str. 2, St. Petersburg 197341, Russian Federation

Current effective preclinical screening of new anticancer chemotherapies and biological medicines requires cancer cell culture models. Such models include primary cell cultures and human tumor cell lines cultured in two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) systems. This review discussed different aspects of using human tumor cell culture models and their relevance for studying efficacy of antitumor drugs.

Keywords: cancer, cell culture, anticancer drug efficacy, *in vitro* screening, panel of cancer cell lines, two-dimensional (2D) model of cell culture, three-dimensional (3D) model of cell culture.

For citation: Chernov A.N., Barantsevich E.P., Galimova E.S., Galagudza M.M. Cell cultures of human malignant tumors in development of new anticancer therapies. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15(4): 13—23 (in Russian)

For correspondence: Barantsevich Elena Petrovna, e-mail: lenabara2003@inbox.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 03.10.2017

Введение

В последние годы были достигнуты заметные успехи в терапии злокачественных новообразований, что в значительной степени обусловлено введением в клиническую практику новых поколений химических и биологических соединений. Практика показала, что клинические испытания вновь разработанных противораковых препаратов весьма дорогостоящи и при отсутствии надежных данных о безопасности, полученных на доклиническом этапе, могут быть сопряжены с риском развития серьезных побочных эффектов, инвалидизации и летального исхода у онкологических больных. Доклинический скрининг препаратов, таким образом, является важнейшим

этапом, предшествующим введению новых противоопухолевых препаратов в клиническую практику. Для обеспечения релевантных данных на доклиническом этапе исследования новых субстанций необходимо постоянное совершенствование методологии применения клеточных культур.

Стандарты, предъявляемые к проведению доклинических испытаний препаратов в США [1, 2, 3], Великобритании [2], Европейском Союзе [3] и Российской Федерации [4] изложены в «Надлежащей лабораторной практике» (Good Laboratory Practice, GLP) и «Надлежащей практике клеточного культивирования» (Good Cell Culture Practice, GCCP) [1, 5, 6]. В качестве моделей для тестиро-

вания химических соединений и препаратов на противоопухолевую активность используют гетерогенные и гомогенные панели линий клеток рака, первичные культуры клеток опухолей с применением двумерных (2D), псевдодвумерных и трехмерных систем культур клеток (3D) [1, 4, 6, 7, 8, 9]. Широкому применению культур клеток в качестве моделей послужила простота их использования, а также возможность изучения целого ряда процессов и явлений на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях, которые затруднительно или невозможно исследовать на экспериментальных животных.

В области экспериментальной онкологии с применением двумерной культуральной модели изучают прямое цитотоксическое влияние препаратов, аддитивные, синергические и антагонистические эффекты комбинаций препаратов, механизмы общей лекарственной и перекрестной резистентности, химиочувствительность клеток опухолей пациентов на разных этапах химиотерапии. Однако по современным представлениям двумерные культуры клеток не всегда могут обеспечить достоверный прогноз действия исследуемого препарата *in vivo*. Это связывают с невозможностью воспроизведения в 2D моделях гистоархитектуры и микроокружения опухоли. Поэтому, в последнее время большое внимание уделяют разработке и совершенствованию 3D моделей [10, 11]. Трехмерные системы культур клеток позволяют имитировать условия микроокружения опухоли, гетерогенность ее клеточного состава, патофизиологические, биохимические и молекулярные характеристики, условия развития неоплазии в организме (гипоксия, насыщение ткани кислородом, транспорт химических соединений через физиологические барьеры).

Настоящий обзор посвящен анализу преимуществ и недостатков применения гомогенных и гетерогенных клеточных линий, а также первичных культур клеток в двумерных, псевдодвумерных и трехмерных моделях для скрининга противоопухолевых соединений.

Двумерные (2D) модели культуры клеток опухолей

Двумерная модель подразумевает культивирование опухолевых клеток в монослое, что обеспечивает равномерный доступ к компонентам среды. Технологии двумерного культивирования широко применяются при использовании таких методов оценки противоопухолевой активности химических соединений и биопрепаратов, как метил-тетразолиевый тест (МТТ, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide test), тест на колониобразование (CFA, colonic formation assay), дифференциальное окрашивание на цитотоксичность (DiSC, differential staining cytotoxicity assay), оценка жизнеспособности клеток по уровню аденозинтрифосфорной кислоты (ATP cell viability assay), определение лекарственной чувствительности стволовых опухолевых клеток (HTDA, human tumor stem cell drug sensitivity assay) [12, 13, 14, 15, 16].

Однако, монослойная организация культуры не позволяет учитывать воздействие естественного клеточного микроокружения, присутствующего как в организме, так и при конструировании псевдодвумерных и 3D моделей, что влияет на химиочувствительность опухолевых клеток. Кроме того, 2D модели не позволяют оценить фармакокинетику и транспорт химических соединений к опухолевым клеткам. Растущие в 2D условиях клетки обычно бо-

лее плоские и вытянутые по сравнению с клетками организма и 3D культур. В основе этого явления лежит измененная экспрессия поверхностных рецепторов, молекул клеточной и межклеточной адгезии. Измененная морфология клеток может оказывать влияние на различные физиологические параметры, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку, экспрессию генов и белков, апоптоз [17]. Тем не менее, традиционная двумерная культуральная модель по-прежнему является распространенной тестовой платформой *in vitro* при скрининге лекарственных препаратов.

2D модели клеточных линий опухолей человека в изучении противоопухолевой активности

В 1990 г. Национальным институтом рака США был принят протокол фармацевтического скрининга, включающий тестирование препаратов на панели из 60 линий клеток опухолей человека (NCI60). В панель NCI60 включены клеточные линии рака молочной железы, кишечника, почек, легкого, яичников, простаты, меланомы, лейкоза и опухолей центральной нервной системы [8]. Согласно статистике, ежегодно панель NCI60 используется для скрининга противоопухолевой активности приблизительно 2500 препаратов, по результатам которого только 2% переходят на следующий этап исследований *in vivo*. Противоопухолевый препарат допускается к следующему этапу скрининга *in vivo* в тех случаях, когда вызывает гибель клеток хотя бы одной клеточной линии, обладает уникальным механизмом действия *in vitro*, или же для подавления роста клеток требуется очень низкая его концентрация [8]. Особенностью данного теста является его ориентация не на препарат, а на заболевание, по отношению к которому химическое соединение показало потенциальный терапевтический эффект [7, 9].

Химическая модификация биологически активных соединений природного происхождения является одним из наиболее эффективных подходов в разработке лекарственных препаратов. Так, кумарины являются важным классом природных органических соединений, которые преимущественно встречаются у высших растений и обладают разнообразной фармакологической активностью. О. Galayev и соавторы синтезировали 14 новых гетероциклических соединений из серии 7-гидрокси-8-метил-кумаринов, и на панели NCI60 выявили наибольшую активность индолкумарина 6-(6-фтор-1H-индол-2-ил)-7-гидрокси-4,8-диметил-2H-хромен-2-он в отношении линии клеток HOP-92 немелкоклеточного рака легкого (GI50/TGI/LC50 0,95/4,17/29,9 мкМ/л соответственно) [18]. Группа ученых из США установила противоопухолевую активность у соединения HLBT-100, относящегося к классу флаванонов растения Тилландсия отогнутая (*Tillandsia recurvata*). В антипролиферативном тесте WST-1 флаванон ингибировал рост линий клеток глиобластомы (U87 MG), нейробластомы (IMR-32), рака молочной железы (MDA-MB231), В-клеточного лимфобластного лейкоза (MV4-11), меланомы (A375) и простаты (PC3) в IC50 концентрациях 0,054, 0,05, 0,030, 0,024, 0,003 и 0,031 мкМ/л соответственно. Соединение увеличивало численность клеток в G₁ фазе клеточного цикла, повышало активность каспазы-3 и -7, а также фрагментацию ДНК. Противоопухолевая активность HLBT-100 была

установлена также в отношении клеточных линий рака кишечника и яичников [19].

R. Romagnoli и соавторы на панели NCI60 протести- ровали ингибитор полимеризации тубулина 1-(3',4',5'-триметоксифенил)-2-арил-1H-имидазол и его аналоги. Авторы показали, что аналог, содержащий хлор- и этокси-группы в мета- и пара-положениях имидазоль- ного кольца, имеет самое низкое значение IC₅₀ (0,4–3,8 нМ/л) для 7 клеточных линий: HeLa, HT-29, A549, MCF-7, Jurkat, RS411 и HL-60 [20].

Один из наиболее значимых результатов с использо- ванием панели NCI60 был получен при анализе противо- опухолевой активности модифицированной борной кис- лоты — бортезомиба, ингибирующего в клетках миеломы активность протеасомы 26S. Механизм гибели клеток ми- еломы заключался в ингибировании ядерного транскрип- ционного фактора κB [21]. Исследователи из Университе- та Хельсинки и Школы медицины Университета Джона Хопкинса идентифицировали ингибитор РНК полимера- зы I — VMH-21, и обнаружили у него противоопухолевый эффект. Авторы показали, что VMH-21 связывается с GC-богатыми последовательностями ДНК и вызывает протеосомно-зависимый распад белка RPA194 — компо- нента большой каталитической субъединицы РНК-поли- меразы I, тем самым ингибируя ее активность [22]. Со- гласно результатам последних исследований, РНК-поли- меразы I является перспективной мишенью для противо- раковой терапии.

A. Sato и соавторы синтезировали новый, менее токсичный по сравнению с предыдущими аналогами CC-1065 и дуокармицином, препарат индолкарбоксамид ML-970 (известный также как AS-1-145 и NSC 716970), который связывается с AT-богатыми последовательности- ми ДНК и алкилирует ДНК [23]. Скрининг на панели NCI60 показал, что ML-970 обладает выраженным проти- воопухолевым действием со средним значением концент- рации 50%-го максимального ингибирования клеточной пролиферации (GI₅₀) 34 нМ/л [24].

Приведенные исследования демонстрируют, что на панели клеточных линий опухолей человека NCI60 мож- но не только оценить противоопухолевый эффект тести- руемых химических соединений и препаратов, но и изу- чить механизмы их действия. Продолжительность теста с использованием панели NCI60 составляет всего 2 суток, что положительно отличает эту модель от других панелей клеточных линий, 3D моделей и первичных культурах клеток [7, 9]. NCI60 до сих пор остается самой мощной панелью линий клеток рака человека для высокопроизво- дительного скрининга противоопухолевых препаратов.

Гетерогенная модель JFCR39 (Japanese Foundation for Cancer Research 39), включающая панель из 39 клеточных линий рака человека в сочетании с базой данных об ак- тивности препаратов основывается на NCI60, но исполь- зуется реже [9, 25]. Подобно NCI60, JFCR39 может пред- сказывать механизм действия или молекулярную мишень противоопухолевого средства с использованием алгорит- ма COMPARE. Эту панель применили для исследования ингибитора фосфотидилинозитол-3-киназы — ZSTK474 (2-(2-difluoromethylbenzoimidazol-1-yl)-4, 6-dimorpholi- no-1, 3, 5-triazine) и некоторых других противоопухоле- вых средств, которые в дальнейшем вошли в клинические испытания [25].

Из-за ограниченной мощности панели NCI60, испо- лзующей 60 линий раковых клеток для обнаружения биомаркеров, недавно было проведено несколько иссле- дований с использованием больших коллекций линий ра- ковых клеток, для которых были получены обширные данные фенотипов чувствительности на лекарственные средства по целому ряду цитотоксических и таргетных препаратов. Исследовательские группы из Гарвардского Университета и Массачусетского технологического ин- ститута совместно с компанией «Новартис» создали об- щественный ресурс «Энциклопедия линий клеток рака» (Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE), который объеди- нил данные о геноме рака и противоопухолевых соедине- ниях-кандидатах. Данная база содержит информацию о генетических и фармакологических характеристиках бо- лее 1000 клеточных линий рака человека [26]. Проекты «Геном рака» (Cancer Genome Project, CGP) при Инсти- тUTE Сенгера и «Атлас генома рака» (The Cancer Genome Atlas, TCGA) при Национальном институте рака США включают базу данных «Genomics of Drug Sensitivity in Cancer» (GDSC) с информацией о 1074 клеточных линиях и чувствительности к противоопухолевым препаратам [27]. Оба проекта направлены на поиск мутаций, вызыва- ющих развитие онкологических заболеваний у человека и оценку чувствительности опухолей к химиопрепаратам и биопрепаратам. Таким образом, «Энциклопедия клеточ- ных линий рака», «Геном рака» и «Атлас генома рака» об- легчают проведение фармакогенетических и фармакоге- номных исследований.

Помимо гетерогенных, разработаны и гомогенные мо- дели клеточных линий опухолей человека для тестирова- ния химических соединений и препаратов на противоопу- холевую активность. К ним относятся панели клеточных линий рака молочной железы (Breast cancer cell line panel), колоректального рака (CRC, Colorectal cancer cell line panel) и глиобластомы (GSK, glioblastoma stem cell) [9, 28]. Исследователи из Шеньянского фармацевтического уни- верситета синтезировали тимосапонин A-III — сапонин, выделенный из корневищ растения *Annemarrhena asphode- loides*, который является перспективным соединением для лечения рака, и провели оценку противоопухолевой ак- тивности на панели из шести линий клеток рака молоч- ной железы MCF-7 с использованием МТТ анализа *in vi- tro* [29]. Полученные результаты показали, что соединения 5h, 5i и 5n проявляют значительную цитотоксическую ак- тивность, превышающую таковую у исходного соедине- ния сарсасапогенина. Дальнейший анализ механизма действия 5n показал, что он задерживал клетки MCF-7 в G₂/M фазе, а также индуцировал апоптоз и некроз.

Американские исследователи на панели рака молоч- ной железы и клеточных линиях эпителиоцитов молоч- ной железы оценили их чувствительность к эверолимусу [30]. Авторы показали, что препарат потенцирует антими- тогенную активность тамоксифена, фулвестранта и тра- стузумаба в клеточных линиях рака молочной железы, экс- прессии рецепторы эстрогена (ER) и эпидермаль- ного фактора роста (HER2). Эверолимус индуцировал остановку клеточного цикла в фазах G₀/G₁ и апоптоз. Действие эверолимуса было ассоциировано с амплифика- цией генов киназы Aurora A (AURKA) и рецептора эпи- дермального фактора роста (HER2, hairy-related 2), сверх- экспрессией генов киназы гликогенсинтазы 3 альфа (GSK3A, glycogen synthase kinase 3 alpha), регуляторной

субъединицы 3 фосфатидилинозитол-3-киназы (PIK3R3, Phosphoinositide 3-kinaseregulatory subunit 3), Kruppel-подобного фактора 8 (KLF8, Kruppel-like factor 8), митоген-активируемой протеинкиназы 10 (MAPK10, mitogen-activated protein kinase 10), фосфогликолат фосфатазы (PGP, phosphoglycolate phosphatase), рибосомального белка L38 (RPL38, ribosomal protein L38), аланинаминотрансферазы (ALT, alanineaminotransferase) и глиального фибриллярного кислого белка (GFAP, glial fibrillary acidic protein) [30]. Таким образом, применение гомогенной панели клеточных линий рака молочной железы позволило оценить противоопухолевую активность эверолимуса и изучить его молекулярно-генетические детерминанты.

2D модели первичных культур клеток опухолей человека в изучении противоопухолевой активности

В качестве модели *in vitro* для тестирования противоопухолевой активности соединений используют первичные культуры клеток, полученные из клеток тканей или органов пациентов (PDC, patient-derived tumor cell) [7]. Эта модель может иметь различные источники выделения раковых клеток — опухолевая ткань [7], циркулирующие клетки крови [31], асцитная жидкость [32] и плевральный трансудат [33].

А.Е. Freeman и соавторы показали, что после трансплантации 5 млн клеток меланомы тимусэктомированным мышам у них в течение 2,5 месяцев развились опухоли [34], что позволило сделать вывод о сохранении злокачественности клеток неоплазий в условиях первичной культуры.

С. Haglund и соавторы анализировали противоопухолевую активность 14 препаратов (амсакрин, триоксид мышьяка, бортезомиб, цисплатин, цитарабин, доксорубин, этопозид, 5-фторурацил, gefitinib, иматиниб, мелфалан, РКС412, рапамицин и винкристин) на первичных культурах клеток, полученных от пациентов с острым лимфобластным лейкозом, острым миелобластным лейкозом, хроническим лимфолейкозом, хроническим миелолейкозом, меланомой, раком яичников, кишечника, молочной железы, почки и немелкоклеточным раком легкого. Был обнаружен выраженный противоопухолевый эффект цисплатина и бортезомиба в отношении клеток рака яичников и миеломы [35].

Исследователи из медицинского центра университета Гамбурга выявили противоопухолевый эффект нилотиниба и иматиниба на первичных культурах опухолевых и стромальных клеток (фибробласты) плексиформной нейрофибромы [36]. А. Witkiewicz и соавторы провели скрининг 500 препаратов и их комбинаций на первичной культуре клеток аденокарциномы протока поджелудочной железы. Наблюдавшиеся различия профилей химиочувствительности культур клеток опухоли среди пациентов не могли быть спрогнозированы с использованием генетического анализа [37]. Q. Gao с соавторами на первичных культурах гепатоцеллюлярного рака показали, что ответ неоплазии на противоопухолевые препараты предопределяется профилем экспрессии генов во всех типах клеток, образующих опухоль (внутриопухолевая гетерогенность) [38]. Таким образом, клетки первичных культур опухолей сохраняют внутриопухолевую гетерогенность, экспрессию генов и белков, присущую новообразованию *in vivo*. Это позволяет использовать модель первичной культуры

опухолевых клеток для изучения индивидуальной реакции опухоли конкретного пациента на проводимую терапию.

М. Schmidt и соавторы на 50 первичных культурах аденокарциномы молочной железы выявили значимую ($p=0,007$) ассоциацию между экспрессией мРНК рецепторов прогестерона и снижением чувствительности клеток к паклитакселу. Опухоли стадий T3 и T4 были значимо ($p=0,013$) более устойчивы к химиопрепарату, чем опухоли стадий T1 и T2. Вместе с тем, рецепторы к эстрогену, N стадия и возраст пациентов не влияли на химиочувствительность клеток опухоли [39]. Авторы показали, что первичные культуры клеток аденокарциномы молочной железы сохраняют экспрессию рецепторов к эстрогенам и прогестерону, особенности T и N стадий опухоли, растущей в организме, а при изучении чувствительности клеток гормон-зависимых опухолей к химиопрепаратам следует учитывать экспрессию рецепторов андрогенов, эстрогенов, а также пол пациентов.

J.W. Jang и соавторы протестировали пириметамин на первичных культурах клеток рака печени и клеточных линиях Huh7 и Fa2N-4 гепатоцеллюлярной карциномы человека. Ученые выявили, что пириметамин усиливает образование лизосом, высвобождение из них катепсина B и активацию апоптоза через каспаза-3-зависимый механизм [40].

Таким образом, в гомогенных по клеточному составу типах опухолей, растущих в условиях первичной культуры, возможно, как и на клеточных линиях, изучение механизма действия тестируемых химических соединений и препаратов. Гетерогенность клеточного состава опухолей в первичных культурах не позволяет точно идентифицировать молекулярный механизм действия испытываемых препаратов или химических соединений, поскольку присутствие неопухолевых клеток оказывает непосредственное влияние (за счет выделения цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, пептидов) на раковые клетки. Опухолевые клетки в первичной культуре имеют ограниченное время жизни, что лимитирует использование этой модели [32, 33, 38].

Создание в Национальном институте рака США Национального банка моделей, включающего как клеточные линии, так и первичные культуры клеток, свидетельствует о перспективности и необходимости применения первичных культур клеток [41], несмотря на упомянутые ограничения.

Псевдодвумерные модели культуры клеток

В основе организации псевдодвумерных моделей клеточных культур лежит сокультивирование раковых клеток с неопухолевыми клеточными элементами экстрацеллюлярного матрикса (ЕСМ, extracellular matrix) — фибробластами, эндотелиоцитами и стволовыми клетками. Разработке такого рода моделей послужили данные о влиянии компонентов ЕСМ на гистоархитектуру, иммунные характеристики и ангиогенез опухолей, пролиферацию, дифференцировку, миграцию раковых клеток и их чувствительность к химио- и биопрепаратам [42]. Кроме того, воздействие на солидные опухоли с плотным ЕСМ противоопухолевых препаратов может быть снижено вследствие их неспособности проникать через плотно организованную структуру матрикса и достигать раковых клеток

[43]. На диффузию препаратов через ЕСМ, передачу сигналов в раковые клетки, прогрессирование и приобретение злокачественного фенотипа опухолью могут оказывать влияние физические свойства (жесткость, топография, интерстициальное давление жидкости, доступность лиганда, циклическое напряжение и напряжение сдвига) его компонентов [44].

В Институте рака Гарвардской медицинской школы (США), культивируя клеточные линии множественной миеломы RPMI-8226 и U266 с костномозговыми стромальными клетками HS5, наблюдали усиление устойчивости опухолевых клеток к мелфалану, циклофосфамиду, протеосомному ингибитору бортезомибу и ингибитору онкогена MUC1 GO-203. Совместное выращивание стромальных клеток с миеломными повышало в последних экспрессию онкогена MUC1 и ингибировало апоптоз через стимуляцию интерлейкином-6 JAK-STAT3 (JAK-STAT3, Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) сигнального пути. Таким образом, сокультивирование клеток стромы костного мозга с клетками миеломы снижало чувствительность клеток миеломы к химиопрепаратам, ингибиторам протеосомы и онкогена MUC1 посредством активации интерлейкина-6 и JAK-STAT3 сигнального пути [45]. Китайские исследователи использовали межлуночную систему с проницаемой пористой мембраной для совместного культивирования мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК-КМ) и клеточных линий рака желудка SGC7901, KATO-III, MKN45 и AGS. MSC-КМ повышали устойчивость к цисплатину CD133-положительных клеток рака желудка через ингибирование BAX (Bcl-2 associated X protein), апоптоза, активацию Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) и АКТ (PI3K/Akt, phosphoinositide-3-kinase-protein kinase B/Akt) сигнального пути. Использование этого механизма может повысить эффективность химиотерапии рака желудка [46]. В Техасском университете установили, что адипоциты костного мозга секретировали адипокины лептин и адипсин, которые в свою очередь стимулировали аутофагию и активировали экспрессию белков, участвующих в аутофагии Atg3, Atg5, LC3-I/II, а также подавляли апоптоз и активацию каспаз-9, -3 в клеточных линиях миеломы человека ARP-1, U266 и ARK. В результате реализации этого механизма раковые клетки приобретали устойчивость к мелфалану, доксорубину, дексаметазону и бортезомибу. Аутофагия клеток меланомы запускалась при активации JAK-STAT3 сигнального пути [47]. Коллектив японских исследователей разработал мультикомпонентную культуральную систему, в которой клетки мелкоклеточного WA-hT и немелкоклеточного рака легкого A549 культивировались со стромальными фибробластами WA-mFib и провоспалительными моноцитами THP-1. Фибробласты повышали устойчивость раковых клеток к химиопрепарату, в то время как моноциты активировали в опухолевых клетках тимидинфосфорилазу, которая способствовала превращению проформы препарата 5'-DFUR (5'-deoxy-5-fluorouridine) в активную форму и тем самым усиливала восприимчивость клеток рака легкого к химиопрепарату [48]. Чувствительность клеток рака легкого A549 и WA-hT к цисплатину зависела от присутствия и качественного состава клеток опухолевого микроокружения.

Таким образом, псевдодвумерные модели культур клеток широко применяются для изучения влияния опухоле-

вого микроокружения на чувствительность раковых клеток к химио- и биопрепаратам, установления их молекулярных механизмов действия.

Трехмерные (3D) модели культуры клеток опухолей

В последние годы наблюдается тенденция к более широкому использованию трехмерных клеточных культур для тестирования противоопухолевых соединений [49]. В процессе 3D культивирования клетки растут внутри трехмерного каркаса или матрикса с трехмерной архитектурой, формируя многослойную модель ткани опухоли [50]. Выделяют следующие типы трехмерных культур опухолевых клеток: опухолевые сфероиды, опухолевые органоиды, многоклеточные слои и 3D модели на микрочипах [7, 9, 51, 52].

Многочисленные исследования показали, что опухолевые клетки в трехмерных моделях проявляют более высокую химиоустойчивость, чем клетки в монослойных культурах [53]. Конструирование 3D моделей культур опухолевых клеток включает их совместное выращивание со стволовыми и стромальными клетками. Присутствие в 3D моделях стромальных клеток опухолевого микроокружения и измененная химиочувствительность делают указанные модели идеальными для изучения феномена множественной лекарственной устойчивости [54].

Однако, повсеместному использованию 3D моделей препятствует продолжительность (31 и более суток), трудоемкость и невысокая производительность [7, 9, 51, 53, 55]. До настоящего времени не определен оптимальный состав компонентов для матрикса 3D моделей. Природные полимеры обладают значительным биологическим разнообразием, не обеспечивают оптимальных механических свойств. Кроме того, их применение сопряжено с более высоким риском иммунного ответа и затрудняет точный учет исследуемых параметров. Синтетические материалы имеют низкую биоактивность, вариабельный размер гнезд роста неоплазии в 3D культурах. Получаемые гнезда роста раковых клеток в культуре обычно меньше по объему, чем метастазы в организме [7]. Широкое применение трехмерных культур опухолевых клеток ограничивают сложности, связанные с визуализацией клеток внутри модельной системы, что сопряжено с необходимостью выполнения гистологических срезов и их окрашивания [7, 9, 53, 55]. Применение флуоресцентной микроскопии плоскостного освещения дает возможность наблюдать за клетками в трехмерных условиях [7]. В настоящее время технологии 3D культивирования менее разработаны по сравнению с монослойными клеточными культурами. Кроме того, число методов оценки противоопухолевой активности, предполагающих использование трехмерных моделей, ограничено.

Применение культуральных 3D моделей предусматривает проведение оценки ответа гистокультур на препараты (HDRA, histoculturedrugresponseassay), *ex vivo* анализа программированной клеточной гибели (EVA/PCD, *ex vivo* analysis of programmed cell death), CD-DST (collagen gel drop letembedded culture drug sensitivity test) [56, 57].

A.A. Rizvanov и соавторы разработали модельную систему на основе сокультивирования мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) из зачатков третьего моляра человека с клетками нейроblastомы SH-SY5Y на тонком слое матригеля [58]. Исследователи

наблюдали быстрое формирование структур, в центре которых располагались ММСК, а по периферии — клетки нейробластомы. Такая структурная организация опухолевых клеток повышает их устойчивость к испытываемым химическим соединениям [58]. Подобные сфероиды могут имитировать строение солидных опухолей с плохой васкуляризацией или микрометастазов [7].

Разрабатываются 3D модели культур с использованием микрофлюидной технологии: микроколичества жидкости (10^{-8} - 10^{-6} л), проходя по микроканалам чипа, позволяют выявить градиенты распределения тестируемых химических соединений внутри ткани [59]. E. Yildiz-Ozturk и соавторы на подобной модели изучили цитотоксический эффект карнозной кислоты и доксорубина в отношении клеток рака молочной железы (MCF-7 и MDAMB231) и неопухолевых эпителиоцитов молочной железы MCF-10A. Авторы показали, что карнозная кислота проявляла выраженную цитотоксичность по отношению к клеткам MDAMB231, а доксорубин — в отношении клеток MCF-7 [60]. В указанной модели особенности транспорта препаратов к клеткам-мишеням имитируют физиологические барьеры *in vivo*.

В Канзасском университете США исследовали антимитотическую активность 10 препаратов (паклитаксел, алимта, закзима, доксорубин, винорелбин, гемцитабин, 17-ААг, цисплатин, KU174 и KU363) на трехмерной коллагеновой модели и монослойных клеточных линиях рака легкого A549, H358. Восприимчивость H358 клеток в 3D модели к паклитакселу, KU174, алимте, закзиму, доксорубину, винорелбину, KU363 и 17-ААг значительно отличалась от таковой в перевиваемых клеточных культурах. Чувствительность этой линии клеток к цисплатину и гемцитабину в 3D и монослойных моделях не отличалась [61]. Y. Imamura и соавторы сравнили действие паклитаксела и доксорубина на клетки рака молочной железы (BT-549, BT-474 и T-47D), культивируемых в виде монослойных перевиваемых линий и 3D сфероидов [62]. Оказалось, что клетки BT-549, BT-474 и T-47D в 3D модели проявляли повышенную устойчивость к химиопрепаратам по сравнению с перевиваемыми клеточными линиями. В клонных линиях паклитаксел индуцировал экспрессию проапоптотического фермента — поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), в отличие от 3D сфероидов, демонстрируя возможность защиты клеток рака молочной железы в 3D модели от апоптоза [62].

Раковые клетки в 3D моделях проявляли более высокую химиоустойчивость, чем клетки в монослойных культурах. В основе этого явления лежит изменение экспрессии генов, каскадов внутриклеточных сигнальных путей по сравнению с 2D моделями [7, 9, 51, 53, 55].

В многоклеточных слоях клетки выращивают на микропористой тефлоновой мембране, покрытой коллагеном и погруженной в большой объем постоянно циркулирующей ростовой среды, что приводит к формированию симметричного многоклеточного слоя с ядром из некротических клеток и окружающих его жизнеспособных клеток [54]. Корейские исследователи на модели многоклеточных слоев клеточной линии колоректального рака человека DLD-1 изучили проницаемость и распределение паклитаксел-родамина и доксорубина в нескольких концентрациях. Доксорубин в течение 1 часа проходил через многоклеточные слои раковых клеток, накапливаясь спустя 3 часа. Однако полного проникновения пакли-

таксел-родамина не наблюдалось даже спустя 72 часа, что позволило предположить зависимость накопления химиопрепаратов в раковых клетках многоклеточного слоя от концентрации, а не времени воздействия [63]. Таким образом, применение модели многоклеточных слоев позволяет оценить скорость диффузии лекарственных препаратов в опухолевом микроокружении, их распределение и накопление в раковых клетках.

Особый интерес представляет разработанная канадскими учеными трехмерная культуральная модель опухолевых органоидов, которая включает клетки аденокарциномы поджелудочной железы и плюрипотентные стволовые клетки, формирующие протоки и ацинусы железы в культуре и *in vivo*. Таким образом, раковые клетки в этой модельной системе поддерживают различную степень дифференцировки, гистоархитектуру, фенотипическую гетерогенность первичной опухоли и сохраняют специфические условия организма пациента, включая гипоксию, насыщение ткани кислородом, эпигенетические маркеры и чувствительность к препаратам [64]. Кроме того, 3D модели опухолевых органоидов могут имитировать структуру, функциональные, биохимические и механические особенности живых органов (легкое, печень, почка, кость, мозг, глаз и др.) и моделировать схемы терапевтического воздействия [65].

Заключение

Применение культур клеток злокачественных новообразований человека для тестирования противоопухолевой активности соединений повысило эффективность доклинического скрининга химических и биологических соединений и способствовало введению в клиническую практику новых поколений противораковых препаратов. Двумерные модели культур клеток до настоящего времени остаются наиболее широко применяемыми системами культивирования, которые с наименьшими трудозатратами позволяют не только оценить цитотоксический и цитостатический эффекты тестируемых соединений, но и выявить их механизм действия, молекулярные мишени, а также определить индивидуальную чувствительность опухолевых клеток пациентов.

В отличие от гомогенных 2D моделей, создание псевдодвумерных и 3D моделей является более сложным и трудоемким процессом. Однако применение такого рода модельных систем позволяет исследовать ряд процессов, изучение которых было возможно лишь на живых организмах, в первую очередь на экспериментальных животных. Особенно перспективной представляется недавно разработанная трехмерная культуральная модель опухолевых органоидов: раковые клетки в этой модельной системе поддерживают различную степень дифференцировки, гистоархитектуру, и фенотипическую гетерогенность первичной опухоли. Использование 3D моделей создает возможность для оптимизации количества лабораторных животных в экспериментах *in vivo*.

Таким образом, использование культур раковых клеток для скрининга противоопухолевых препаратов при соблюдении ряда условий позволяет моделировать гистологический тип, стадию, степень злокачественности опухоли, внутриопухолевую клеточную гетерогенность, экспрессию рецепторов, гормонов, ростовых факторов, белков и генов множественной лекарственной устойчивости,

диффузию и накопление препаратов в опухолевых клетках. Эти признаки составляют основные характеристики развития новообразований, которые учитываются при разработке и клиническом применении химио- и биопрепаратов.

Список литературы

1. Strovel J., Sittampalam S., Coussens N.P., Hughes M., Inglese J., Kurtz A., Andalibi A., Patton L., Austin Ch., Baltezor M., Beckloff M., Weingarten M., Weir S. *Assay Guidance Manual Early drug discovery and development guidelines: for academic researchers, collaborators, and start-up companies*. Bethesda: the National center for advancing translational sciences; 2012.
2. Geraghty R.J., Capes-Davis A., Davis J.M., Downward J., Freshney R.I., Knezevic I., Lovell-Badge R., Masters J.R., Meredith J., Stacey G.N., Thraves P., Vias M. Cancer Research UK. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Brit. J. Cancer*. 2014; 111(6): 1021-46. DOI: 10.1038/bjc.2014.166.
3. Roi A.J., Grune B. *The EURL ECVAM search guide data retrieval procedures basic principles* (original title: «The ECVAM search guide — good search practice on animal alternatives»). Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2013.
4. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепяхин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В., Утешев Д.Б., Яворский А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. Под ред. А.Г. Муллара, О.Н. Чиченкова. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
5. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение принципов GLP к краткосрочным исследованиям: Межго. стандарт. ГОСТ 31886-2012-М. Введ. в РФ 01.01.13. М.: Сандартинформ; 2013. 20 с.
6. Bal-Price A., Coecke S. *Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP)*. *Cell Culture Techniques. Series: Neuromethods*. Springer; 2011; 56: 1-25.
7. Мингалеева Р.Н., Соловьева В.В., Блатт Н.Л., Ризванов А.А. Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов invitro. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013; VIII(2): 20-8.
8. Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Nat. Cancer. Inst.* 1990; 82(13): 1107-12.
9. Niu N., Wang L. *In vitro* human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics*. 2015; 16(3): 273-85. DOI: 10.2217/pgs.14.170.
10. Smalley K.S.M., Lioni M., Noma K., Haass N., Herlyn M. *In vitro* three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery. *Expert. Opin. Drug Discov.* 2008; 3: 1-10. DOI: 10.1517/17460441.3.1.1.
11. Weigelt B., Garjar C.M., Bissell M.J. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014; 69-70: 42-51. DOI: 10.1016/j.addr.2014.01.001.
12. Takebayashi K., Mekata E., Sonoda H., Shimizu T., Endo Y., Tani T. Clinical potential of the anticancer drug sensitivity test for patients with synchronous stage IV colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013; 72(1): 217-22. DOI: 10.1007/s00280-013-2189-7.
13. D'Arcangelo M., Todaro M., Salvini J., Benfante A., Colorito M.L., D'Incecco A., Landi L., Apuzzo T., Rossi E., Sani S., Stasi G., Cappuzzo F. Cancer stem cells sensitivity assay (STELLA) in patients with advanced lung and colorectal cancer: a feasibility study. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0125037. DOI: 10.1371/journal.pone.0125037.
14. Von Hoff D.D., Clark G.M., Stoddill B.J., Sarosdy M.F., O'Brien M.T., Casper J.T., Mattox D.E., Page C.P., Cruz A.B., Sandbach J.F. Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.* 1983; 43(4): 1926-31.
15. Galluzzi L., Vitale I., Michels J., Brenner C., Szabadkai G., Harel-Bellan A., Castedo M., Kroemer G. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1257. DOI: 10.1038/cddis.2013.428.
16. Kwon H.Y., Kim I.K., Kang J., Sohn S.K., Lee K.Y. *In vitro* adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay

(ATP-CRA) as a predictor of clinical response to fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer. *Cancer Res. Treat.* 2016; 48(3): 970-7. DOI: 10.4143/crt.2015.140.

17. Tibbitt M.W., Anseth K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2009; 103(4): 655-63. DOI: 10.1002/bit.22361.

18. Galayev O., Garazd Y., Garazd M., Lesyk R. Synthesis and anticancer activity of 6-heteroaryl coumarins. *Eur. J. Med. Chem.* 2015; 105: 171-81. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.10.021.

19. Lowe H.I.C., Toyang N.J., Watson C.T., Ayeah K.N., Bryant J. HLBT-100: a highly potent anti-cancer flavanone from *Tillandsia recurvata* (L.). *Cancer Cell Int.* 2017; 17: 38. DOI: 10.1186/s12935-017-0404-z.

20. Romagnoli R., Baraldi P.G., Prencipe F., Oliva P., Baraldi S., Tabrizi M.A., Lopez-Cara L.C., Ferla S., Brancale A., Hamel E., Ronca R., Bortolozzi R., Mariotto E., Basso G., Viola G. Design and synthesis of potent *in vitro* and *in vivo* anticancer agents based on 1-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-2-aryl-1H-imidazole. *Sci. Rep.* 2016; 6: 26602. DOI: 10.1038/srep26602.

21. Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist*. 2002; 7(1): 9-16.

22. Peltonen K., Colis L., Liu H., Trivedi R., Moubarek M.S., Moore H.M., Bai B., Rudek M.A., Bieberich C.J., Laiho M. A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell*. 2014; 25(1): 77-90. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.12.009.

23. Sato A., McNulty L., Cox K., Kim S., Scott A., Daniell K., Summerville K., Price C., Hudson S., Kiakos K., Hartley J.A., Asao T., Lee M. A novel class of *in vivo* active anticancer agents: achiral seco-amino- and seco-hydroxycyclopropylbenz[e]indolone (seco-CBI) analogues of the duocarmycins and CC-1065. *J. Med. Chem.* 2005; 48: 3903-18. DOI: 10.1021/jm050179u.

24. Rayburn E., Wang W., Li M., Zhang X., Xu H., Li H., Qin J.J., Jia L., Covey J., Lee M., Zhang R. Preclinical pharmacology of novel indolecarboxamide ML-970, an investigative anticancer agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2012; 69(6): 1423-31. DOI: 10.1007/s00280-012-1851-9.

25. Kong D., Yamori T. JFCR39, a panel of 39 human cancer cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs. *Bioorg. Med. Chem.* 2012; 20(6): 1947-51. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.01.017.

26. Barretina J., Caponigro G., Stransky N., Venkatesan K., Margolin A.A., Kim S., Wilson C.J., Lehár J., Kryukov G.V., Sonkin D., Reddy A., Liu M., Murray L., Berger M.F., Monahan J.E., Morais P., Meltzer J., Korejwa A., Jane-Valbuena J., Mapa F.A., Thibault J., Bric-Furlong E., Raman P., Shipway A., Engels I.H., Cheng J., Yu G.K., Yu J., Aspesi P. Jr., de Silva M., Jagtap K., Jones M.D., Wang L., Hatton C., Palesscandolo E., Gupta S., Mahan S., Sougnez C., Onofrio R.C., Liefeld T., MacConaill L., Winckler W., Reich M., Li N., Mesirov J.P., Gabriel S.B., Getz G., Ardlie K., Chan V., Myer V.E., Weber B.L., Porter J., Warmuth M., Finan P., Harris J.L., Meyerson M., Golub T.R., Morrissey M.P., Sellers W.R., Schlegel R., Garraway L.A. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature*. 2012; 483(7391): 603-7. DOI: 10.1038/nature11003.

27. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer. www.cancerrxgene.org/translation/CellLine (дата обращения 29.06.2017).

28. Xie Y., Bergstrom T., Jiang Y., Johansson P., Marinescu V.D., Lindberg N., Segerman A., Wicher G., Niklasson M., Baskaran S., Sreedharan S., Everlien I., Kastemar M., Hermansson A., Elfineh L., Libard S., Holland E.C., Hesselager G., Alafuzoff I., Westermark B., Nelander S., Forsberg-Nilsson K., Uhrbom L. The human glioblastoma cell culture resource: validated cell models representing all molecular subtypes. *EbioMedicine*. 2015; 2(10): 1351-63. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.08.026.

29. Wang W., Wang D., Wang Z., Yao G., Li X., Gao P., Li L., Zhang Y., Wang S., Song S. Synthesis of new sarsasapogenin derivatives with cytotoxicity and apoptosis-inducing activities in human breast cancer MCF-7 cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 127: 62-71. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.12.011.

30. Hurvitz S.A., Kalous O., Conklin D., Desai A.J., Dering J., Anderson L., O'Brien N.A., Kolarova T., Finn R.S., Linnartz R., Chen D., Slamon D.J. *In vitro* activity of the mTOR inhibitor everolimus, in a large panel of breast cancer cell lines and analysis for predictors of response. *Breast. Cancer Res. Treat.* 2015; 149(3): 669-80. DOI: 10.1007/s10549-015-3282-x.

31. Yu M., Bardia A., Aceto N., Bersani F., Madden M.W., Donaldson M.C., Desai R., Zhu H., Comaills V., Zheng Z., Wittner B.S., Stojanov P., Brachtel E., Sgroi D., Kapur R., Shioda T., Ting D.T., Ramaswamy S., Getz G., Iafrate A.J., Benes C., Toner M., Maheswaran S., Haber D.A. Cancer therapy. *Ex vivo* culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014; 345(6193): 216-20. DOI: 10.1126/science.1253533.
32. Lee J.Y., Kim S.Y., Park C., Kim N.K., Jang J., Park K., Yi J.H., Hong M., Ahn T., Rath O., Schueler J., Kim S.T., Do I.G., Lee S., Park S.H., Ji Y.I., Kim D., Park J.O., Park Y.S., Kang W.K., Kim K.M., Park W.Y., Lim H.Y., Lee J. Patient-derived cell models as preclinical tools for genome-directed targeted therapy. *Oncotarget*. 2015; 6(28): 25619-30. DOI: 10.18632/oncotarget.4627.
33. Roscilli G., De Vitis C., Ferrara F.F., Noto A., Cherubini E., Ricci A., Mariotta S., Giarnieri E., Giovagnoli M.R., Torrisi M.R., Bergantino F., Costantini S., Fenzia F., Lambiase M., Aurisicchio L., Normanno N., Ciliberto G., Mancini R. Human lung adenocarcinoma cell cultures derived from malignant pleural effusions as model system to predict patients chemosensitivity. *J. Transl. Med.* 2016; 14: 61. DOI: 10.1186/s12967-016-0816-x.
34. Freeman A.E., Hoffman R.M. *In vivo*-like growth of human tumors *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83: 2694-8.
35. Haglund C., Aleskog A., Nygren P., Gullbo J., Hoglund M., Wickstrom M., Larsson R., Lindhagen E. *In vitro* evaluation of clinical activity and toxicity of anticancer drugs using tumor cells from patients and cells representing normal tissues. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 2012; 69(3): 697-707. DOI: 10.1007/s00280-011-1746-1.
36. Jiang W., Mautner V.F., Friedrich R.E., Kluge L. Preclinical assessment of the anticancer drug response of plexiform neurofibroma tissue using primary cultures. *J. Clin. Neurol.* 2015; 11(2): 172-7. DOI: 10.3988/jcn.2015.11.2.172.
37. Witkiewicz A.K., Balaji U., Eslinger C., McMillan E., Conway W., Posner B., Mills G.B., O'Reilly E.M., Knudsen E.S. Integrated patient-derived models delineate individualized therapeutic vulnerabilities of pancreatic cancer. *Cell Rep.* 2016; 16(7): 2017-31. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.023.
38. Gao Q., Wang Z.C., Duan M., Lin Y.H., Zhou X.Y., Worthley D.L., Wang X.Y., Niu G., Xia Y., Deng M., Liu L.Z., Shi J.Y., Yang L.X., Zhang S., Ding Z.B., Zhou J., Liang C.M., Cao Y., Xi-ong L., Xi R., Shi Y.Y., Fan J. Cell culture system for analysis of genetic heterogeneity within hepatocellular carcinomas and response to pharmacologic agents. *Gastroenterology*. 2017; 152(1): 232-42.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.008.
39. Schmidt M., Bremer E., Hasenclever D., Victor A., Gehrmann M., Steiner E., Schiffer I.B., Gebhardt S., Lehr H.A., Mahlke M., Hermes M., Mustea A., Tanner B., Koelbl H., Pilch H., Hengstler J.G. Role of the progesterone receptor for paclitaxel resistance in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2007; 96(2): 241-7. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603538.
40. Jang J.W., Song Y., Kim K.M., Kim J.S., Choi E.K., Kim J., Seo H. Hepatocellular carcinoma-targeted drug discovery through image-based phenotypic screening in co-cultures of HCC cells with hepatocytes. *BMC Cancer*. 2016; 16(1): 810. DOI: 10.1186/s12885-016-2816-x.
41. National Cancer Institute. <https://dtp.cancer.gov/respositories.html> (дата обращения 21.12.2016)
42. Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014; 15(12): 1243-53. DOI: 10.15252/embr.201439246.
43. Jaganathan H., Gage J., Leonard F., Srinivasan S., Souza G.R., Dave B., Godin V. Three-dimensional *in vitro* co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6468. DOI: 10.1038/srep06468.
44. Levental K.R., Yu H., Kass L., Lakins J.N., Egeblad M., Erler J.T., Fong S.F., Csiszar K., Giaccia A., Weninger W., Yamauchi M., Gasser D.L., Weaver V.M. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009; 139(5): 891-906. DOI: 10.1016/j.cell.2009.10.027.
45. Bar-Natan H., Stroopinsky D., Luptakova K., Coll M.D., Apel A., Rajabi M., Pyzer A.R., Palmer K., Reagan M.R., Nahas M.R., Karp Leaf R., Jain S., Arnason J., Ghobrial I.M., Anderson K.C., Kufe D., Rosenblatt J., Avigan D. Bone marrow stroma protects myeloma cells from cytotoxic damage via induction of the oncoprotein MUC1. *Br. J. Haematol.* 2017; 176(6): 929-38. DOI: 10.1111/bjh.14493.
46. Ji N., Yu J.W., Ni X.C., Wu J.G., Wang S.L., Jiang B.J. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells increase drug resistance in CD133-expressing gastric cancer cells by regulating the PI3K/AKT pathway. *Tumour Biol.* 2016; 37(11): 14637-51. DOI: 10.1007/s13277-016-5319-0.
47. Liu Z., Xu J., He J., Liu H., Lin P., Wan X., Navone N.M., Tong Q., Kwak L.W., Orlowski R.Z., Yang J. Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation. *Oncotarget*. 2015; 6(33): 34329-41. DOI: 10.18632/oncotarget.6020.
48. Yamazoe H., Hagihara Y., Kobayashi H. Multi-component co-culture system of cancer cells and two types of stromal cells for *in vitro* evaluation of anticancer drugs. *Tissue Eng. Part C Methods*. 2016; 22(1): 20-9. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0188.
49. Xu Z., Gao Y., Hao Y., Li E., Wang Y., Zhang J., Wang W., Gao Z., Wang Q. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials*. 2013; 34(16): 4109-17. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.02.045.
50. Costa E.C., Moreira A.F., de Melo-Diogo D., Gaspar V.M., Carvalho M.P., Correia I.J. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* 2016; 34(8): 1427-41. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.
51. Li L., Lu Y. Optimizing a 3D culture system to study the interaction between epithelial breast cancer and its surrounding fibroblasts. *Cancer*. 2011; 2: 458-66.
52. Kiyohara Y., Yoshino K., Kubota S., Okuyama H., Endo H., Ueda Y., Kimura T., Kimura T., Kamiura S., Inoue M. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer Sci.* 2016; 107(4): 452-60. DOI: 10.1111/cas.12898.
53. Mcmillin D.W., Negri J.M., Mitsiades C.S. The role of tumour stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Natl. Rev. Drug Discov.* 2013; 12(3): 217-28. DOI: 10.1038/nrd3870.
54. Elliott N.T., Yuan F. A review of three-dimensional *in vitro* tissue models for drug discovery and transport studies. *J. Pharm. Sci.* 2010; 100(1): 59-74. DOI: 10.1002/jps.22257.
55. Raghavan S., Ward M.R., Rowley K.R., Wold R.M., Takayama S., Buckanovich R.J., Mehta G. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. *Gynecol. Oncol.* 2015; 138(1): 181-9. DOI: 10.1016/j.ygyno.2015.04.014.
56. Kiyohara Y., Yoshino K., Kubota S., Okuyama H., Endo H., Ueda Y., Kimura T., Kimura T., Kamiura S., Inoue M. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer Sci.* 2016; 107(4): 452-60. DOI: 10.1111/cas.12898.
57. Lee S.W., Kim Y.M., Kim M.B., Kim D.Y., Kim J.H., Nam J.H., Kim Y.T. *In vitro* chemosensitivity using the histoculture drug response assay in human epithelial ovarian cancer. *Acta Med. Okayama*. 2012; 66(3): 271-7. DOI: 10.18926/AMO/48567.
58. Rizvanov A.A., Yalvac M.E., Shafiqullina A.K., Salafutdinov I.I., Blatt N.L., Sahin F., Kiyasov A.P., Palotas A. Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuroblastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: A novel system for modeling cancer cell micro-environment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010; 76(2): 253-9. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.05.012.
59. Lovitt C.J., Shelper T.B., Avery V.M. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2015; 141(5): 951-9. DOI: 10.1007/s00432-015-1950-1.
60. Yildiz-Ozturk E., Gulce-Iz S., Anil M., Yesil-Celiktas O. Cytotoxic responses of carnosis acid and doxorubicin on breast cancer cells in butterfly-shaped microchips in comparison to 2D and 3D culture. *Cytotechnology*. 2017; 69(2): 337-47. DOI: 10.1007/s10616-016-0062-3.
61. Nirmalanandhan V.S., Duren A., Hendricks P., Vielhauer G., Sittampalam G.S. Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. *Assay Drug Dev. Technol.* 2010; 8(5): 581-90. DOI: 10.1089/adt.2010.0276.
62. Imamura Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., Kiyota N., Takao S., Kono S., Nakatsura T., Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol. Rep.* 2015; 33(4): 1837-43. DOI: 10.3892/or.2015.3767.
63. Lee J.H., Lee J.H., Na K., Song S.C., Lee J., Kuh H.J. The distribution and retention of paclitaxel and doxorubicin in multicellular layer cultures. *Oncol. Rep.* 2012; 27(4): 995-1002. DOI: 10.3892/or.2012.1650.

64. Huang L., Holtzinger A., Jagan I., BeGora M., Lohse I., Ngai N., Nostro C., Wang R., Muthuswamy L.B., Crawford H.C., Arrowsmith C., Kaloger S.E., Renouf D.J., Connor A.A., Cleary S., Schaeffer D.F., Roehrl M., Tsao M.S., Gallinger S., Keller G., Muthuswamy S.K. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat. Med.* 2015; 21(11): 1364-71. DOI: 10.1038/nm.3973.

65. Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014; 15(12): 1243-53. DOI: 10.15252/embr.201439246.

References

1. Strovel J., Sittampalam S., Coussens N.P., Hughes M., Inglese J., Kurtz A., Andalibi A., Patton L., Austin Ch., Baltezor M., Beckloff M., Weingarten M., Weir S. *Assay Guidance Manual Early drug discovery and development guidelines: for academic researchers, collaborators, and start-up companies*. Bethesda: the National center for advancing translational sciences; 2012.

2. Geraghty R.J., Capes-Davis A., Davis J.M., Downward J., Freshney R.I., Knezevic I., Lovell-Badge R., Masters J.R., Meredith J., Stacey G.N., Thraves P., Vias M. Cancer Research UK. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Brit. J. Cancer.* 2014; 111(6): 1021-46. DOI: 10.1038/bjc.2014.166.

3. Roi A.J., Grune B. *The Eurl ECVAM search guide data retrieval procedures basic principles* (original title: «The ECVAM search guide — good search practice on animal alternatives»). Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2013.

4. Mironov A.N., Bunyatyan N.D., Vasiliev A.N., Verstakova O.L., Zhuravleva M.V., Lepakhin V.K., Korobov N.V., Merkulov V.A., Orekhov S.N., Sakayeva I.V., Uteshev D.B., Yavorsky A.N. [A guidance to preclinical drug research]. Part One. Ed. A.G. Mulyar, O.N. Chichenkova. M.: Grif & K; 2012. 944 p. (in Russian).

5. [Principles of Good Laboratory Practice (GLP). Application of GLP principles to short-term studies]: Interstate. standard. GOST 31886-2012-M. — Introduce. In Russian Federation 01.01.13. M.: Sandartinform; 2013. 20 p. (in Russian).

6. Bal-Price A., Coecke S. *Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP). Cell Culture Techniques. Series: Neuromethods*. Springer; 2011; 56: 1-25.

7. Mingaleva R.N., Solovieva V.V., Blatt N.L., Rizvanov A.A. [Application of cell and tissue cultures for potential anti-cancer/oncology drugs screening *in vitro*]. *Cellular transplantology and tissue engineering.* 2013; VIII(2): 20-8. (in Russian).

8. Skehan P., Storey R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* 1990; 82(13): 1107-12.

9. Niu N., Wang L. *In vitro* human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs. *Pharmacogenomics.* 2015; 16(3): 273-85. DOI: 10.2217/pgs.14.170.

10. Smalley K.S.M., Lioni M., Noma K., Haass N., Herlyn M. *In vitro* three-dimensional tumor microenvironment models for anticancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2008; 3: 1-10. DOI: 10.1517/17460441.3.1.1.

11. Weigelt B., Garjar C.M., Bissell M.J. The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014; 69-70: 42-51. DOI: 10.1016/j.addr.2014.01.001.

12. Takebayashi K., Mekata E., Sonoda H., Shimizu T., Endo Y., Tani T. Clinical potential of the anticancer drug sensitivity test for patients with synchronous stage IV colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2013; 72(1): 217-22. DOI: 10.1007/s00280-013-2189-7.

13. D'Arcangelo M., Todaro M., Salvini J., Benfante A., Colorito M.L., D'Incezo A., Landi L., Apuzzo T., Rossi E., Sani S., Stassi G., Cappuzzo F. Cancer stem cells sensitivity assay (STELLA) in patients with advanced lung and colorectal cancer: a feasibility study. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0125037. DOI: 10.1371/journal.pone.0125037.

14. Von Hoff D.D., Clark G.M., Stogdill B.J., Sarosdy M.F., O'Brien M.T., Casper J.T., Mattox D.E., Page C.P., Cruz A.B., Sandbach J.F. Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.* 1983; 43(4): 1926-31.

15. Galluzzi L., Vitale I., Michels J., Brenner C., Szabadkai G., Harel-Bellan A., Castedo M., Kroemer G. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future. *Cell Death Dis.* 2014; 5: e1257. DOI: 10.1038/cddis.2013.428.

16. Kwon H.Y., Kim I.K., Kang J., Sohn S.K., Lee K.Y. *In vitro* adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) as a predictor of clinical response to fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in stage II colorectal cancer. *Cancer Res. Treat.* 2016; 48(3): 970-7. DOI: 10.4143/crt.2015.140.

17. Tibbitt M.W., Anseth K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2009; 103(4): 655-63. DOI: 10.1002/bit.22361.

18. Galayev O., Garazd Y., Garazd M., Lesyk R. Synthesis and anticancer activity of 6-heteroaryl coumarins. *Eur. J. Med. Chem.* 2015; 105: 171-81. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.10.021.

19. Lowe H.I.C., Toyang N.J., Watson C.T., Ayeah K.N., Bryant J. HLBT-100: a highly potent anti-cancer flavanone from *Tillandsia recurvata* (L.). *Cancer Cell Int.* 2017; 17: 38. DOI: 10.1186/s12935-017-0404-z.

20. Romagnoli R., Baraldi P.G., Prencipe F., Oliva P., Baraldi S., Tabrizi M.A., Lopez-Cara L.C., Ferla S., Brancale A., Hamel E., Ronca R., Bortolozzi R., Mariotto E., Basso G., Viola G. Design and synthesis of potent *in vitro* and *in vivo* anticancer agents based on 1-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-2-aryl-1H-imidazole. *Sci. Rep.* 2016; 6: 26602. DOI: 10.1038/srep26602.

21. Adams J. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist.* 2002; 7(1): 9-16.

22. Peltonen K., Colis L., Liu H., Trivedi R., Moubarek M.S., Moore H.M., Bai B., Rudek M.A., Bieberich C.J., Laiho M. A targeting modality for destruction of RNA polymerase I that possesses anticancer activity. *Cancer Cell.* 2014; 25(1): 77-90. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.12.009.

23. Sato A., McNulty L., Cox K., Kim S., Scott A., Daniell K., Summerville K., Price C., Hudson S., Kiakos K., Hartley J.A., Asao T., Lee M. A novel class of *in vivo* active anticancer agents: achiral seco-amino- and seco-hydroxycyclopropylbenz[e]indolone (seco-CBI) analogues of the duocarmycins and CC-1065. *J. Med. Chem.* 2005; 48: 3903-18. DOI: 10.1021/jm050179u.

24. Rayburn E., Wang W., Li M., Zhang X., Xu H., Li H., Qin J.J., Jia L., Covey J., Lee M., Zhang R. Preclinical pharmacology of novel indolecarboxamide ML-970, an investigative anticancer agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2012; 69(6): 1423-31. DOI: 10.1007/s00280-012-1851-9.

25. Kong D., Yamori T. JFCR39, a panel of 39 human cancer cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs. *Bioorg. Med. Chem.* 2012; 20(6): 1947-51. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.01.017.

26. Barretina J., Caponigro G., Stransky N., Venkatesan K., Margolin A.A., Kim S., Wilson C.J., Lehár J., Kryukov G.V., Sonkin D., Reddy A., Liu M., Murray L., Berger M.F., Monahan J.E., Morais P., Meltzer J., Korejwa A., Jane-Valbuena J., Mapa F.A., Thibault J., Bric-Furlong E., Raman P., Shipway A., Engels I.H., Cheng J., Yu G.K., Yu J., Aspesi P. Jr., de Silva M., Jagtap K., Jones M.D., Wang L., Hatton C., Palesscandolo E., Gupta S., Mahan S., Sougnez C., Onofrio R.C., Liefeld T., MacConaill L., Winkler W., Reich M., Li N., Mesirov J.P., Gabriel S.B., Getz G., Ardlie K., Chan V., Myer V.E., Weber B.L., Porter J., Warmuth M., Finan P., Harris J.L., Meyerson M., Golub T.R., Morrissey M.P., Sellers W.R., Schlegel R., Garraway L.A. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature.* 2012; 483(7391): 603-7. DOI: 10.1038/nature11003.

27. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer. www.cancerrxgene.org/translation/CellLine (Retrieved 29.06.2017).

28. Xie Y., Bergstrom T., Jiang Y., Johansson P., Marinescu V.D., Lindberg N., Segerman A., Wicher G., Niklasson M., Baskaran S., Sreedharan S., Everlien I., Kastemar M., Hermansson A., Elfineh L., Libard S., Holland E.C., Hesselager G., Alafuzoff I., Westermark B., Nelander S., Forsberg-Nilsson K., Uhrbom L. The human glioblastoma cell culture resource: validated cell models representing all molecular subtypes. *Ebiomedicine.* 2015; 2(10): 1351-63. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.08.026.

29. Wang W., Wang D., Wang Z., Yao G., Li X., Gao P., Li L., Zhang Y., Wang S., Song S. Synthesis of new sarsasapogenin derivatives with cytotoxicity and apoptosis-inducing activities in human breast cancer MCF-7 cells. *Eur. J. Med. Chem.* 2017; 127: 62-71. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.12.011.

30. Hurvitz S.A., Kalous O., Conklin D., Desai A.J., Dering J., Anderson L., O'Brien N.A., Kolarova T., Finn R.S., Linnartz R., Chen D., Slamon D.J. *In vitro* activity of the mTOR inhibitor everolimus, in a large panel of breast cancer cell lines and analysis for predic-

tors of response. *Breast. Cancer Res. Treat.* 2015; 149(3): 669-80. DOI: 10.1007/s10549-015-3282-x.

31. Yu M., Bardia A., Aceto N., Bersani F., Madden M.W., Donaldson M.C., Desai R., Zhu H., Comaills V., Zheng Z., Wittner B.S., Stojanov P., Brachtel E., Sgroi D., Kapur R., Shioda T., Ting D.T., Ramaswamy S., Getz G., Iafrate A.J., Benes C., Toner M., Maheswaran S., Haber D.A. Cancer therapy. *Ex vivo* culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science*. 2014; 345(6193): 216-20. DOI: 10.1126/science.1253533.

32. Lee J.Y., Kim S.Y., Park C., Kim N.K., Jang J., Park K., Yi J.H., Hong M., Ahn T., Rath O., Schueler J., Kim S.T., Do I.G., Lee S., Park S.H., Ji Y.I., Kim D., Park J.O., Park Y.S., Kang W.K., Kim K.M., Park W.Y., Lim H.Y., Lee J. Patient-derived cell models as preclinical tools for genome-directed targeted therapy. *Oncotarget*. 2015; 6(28): 25619-30. DOI: 10.18632/oncotarget.4627.

33. Roscilli G., De Vitis C., Ferrara F.F., Noto A., Cherubini E., Ricci A., Mariotta S., Giarnieri E., Giovagnoli M.R., Torrisi M.R., Bergantino F., Costantini S., Fenizia F., Lambiasi M., Aurisicchio L., Normanno N., Ciliberto G., Mancini R. Human lung adenocarcinoma cell cultures derived from malignant pleural effusions as model system to predict patients chemosensitivity. *J. Transl. Med.* 2016; 14: 61. DOI: 10.1186/s12967-016-0816-x.

34. Freeman A.E., Hoffman R.M. *In vivo*-like growth of human tumors *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986; 83: 2694-8.

35. Haglund C., Aleskog A., Nygren P., Gullbo J., Hoglund M., Wickstrom M., Larsson R., Lindhagen E. *In vitro* evaluation of clinical activity and toxicity of anticancer drugs using tumor cells from patients and cells representing normal tissues. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2012; 69(3): 697-707. DOI: 10.1007/s00280-011-1746-1.

36. Jiang W., Mautner V.F., Friedrich R.E., Kluwe L. Preclinical assessment of the anticancer drug response of plexiform neurofibroma tissue using primary cultures. *J. Clin. Neurol.* 2015; 11(2): 172-7. DOI: 10.3988/jcn.2015.11.2.172.

37. Witkiewicz A.K., Balaji U., Eslinger C., McMillan E., Conway W., Posner B., Mills G.B., O'Reilly E.M., Knudsen E.S. Integrated patient-derived models delineate individualized therapeutic vulnerabilities of pancreatic cancer. *Cell Rep.* 2016; 16(7): 2017-31. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.023.

38. Gao Q., Wang Z.C., Duan M., Lin Y.H., Zhou X.Y., Worthley D.L., Wang X.Y., Niu G., Xia Y., Deng M., Liu L.Z., Shi J.Y., Yang L.X., Zhang S., Ding Z.B., Zhou J., Liang C.M., Cao Y., Xiong L., Xi R., Shi Y.Y., Fan J. Cell culture system for analysis of genetic heterogeneity within hepatocellular carcinomas and response to pharmacologic agents. *Gastroenterology*. 2017; 152(1): 232-42.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.09.008.

39. Schmidt M., Bremer E., Hasenclever D., Victor A., Gehrman M., Steiner E., Schiffer I.B., Gebhardt S., Lehr H.A., Mahlke M., Hermes M., Mustea A., Tanner B., Koelbl H., Pilch H., Hengstler J.G. Role of the progesterone receptor for paclitaxel resistance in primary breast cancer. *Br. J. Cancer*. 2007; 96(2): 241-7. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603538.

40. Jang J.W., Song Y., Kim K.M., Kim J.S., Choi E.K., Kim J., Seo H. Hepatocellular carcinoma-targeted drug discovery through image-based phenotypic screening in co-cultures of HCC cells with hepatocytes. *BMC Cancer*. 2016; 16(1): 810. DOI: 10.1186/s12885-016-2816-x.

41. National Cancer Institute. <https://dtp.cancer.gov/respositories.html> (Retrieved 21.12.2016)

42. Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014; 15(12): 1243-53. DOI: 10.15252/embr.201439246.

43. Jaganathan H., Gage J., Leonard F., Srinivasan S., Souza G.R., Dave B., Godin B. Three-dimensional *in vitro* co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6468. DOI: 10.1038/srep06468.

44. Levental K.R., Yu H., Kass L., Lakins J.N., Egeblad M., Erler J.T., Fong S.F., Csiszar K., Giaccia A., Weninger W., Yamauchi M., Gasser D.L., Weaver V.M. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009; 139(5): 891-906. DOI: 10.1016/j.cell.2009.10.027.

45. Bar-Natan M., Stroopinsky D., Luptakova K., Coll M.D., Apel A., Rajabi H., Pyzer A.R., Palmer K., Reagan M.R., Nahas M.R., Karp Leaf R., Jain S., Arnason J., Ghobrial I.M., Anderson K.C., Kufe D., Rosenblatt J., Avigan D. Bone marrow stroma protects myeloma cells from cytotoxic damage via induction of the oncoprotein MUC1. *Br. J. Haematol.* 2017; 176(6): 929-38. DOI: 10.1111/bjh.14493.

46. Ji N., Yu J.W., Ni X.C., Wu J.G., Wang S.L., Jiang B.J. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells increase drug resistance in CD133-expressing gastric cancer cells by regulating the PI3K/AKT pathway. *Tumour Biol.* 2016; 37(11): 14637-51. DOI: 10.1007/s13277-016-5319-0.

47. Liu Z., Xu J., He J., Liu H., Lin P., Wan X., Navone N.M., Tong Q., Kwak L.W., Orlowski R.Z., Yang J. Mature adipocytes in bone marrow protect myeloma cells against chemotherapy through autophagy activation. *Oncotarget*. 2015; 6(33): 34329-41. DOI: 10.18632/oncotarget.6020.

48. Yamazoe H., Hagihara Y., Kobayashi H. Multi-component co-culture system of cancer cells and two types of stromal cells for *in vitro* evaluation of anticancer drugs. *Tissue Eng. Part C Methods*. 2016; 22(1): 20-9. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0188.

49. Xu Z., Gao Y., Hao Y., Li E., Wang Y., Zhang J., Wang W., Gao Z., Wang Q. Application of a microfluidic chip-based 3D co-culture to test drug sensitivity for individualized treatment of lung cancer. *Biomaterials*. 2013; 34(16): 4109-17. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.02.045.

50. Costa E.C., Moreira A.F., de Melo-Diogo D., Gaspar V.M., Carvalho M.P., Correia I.J. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* 2016; 34(8): 1427-41. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.

51. Li L., Lu Y. Optimizing a 3D culture system to study the interaction between epithelial breast cancer and its surrounding fibroblasts. *Cancer*. 2011; 2: 458-66.

52. Kiyohara Y., Yoshino K., Kubota S., Okuyama H., Endo H., Ueda Y., Kimura T., Kimura T., Kamiura S., Inoue M. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer Sci.* 2016; 107(4): 452-60. DOI: 10.1111/cas.12898.

53. Mcmillin D.W., Negri J.M., Mitsiades C.S. The role of tumour stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Natl. Rev. Drug Discov.* 2013; 12(3): 217-28. DOI: 10.1038/nrd3870.

54. Elliott N.T., Yuan F. A review of three-dimensional *in vitro* tissue models for drug discovery and transport studies. *J. Pharm. Sci.* 2010; 100(1): 59-74. DOI: 10.1002/jps.22257.

55. Raghavan S., Ward M.R., Rowley K.R., Wold R.M., Takayama S., Buckanovich R.J., Mehta G. Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays. *Gynecol. Oncol.* 2015; 138(1): 181-9. DOI: 10.1016/j.ygyno.2015.04.014.

56. Kiyohara Y., Yoshino K., Kubota S., Okuyama H., Endo H., Ueda Y., Kimura T., Kimura T., Kamiura S., Inoue M. Drug screening and grouping by sensitivity with a panel of primary cultured cancer spheroids derived from endometrial cancer. *Cancer Sci.* 2016; 107(4): 452-60. DOI: 10.1111/cas.12898.

57. Lee S.W., Kim Y.M., Kim M.B., Kim D.Y., Kim J.H., Nam J.H., Kim Y.T. *In vitro* chemosensitivity using the histoculture drug response assay in human epithelial ovarian cancer. *Acta Med. Okayama*. 2012; 66(3): 271-7. DOI: 10.18926/AMO/48567.

58. Rizvanov A.A., Yalvac M.E., Shafiqullina A.K., Salafutdinov I.I., Blatt N.L., Sahin F., Kiyasov A.P., Palotas A. Interaction and self-organization of human mesenchymal stem cells and neuroblastoma SH-SY5Y cells under co-culture conditions: A novel system for modeling cancer cell micro-environment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010; 76(2): 253-9. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.05.012.

59. Lovitt C.J., Shelper T.B., Avery V.M. Evaluation of chemotherapeutics in a three-dimensional breast cancer model. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2015; 141(5): 951-9. DOI: 10.1007/s00432-015-1950-1.

60. Yildiz-Ozturk E., Gulce-Iz S., Anil M., Yesil-Celiktas O. Cytotoxic responses of carnosis acid and doxorubicin on breast cancer cells in butterfly-shaped microchips in comparison to 2D and 3D culture. *Cyrotechnology*. 2017; 69(2): 337-47. DOI: 10.1007/s10616-016-0062-3.

61. Nirmalanandhan V.S., Duren A., Hendricks P., Vielhauer G., Sittampalam G.S. Activity of anticancer agents in a three-dimensional cell culture model. *Assay Drug Dev. Technol.* 2010; 8(5): 581-90. DOI: 10.1089/adt.2010.0276.

62. Imamura Y., Mukohara T., Shimono Y., Funakoshi Y., Chayahara N., Toyoda M., Kiyota N., Takao S., Kono S., Nakatsura T., Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol. Rep.* 2015; 33(4): 1837-43. DOI: 10.3892/or.2015.3767.

63. Lee J.H., Lee J.H., Na K., Song S.C., Lee J., Kuh H.J. The distribution and retention of paclitaxel and doxorubicin in multicellu-

lar layer cultures. *Oncol. Rep.* 2012; 27(4): 995-1002. DOI: 10.3892/or.2012.1650.

64. Huang L., Holtzinger A., Jagan I., BeGora M., Lohse I., Ngai N., Nostro C., Wang R., Muthuswamy L.B., Crawford H.C., Arrowsmith C., Kalloger S.E., Renouf D.J., Connor A.A., Cleary S., Schaeffer D.F., Roehrl M., Tsao M.S., Gallinger S., Mut-

huswamy S.K. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat. Med.* 2015; 21(11): 1364-71. DOI: 10.1038/nm.3973.

65. Pickup M.W., Mouw J.K., Weaver V.M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014; 15(12): 1243-53. DOI: 10.15252/embr.201439246.

Сведения об авторах

Чернов Александр Николаевич — научный сотрудник отдела микробиологии, клеточных технологий и молекулярной биологии Центра доклинических и трансляционных исследований.

Баранцевич Елена Петровна — доктор медицинских наук, заведующая отделом микробиологии, клеточных технологий и молекулярной биологии Центра доклинических и трансляционных исследований.

Галимова Эльвира Сафуановна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии, клеточных технологий и молекулярной биологии Центра доклинических и трансляционных исследований.

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, директор.

УДК 612.1/.6:612.17-003.96:531.5
DOI:

Общие подходы в антропофизиологической характеристике возрастной динамики кровообращения человека

Белканиа Г.С.¹, Диленян Л.Р.², Багрий А.С.¹, Рыжаков Д.И.², Пухальская Л.Г.³

¹ Лаборатория медицинских экспертных систем «Антропос Системс Лаб.», Украина, 28001, Винница, пр. Коцюбинского, д. 37

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1

³ Варшавский медицинский университет. Польша, 00-001, Варшава, ул. Жвирки и Вигуры, д. 61

В аналитическом обзоре показана динамика гидростатического (гравитационного) фактора кровообращения в соответствии с основными этапами адаптации в процессе развития и жизнедеятельности человека в условиях прямохождения (антропогенетическая модель постнатального онтогенеза). С этой динамикой сопоставляются имеющиеся данные по ростовому процессу массы сердца и минутного объема кровообращения (МОК). Демонстрируются принципиальные отличия возрастной динамики МОК по положению лежа и стоя. Особенно чётко эти отличия определяются по гидростатическому индексу сердца, который рассчитывается по отношению МОК (мл) на высоту гидростатического столба крови (см). Антропогенетическая модель постнатального онтогенеза обосновывает тип динамической организации сердечно-сосудистой системы (ССС) по соотношению МОК стоя/лежа (в %), представленной: гипокинетическим состоянием с уменьшением МОК в положении стоя по сравнению с положением лежа; эукинетическим (без изменений МОК); и гиперкинетическим состоянием с увеличением МОК в положении стоя. Показано, что основной направленностью возрастной динамики является перманентное уменьшение представленности гипокинетического состояния и возрастание представленности гиперкинетического состояния.

Ключевые слова: постнатальный онтогенез, антропогенетическая модель, гравитационный фактор, масса сердца, минутный объем кровообращения, тип кровообращения.

Для цитирования: Белканиа Г.С., Диленян Л.Р., Багрий А.С., Рыжаков Д.И., Пухальская Л.Г. Общие подходы в антропофизиологической характеристике возрастной динамики кровообращения человека. Патогенез. 2017; 15(4): 24–31

Для корреспонденции: Диленян Левон Робертович, e-mail: levon-nn@yandex.ru

Финансирование. При отсутствии «Исследование не имеет спонсорской поддержки».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 15.09.2017

General approaches to anthropophysiological characterization of age-related changes in human circulation

Belkaniya G.S.¹, Dilenyanyan L.R.², Bagrii A.S.¹, Ryzhakov D.I.², Pukhalska L.G.³

¹ Laboratory of Medical Expert Systems, Anthropos Systems Lab., Prospekt Kotsyubinskogo 37, Vinnitsa 28001, Ukraine

² Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ploshchad Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod 603005, Russian Federation

³ Warsaw Medical University, Zwirki i Wigury Str. 61, Warsaw 00-001, Poland

This analytical review analyzes the dynamics of the hydrostatic (gravitational) factor of circulation in accordance with major stages of adaptation in the process of human development and vital activity under the conditions of bipedal locomotion (anthropogenetic model of postnatal ontogenesis). This dynamics is compared with available data on growth-related changes in heart mass and cardiac output (CO). Fundamental differences are demonstrated for age-related CO changes in prone and upright positions. These differences particularly clearly evident from the hydrostatic heart index calculated as a ratio of MVB (ml) to the height of hydrostatic blood column (cm). The anthropogenetic model of postnatal ontogenesis determines the type of dynamic organization of the cardiovascular system (CVS) by the ratio of upright/prone CO (%) as the hypokinetic state with decreased upright CO compared to prone CO, eukinetic state (unchanged CO), and hyperkinetic state with increased upright CO. The major trend in age dynamics is a permanent decrease in the hypokinetic state and an increase in the hyperkinetic state.

Key words: postnatal ontogenesis, anthropogenetic model, gravitational factor, heart mass, cardiac output, type of circulation

For citation: Belkaniya G.S., Dilenyanyan L.R., Bagrii A.S., Ryzhakov D.I., Pukhalska L.G. General approaches to anthropophysiological characterization of age-related changes in human circulation. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15(4): 24–31 (in Russian)

For correspondence: Dilenyanyan Levon Robertovich, e-mail: levon-nn@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 15.09.2017

Введение

В процессе онтогенетического формирования прямохождения и жизнедеятельности человека в этих характерных для него позных условиях организменная адаптация к земной гравитации у человека реализуется по трем составляющим. Первая — это изменения массы, линейных размеров и пропорций тела в процессе роста и физического развития. Вторая — поэтапное формирование поз и переход к прямохождению. Третья — гидростатический фактор кровообращения, изменения которого детерминированы как изменениями линейных размеров, так и, особенно, позой тела, а по завершению роста — временной экспозицией жизнедеятельности в условиях прямохождения (стоя, сидя, при ходьбе).

Влияние земной гравитации на развитие плода минимально. Рождение ребенка — это начало формирования базовых биологических адаптаций к основным физическим условиям среды [1, 2].

По мере роста и поэтапного освоения прямохождения, а затем и прямохождения относительное влияние гравитации на осевые структуры тела и сердечно-сосудистую систему (ССС) усиливается. Принципиальное отличие проявляемости этого фактора у человека от других животных напрямую связано с видовыми особенностями позной статики и локомоции. Только у человека в характерных для него видовых условиях прямохождения около 70% объема крови сосредотачивается ниже уровня сердца. Формирующийся таким образом столб крови, который зависит от высоты (от стоп до уровня сердца), объема и удельного веса крови, и определяет величину гидростатического фактора,

на преодоление которого направлена антигравитационная регуляция кровообращения. У остальных животных с проноградной позной статикой и четвероногой локомоцией тот же объем крови локализуется на уровне сердца и выше него. Это — принципиально иная гидростатическая ситуация кровообращения. При этом следует подчеркнуть, что если для четвероногих животных принятие вертикальной позы эпизодично, то для человека, как прямоходящего существа, такая поза является характерным и основным физическим условием его жизнедеятельности, как на протяжении суток, так и всей его жизни.

Усиление гидростатического (гравитационного) фактора кровообращения в процессе роста и поэтапного перехода человека к прямохождению

В процессе онтогенетической адаптации кровообращения к прямохождению условная величина гидростатического фактора (gmh, усл.ед.) увеличивается в несколько раз (рис. 1). Основой такого увеличения является поэтапный переход к прямохождению. Ростовое увеличение массы тела сопровождается увеличением объема и массы крови [3, 4], что усиливает весовую составляющую (m) гидростатического столба крови. А сама высота столба (h) также прогрессивно увеличивается в соответствии с ростовым увеличением общей длины тела, а также с изменениями пропорций тела [5] — относительное к длине тела укорочение верхней части туловища (от уровня сердца до головы) и относительное удлинение нижней части тела (от уровня сердца до стоп).

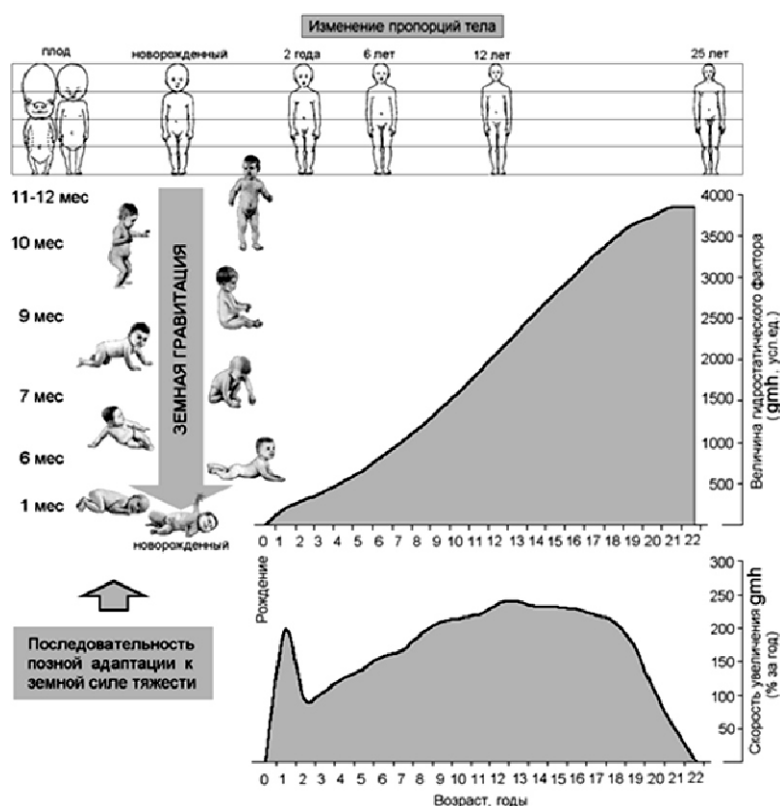


Рис. 1. Усиление гидростатического (гравитационного) фактора кровообращения в процессе роста и поэтапного перехода человека к прямохождению на протяжении предефинитивной стадии постнатального онтогенеза. Вверху — изменения пропорций тела по данным Robbins W.J. [5]. Слева: поэтапные позные формы адаптации к земной гравитации. Справа: верхний затемненный профиль — условная величина гидростатического фактора из расчета gmh (в усл. ед.), где g — ускорение свободного падения (принято за 1), m — масса крови (в мл, плотность крови принята за 1) и h — высота гидростатического столба крови (от уровня сердца до стоп, в см); нижний затемненный профиль — уровень годового прироста величины гидростатического фактора (%).

На графике скорости изменений величины гидростатического фактора (рис. 1) видно, что его величина (gmh, усл.ед.) растет на протяжении всего предефинитивного периода постнатального онтогенеза, вплоть до общей остановки роста. Причем, первый пик скорости увеличения «gmh» (в % за год) отмечается к 1-му году, когда ребенок самостоятельно становится на ноги, и принципиально изменяются гидростатические условия кровообращения. Затем на протяжении 2—3 лет скорость замедляется, после чего она прогрессивно растет до 12—13 лет, остается на стабильном уровне до 17—18 лет и к завершению общего роста (21—22 года) прогрессивно снижается до нуля.

Таким образом, наиболее динамичными периодами формирования гидростатического (гравитационного) фактора кровообращения у человека является первый год жизни, а затем период с 4—5 до 12—13 лет (т.е. к началу полового созревания). А это значит, что именно в этих периодах наиболее выражено проявляется нестабильность антигравитационного напряжения кровообращения. Напряженной остается регуляция кровообращения по гидростатическому (гравитационному) фактору в периоде полового созревания (12—18 лет), после чего по завершению роста и физического развития гидростатическая ситуация кровообращения стабилизируется. Однако в дефинитивном и постдефинитивном периодах постнатального онтогенеза реально перманентное увеличение временной экспозиции напряжения ССС в режиме антигравитационного обеспечения по возрастной, социальной и нозологической составляющим жизнедеятельности человека.

На рис. 2 схематически показаны предложенные нами [6] этапы относительных изменений влияния земной гравитации и напряженности организменной адаптации в процессе роста, физического развития и жизнедеятельности человека: 0 — пренатальное развитие (от оплодотворения яйцеклетки до рождения); 1 — формирование прямохождения (от рождения до 1 года); 2 — формирование основных локомоторных форм прямохождения (к 5 годам); 3 — способность длительного удержания тела в условиях прямохождения и прямохождения (к 7 годам); 4

— половое закрепление прямохождения и формирование полодифференцированных форм адаптации организма женщин и мужчин к гравитации (к 20—21 годам); 5 — репродуктивные и нозологические формы адаптации на протяжении первого и второго зрелого возраста (от 20—21 года до менопаузы у женщин и до 60 лет у мужчин); 6 — старение и амортизационные формы проявления адаптации к гравитации (после менопаузы у женщин и старше 60 лет у мужчин и до конца жизни). Помимо возрастных границ основных этапов, по шкале возраста цифрами обозначены дополнительные разграничительные даты: по этапу 4 — дата 14—15 лет соответствует вхождению в период полового созревания, по этапу 5 — дата 35 лет разграничивает периоды 1-го и 2-го репродуктивного возраста, по периоду 6 — дата 70 лет разделяет фазу пострепродуктивного возраста до и после условного рубежа средней продолжительности жизни. В качестве последней принимается условная средняя продолжительность жизни при рождении от общей численности населения по данным ВОЗ.

Ростовой процесс и антропогенетическая модель постнатального онтогенеза по насосной функции сердца

Представление о возрастной динамике напряженности адаптации организма к земной гравитации в процессе формирования прямохождения хорошо согласуется и с данными Ю.А. Власова [3] по продолжительности жизни и динамике смертности больных с пороками сердца. На рис. 3 хорошо видно, что больные с врожденными пороками сердца (ВПС) быстро элиминируют из популяции. Учитывая значение гидростатического (гравитационного) фактора кровообращения для человека в условиях прямохождения, понятно, что именно адаптация ССС к этому фактору становится критическим испытанием для сердца. Поэтому, независимо от пола, выраженная динамика уменьшения числа живущих с ВПС отражает затруднение или невозможность ростовой адаптации к условиям прямохождения.

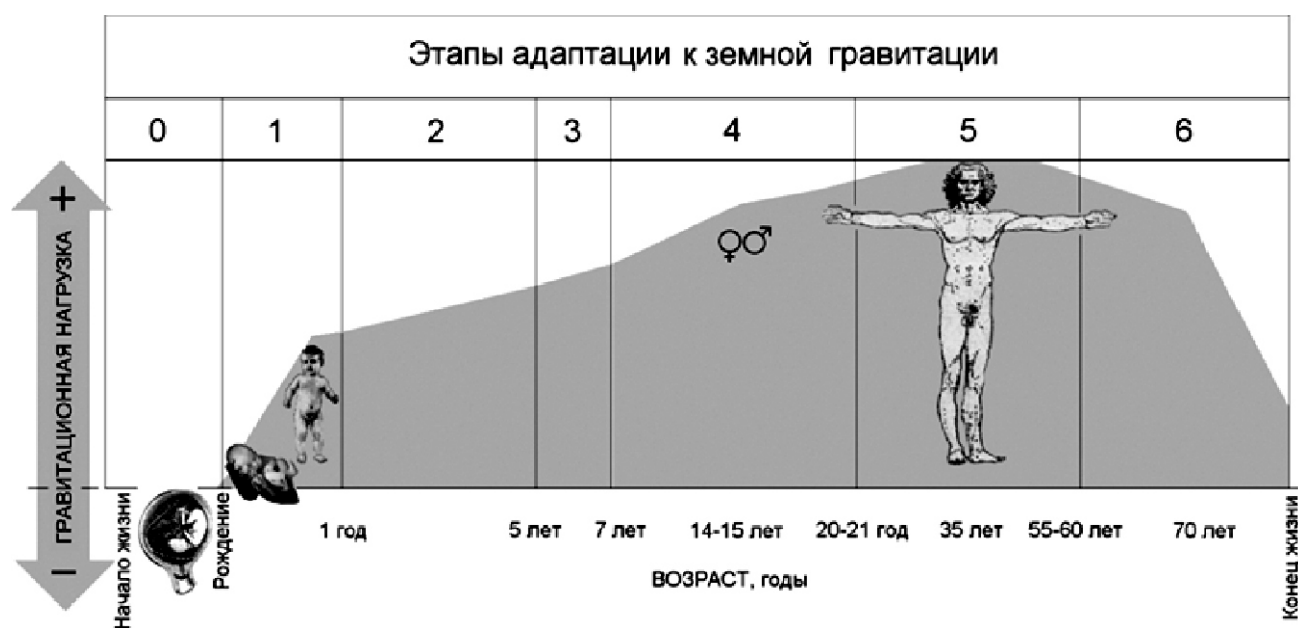


Рис. 2. Этапы относительных изменений влияния земной гравитации и организменной адаптации к ним в процессе развития и жизнедеятельности человека.

При сравнении динамики умирающих лиц без ВПС и больных с ВПС на этапы онтогенетической адаптации к земной гравитации (рис. 3) видно, что смертность больных с ВПС на протяжении первых четырех и начала 5-го этапов значительно выше, чем по общей популяции. Причем, пики смертности приходятся на основные этапы ростовой адаптации в процессе формирования прямохождения. Так, первый пик приходится на период новорожденности и свидетельствует об общей несовместимости с жизнью сложных и тяжелых пороков сердца. Следующий этап физического развития связан с формированием прямохождения и базовой адаптации организма к земной гравитации, которая становится критическим испытанием для организма с ВПС, и проявляется в выраженном пике смертности к 5 годам.

Часть выживших больных с ВПС переходят к следующему этапу ростовой адаптации в условиях прямохождения. Усиливающаяся гравитационная нагрузка на организм и на кровообращение в периоде ускоренного роста и полового созревания вновь становится критичной для детей с ВПС. Отражением этого является третий пик повышения смертности по популяции больных детей (рис. 3). При этом у девочек в связи с более ранним вхождением в период полового созревания и более сложной формой гормонального обеспечения циклического состояния организма, включая менструальные кровотечения, повышение смертности по времени наступает раньше и поддерживается на этом уровне дольше, чем у мальчиков. И только наиболее жизнеспособные дети из этой популяции переходят на следующий этап рассматриваемой модели онтогенетической адаптации к земной гравитации. Однако и тогда ограниченность их жизненного ресурса отражается значительно меньшей, по сравнению с общей популяцией, продолжительностью жизни — для мужчин около 50—54 лет, женщин около — 55—59 лет (рис. 3).

Нагрузочный характер антигравитационного напряжения ССС в процессе ростового формирования прямохождения определяет необходимость структурной и функциональной полноценности сердца и кровообращения [3, 4]. Динамика роста сердца в соответствии с этапами этой адаптации показывает процесс становления такой структурной трансформации (рис. 4, сверху).

Самая высокая скорость прироста массы сердца отмечается к моменту перехода ребенка к самостоятельному стоянию (1-й этап). Высокой эта скорость остается и на протяжении 2 и 3 этапов. После завершения формирования прямохождения (3 этап), нарастание массы сердца несколько снижается, однако в пубертатном периоде оно вновь повышается. Отмеченный фазовый характер особенно четко прослеживается по возрастной динамике скорости изменения удельной массы сердца (рис. 4, внизу), проявляя этапные особенности соотношений между становлением прямохождения и структурным развитием сердца.

При этом прослеживается и наложение на ростовой процесс полового созревания, которое через увеличение линейных размеров и объема крови permanently усиливает и влияние гидростатического (гравитационного) фактора кровообращения. Так, на рис. 4 (внизу) четко определяются скачки скорости роста в 9—10 лет и после 14 лет, которые, с одной стороны, определяют влияние пре- и пубертатной фаз полового созревания на ростовой процесс, а, с другой стороны, демонстрируют возросший

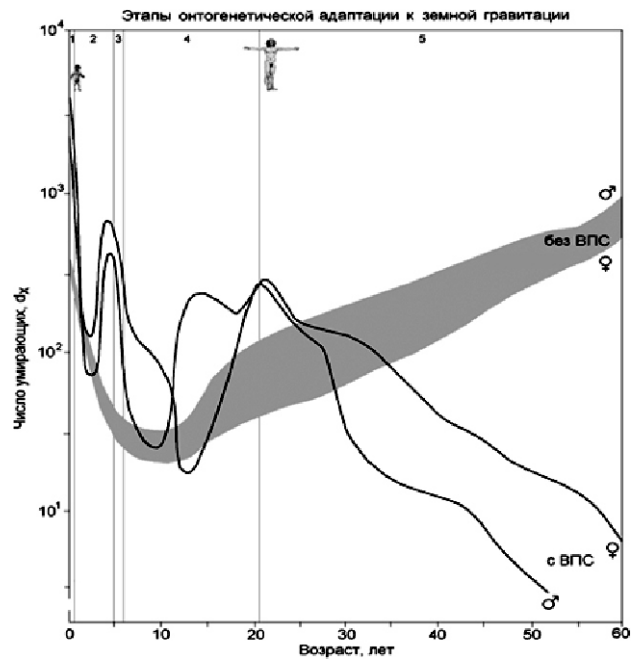


Рис. 3. Динамики умирающих (d_x) в популяции мужчин и женщин без ВПС (верхний и нижний край затемненного профиля) и в популяции больных с ВПС (нижняя и верхняя сплошные линии) по данным Ю.А. Власова [3], совмещенной с антропогенетической моделью постнатального онтогенеза по этапам онтогенетической адаптации к земной гравитации [1, 2]. Числами вверху обозначены этапы относительных изменений влияния земной гравитации и организменной адаптации к ним в процессе развития и жизнедеятельности человека (см. рис. 2).

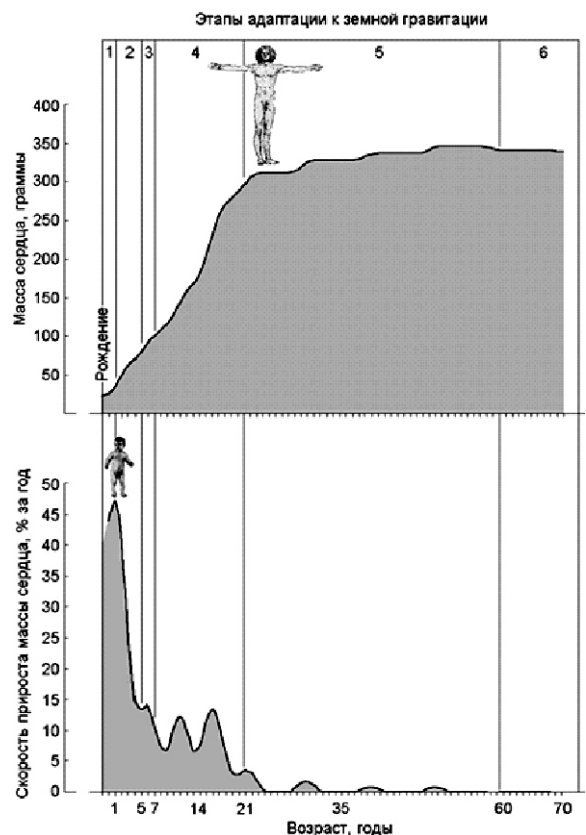


Рис. 4. Вверху — увеличение массы сердца в соответствии с этапами адаптации к земной гравитации в процессе онтогенетического становления прямохождения у человека. Внизу — динамики массы сердца по Ю.А. Власову [3, 4], дополненная собственными данными по скорости прироста массы в % за год, и совмещенная с оригинальной периодизацией по «антропогенетической модели» постнатального онтогенеза [1, 2].

запрос к сердцу на гемодинамическое обеспечение жизнедеятельности в условиях прямохождения. Значительно менее выражено такой запрос реализуется на 5-м этапе рассматриваемой «антропогенетической модели», отражая, в отличие от ростового процесса на начальных этапах, проявления функциональной гипертрофии сердца.

Рассмотренные данные демонстрируют, с одной стороны, нагрузочный характер антигравитационного напряжения организма в процессе ростового формирования прямохождения, а, с другой стороны, свидетельствуют о необходимости структурной и функциональной полноценности сердца и кровообращения для реализации базовой онтогенетической адаптации к планетной гравитации человека как прямоходящего существа.

Структурное становление сердца формирует и его функциональные возможности. Так, увеличение массы сердца сопровождается и увеличением минутного объема кровообращения (рис. 5, сверху, линия 1). Причем, наибольшей скоростью его прироста является на 1-м, 2-м и 3-м этапах становления прямохождения (рис. 5, внизу, линия 1), после чего, в отличие от изменений массы сердца, скорость нарастания МОК уменьшается, мало изменяется в пубертатном и в остальных возрастных периодах. Отставание увеличения МОК по сравнению с массой тела и, особенно, массой сердца отражается в четком уменьше-

нии соответствующих удельных показателей — МОК на кг массы тела (линия 2) и МОК на грамм массы сердца (линия 3). И по этим показателям наиболее выраженные изменения проявляются как по их общему уровню (рис. 5, сверху), так и по скорости изменений (рис. 5, внизу) на основных этапах становления прямохождения.

Следует отметить, что данные литературы, включая и использованные характеристики возрастной динамики МОК [3, 4], получены при традиционном измерении сердечного выброса в положении лежа. И даже при таком ограничении, возрастная динамика МОК совмещается с основными этапами формирования прямохождения и проявлениями адаптации ССС по гравитационному фактору кровообращения (по первой составляющей «антропогенетической модели»).

Учитывая, что для человека наиболее актуальными условиями жизнедеятельности являются те или иные формы прямохождения, то с позиций антропофизиологического подхода необходимо показать характеристику возрастной динамики по сердечному выбросу и в положении стоя (по второй составляющей «антропогенетической модели»).

В соответствии с антропофизиологическим подходом нами проведен анализ (суммарно мужчины и женщины) возрастной динамики сердечного выброса по положению

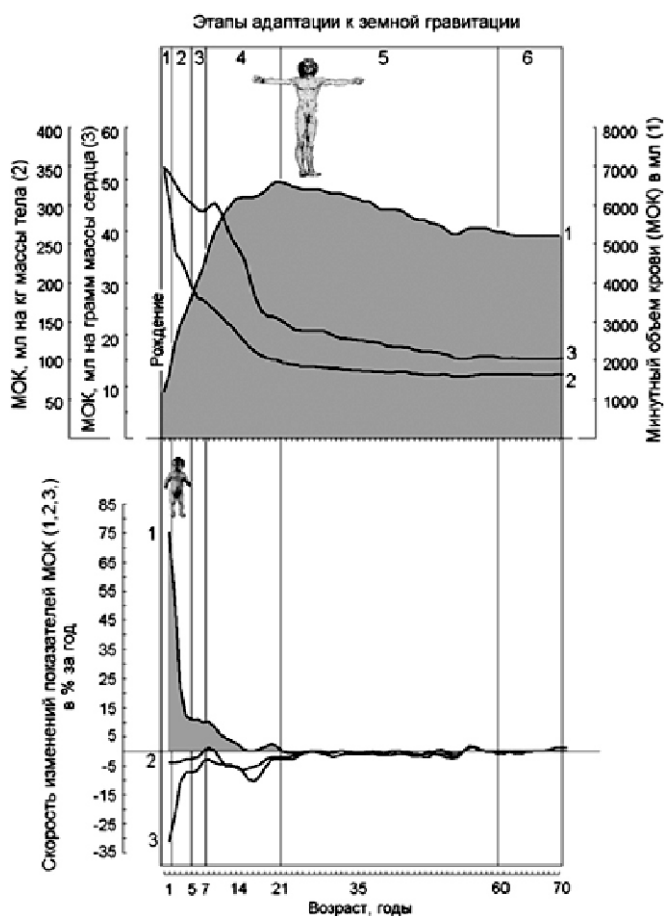


Рис. 5. Онтогенетическая динамика МОК, совмещенная с этапами адаптации к земной гравитации в процессе становления прямохождения у человека [1, 2]. Вверху: МОК приводится по данным Ю.А. Власова [3, 4] и дополнена нами расчетными данными по МОК (2, 3). Внизу: скорость изменений показателей МОК. Обозначения: 1 — МОК, 2 — МОК на кг массы тела, 3 — МОК на грамм массы сердца.

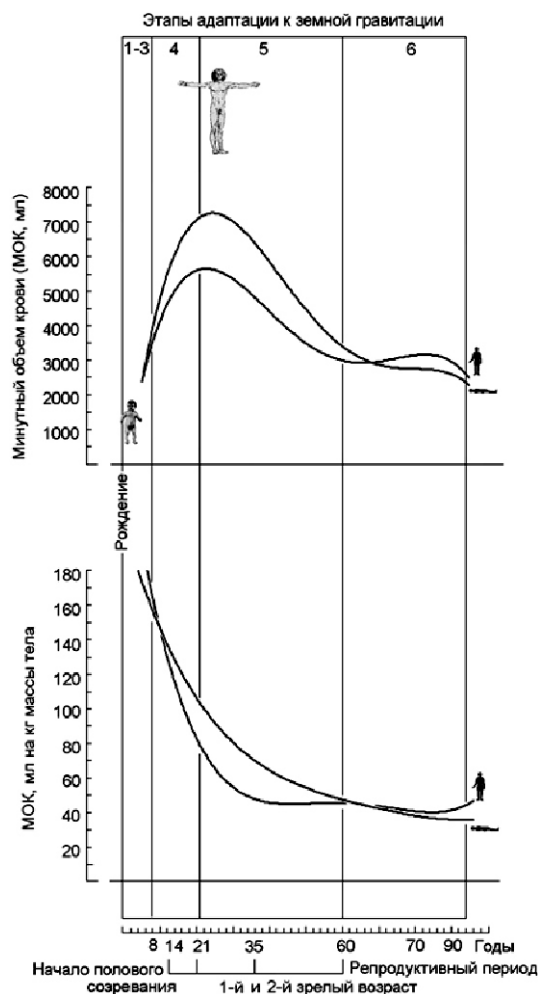


Рис. 6. Антропофизиологическая характеристика возрастной динамики МОК и МОК на кг массы тела по общей выборке (мужчины и женщины суммарно), в положениях стоя и лёжа (обозначено фигурками).

стоя и лежа. На рис. 6 представлены данные по возрастной динамике прямой величины МОК (вверху) и индексированной по массе тела (МОК на кг массы тела, внизу). Рисунки построены на основании модальных значений (Mo) по возрастным группам: до 8 лет (n = 55), 9–14 лет (n = 99), 15–21 лет (n = 358), 22–35 лет (n = 496), 36–55 лет у женщин и 36–60 лет у мужчин (n = 1021), до 70 лет (n = 413), 71–80 (n = 196), 81–90 (n = 42) и старше 90 лет (n = 5).

При сопоставлении динамики абсолютных значений МОК (в мл) по собственным данным в положении лежа (рис. 5) и по данным Ю.А. Власова [3, 4], которые тоже получены в положении лежа (рис. 4), отмечается практическое совпадение максимального увеличения сердечного выброса к моменту завершения роста (к 21 году). Принципиально схожей была и последующая динамика прогрессирующего снижения величин МОК. Особенно четко возрастное снижение сердечного выброса в положении лежа определяется величине МОК на кг массы тела.

Заметно более крутое снижение уровня МОК по нашим данным связано с тем, что данные Ю.А. Власова [3, 4] были получены на выборках практически здоровых людей. Нами использовалась обсервационная клинически нерафинированная выборка, в которой были и хронические заболевания в стадии ремиссии. И вполне закономерно, что с момента накопления таких лиц по старшим возрастным выборкам более выражено проявлялась соответствующая депрессия насосной функции сердца. Тогда как возрастные выборки предефинитивной стадии постнатального онтогенеза и по нашим, и по данным Ю.А. Власова [3, 4] были более однородными и менее нозологически отягощенными по своему составу.

Что касается величин МОК в положении стоя, то для анализа использованы собственные данные. В первом приближении характер динамики кривых уровня МОК и МОК на кг массы тела в положении стоя соответствует таковому в положении лежа. Однако при сопоставлении кривых проявляются принципиальные различия по возрастной динамике сердечного выброса в положениях стоя и лежа. Это видно по просвету между кривыми на разных этапах возрастной динамики и по перекресту кривых в пострепродуктивном возрасте (старше 60 лет), что свидетельствует об особой информативной значимости антропофизиологического соотношения по МОК (стоя/лежа) в характеристике динамической организации кровообращения (рис. 6). Еще выразительнее антропофизиологическое соотношение по МОК подчеркивалось при анализе возрастной динамики «гидростатического индекса» сердечного выброса (рис. 7). Последний рассчитывался по отношению МОК к высоте гидростатического столба, которая условно принималась для положения лежа в 10 см, а стоя — 70% от длины роста.

При этом еще более четко определяется не просто изменение соотношения кривых возрастной динамики по «гидростатическому индексу» МОК в положениях лежа и стоя, а смена их на противоположные. Если в периоде роста вплоть до его окончания и вступления в период зрелости отмечается четкое превалирование индексированной величины МОК по положению лежа, то на протяжении 1-го репродуктивного возраста (22–35 лет) это соотношение изменяется на противоположное, причем, permanently усиливаясь на протяжении 2-го репродуктивного (36–60 лет) и пострепродуктивного (старше 60 лет) возраста.

Типологическое отражение «антропогенетической модели» возрастной динамики кровообращения

Особое внимание к рассмотрению характеристик МОК связано не только с пониманием центрального значения сердечного выброса в перфузионных механизмах кровообращения, а с необходимостью использования антропофизиологического соотношения МОК (стоя/лежа) в идентификации типологической структуры динамической организации кровообращения [1, 6, 7], которая представлена тремя типами: гипокинетическим состоянием (I тип) с уменьшением МОК стоя по сравнению с лежа (меньше 94%); эукинетический или II тип (94–106%); и гиперкинетическое состояние, или III тип (больше 106%). При этом следует иметь в виду, что тип определяет и направленность гемодинамической реактивности по сердечному выбросу на самые разнообразные воздействия, включая и медикаментозные [1, 7].

Приведенные на рис. 8 данные демонстрируют четко выраженную возрастную динамику типологической структуры состояния кровообращения. Последняя у детей до 8 лет представлена преимущественно (64%) I типом или гипокинетическим состоянием. В препубертатном возрасте (9–14 лет) увеличивается доля переходного II типа и нивелируется типологическая преимущественность по выборке какого-либо типа. Устойчиво стабильной типологической организацией кровообращения становится в периодах завершения роста (15–21 лет) и физической зрелости (22–35 и 36–60 лет). На этом этапе возрастной динамики доля состояний по I типу достигает, соответственно 85%, 68% и 67%, являясь специфической характеристикой соответствующих возрастных выборок. Однако именно 1-й репродуктивный (зрелый) возраст (22–35 лет) становится границей перехода к permanently нарастающей в дальнейшем доли III типа. Постдефинитивный (пострепродуктивный) этап возрастной динамики

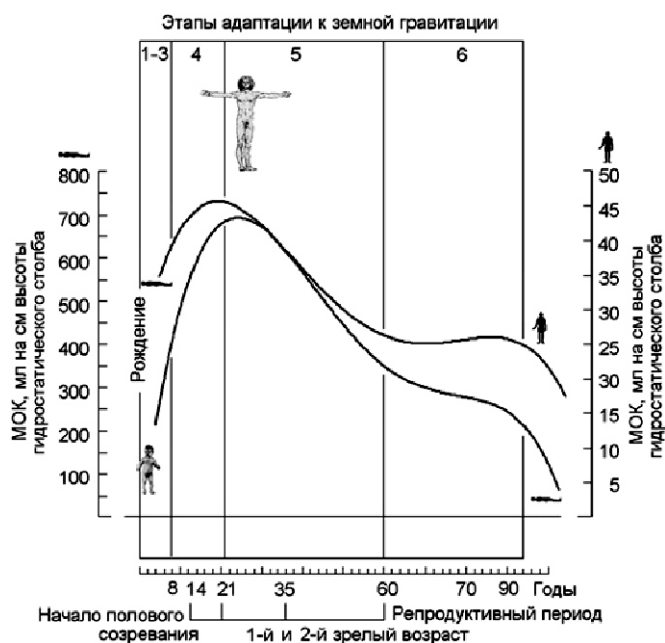


Рис. 7. Онтогенетическая динамика изменений «гидростатического индекса» сердечного выброса (МОК / 70% роста) у человека в положении лежа (МОК / 10 см) и стоя (МОК / 70% роста) в соответствии с этапами адаптации к земной гравитации в процессе становления прямохождения. Положение тела обозначено фигурками.

ДОЛЯ ТИПОВ ГЕМОДИНАМИКИ (в %)

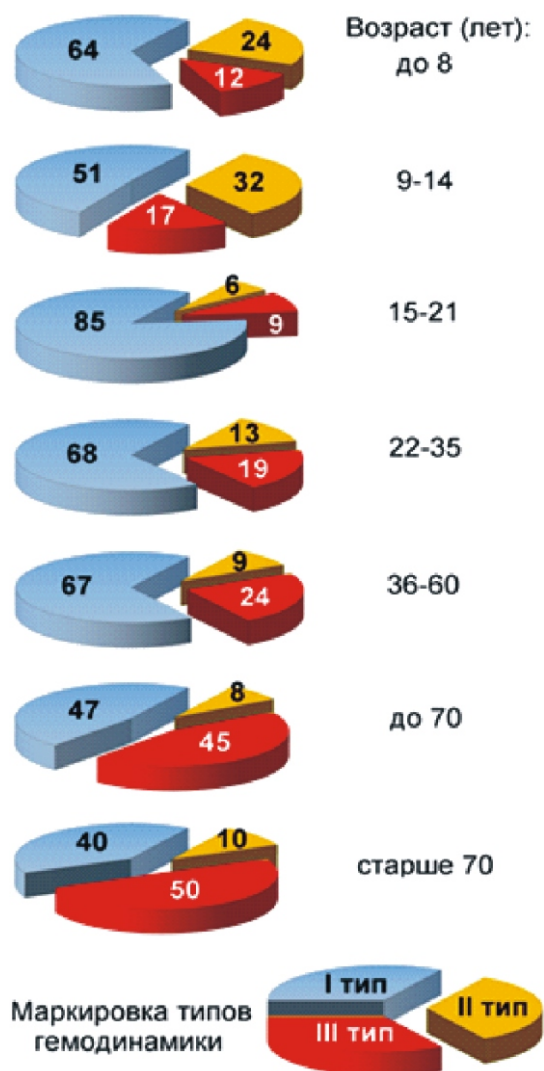


Рис. 8. Антропогенетическая модель возрастной динамики типологической структуры кровообращения у мужчин и женщин по соотношению МОК в положениях стоя/лежа. Цифрами обозначены распределение типов гемодинамики (%) по выборкам. Расшифровка типов гемодинамики I, II и III – в тексте статьи.

характеризуется уменьшением доли I типа до 47% и 40% с параллельным нарастанием представительства III типа до 45–50% как проявление неоптимальности типологической структуры кровообращения [8].

Гиперкинетическое состояние в ортостатике (III тип), с одной стороны, является проявлением адаптации к гравитационному (гидростатическому) фактору кровообращения для обеспечения циркуляторного состояния ССС человека в условиях прямохождения. Направленностью такой адаптации является централизация кровообращения в положении стоя. С другой стороны, III тип отражает напряженное состояние ССС в режиме антигравитационного обеспечения, при котором ограничен функциональный резерв по сердечному выбросу в положении стоя [7, 8], нарастают циркуляторные синдромы и формируются на этой основе нозологические состояния [8, 9].

Заключение

Приведенные данные обосновывают необходимость учета динамической организации кровообращения у человека по антропофизиологическому соотношению МОК в положениях стоя и лежа. Поскольку она отражает форму адаптации кровообращения к гравитационно-гидростатическому фактору в условиях прямохождения. Возрастной направленностью динамики является перманентное уменьшение представленности гипокинетического состояния и нарастание представленности гиперкинетического состояния, границей перехода является возраст 22–35 лет.

Список литературы

1. Белкания Г.С., Диленян Л.Р., Багрий А.С., Рыжаков Д.И., Пухальская Л.Г. Антропофизиологический подход в диагностической оценке состояния сердечно-сосудистой системы. *Медицинский альманах*. 2013; 4(28): 108-14.
2. Белкания Г.С., Диленян Л.Р., Багрий А.С., Рыжаков Д.И., Кононец В.В., Пухальская Л.Г. «Гравитационная биология — антропология» в антропогенетическом обосновании здоровья и нездоровья. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; 4: URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=13976>. Дата обращения: 18.09.2017.
3. Власов Ю.А. *Онтогенез кровообращения человека*. Новосибирск: Наука, 1985. 226 с.
4. Власов Ю.А., Окунева Г.Н. *Кровообращение и газообмен человека*. Новосибирск: Наука, 1992. 319 с.
5. Robbins W.J., Brody S, Hogan A.G, Jackson, Green C.W. *Pediatric Body Proportions*. In: Growth. New Haven: Yale University Press, 1928.
6. Белкания Г.С., Диленян Л.Р., Багрий А.С., Рыжаков Д.И., Пухальская Л.Г., Коньков Д.Г. Особенности методического обеспечения антропофизиологической диагностики состояния сердечно-сосудистой системы. *Медицинский альманах*. 2013; 6(30): 208-14.
7. Белкания Г.С., Диленян Л.Р., Багрий А.С. *Кардиодинамические основы и перспективы клинического использования реографии*. Н.Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2016. 220 с.
8. Белкания Г.С., Диленян Л.Р., Багрий А.С., Рыжаков Д.И., Коньков Д.Г., Пухальская Л.Г. Антропофизиологическое обоснование типологического определения оптимальности и неоптимальности гемодинамического обеспечения соматического состояния организма. *Медицинский альманах*. 2014; 1(31): 119-22.
9. Диленян Л.Р., Багрий А.С., Белкания Г.С., Рыжаков Д.И., Пухальская Л.Г. Антропогенетическая и онтогенетическая модель общих клинических проявлений соматического состояния человека. *Медицинский альманах*. 2015; 4 (39): 222-7.

References

1. Belkaniya G.S, Dilenyana L.R., Bagrij A.S., Ryzhakov D.I., Pukhalskaya L.G. [Anthropophysiological approach in the diagnostic assessment of the condition of cardiovascular system]. *Meditsinskii al'manakh [Medical Almanac]*. 2013; 4(28): 108-14. (in Russian)
2. Belkaniya G.S., Dilenyana L.R., Bagrij A.S., Ryzhakov D.I., Kononets V.V., Pukhal'skaya L.G. [«Gravitational biology — anthropology» in anthropogenetic justification of health and illness]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]*. 2014; 4: URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=13976>. Retrieved: 18.11.2017. (in Russian)
3. Vlasov Yu.A. [Ontogeny of the circulatory system of humans]. Novosibirsk: Nauka, 1985. 226 p. (in Russian)
4. Vlasov Yu.A., Okuneva G.N. [Blood circulation and gas exchange in humans]. Novosibirsk: Nauka, 1992. 319 p. (in Russian)
5. Robbins W.J., Brody S, Hogan A.G, Jackson, Green C.W. *Pediatric Body Proportions*. In: Growth. New Haven: Yale University Press, 1928.
6. Belkaniya G.S., Dilenyana L.R., Bagrij A.S., Ryzhakov D.I., Pukhalskaya L.G., Konkov D.G. [The peculiarities of methodic provi-

sion of anthropophysiological diagnostics of the condition of cardiovascular system]. *Meditsinskii al'manakh [Medical Almanac]*. 2013; 6(30): 208-14. (in Russian)

7. Belkaniya G.S., Dilenyan L.R., Bagriy A.S. [*Cardiodynamic bases and outcomes of the clinical use of rheography*]. N.Novgorod: Izd-vo Nizhegorodskoy gosudarstvennoy meditsinskoy akademii [Publishing house of Nizhny Novgorod State Medical Academy], 2016. 220 p. (in Russian)

8. Dilenyan L.R., Belkaniya G.S., Bagriy A.S., Ryzhakov D.I., Konkov D.G., Pukhalskaya L.G. [Anthropophysiological approach in the system algorithm of criterial analysis of the state of the cardiovascular system]. *Meditsinskii al'manakh [Medical Almanac]*. 2014; 1(31): 119-21. (in Russian)

9. Dilenyan L.R., Bagry A.S., Belkaniya G.S., Ryzhakov D.I., Pukhalskaya L.G. [Anthropogenetic and ontogenetic model of general clinical evidence of somatic human condition]. *Meditsinskii al'manakh [Medical Almanac]*. 2015; (4): 222-7 (in Russian)

Сведения об авторах:

Белкания Георгий Северьянович — доктор медицинских наук, профессор, руководитель¹

Диленян Левон Робертович — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры лечебной физкультуры и спортивной медицины².

Багрий Алексей Сергеевич — кандидат медицинских наук, заместитель руководителя¹

Рыжаков Дмитрий Иванович — доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры патологической физиологии².

Пухальская Лиана Георгиевна — кандидат медицинских наук, адъюнкт кафедры экспериментальной и клинической физиологии³.

УДК 57.085.1
DOI:

Гистологические изменения печени и почек при экспериментальном сепсисе в аспекте специфики строения их микроциркуляторного русла

Боровая Т.Г.¹, Жуховицкий В.Г.^{1,2}, Андреевская С.Г.¹, Черкасова М.Н.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

Патогенетический механизм полиорганного поражения при сепсисе окончательно не ясен. Перспективно исследование морфогенетических основ сепсиса в экспериментальных моделях. **Цель исследования** — анализ гистологических изменений печени и почек в модели экспериментального сепсиса, выявление взаимосвязи характера этих изменений с морфологическими особенностями микроциркуляторных сосудов. **Материал и методы.** Исследование проведено на 27 половозрелых самцах мышей линии С57Bl/6. Суточную бульонную культуру штамма *Pseudomonas aeruginosa* 1840, выделенного из раневого содержимого при ожоговой болезни, вводили животным интраперитонеально по 0,5 мл. В группе №1 — в дозе 1×10^9 КОЕ/мл; №2 — 1×10^5 КОЕ/мл; №3 — 1×10^4 КОЕ/мл; №4 — 1×10^3 КОЕ/мл. Контрольным животным вводили 0,5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. На терминальной стадии сепсиса мышей усыпляли парами эфира. Удаленные органы фиксировали формалином, обезжировали в этаноле, заливали в парафиновые блоки. Серийные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, и анализировали при помощи светового микроскопа. **Результаты.** Характер микроскопических изменений печени и почек у инфицированных животных принципиально не зависел от дозы введенного возбудителя, однако степень этих изменений была наиболее высокой у животных группы №1. Изменения печени были выраженными и проявлялись венозным стазом, расширением и кровенаполнением синусоидных капилляров, деструкцией гепатоцитов, образованием фибриновых тромбов, лейкоцитарной инфильтрацией. Эти признаки соответствовали воспалению, результатом которого явились деструкция и превращение пластинок гепатоцитов в аморфные эозинофильные массы. Гистологические изменения почек, в микроциркуляторном русле которых преобладает система капиллярных клубочков с артериальной кровью, были менее выраженными и заключались в снижении кровенаполнения капилляров клубочков, деструкции проксимальных канальцев нефронов, кровенаполнении вен. Очаги лейкоцитарной инфильтрации и венозные тромбы были единичными и небольшими. Зарегистрированные изменения обсуждены с позиции специфики морфологии микроциркуляторного русла почек. **Заключение.** Морфологические особенности печеночных синусоидных капилляров и капиллярной сети почечных нефронов, связанные с их функциональной специализацией, оказывают определенное влияние на механизм и характер гистологических изменений печени и почек при сепсисе.

Ключевые слова: сепсис; гепатоцит; печеночная долька; синусоидный капилляр; клубочек нефрона; проксимальный каналец; *Pseudomonas aeruginosa*.

Для цитирования: Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г., Андреевская С.Г., Черкасова М.Н. Гистологические изменения печени и почек при экспериментальном сепсисе в аспекте специфики строения их микроциркуляторного русла. Патогенез. 2017; 15(4): 32—37

Для корреспонденции: Андреевская Светлана Георгиевна, hacaranda@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 17.09.2017

Histological changes of the liver and kidneys in experimental sepsis related with structural features of their microvasculature

Borovaya T.G.¹, Zhukhovitsky V.G.^{1,2}, Andreevskaya S.G.¹, Cherkasova M.N.¹

¹ The Honorable Academician, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Gamaleya Str. 18, Moscow 123098, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Bldg. 2, Trubetskaya Str. 8, Moscow 119991, Russian Federation

Pathogenic mechanisms of multiple-organ failure in sepsis are not completely clear. Studies of morphogenetic bases for sepsis performed on experimental models are promising. The aim of this study was to analyze histological changes in the liver and kidneys on a model of experimental sepsis and to identify a relationship of these changes and morphological features of the microvasculature. **Material and methods.** The study was performed on 27 mature

C57Bl/6 male mice. A 24-h broth culture of the *Pseudomonas aeruginosa* 1840 strain isolated from burn disease wound fluid was injected intraperitoneally by 0.5 ml per animal at doses of 1×10^6 CFU/ml in Group 1, 1.1×10^5 CFU/ml in Group 2, 1×10^4 CFU/ml in Group 3, and 1×10^3 CFU/ml in Group 4. Control animals were injected with 0.5 ml of sterile isotonic sodium chloride solution. At the terminal stage of sepsis, mice were euthanized with ether vapour. Excised organs were fixed, dehydrated, and embedded into paraffin blocks. Serial sections were stained with haematoxylin and eosin and analyzed using a light microscope. **Results.** The nature of microscopic changes in the liver and kidneys from infected animals did not basically depend on the dose of causative agent, but severity of these changes was the highest in animals of Group 1. Changes in the liver were pronounced and evident as venous stasis, dilated and blood-filled sinusoids, destruction of hepatocytes, formation of fibrin clots, and leukocyte infiltration. These signs were consistent with inflammation, which resulted in destruction and transformation of hepatocyte laminae into amorphous eosinophilic masses. Histological changes in kidneys, where glomerular capillaries with arterial blood predominate in the microvasculature, were less pronounced and evident as decreased blood filling of glomerular capillaries, destruction of proximal tubules of the nephron, and blood filling of veins. Foci of leukocyte infiltration and venous clots were occasional and small. The observed changes were discussed from the perspective of morphological peculiarities of kidney microvasculature. **Conclusion.** Morphological features of hepatic sinusoidal capillaries and the capillary network of renal nephrons related with specificity of their function exert a certain influence on the mechanism and nature of histological changes in the liver and kidneys in sepsis.

Key words: sepsis; hepatocyte; hepatic lobule; sinusoidal capillary; glomerulus of the nephron; proximal tubule; *Pseudomonas aeruginosa*.

For citation: Borovaya T.G., Zhukhovitsky V.G., Andreevskaya S.G., Cherkasova M.N. Histological changes of the liver and kidneys in experimental sepsis related with structural features of their microvasculature. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2017; 15(4): 32–37 (in Russian)

For correspondence: Andreevskaya Svetlana Georgievna, hacaranda@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 17.09.2017

Введение

Неотъемлемым отличительным признаком сепсиса является быстро возникающее полиорганное поражение, приводящее к функциональной «разбалансировке организма» и неспособности справиться с инфекцией. Важнейшим патогенетическим звеном в сложном и до конца еще не изученном механизме развития сепсиса считается нарушение микроциркуляции — универсального биологического процесса, обеспечивающего жизнедеятельность всех клеток и тканей организма [1–5]. При сепсисе наиболее рано и глубоко поражаются функции печени и почек — органов, играющих важную роль в поддержании постоянства гомеостаза организма и имеющих уникальные особенности строения микроциркуляторного русла. Проведение подробного гистологического анализа печени и почек в модели экспериментального сепсиса будет способствовать детализации морфогенетических основ поражения этих органов при сепсисе и конкретизации роли микроциркуляторного русла.

Цель исследования — анализ гистологических изменений печени и почек в модели экспериментального сепсиса, выявление взаимосвязи характера этих изменений с морфологическими особенностями микроциркуляторных сосудов.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на 27 половозрелых самцах мышей линии C57Bl/6 массой 18–20 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Животных рандомизировали на 5 групп: в 4 экспериментальных по 6 особей в каждой; 5-я группа — контрольная, состояла из 3 животных. Суточную бульонную культуру штамма *Pseudomonas aeruginosa* 1840, выделенного из раневого содержимого при ожоговой болезни, вводили в объеме 0,5 мл интраперитонеально в соответствии со следующей схемой: группа 1 — в дозе 1×10^6 КОЕ/мл; группа 2 — в дозе 1×10^5 КОЕ/мл; группа 3

— в дозе 1×10^4 КОЕ/мл; группа 4 — в дозе 1×10^3 КОЕ/мл. Контрольным животным вводили интраперитонеально 0,5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. На протяжении эксперимента дважды в день проводили мониторинг поведения и общего состояния подопытных животных. На терминальной стадии экспериментального сепсиса (которая у животных 1-й и 2-й групп наступала на 2–3-е сутки после заражения, а у животных 3-й и 4-й групп — на 4–5-е сутки после заражения) мышей выводили из опыта, усыпляя парами эфира в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, 1989» и вскрывали по общепринятой методике. Удаленные органы фиксировали 10% нейтральным формалином, обезжизняли в батарее спиртов восходящей концентрации, заливали в парафиновые блоки. Серийные срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, подготовленные образцы анализировали и фотографировали в световом микроскопе модели «Axiostar plus» (фирмы «Carl Zeiss», Германия).

Результаты исследования

Макроскопически печень у всех инфицированных животных выглядела багрово-синюшной со светлыми пятнами на поверхности. Характер микроскопических изменений принципиально не зависел от дозы введенного животным возбудителя, поэтому далее эти изменения будут описаны как общие для всех инфицированных мышей. Вместе с тем, выраженность гистологических изменений варьировала в пределах каждой из групп и была самой высокой у животных, получивших наибольшую дозу возбудителя. При обзорной микроскопии серийных срезов печени инфицированных животных обращало на себя внимание нарушение (и даже полное отсутствие) признаков дольчатого строения. Гистологические изменения не были однородными (рис. 1–4).

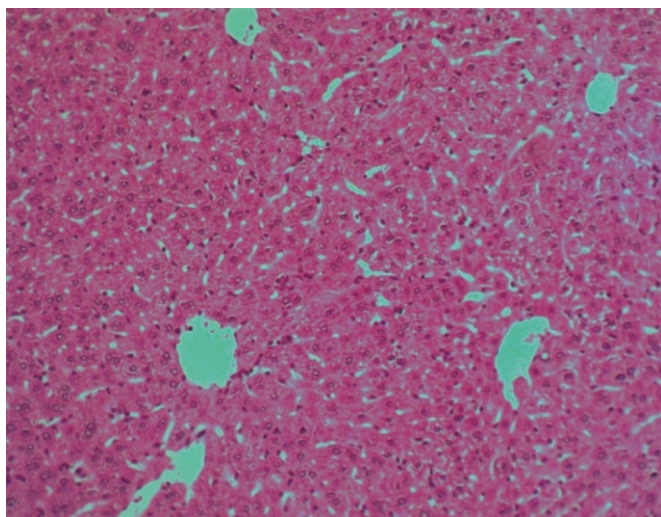


Рис. 1. Фрагмент печени контрольной мыши: дольчатое строение паренхимы, радиально расположенные печеночные пластинки. Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. 10 х об. 10.

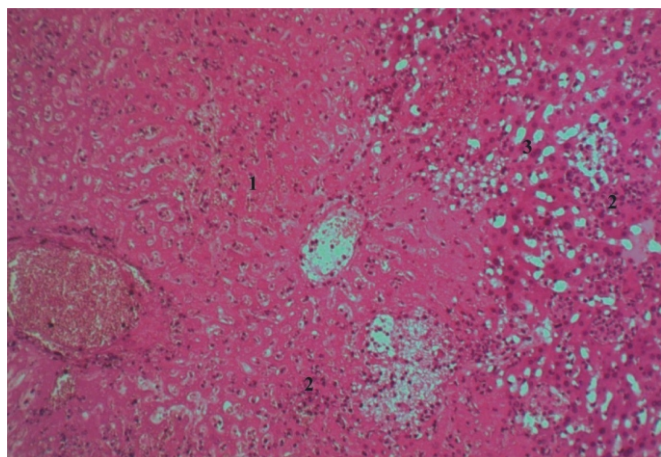


Рис. 2. Фрагмент печени инфицированной мыши (доза 1×10^6 КОЕ/мл): нарушение дольчатой структуры паренхимы, замещение печеночных долек эозинофильными массами (1), лейкоцитарная инфильтрация (2), расширенные синусоидные капилляры (3). Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. 10 х об. 10.

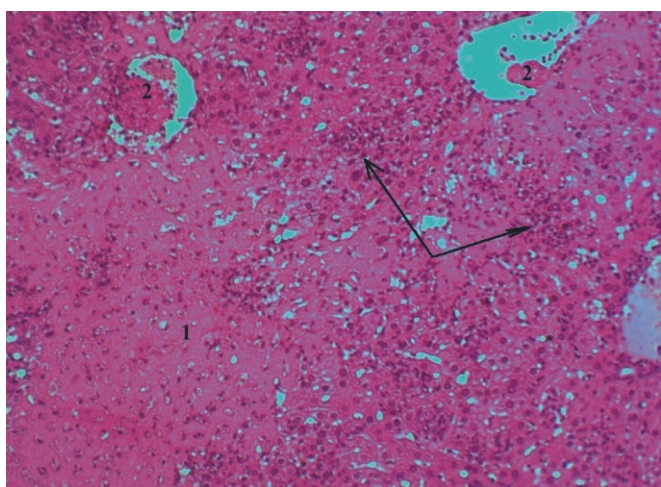


Рис. 3. Фрагмент печени инфицированной мыши (доза 1×10^4 КОЕ/мл): участки эозинофильных масс (1), фибриновые тромбы в просветах вен (2), очаги лейкоцитарной инфильтрации с клеточным детритом (3). Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. 10 х об. 20.

Участки с типичной для печени радиальной ориентацией пластинок гепатоцитов и синусоидных капилляров по отношению к центральным венам занимали небольшие площади. Чаще печеночные клетки располагались в виде скоплений без видимых межклеточных границ либо в виде пластов, пограничных с очагами лейкоцитарной инфильтрации и практически не содержали капилляров. В других участках срезов пластинки гепатоцитов превращались в гомогенно окрашенные эозином «тяжи» (с остатками ядер этих клеток), которые совместно с расширенными синусоидными капиллярами сохраняли радиальную направленность. Сливаясь друг с другом, такие «тяжи» формировали более крупные участки (соизмеримые по площади с печеночными дольками), представленные аморфными эозинофильными массами. В печени животных, получивших наибольшую дозу возбудителя, участки эозинофильных масс занимали значительную часть площади срезов (рис. 2) и содержали в своем составе множественные скопления лейкоцитов с клеточным детритом и остатками синусоидных капилляров. Вокруг синусоидных капилляров выделялись ореолы, слабо окрашенные эозином (рис. 5, 6). Практически повсеместно печеночные синусоидные капилляры выглядели резко расширенными и кровенаполненными (рис. 4). В тех частях срезов, где сохранялась узнаваемая характерная для печени гистологическая структура, подавляющее большинство гепатоцитов имели деструктивные изменения в виде резко вакуолизированной цитоплазмы при относительной сохранности ядер. Сосудистое русло печени характеризовалось расширением и полнокровием междольковых и центральных вен, образованием в их просветах фибриновых тромбов (рис. 3, 5), пристеночным стоянием лейкоцитов в междольковых венах, паравазальными скоплениями лейкоцитов у междольковых и реже — вблизи центральных вен.

Почки инфицированных животных всех групп макроскопически отличались от почек контрольных мышей более светлой окраской поверхности, что, как мы полагаем, связано с одним из наиболее значимых гистологических признаков, обнаруженных у инфицированных животных — выраженным снижением кровенаполнения капилляров клубочков (рис. 7, 8) корковых и юкстамедуллярных нефронов. Петли капилляров клубочков были спавшимися или содержали единичные эритроциты. Просветы капсул клубочков на этом фоне представлялись расширенными. Отмеченные изменения клубочков не были топографически связаны с той или иной областью коркового вещества. Другим ярко выраженным признаком изменения паренхимы почек у инфицированных животных были деструктивные изменения канальцев нефронов (рис. 9). В основном они затрагивали проксимальные канальцы и варьировали от резкого просветления и разрушения цитоплазмы эпителиоцитов с образованием подобия микрокист до слущивания апикальных частей эпителиоцитов в просвет канальцев и заполнения ими просветов вплоть до полной облитерации. На люминальной поверхности проксимальных канальцев часто располагался слой гомогенного эозинофильного вещества (рис. 10). Деструкция стенок была характерна преимущественно для проксимальных извитых канальцев, расположенных в поверхностных участках коркового вещества, т.е. для проксимальных извитых канальцев корковых и, в меньшей степени — для юкстамедуллярных нефронов. Дистальные канальцы, как и остальные отделы канальцевой системы почек вы-

глядели несколько расширенными, но без выраженных морфологических изменений. Венозные сосуды в области ворот почек были расширены и кровенаполнены, в то время как в срезах коркового и мозгового вещества артериальные и венозные сосуды контурировались плохо. В отличие от печени, венозные тромбы, как и лейкоцитарные скопления, в срезах почек были единичными.

Обсуждение

Характерным признаком сепсиса, по мнению многих исследователей, является венозный застой, развивающийся по причине сердечной недостаточности [6, 7]. Специфической особенностью кровоснабжения печени является богатая внутриорганный венозная система, состоящая из сосудов-производных воротной вены и венозных внутриорганных предшественников печеночных вен. Как отмечалось в исследованиях [8, 9], при сепсисе происходит существенное — по данным [8], практически вдвое — снижение внут-

рипеченочного кровотока и формирование застоя, как в крупных сосудах, так и в микроциркуляторном русле. Синусоидные капилляры печени, образующиеся при слиянии капилляров, отходящих от междольковых артерий и от междольковых вен и несущие, таким образом, смешанную кровь, имеют многочисленные поры и в большинстве своем лишены базальной мембраны. Вероятно, что в условиях застоя крови и развития воспаления, стенки печеночных синусоидных капилляров становятся «еще более высоко проницаемыми» для плазмы крови (которая и в норме всегда присутствует в определенных количествах в перисинусоидных пространствах и обменивается с плазмой крови в капиллярах). По этой причине в перисинусоидных пространствах накапливаются белки и жидкая часть плазмы, о чем свидетельствуют бледно-эозинофильные ореолы вокруг капилляров, пластинки гепатоцитов превращаются сначала в «эозинофильные тяжи», сохраняющие первоначальную архитектуру печеночных пластинок, а далее (по мере слияния тяжей) — в аморфные эозинофильные массы с остатками в виде ядер

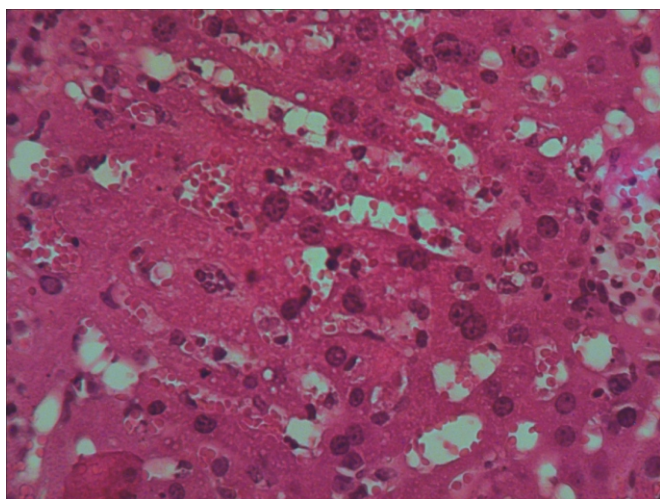


Рис. 4. Фрагмент печени инфицированной мыши (доза 1×10^3 КОЕ/мл): нарушение архитектоники печеночных пластинок, гепатоциты располагаются в виде скоплений без видимых границ, расширение синусоидных капилляров. Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. $10 \times$ об. 100.

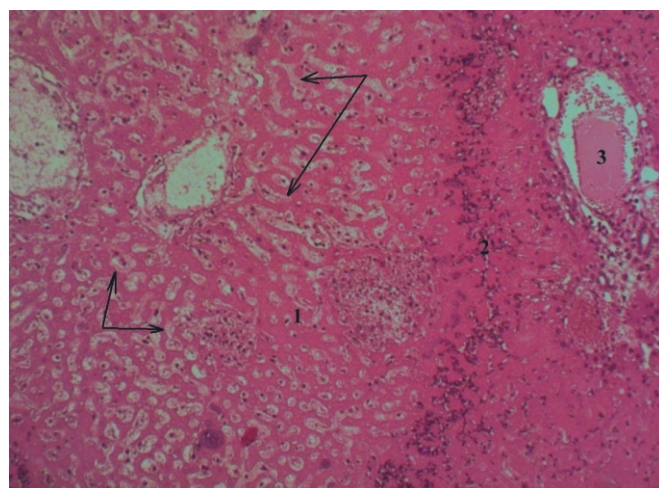


Рис. 5. Фрагмент печени инфицированной мыши (доза 1×10^6 КОЕ/мл): нарушение дольчатой структуры паренхимы. Слева крупный эозинофильный участок (1), вокруг синусоидных капилляров этого участка бледно-эозинофильные ореолы (↓); справа — разнотипные участки лейкоцитарной инфильтрации (2) и междольковая вена с фибриновым тромбом в просвете (3). Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. $10 \times$ об. 10.

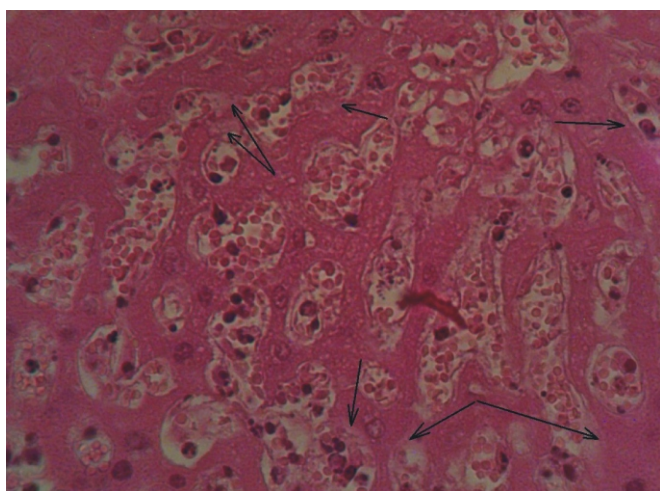


Рис. 6. Фрагмент печени инфицированной мыши (доза 1×10^6 КОЕ/мл): светлые эозинофильные ореолы у синусоидных капилляров (↓). Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. $10 \times$ об. 100.

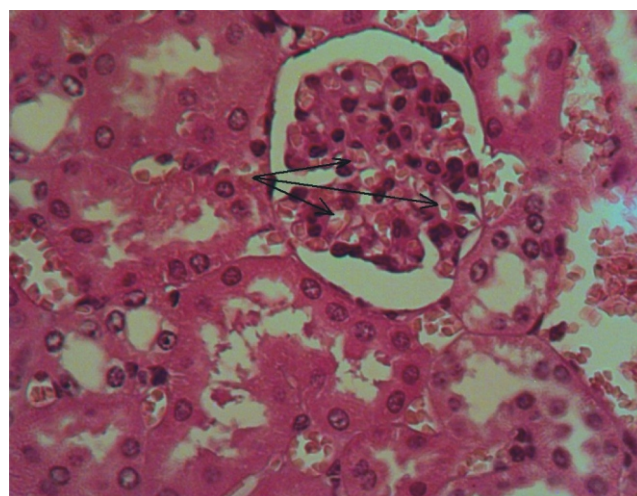


Рис. 7. Фрагмент коркового вещества почки контрольной мыши: капилляры клубочка нефрона заполнены эритроцитами (↓). Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. $10 \times$ об. 100.

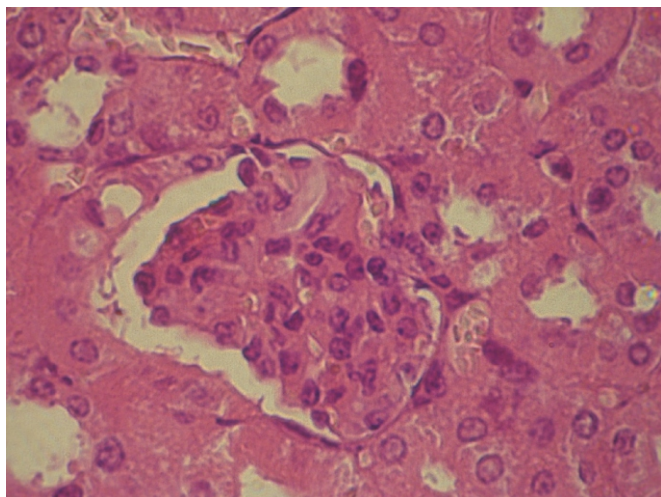


Рис. 8. Фрагмент коркового вещества почки инфицированной мыши (доза 1×10^3 КОЕ/мл): капилляры клубочка нефрона в срезе практически не видны (не кровенаполнены). Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. 10 х об. 100.

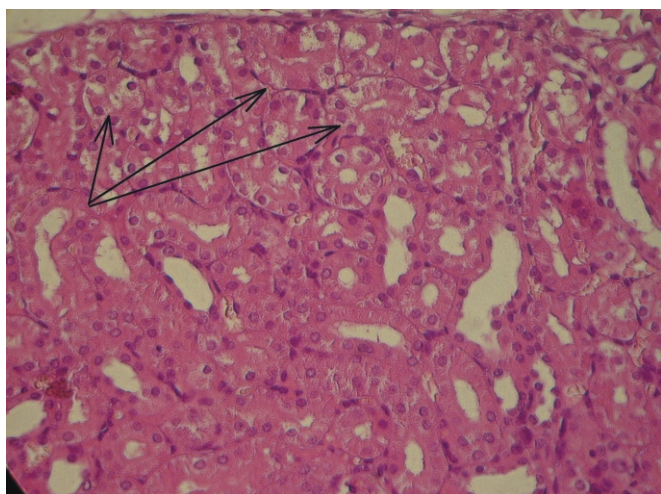


Рис. 9. Фрагмент периферической части коркового вещества почки инфицированной мыши (доза 1×10^4 КОЕ/мл): деструктивно измененные проксимальные канальцы нефронов (↓). Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. 10 х об. 20.

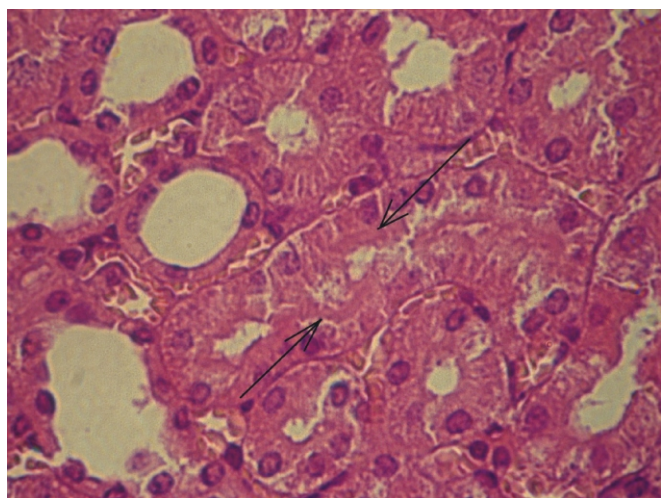


Рис. 10. Фрагмент коркового вещества почки инфицированной мыши (доза 1×10^5 КОЕ/мл): слой эозинофильного вещества на люминальной поверхности проксимального канальца (↓). Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.: ок. 10 х об. 100.

гепатоцитов и клеток синусоидных капилляров. Таким образом, предполагается, что зарегистрированная деструкция паренхимы печени с замещением печеночных долек аморфными эозинофильными массами связана с интенсивным выходом плазмы из синусоидных капилляров при воспалении, вызванном возбудителем (что в специальной литературе обозначается термином «синдром капиллярной утечки»). Выявленные морфологические изменения паренхимы печени, как мы полагаем, связаны с бурным течением процесса воспаления, которое в определенной степени обусловлено специфической строением и высокой проницаемостью микроциркуляторного русла этого органа.

Уникальной особенностью кровоснабжения почек, на которой основана функция фильтрации плазмы крови с образованием мочи, является так называемая «чудесная капиллярная сеть» клубочков нефронов. В условиях сниженного внутривенного кровотока, возникновения интравенного венозного застоя и повышения внутриорганного венозного давления, возникающих при сепсисе [6, 7], «чудесная капиллярная сеть» нефронов недополучает нужного для эффективной фильтрации количества крови, и по этой причине падает фильтрационное давление, петли капилляров и капиллярные клубочки спадаются.

Существует интересное и небезосновательное предположение, что микроциркуляторные изменения в почках возникают раньше, чем нарушения гемодинамики в более крупных сосудах [10] и, хотя окончательное подтверждение этого предположения пока отсутствует, его авторы считают, что мониторинг изменения микроциркуляции может быть полезен для ранней диагностики сепсиса. Морфологические изменения почек в условиях исследованной нами модели не являются столь глубокими, как зарегистрированные изменения печени: деструкция паренхимы почек обнаруживается преимущественно на уровне проксимальных канальцев, очаги лейкоцитарной инфильтрации единичные и небольшие по площади. Эти данные согласуются с результатами других исследований [11], в которых указывается, что структурные изменения почек не сопровождаются выраженным воспалением и некрозом и не отражают ту тяжесть поражения функции выделительной системы, которая характеризует сепсис. Что касается гистологических изменений проксимальных извитых канальцев, их достаточно сложно объяснить, не прибегая к литературным справкам. Так, в литературе имеются данные о том, что липополисахарид — эндотоксин грамотрицательных бактерий, к числу которых принадлежит *Pseudomonas aeruginosa* 1840, способен проникать через почечный фильтр в полость капсулы клубочка нефрона [2] и прямо воздействовать на эпителий проксимальных извитых канальцев (первого участка реабсорбционной системы корковых нефронов). Это воздействие заключается в активации функции пероксисом эпителиоцитов по TLR-4-зависимому пути и стимулировании деструктивных изменений этих клеток. В механизме нарушения реабсорбционной функции проксимальных канальцев (помимо разрушения эпителиоцитов их стенки) определенная роль, как мы полагаем, принадлежит отложению белков плазмы на люминальной поверхности канальцев. Детрит апикальных частей эпителиоцитов совместно с белками плазмы, реабсорбция которых нарушена (или затруднена), перекрывают просветы проксимальных канальцев и могут частично или полностью исключить тот или иной отрезок канальцев из функции реабсорбции.

Заключение

Морфологические особенности печеночных синусоидных капилляров и капиллярной сети почечных нефронов, связанные с функциональной специализацией, вносят определенные коррективы в характер и механизм гистологических изменений печени и почек при сепсисе.

Список литературы

1. Langenberg C., Bellomo R., May C., Wan L., Morge-
ra S. Renal blood flow in sepsis. *Crit. Care.* 2005; 9(4): 363-74. DOI: 10.1186/cc3540
2. Langenberg C., Wan L., Egi M., May C.N., Bellomo R. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int.* 2006; 69: 1996-2002. DOI: 10.1038/sj.ki.5000440
3. Langenberg C., Bellomo R., May C.N., Egi M., Wan L., Morge-
ra S. Renal vascular resistance in sepsis. *Nephron Physiol.* 2006; 104(1): 1-11. DOI: 10.1159/000093275
4. Langenberg C., Wan L., Egi M., May C.N., Bellomo R. Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury. *Intensive Care Med.* 2007; 33: 1614-8. DOI: 10.1007/s00134-007-0734-8
5. Matejovic M., Radermacher P., Thongboonkerd V. From hemodynamics to proteomics: Unrevealing the complexity of acute kidney injury in sepsis. In: *Yearbook of Intensive care and emergency medicine.* Ed J.L.Vincent. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 2008.
6. Chvojka J., Sykora R., Krouzecky A., Radej J., Varnerova V., Karvunidis T., Hes O., Novak I., Radermacher P., Matejovic M. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit. Care.* 2008; 12(6): 149-64. DOI: 10.1186/cc7164
7. Gullichsen E. Renal perfusion and metabolism in experimental endotoxin shock. *Acta Chir. Scand. Suppl.* 1991; 560: 7-31.
8. Nahum E., Skippen P.W., Gagnon R.E., Macnab A.J., Skarsgard E.D. Correlation of near-infrared spectroscopy with perfusion parameters at the hepatic and systemic levels in an endotoxemic shock model. *Med. Sci. Monit.* 2006; 12(10): 313-7.
9. Secchi A., Ortanderl J.M., Schmidt W., Gebhard M.M., Martin E., Schmidt H. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J. Surg. Res.* 2000; 89(1): 26-30. DOI: 10.1006/jsre.1999.5811
10. Hua T., Wu X., Wang W., Li H., Bradley J., Peberdy M.A., Ornato J.P., Tang W. Micro- and Macro Circulatory Changes During Sepsis and Septic Shock in a Rat Model. *Shock.* 2017. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000954

Сведения об авторах:

Боровая Татьяна Геннадьевна — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник¹.

Жуховицкий Владимир Григорьевич — кандидат медицинских наук, заведующий¹, старший научный сотрудник².

Андреевская Светлана Георгиевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник¹.

Черкасова Мария Николаевна — младший научный сотрудник¹.

11. Wan L., Bagshaw S.M., Langenberg C., Saotome T., May C., Bellomo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Crit. Care Med.* 2008; 36(4 Suppl.): 198-203. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318168ccd5

References

1. Langenberg C., Bellomo R., May C., Wan L., Egi M., Morge-
ra S. Renal blood flow in sepsis. *Crit. Care.* 2005; 9(4): 363-74. DOI: 10.1186/cc3540
2. Langenberg C., Wan L., Egi M., May C.N., Bellomo R. Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int.* 2006; 69: 1996-2002. DOI: 10.1038/sj.ki.5000440
3. Langenberg C., Bellomo R., May C.N., Egi M., Wan L., Morge-
ra S. Renal vascular resistance in sepsis. *Nephron Physiol.* 2006; 104(1): 1-11. DOI: 10.1159/000093275
4. Langenberg C., Wan L., Egi M., May C.N., Bellomo R. Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury. *Intensive Care Med.* 2007; 33: 1614-8. DOI: 10.1007/s00134-007-0734-8
5. Matejovic M., Radermacher P., Thongboonkerd V. From hemodynamics to proteomics: Unrevealing the complexity of acute kidney injury in sepsis. In: *Yearbook of Intensive care and emergency medicine.* Ed J.L.Vincent. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag; 2008.
6. Chvojka J., Sykora R., Krouzecky A., Radej J., Varnerova V., Karvunidis T., Hes O., Novak I., Radermacher P., Matejovic M. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit. Care.* 2008; 12(6): 149-64. DOI: 10.1186/cc7164
7. Gullichsen E. Renal perfusion and metabolism in experimental endotoxin shock. *Acta Chir. Scand. Suppl.* 1991; 560: 7-31.
8. Nahum E., Skippen P.W., Gagnon R.E., Macnab A.J., Skarsgard E.D. Correlation of near-infrared spectroscopy with perfusion parameters at the hepatic and systemic levels in an endotoxemic shock model. *Med. Sci. Monit.* 2006; 12(10): 313-7.
9. Secchi A., Ortanderl J.M., Schmidt W., Gebhard M.M., Martin E., Schmidt H. Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats. *J. Surg. Res.* 2000; 89(1): 26-30. DOI: 10.1006/jsre.1999.5811
10. Hua T., Wu X., Wang W., Li H., Bradley J., Peberdy M.A., Ornato J.P., Tang W. Micro- and Macro Circulatory Changes During Sepsis and Septic Shock in a Rat Model. *Shock.* 2017. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000954
11. Wan L., Bagshaw S.M., Langenberg C., Saotome T., May C., Bellomo R. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Crit. Care Med.* 2008; 36(4 Suppl.): 198-203. DOI: 10.1097/CCM.0b013e318168ccd5

УДК 616-092
DOI:

Размеры внеклеточных везикул, секретиремых разными видами стволовых клеток

Алчинова И.Б.^{1,2}, Полякова М.В.¹, Сабурин И.Н.¹, Карганов М.Ю.¹

- ¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8
² Научно-исследовательский институт космической медицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства России. 115682, Москва, Ореховый бульвар, д. 28

Механизм терапевтического действия мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) на облученный организм в последнее время вызывает повышенный интерес исследователей. В качестве активного участника паракринного механизма реализации этого эффекта предлагают рассматривать внеклеточные везикулы, секретиремые практически всеми клетками живого организма. **Цель работы:** выделить и охарактеризовать внеклеточные везикулы, продуцируемые стволовыми клетками различной природы. **Материалы и методы.** Суспензии внеклеточных везикул, выделенных по модифицированному протоколу дифференциального центрифугирования из культуральных жидкостей от культур ММСК костного мозга человека 2-го пассажа и ММСК жировой ткани крысы 4-го пассажа, были проанализированы методом просвечивающей электронной микроскопии и методом анализа траекторий наночастиц. **Результаты.** Исследование показало наличие в обоих образцах микрочастиц размерами до и около 100 нм, однако процентное содержание частиц разных размеров в суспензии различалось для двух анализируемых типов клеток. **Заключение.** Полученные результаты могут свидетельствовать о специфике секреции, обусловленной клеточным типом.

Ключевые слова: стволовые клетки, внеклеточные везикулы, анализ траекторий наночастиц, просвечивающая электронная микроскопия.

Для цитирования: Алчинова И.Б., Полякова М.В., Сабурин И.Н., Карганов М.Ю. Размеры внеклеточных везикул, секретиремых разными видами стволовых клеток. Патогенез. 2017; 15 (2): 38—42

Для корреспонденции: Полякова Маргарита Вячеславовна, e-mail: nedzumy@bk.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Московскому Государственному Университету им. М.В. Ломоносова и лично Е.Г. Евтушенко, Н.А. Никитину и Е.А. Трифионовой за проведение измерений.

Поступила: 20.08.2017

The size of extracellular vesicles secreted by different types of stem cells

Alchinova I.B.^{1,2}, Polyakova M.V.¹, Saburina I.N.¹, Karganov M.Yu.¹

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Research Institute for Space Medicine of the Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Assistance and Medical Technologies, Orekhovi Blvd. 28, Moscow 115682, Russian Federation

A mechanism of the therapeutic effect of multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) on irradiated body has recently arisen much interest of researchers. Extracellular vesicles (EVs) secreted by almost all cells of a living organism were suggested to actively contribute to the paracrine mechanism of this effect. The aim of the study was isolation and characterization of extracellular vesicles produced by various types of stem cells. Materials and methods. Suspensions of EVs were isolated from culture media of passage 2 human bone marrow-derived MMSC and passage 4 rat adipose tissue-derived MMSC using a modified protocol of differential centrifugation and then studied using transmission electron microscopy and nanoparticle tracking analysis. Results. The study showed the presence of microparticles with a size of ≥ 100 nm in the examined samples. However, the percent content of particles with different sizes in the suspension was different in two analyzed types of cell culture. Conclusion. The study results might reflect a specificity of secretion determined by the cell type.

Key words: stem cells, extracellular vesicles, nanoparticle tracking analysis, transmission electron microscopy.

For citation: Alchinova I.B., Polyakova M.V., Saburina I.N., Karganov M.Yu. The size of extracellular vesicles secreted by different types of stem cells. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15 (2): 38—42 (in Russian)

For correspondence: Polyakova Margarita Vyacheslavovna, e-mail: nedzumy@bk.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The authors are grateful to MV Lomonosov Moscow State University and personally E.G. Evtushenko, N.A. Nikitin and E.A. Trifonova for conducting measurements.

Received: 20.08.2017

Введение

В настоящее время существует острая необходимость в разработке новых способов терапии последствий действия ионизирующего излучения на живой организм. Одним из предложенных исследователями вариантов подобной терапии является трансплантация мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга (КМ). В предыдущей работе [1] нами было показано, что даже однократная внутривенная инъекция ММСК КМ человека облученным мышам способствовала частичному восстановлению их физиологических параметров. Однако механизм реализации такого терапевтического эффекта до сих пор полностью не изучен. В настоящее время в качестве эффекторов паракринного механизма терапевтического действия ММСК на облученный организм интенсивно изучают внеклеточные везикулы (ВВ), которые секретируются практически всеми клетками организма [2, 3]. Полагают, что эти частицы являются активными участниками процессов межклеточной коммуникации и взаимодействия клеток с микроокружением. *Целью настоящей работы* было выделить и охарактеризовать внеклеточные везикулы, продуцируемые стволовыми клетками различной природы.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы культуральные жидкости от двух клеточных линий: ММСК КМ человека 2-го пассажа (клетки, использованные ранее в качестве терапии облученных животных; КЖ-1) и ММСК жировой ткани (ЖТ) крысы 4-го пассажа (КЖ-2; для сравнения). Суспензии внеклеточных везикул, выделенных из культуральных жидкостей, были проанализированы методом просвечивающей электронной микроскопии и методом анализа траекторий наночастиц (Nanoparticle tracking analysis, NTA).

Выделение и культивирование культур клеток

Выделение и культивирование ММСК КМ человека проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [1]. Для выделения клеток ЖТ крысы в процессе операции брали фрагменты ткани подкожного жира и выделяли по стандартному протоколу [4]. Полученные фрагменты ткани в стерильных условиях измельчали, получали суспензию мелких фрагментов и проводили их инкубацию в растворах коллагеназы 1-го типа (0,07%) («ПанЭко», Россия) и диспазы (0,025%) («ПанЭко», Россия) в течение 25–30 мин. После окончания инкубации в раствор с ферментами и ткань добавляли полную питательную среду и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Супернатант сливали, а полученный осадок ресуспендировали в полной питательной среде и пропускали через нейлоновый фильтр, для того чтобы избавиться от крупных фрагментов ткани. Полученную суспензию клеток высевали на чашки Петри и культивировали в течение 7–10 дней. Среду меняли каждые 3 дня. Полная питательная среда имеет следующий состав: DMEM/F12 с глутамином («ПанЭко», Россия), 1% пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», Россия), 10% FCS (Fetal Calf Serum). При достижении монослоем клеток 80–90% конfluэнтности осуществляли пассирование культуры. В эксперименте использовали культуру клеток 4-го пассажа.

Характеристика культур стволовых клеток

Для определения иммунофенотипа полученных клеток проводили иммунофенотипирование по следующим маркерам: CD90, CD105, CD29, CD133, CD19, CD45, CD34, CD11b, CD49b, CD73, CD14 (антитела фирмы «BD Biosciences», США).

Клетки отмывали от ростовой среды раствором Версена, обрабатывали 0,25% раствором трипсина, пипетировали и центрифугировали в течение 5 минут при 300g. Полученный осадок ресуспендировали в растворе фосфатно-солевого буфера (pH = 7,4) и аликвотировали. Каждую пробу инкубировали в темноте при +25°C, 15 минут с антителами. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре «Cytomics FC 500» («Beckman Coulter», США).

Исследуемые культуры экспрессировали характерные поверхностные маркеры культуры ММСК и не экспрессировали маркеры клеток гемопоэтического и лимфоцитарного рядов. Результаты иммунофенотипирования представлены на рис. 1.

Выделение внеклеточных везикул

Выделение ВВ производили методом дифференциального центрифугирования при +4°C по модифицированному протоколу [5]. Все используемые инструменты и посуда были предварительно промыты в течение 2 часов в специально очищенной воде («Медиана», Россия). Чистоту воды оценивали по величине сопротивления, которая составила 15 МОм. КЖ центрифугировали 10 мин при 300g для осаждения клеток. Супернатант центрифугиро-

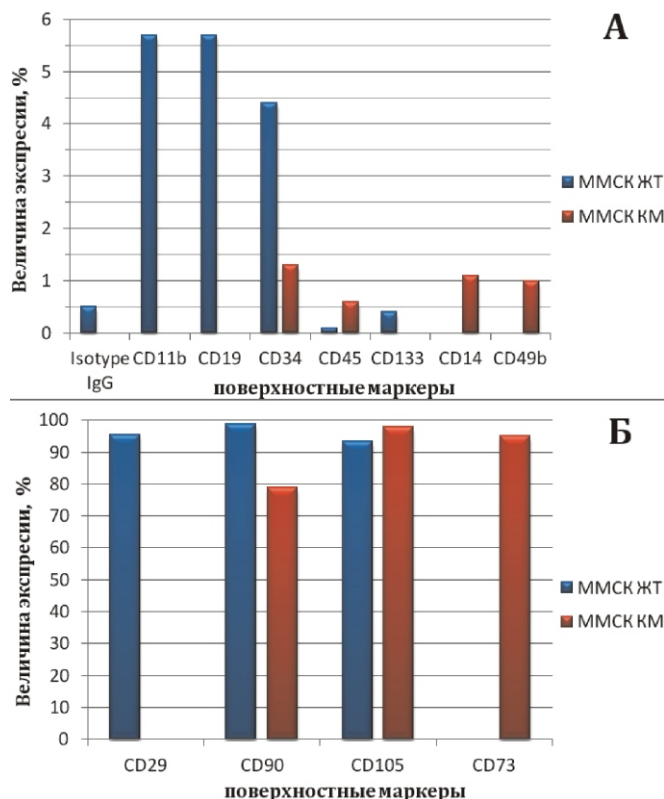


Рис. 1. Результаты иммунофенотипического анализа ММСК КМ человека и ММСК ЖТ крысы: величина экспрессии поверхностных маркеров клеток (%). А — показатели поверхностных маркеров клеток с низкой экспрессией. Б — показатели поверхностных маркеров клеток с высокой экспрессией.

вали 20 минут при 16500g (Ultracentrifuge Optima L-90K, «Beckman coulter» angular rotor) для более полного удаления клеток и дебриса. Супернатант пропускали через фильтр 0,2 мкм (Millipore Millex-GN Nylon filter, Германия), чтобы удалить частицы размером больше 200 нм, и центрифугировали 2 ч при 100000g для осаждения ВВ. Осадок ресуспендировали в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера (phosphate buffered saline, PBS) («ЭкоСервис», Россия), который был предварительно пропущен через фильтр 0,2 мкм и ультрацентрифугирован в течение 1 часа при 100000g при +4°C. Для ультрацентрифугирования использовали пробирки «Polyallomer» («Beckman», Германия) со стальными крышками, также предварительно отмытые в специально очищенной воде. Ресуспендированные пробы хранили при -20°C вплоть до начала всех последующих манипуляций.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Адсорбцию препаратов проводили в течение 30 секунд на медных сетках для электронной микроскопии IGC 200 («PELCO», США), покрытых формваровой пленкой (при нанесении пленки использовали 0,5% раствор формвара в

дихлорэтано), с последующим негативным контрастированием препаратов в 2% растворе уранил ацетата. Наблюдения проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1400 («JEOL», Япония) с цифровой фотокамерой Quemesa («Olympus», Япония) и программного обеспечения («Olympus Soft Imaging Solutions GmbH», Мюнстер, Германия) при 40000-кратном увеличении. Размеры исследуемых объектов оценивали с помощью программы ImageJ («Национальный институт здоровья», США).

Анализ траекторий наночастиц (NTA)

Метод NTA («Nanosight LM10-HSBF», Великобритания) использовали для измерения среднего размера и концентрации частиц в исследуемых образцах. Согласно заявленным производителем характеристикам, «NanoSight» позволяет обнаруживать и идентифицировать растворенные частицы размером в пределах от 10 до 2000 нм. Во время анализа через суспензию проходит сфокусированный луч лазера, который освещает содержащиеся в ней микрочастицы. Свет, рассеянный каждой отдельной частицей в регистрируемом поле зрения, фокусируется микроскопом на датчик изображения видеокамеры. Программное обеспечение NTA идентифицирует и отслеживает каждую частицу, что позволяет измерять ее среднеквадратичное смещение в процессе Броуновского движения. Этот параметр, а также данные о температуре и вязкости анализируемой суспензии, позволяют рассчитать теоретический гидродинамический диаметр исследуемых микрочастиц по уравнению Эйнштейна—Стокса [6]. Имея данные об объеме анализируемой суспензии с помощью метода NTA также возможно оценить концентрацию исследуемых частиц в образце.

В нашей работе было необходимо оценить размеры внеклеточных везикул, секретируемых разными культурами клеток. Большинство этих везикул имеют субмикронный размер (30—1000 нм), среди них особый интерес вызывают экзосомы, которые являются самыми маленькими представителями ВВ (от 30 до 150 нм) [6]. Исходя из этого, при измерении методом NTA был установлен минимальный ожидаемый размер детектируемых частиц — 30 нм. Каждый образец был разведен в 1000 раз, чтобы достичь рекомендуемой производителем для корректности измерений концентрации анализируемых частиц ($1-10 \times 10^8$ частиц/мл) [7]. В качестве контроля был выбран образец PBS, используемый для разведения. Измерения суспензий ВВ, полученных от анализируемых культур клеток, проводили в 12 повторах, контрольной пробы — в 4. Среднее количество отслеженных траекторий составило 145, 155 и 52 за проход для образцов из КЖ-1, КЖ-2 и контроля соответственно.

Результаты исследования и обсуждение

В ходе анализа суспензий ВВ с помощью ПЭМ в КЖ-1 были выявлены частицы с формой, близкой к сферической, и размерами в диапазоне от 36 до 45 нм (рис. 2, А). Других частиц в этом образце обнаружено не было. В КЖ-2 присутствовало два типа частиц: размером от 79 до 106 нм с морфологическими признаками внеклеточных везикул и от 37 до 53 нм, соответствующими, по-видимому, липопротеинам очень низкой плотности, присутствующими в сыворотке, добавляемой в культуральную среду (рис. 2, Б).

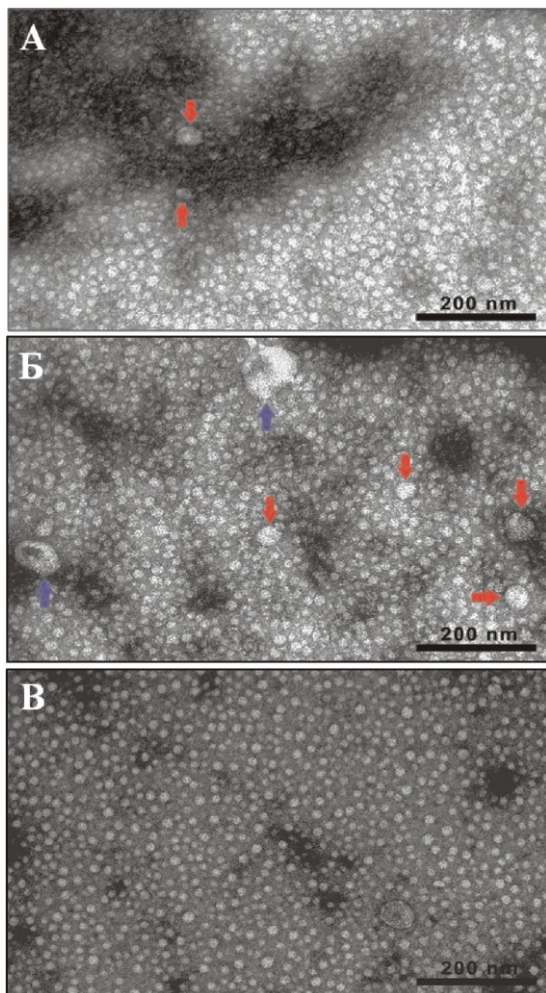


Рис. 2. Изображение ВВ в анализируемых суспензиях, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии, при 40000-кратном увеличении. А — ПЭМ ВВ от ММСК КМ человека, частицы размером 36—45 нм обозначены красными стрелками. Б — ПЭМ ВВ от ММСК ЖТ крысы, частицы размером 79—106 нм обозначены синими стрелками, а частицы размером 37—53 нм — красными стрелками. В — ПЭМ контрольного образца PBS.

В контрольном образце (PBS), подвергнутом такой же процедуре, микрочастиц близких размеров не обнаружили (рис. 2, В). Мелкая зернистость, которая присутствует и в препаратах, и в контроле, вероятно, представляет собой структуру формваровой подложки.

По результатам NTA средний размер частиц в образце КЖ-1 составил 86 нм при концентрации $6,6 \times 10^{10}$ частиц/мл, а в образце КЖ-2 — 101 нм при концентрации $7,9 \times 10^{10}$ частиц/мл (рис. 3). В контрольных образцах сред (без культивирования в них клеток) а также в образце буфера, используемого для разведения, концентрация микрочастиц не превышает 10^8 частиц/мл (данные не представлены).

Исследуя такой объект, как внеклеточные везикулы, необходимо помнить, что получаемые данные о размере микрочастиц не являются истинной величиной. Для проведения ПЭМ исследуемый образец необходимо предварительно фиксировать и регидратировать, а сам процесс получения изображения проводится в условиях вакуума. Многоступенчатая пробоподготовка и условия проведения наблюдений могут вызывать изменения формы и размеров исследуемых частиц [8]. Однако данный метод находит широкое применение, позволяя проводить анализ структурных и биологических характеристик внеклеточных везикул.

В случае NTA-анализа имеет место обратная ситуация. Вокруг везикул, находящихся в водном растворе, образуется гидратная оболочка, поэтому методы, основанные на детекции частиц в подобных условиях (NTA, методы динамического светорассеяния), позволяют определить только теоретический гидродинамический размер исследуемых микрочастиц. Тем не менее, эти методы позволяют получить довольно точную информацию о концентрации и распределении частиц по размеру в анализируемой суспензии.

Результаты нашего исследования согласуются с изложенным выше. Размеры микрочастиц, определенные методом NTA, были несколько большими, чем полученные при исследовании методом просвечивающей электронной микроскопии. Подобные различия также характерны для размеров биомолекул, определяемых в сухом и растворенном состоянии, например, с помощью рентгеноструктурного анализа и лазерной корреляционной спектроскопии [9]. Количество отслеженных траекторий в ходе NTA-анализа каждого образца также косвенно свидетельствует о различии в концентрациях частиц, содержащихся в суспензиях ВВ от разных клеточных культур.

Заключение

Полученное в нашем исследовании различие в процентном содержании микрочастиц разного гидродинамического радиуса в анализируемых суспензиях ВВ, выделенных из культуральных жидкостей от двух разных культур клеток, может свидетельствовать о специфике секреции, обусловленной клеточным типом, что согласуется с известными данными литературы [10, 11].

Список литературы

1. Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu. Long-Term Effects of Stem Cells on Total-Body Irradiated Mice. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*,

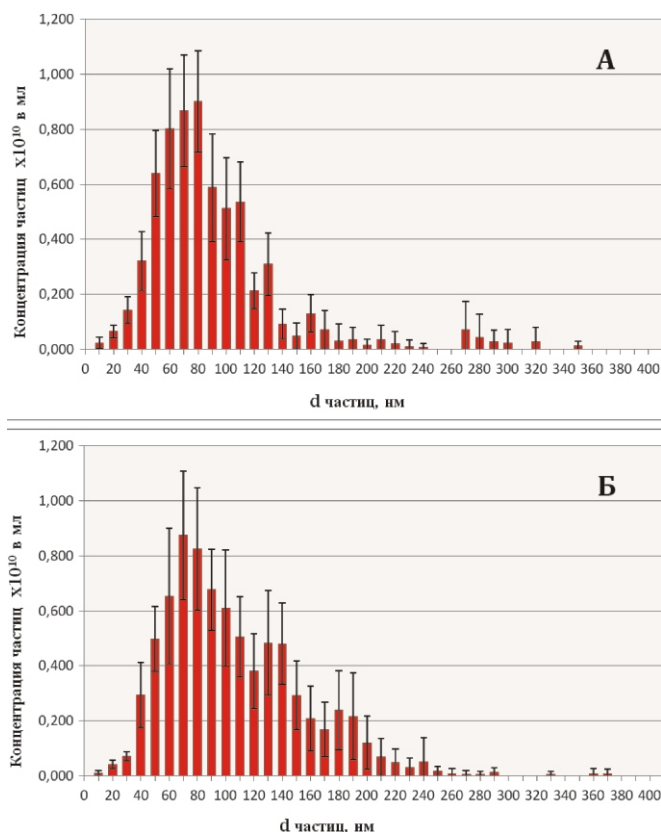


Рис. 3. Содержание частиц разных размеров в анализируемых суспензиях ВВ, полученных из двух разных культуральных жидкостей. А — ММСК КМ человека, Б — ММСК ЖТ крысы.

2017; 784(1): 012015. DOI: 10.1088/1742-6596/784/1/012015. Режим доступа: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/784/1/012015/pdf>/ Дата обращения: 19.08.2017

2. Schoefinius J.-S., Brunswig-Spickenheier B., Speiseder T., Krebs S., Just U., Lange C. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Provide Long-Term Survival After Total Body Irradiation Without Additional Hematopoietic Stem Cell Support. *Stem Cells*. 2017. DOI: 10.1002/stem.2716. Режим доступа: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.2716/epdf>/ Дата обращения: 19.08.2017

3. Wen S., Dooner M., Cheng Y., Papa E., Del Tatto M., Pereira M., Deng Y., Goldberg L., Aliotta J., Chatterjee D., Stewart C., Carpanetto A., Collino F., Bruno S., Camussi G., Quesenberry P. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016; 30(11): 2221-31. DOI: 10.1038/leu.2016.107

4. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001; 7(2): 211-28. DOI: 10.1089/107632701300062859

5. Lasser C., Eldh M., Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012; (59): e3037. DOI: 10.3791/3037. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369768/> Дата обращения: 19.08.2017

6. Gardiner C., Ferreira Y.J., Dragovic R.A., Redman C.W., Sargent I.L. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of extracellular vesicles*. 2013; 2(1): 196-71. DOI: 10.3390/ijms18061153. Режим доступа: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1153/> Дата обращения: 19.08.2017

7. Vestad B., Llorente A., Neurauder A., Phuyal S., Kierulf B., Kierulf P., Skotland T., Sandvig K., Haug K.B.F., Ovstebo R. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. *Journal of extracellular vesicles*. 2017; 6(1): 1344087. DOI: 10.1080/20013078.2017.1344087. Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/20013078.2017.1344087/> Дата обращения: 19.08.2017

8. Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(6): 1153. DOI: 10.3402/jev.v2i0.19671.1 Режим доступа: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3402/jev.v2i0.19671/> Дата обращения: 19.08.2017

9. Карганов М.Ю., Алчинова И.Б., Яковенко Е.Н., Ковалева О.И., Медведева Ю.С., Вялкина М.В. Применение метода лазерной корреляционной спектроскопии в лабораторной медицине. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61 (9): 533-4. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-9

10. Кубатиев А.А., Боровая Т.Г., Жуховицкий В.Г., Адриевская С.Г., Шевлягина Н.В. Микрочастицы тромбоцитов: образование и свойства. *Патогенез*. 2017; 15(2): С. 4-13. DOI: 10.25557/GM.2017.2.7296

11. Shustova O.N., Antonova O.A., Golubeva N.V., Khaspekova S.G., Yakushkin V.V., Aksuk S.A., Alchinova I.B., Karganov M.Yu., Mazurov A.V. Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells: impact of active tissue factor. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2017; 28(5): 373-82. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000609

References

1. Vyalkina M.V., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Medvedeva Yu.S., Saburina I.N., Karganov M.Yu. Long-Term Effects of Stem Cells on Total-Body Irradiated Mice. *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*, 2017; 784(1): 012015. DOI: 10.1088/1742-6596/784/1/012015. Available at: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/784/1/012015/pdf/> Retrieved: 19.08.2017

2. Schoefinius J.-S., Brunswig-Spickenheier B., Speiseder T., Krebs S., Just U., Lange C. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Provide Long-Term Survival After Total Body Irradiation Without Additional Hematopoietic Stem Cell Support. *Stem Cells*. 2017. DOI: 10.1002/stem.2716. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.2716/epdf/> Retrieved: 19.08.2017

3. Wen S., Dooner M., Cheng Y., Papa E., Del Totto M., Pereira M., Deng Y., Goldberg L., Aliotta J., Chatterjee D., Stewart C., Carpanetto A., Collino F., Bruno S., Camussi G., Quesenberry P. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation

damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016; 30(11): 2221-31. DOI: 10.1038/leu.2016.107

4. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J.W., Katz A.J., Benhaim P., Lorenz H.P., Hedrick M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001; 7(2): 211-28. DOI: 10.1089/107632701300062859

5. Lasser C., Eldh M., Lotvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012; (59): e3037. DOI: 10.3791/3037. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3369768/> Retrieved: 19.08.2017

6. Gardiner C., Ferreira Y.J., Dragovic R.A., Redman C.W., Sargent I.L. Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of extracellular vesicles*. 2013; 2(1): 196-71. DOI: 10.3390/ijms18061153. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/18/6/1153/> Retrieved: 19.08.2017

7. Vestad B., Llorente A., Neurauder A., Phuyal S., Kierulf B., Kierulf P., Skotland T., Sandvig K., Haug K.B.F., Ovstebo R. Size and concentration analyses of extracellular vesicles by nanoparticle tracking analysis: a variation study. *Journal of extracellular vesicles*. 2017; 6(1): 1344087. DOI: 10.1080/20013078.2017.1344087. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/20013078.2017.1344087/> Retrieved: 19.08.2017

8. Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(6): 1153. DOI: 10.3402/jev.v2i0.19671.1 Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3402/jev.v2i0.19671/> Retrieved: 19.08.2017

9. Karganov M.Yu., Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Kovaleva O.I., Medvedeva Yu.S., Vyalkina M.V. [Use of laser correlation spectroscopy in laboratory medicine]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(9): 533-4. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-9 (in Russian)

10. Kubatiev A.A., Borovaya T.G., Zhukhovitsky V.G., Adreevskaya S.G., Shevlyagina N.V. [Platelet Microparticles: Formation and Properties]. *Patogenez [Pathogenesis (Russian Federation)]*. 2017; 15(2): 4-13. (in Russian)

11. Shustova O.N., Antonova O.A., Golubeva N.V., Khaspekova S.G., Yakushkin V.V., Aksuk S.A., Alchinova I.B., Karganov M.Yu., Mazurov A.V. Differential procoagulant activity of microparticles derived from monocytes, granulocytes, platelets and endothelial cells: impact of active tissue factor. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2017; 28(5): 373-82. DOI: 10.1097/MBC.0000000000000609

Сведения об авторах:

Алчинова Ирина Борисовна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии¹, заведующая лабораторией космической патофизиологии².

Полякова Маргарита Вячеславовна — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории физико-химической и экологической патофизиологии¹.

Сабурина Ирина Николаевна — доктор биологических наук, заведующая лабораторией клеточной биологии и патологии развития¹.

Карганов Михаил Юрьевич — доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией физико-химической и экологической патофизиологии¹.

УДК 616-092
DOI:

Коррекция морфофункциональных нарушений в экспериментальном метаболическом синдроме у крыс полифенолами винограда

Шрамко Ю.И., Кубышкин А.В., Давыдова А.А., Фомочкина И.И., Алиев Л.Л., Чегодарь Д.В.

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского». 295000, г. Симферополь, б-р Ленина, д. 5/7

Цель работы состояла в изучении влияния полифенолов винограда на органы-мишени при экспериментальном метаболическом синдроме у крыс. **Методы.** В течение 12 недель полифенолы винограда применялись у крыс линии Вистар. Все крысы находились на стандартном рационе. Животные были разделены на 6 групп: 1-я контрольная получала питьевую воду; 2-я контрольная и все 4 экспериментальные — 2,5% раствор фруктозы в качестве питья. 1-я экспериментальная группа дополнительно получала препарат «Фэнокор» с суммарным содержанием полифенолов 181,53 г/дм³, 2-я экспериментальная — виноматериал с суммарным содержанием полифенолов 1,73 г/дм³; 3-я экспериментальная — виноматериал с суммарным содержанием полифенолов 4,33 г/дм³ и 4-я экспериментальная — виноматериал с суммарным содержанием полифенолов 8,58 г/дм³. После окончания опыта у крыс проводили морфологические исследования висцеральной жировой ткани, тканей миокарда и печени. **Результаты.** Анализ результатов показал, что применение полифенольных продуктов переработки винограда в концентрациях 181,53 г/дм³ при моделировании метаболического синдрома приводило к минимизации морфофункциональных нарушений в висцеральной жировой ткани (уменьшение интенсивности лимфоплазмочитарной инфильтрации), миокарде (мышечные волокна имели типичное строение и адипоциты между ними встречались лишь очагово) и печени (имелись лишь слабые очаговые дистрофические изменения гепатоцитов). **Заключение.** Результаты работы свидетельствуют о возможности применения виноматериалов с наибольшей концентрацией полифенолов и препарата «Фэнокор» в коррекции и профилактике поражений при метаболическом синдроме.

Ключевые слова: метаболический синдром; полифенолы винограда; «Фэнокор».

Для цитирования: Шрамко Ю.И., Кубышкин А.В., Давыдова А.А., Фомочкина И.И., Алиев Л.Л., Чегодарь Д.В. Коррекция морфофункциональных нарушений в экспериментальном метаболическом синдроме у крыс полифенолами винограда. Патогенез. 2017; 15(4): 43–48

Для корреспонденции: Шрамко Юлиана Ивановна, e-mail: julianashramko@rambler.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 17.08.2017

Correction of morphofunctional disorders with grapes polyphenols in rats with experimental metabolic syndrome

Shramko Yu.I., Kubyshkin A.V., Davydova A.A., Fomochkina I.I., Aliev L.L., Chegodar D.V.

S.I. Georgievsky Medical Academy of the V.I. Vernadsky Crimean Federal University. 5/7, Lenina Blvd, Simferopol 295000, Russian Federation

The aim of this work was to study the effect of grape polyphenols on target organs in rats with experimental metabolic syndrome. **Methods.** Grape polyphenols were used in Wistar rats for 12 weeks. All rats received a standard diet. The animals were divided into 6 groups: group 1, control, received drinking water; group 2, the second control, and four experimental groups received a 2.5% fructose solution for drinking. The first experimental group additionally received a drug, Fenocor, containing polyphenols at 181.53 g/dm³; the second experimental group — wine material containing polyphenols at 1.73 g/dm³; the third experimental group — wine material containing polyphenols at 4.33 g/dm³; and the fourth experimental group — wine material containing polyphenols at 8.58 g/dm³. At the end of experiment, morphological studies of visceral adipose tissue, myocardial tissue, and hepatic tissue were performed. **Results.** The treatment of rats with experimental metabolic syndrome with grape polyphenolic products at a concentration of 181.53 g/dm³ minimized morphological and functional disorders in visceral adipose tissue (intensity of lymphoplasmocytic infiltration was decreased), myocardium (muscle fibers had normal structure with only occasional adipocytes between them), and liver (only slight focal degenerative changes were observed in hepatocytes). **Conclusion.** The study indicated a possibility of using wine materials with the highest concentration of polyphenols and the drug Fenocor for correction and prevention of damages in metabolic syndrome.

Key words: metabolic syndrome; polyphenols of grapes; «Fenocor».

For citation: Shramko Yu.I., Kubyshkin A.V., Davydova A.A., Fomochkina I.I., Aliev L.L., Chegodar D.V. Correction of morphofunctional disorders with grapes polyphenols in rats with experimental metabolic syndrome. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2017; 15(4): 43–48 (in Russian)

For correspondence: Shramko Yuliana Ivanovna, e-mail: julianashramko@rambler.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 17.08.2017

Введение

Метаболический синдром (МС) в настоящее время рассматривается как синтропия заболеваний внутренних органов, в основе которой лежат системное воспаление, инсулинорезистентность, липотоксичность и другие процессы. Значительная гиперинсулинемия активизирует многие гены, продукты которых участвуют в развитии воспаления [1]. Терапевтические мероприятия при лечении пациентов с МС должны быть направлены на основные его патогенетические звенья [2]. Вместе с тем, лечение и профилактика МС синтетическими медикаментами представляет серьезные трудности ввиду их выраженных побочных эффектов, высокой стоимости, неэффективности в некоторых случаях и недостаточной доступности для многих людей во всем мире. В связи с этим, возрастает интерес к использованию продуктов натурального происхождения для коррекции данной патологии. Большинство исследований лекарственных средств натурального происхождения указывают на высокую антиоксидантную активность последних, которая коррелирует с содержанием полифенолов [3, 4]. Одним из наиболее экономически важных источников полифенолов является виноград (*Vitis vinifera*) [5], лидирующий по содержанию полифенолов среди фруктов [6]. В последнее время выраженное благотворное влияние на здоровье флавоноидов винограда напрямую связывается с так называемым «французским парадоксом» — традицией регулярного потребления красного вина, что считается главным фактором снижения риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [7]. Имеются доказательства, что полифенолы продуктов переработки винограда способны снизить проявления МС и предотвратить развитие ожирения и сахарного диабета 2 типа, действуя как многоцелевые модуляторы с антиоксидантным и противовоспалительным действием [8, 9]. Полифенолы самостоятельно не синтезируются в организме человека и должны постоянно поступать с растительной пищей. Однако их биологическая доступность для человека крайне мала, вследствие низкой растворимости полифенолов в воде [10]. В биологически легко доступной форме и высокой концентрации полифенолы могут применяться в составе виноградных пищевых концентратов,

приготовленных по специальным технологиям [11]. В связи со всем вышеизложенным целью настоящей работы стало исследование путей коррекции морфофункциональных нарушений при моделировании метаболического синдрома с помощью полифенольных продуктов переработки винограда.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования по изучению биологических эффектов полифенольных продуктов переработки винограда проведены на 60 белых крысах-самцах Вистар, массой 180–200 граммов (возраст 10–12 недель) с использованием фруктозной модели метаболического синдрома [12, 13]. Содержание животных в виварии было одинаковым, что является необходимым условием создания структурной группы. Температура помещения, где осуществлялись эксперименты, составляла 18–20°C. Крысы из всех групп получали в течение 12 недель эксперимента одинаковую пищу стандартного рациона.

Животные были разделены на 6 групп (табл. 1): 1-я контрольная (К1) получала питьевую воду; 2-я контрольная (К2) и все 4 экспериментальные группы — 2,5% раствор фруктозы в качестве питья. 1-я экспериментальная группа (Э1) дополнительно получала препарат «Фэнокор» с суммарным содержанием полифенолов 181,53 г/дм³ (что составляло в среднем 0,05 мл препарата на одну крысу) вместе с 0,05 мл воды, ежедневно перорально с помощью зонда на протяжении 12 недель. Животные групп Э2, Э3 и Э4 получали разведения виноматериалов «Каберне-Совиньон» в дозе из расчета 300 мл вина на 70 кг массы тела (по 0,7 мл на животное), ежедневно перорально с помощью зонда начиная с 4-й недели эксперимента. 2-я экспериментальная (Э2) получала виноматериал с суммарным содержанием полифенолов 1,73 г/дм³, индекс Фолина-Чокальтеу 2,5 (разведение Р1); 3-я экспериментальная (Э3) — виноматериал с суммарным содержанием полифенолов 4,33 г/дм³, индекс Фолина-Чокальтеу 1,0 (разведение Р2) и 4-я экспериментальная (Э4) — виноматериал с суммарным содержанием полифенолов 8,58 г/дм³, индекс Фолина-Чокальтеу 0,5 (разведение Р3).

Таблица 1

Распределение экспериментальных животных по группам

Группа	Питьё	Добавки к стандартному рациону питания	n
К1	Вода	—	10
К2	2,5% раствор фруктозы	—	10
Э1	2,5% раствор фруктозы	"Фэнокор"	10
Э2	2,5% раствор фруктозы	Виноматериалы (разведение Р1)	10
Э3	2,5% раствор фруктозы	Виноматериалы (разведение Р2)	10
Э4	2,5% раствор фруктозы	Виноматериалы (разведение Р3)	10

У контрольных и экспериментальных групп животных определяли массу тела и окружность живота на уровне середины туловища для оценки степени абдоминального ожирения. Эвтаназия животных проводилась путем декапитации под эфирным наркозом. После эвтаназии проводили морфологические исследования висцеральной жировой ткани, тканей миокарда и печени. Все измерения и исследования проводили на оборудовании, прошедшем метрологическую поверку и экспертизу в лаборатории, аттестованной на проведение измерений и метрологических работ (Свидетельство об аттестации №021/12 от 12.12.2012 г.). Исследование было одобрено Институциональным комитетом по биоэтике и соответствует принципам Руководства по уходу и использованию лабораторных животных, изданного US NIH (№85-23, пересмотрено в 1985 г.).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов вариационной статистики, с использованием непараметрического Т-критерия Вилкоксона и U-критерия Манн—Уитни. Числовые данные приведены как Me (Q1, Q3).

Результаты исследования и их обсуждение

В жировой клетчатке всех крыс из второй контрольной (K2) группы, которым проводилось моделирование

метаболического синдрома при помощи введения в рацион раствора фруктозы, имели место умеренно выраженные гемодинамические расстройства, в виде отека межлужочной ткани и полнокровия сосудов. Обнаруживались крупные массивные лимфоплазмочитарные агрегаты в межлужочной ткани, располагавшиеся в ряде наблюдений периваскулярно, а также слабовыраженный интерстициальный фиброз (рис. 1, А). Это сопровождалось увеличением массы тела на 67% ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой преимущественно за счет абдоминальной жировой клетчатки, что подтверждалось увеличением окружности живота на 59% от контрольных цифр ($p < 0,05$) (табл. 2).

При анализе материала, полученного при микроскопическом исследовании висцерального жира у всех крыс групп Э2 и Э3 отмечалась сходная морфологическая картина с крупными очаговыми лимфогистиоцитарными скоплениями (рис. 1, Б). Масса тела крыс групп Э2 и Э3 превышала контрольные цифры на 40% и 55% соответственно ($p < 0,05$), что сопровождалось увеличением окружности живота на 17% и 50% ($p < 0,05$).

Масса тела крыс группы Э4 была наибольшей среди экспериментальных групп — на 67% выше контроля ($p < 0,05$), что сопровождалось увеличением окружности живота на 67% ($p < 0,05$). Однако жировая ткань крыс из

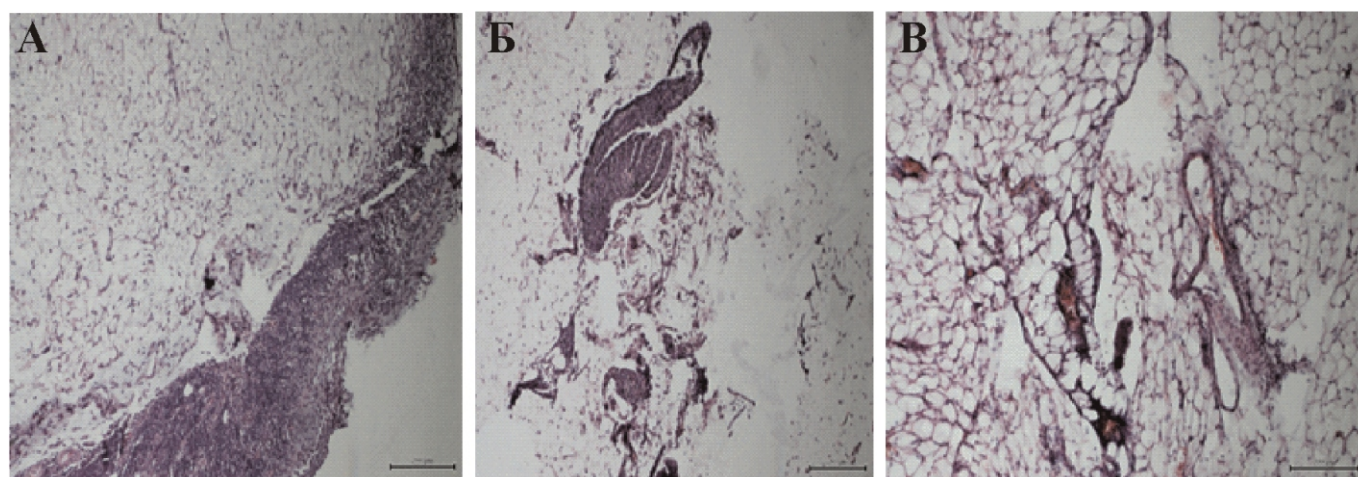


Рис. 1. Морфофункциональные изменения в жировой клетчатке.

А: Массивная лимфоплазмочитарная инфильтрация с формирующейся фиброзной тканью в жировой ткани крыс с моделируемым метаболическим синдромом (группа K2).

Б: Очаговая лимфоплазмочитарная инфильтрация жировой клетчатки у крыс группы Э2.

В: Висцеральный жир с очаговой слабовыраженной лимфогистиоцитарной инфильтрацией, на фоне расстройства кровообращения в группе с применением «Фэнокора» (группа Э1).

Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 10x10.

Таблица 2

Сравнительный анализ массы тела и окружности живота у крыс из разных групп по окончании эксперимента; данные представлены в виде Me (Q1, Q3)

Группа	Масса тела, г	Окружность живота, см
K1	179,5 (178,5; 185)	12 (12,13)
K2	300 (300; 329,5)*	19,4 (18,5; 20,5)*
Э1	179 (172,5; 204,5)	12 (12; 13,5)
Э2	252,5 (250; 257)*	14 (13,5; 15)*
Э3	277,5 (273,5; 288)*	18 (17; 19,5)*
Э4	300 (299; 300)*	20 (19,5; 21,5)*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с группой K1

группы Э4 микроскопически отличалась от вышеописанных групп. Так, в этих наблюдениях отмечалось уменьшение интенсивности лимфоплазмочитарной инфильтрации, а гемодинамические расстройства были выражены в меньшей степени.

Группа с применением в виде корректирующего препарата «Фэнэкор» (Э1), характеризовалась слабой степенью выраженности патологических изменений. Масса тела и окружность живота существенно не отличались от контрольных цифр. При микроскопическом исследовании абдоминального жира нами была выявлена слабовыраженная лимфоплазмочитарная инфильтрация на фоне гемодинамических расстройств в виде отека, полнокровия и единичных петехиальных кровоизлияний (рис. 1, В). Необходимо отметить также, что в этой группе адипоциты имели вариабельные размеры, что, возможно, связано с уменьшением в них триглицеридов.

При микроскопическом исследовании *печени* крыс из второй контрольной (К2) группы были выявлены изменения дистрофически-деструктивного характера, проявившиеся в виде мелкокапельной жировой и гидропической дистрофии гепатоцитов (рис. 2, А), а также наличие признаков некробиотических изменений, в виде сморщивания клеток, конденсации хроматина и очаговых централобулярных некрозов. Также весьма важным гистологическим признаком развившегося стеатогепатита, явилась воспалительная лимфоплазмочитарная инфильтрация, с примесью нейтрофильных лейкоцитов, которая имела преимущественно очаговый периваскулярный, реже диффузный характер. Кроме того, имели место признаки расстройства кровообращения в виде отека, расширения перисинусоидальных пространств с нарушением балочного строения, полнокровия синусоидов и центральных вен со сладжированием эритроцитов, очаговыми петехиальными кровоизлияниями. Микроскопическое исследование печени крыс групп Э2 и Э3 выявило следующее: мелкокапельная жировая дистрофия в сочетании с выраженной гидропической дистрофией гепатоцитов (рис. 2, Б), умеренно выраженный отек и полнокровие синусоидов, а также наличие умеренновыраженной лимфоплазмочитарной инфильтрации, которая имела преимущественно

периваскулярный характер. В ткани печени у крыс группы Э4 обращало на себя внимание уменьшение степени выраженности дистрофических и воспалительных изменений в сочетании с выраженным расстройством кровообращения. Группа с применением «Фэнэкора» (Э1) характеризовалась также слабыми очаговыми дистрофическими изменениями гепатоцитов, в сочетании с очаговой слабовыраженной преимущественно перипортальной, реже диффузной интралобулярной лимфогистиоцитарной инфильтрацией и слабовыраженными признаками расстройства гемодинамики (рис. 2, В).

При микроскопическом исследовании ткани *сердца* крыс из второй контрольной (К2) группы на фоне умеренно выраженного расстройства гемодинамики, в виде отека межжучной ткани, полнокровия сосудов и очаговых петехиальных кровоизлияний, отмечалось очаговое истончение и разволокнение мышечных волокон слабовыраженный интерстициальный фиброз (рис. 3, А). Отмечалось вращание жировой клетчатки между кардиомиоцитами. В области эпикарда вокруг крупных сосудов отмечалось скопление преимущественно белого жира, в виде групп крупных полигональных клеток с наличием единственной вакуоли и ядром на периферии клетки. В жировой клетчатке обнаруживались очаговые лимфолазмочитарные инфильтраты.

При микроскопическом исследовании сердечной мышцы крыс групп Э2 и Э3 отмечалась сходная морфологическая картина с преобладанием бурого жира в периваскулярной клетчатке (рис. 3, Б). В области эпикарда у крыс из группы Э4 вокруг сосудов обнаруживались скопления клеток преимущественно бурого жира с очаговой слабовыраженной лимфолазмочитарной инфильтрацией, а гемодинамические расстройства были выражены в меньшей степени. Также отмечалось уменьшение количества и размеров адипоцитов между мышечными клетками. В группе с применением в виде корректирующего препарата «Фэнэкор» (Э1) степень выраженности патологических изменений в миокарде была слабой, мышечные волокна имели типичное строение и адипоциты между ними встречались лишь очагово, ближе к эпикарду, однако в миокарде все же имели место явления отека и полнокровия (рис. 3, В).

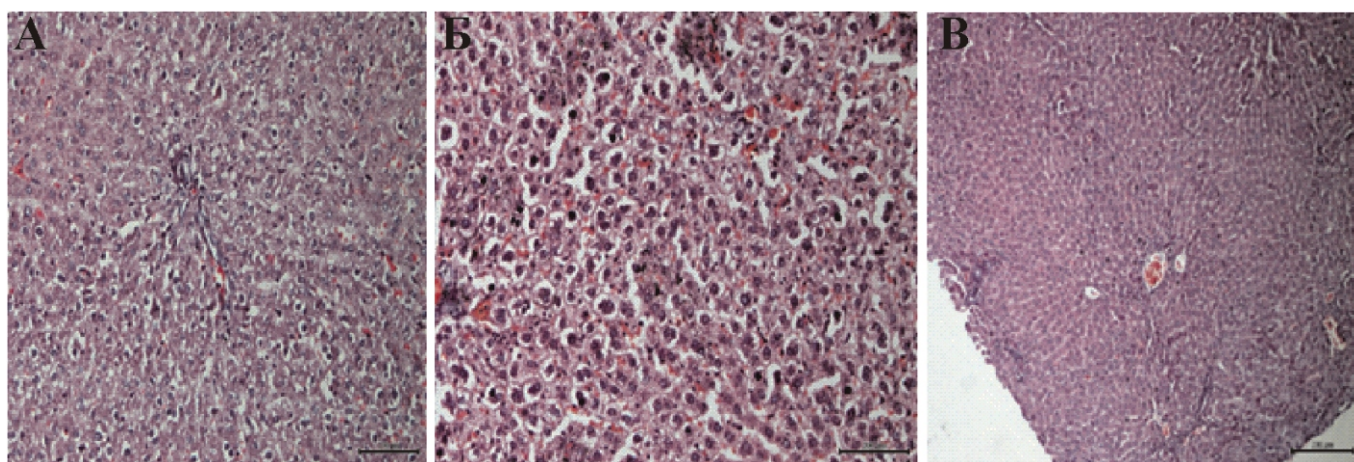


Рис. 2. Морфофункциональные изменения в печени.

А: Гидропическая дистрофия гепатоцитов при моделируемом метаболическом синдроме (группа К2). Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 10х20.

Б: Дистрофически измененные гепатоциты на фоне расстройства кровообращения в группе Э2. Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 10х20.

В: Слабовыраженные признаки гемодинамических расстройств и слабовыраженная воспалительная инфильтрация в ткани печени крыс из группы с применением «Фэнэкора» (группа Э1). Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 10х10.

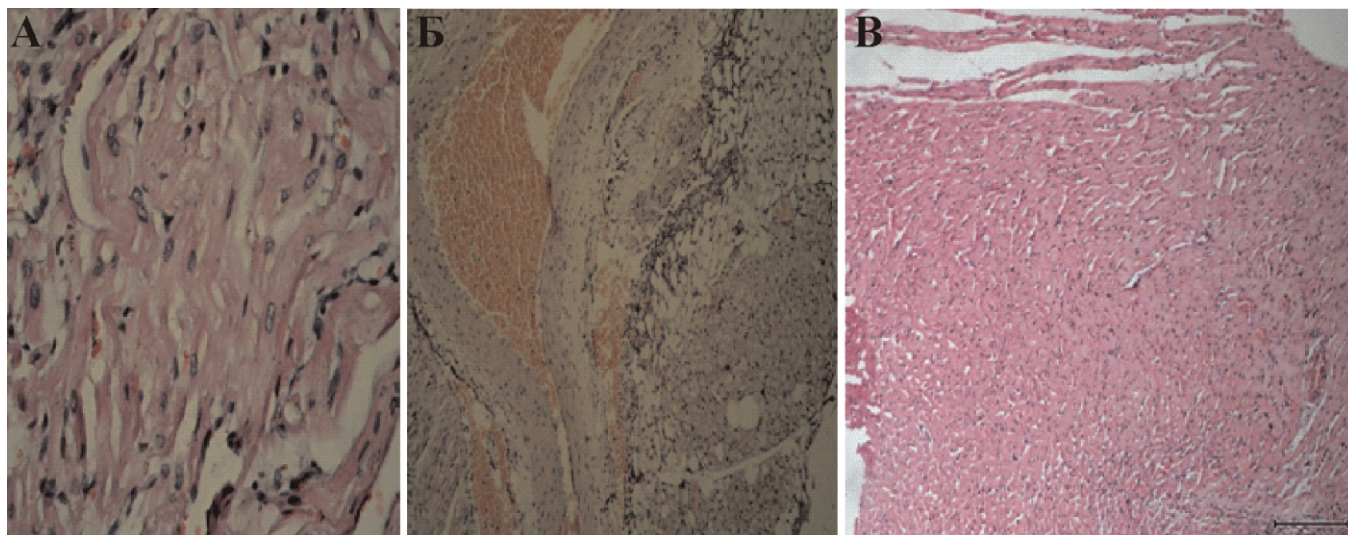


Рис. 3. Морфофункциональные изменения в миокарде.

А: Разволоknение и расщепление мышечных волокон на фоне расстройства кровообращения в группе К2. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.10x40.

Б: Лимфоплазматическая инфильтрация жировой клетчатки в ткани сердца крысы группы Э2. Окраска гематоксилин-эозин. Ув.10x10.

В: Ткань миокарда со слабовыраженными явлениями расстройства кровообращения в группе с применением «Фэнэко́ра» (группа Э1). Окраска гематоксилин-эозин. Ув.10x10.

Таким образом, при моделировании МС у всех животных проявились типичные изменения в морфологии органов-мишеней (дистрофия и атрофия в сочетании с воспалительными изменениями) на фоне выраженного абдоминального ожирения, которые, по данным наших исследований [14, 15, 16], сопровождались нарушением про- и антиоксидантного баланса в крови во всех экспериментальных группах. Применение более высоких концентраций полифенолов в группе Э4 привело к уменьшению морфологических изменений в органах-мишенях, несмотря на выраженное абдоминальное ожирение. Применение концентраций полифенолов винограда в группах Э2 и Э3 оказалось недостаточным для коррекции нарушений при МС.

Заключение

Применение полифенольных препаратов переработки винограда приводило к снижению выраженности морфофункциональных нарушений в органах-мишенях у экспериментальных животных с моделью метаболического синдрома. Наибольший эффект в отношении нормализации морфологических изменений продемонстрировали разведение виноматериалов с наибольшей концентрацией полифенолов и препарат «Фэнэко́р».

Список литературы

- Jialal I., Huet V.A., Kaur N. Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2012; 35(4): 900-4. DOI: 10.2337/dc11-2375.
- 10-й Проект рекомендаций экспертов Российского кардиологического общества по диагностике и лечению метаболического синдрома. М.; 2013. 103 с.
- Harris C.S., Beaulieu L.P., Fraser M.H. Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. *Planta Med*. 2011; 77: 196-204. DOI: 10.1055/s-0030-1250161.
- Hasani-Ranjbar S., Larijani B., Abdollahi M. A systematic review of the potential herbal sources of future drugs effective in oxi-

dant-related diseases. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 2009; 8: 2-10. DOI: 10.2174/187152809787582561.

5. Ali K., Maltese F., Choi Y. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem. Rev*. 2010; 9: 357-78. DOI: 10.1007/s11101-009-9158-0.

6. Ananga A., Tsoolova V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*. 2014; 6(1): 391-415. DOI: 10.3390/nu6010391.

7. Renaud S.C., Beswick A.D., Fehily A.M., Sharp D.S., Elwood P.C. Alcohol and platelet aggregation: The carefully prospective heart disease study. *Am. J. Clin. Nutr*. 1992; 55: 1012-7.

8. Chuang C.C., McIntosh M.K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Ann. Rev. Nutr*. 2011; 31: 155-76. DOI: 10.1146/annurev-nutr-072610-145149.

9. Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol. Nutr. Food Res*. 2012; 56: 159-70. DOI: 10.1002/mnfr.201100526.

10. Clifford M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implication for health. *Planta Med*. 2004; 70(12): 1103-14. PMID: 15643541

11. Авидзба А.М., Агеева Г.П., Гугучкина Н.М. *Красные столовые вина: биохимия, технология, эноterapia*. Краснодар: ООО «Экоинвест»; 2016. 192 с.

12. de Moura R.F., Ribeiro C., de Oliveira J.A. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br. J. Nutr.* 2009; 101(8): 1178-84. DOI: 10.1017/S0007114508066774.

13. Лещенко Д.В., Костюк Н.В., Белякова М.Б., Егорова Е.Н., Миняев М.В., Петрова М.Б. Диетически индуцированные животные модели метаболического синдрома (Обзор литературы). *Верхневолжский медицинский журнал*. 2015; 14(2): 34-9.

14. Авидзба А.М., Кубышкин А.В., Гугучкина Т.И., Марков В.А., Кацев А.М., Наумова Н.В., Шрамко Ю.И., Зайцев Г.П., Черноусова И.В., Огай Ю.А., Фомочкина И.И. Антиоксидантная активность продуктов переработки красных сортов винограда «Каберне-совиньон», «Мерло», «Саперави». *Вопросы питания*. 2016; 85(1): 99-109.

15. Кубышкин А.В., Авидзба А.М., Фомочкина И.И., Огай Ю.А., Ханферьян Р.А., Шрамко Ю.И., Марков В.А., Гугучкина Т.И., Агеева Н.М., Зайцев Г.П., Черноусова И.В. Эффективность использования насыщенных полифенолами продуктов переработки винограда для профилактики метаболических нарушений в эксперименте. *Вопросы питания*. 2017; 85(1): 100-7.

16. Кубышкин А.В., Зайцев Г.П., Черноусова И.В., Огай Ю.А., Кацев А.М., Фомочкина И.И., Шрамко Ю.И., Нау-

мова Н.В. Антиоксидантные и антирадикальные свойства продуктов из красных сортов винограда и возможности их применения в качестве лечебно-профилактических средств *Биоантиоксидант. IX Международная конференция*. Москва; 2015. 94 с.

References

1. Jialal I., Huet B.A., Kaur H. Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2012; 35(4): 900-4. DOI: 10.2337/dc11-2375.
2. [The 10th Draft Recommendations of the Experts of the Russian Cardiological Society for the Diagnosis and Treatment of Metabolic Syndrome]. М.; 2013. 103 p. (in Russian)
3. Harris C.S., Beaulieu L.P., Fraser M.H. Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. *Planta Med*. 2011; 77: 196-204. DOI: 10.1055/s-0030-1250161.
4. Hasani-Ranjbar S., Larijani B., Abdollahi M. A systematic review of the potential herbal sources of future drugs effective in oxidant-related diseases. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 2009; 8: 2-10. DOI: 10.2174/187152809787582561.
5. Ali K., Maltese F., Choi Y. Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. *Phytochem. Rev*. 2010; 9: 357-78. DOI: 10.1007/s11101-009-9158-0.
6. Ananga A., Tsovalova V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*. 2014; 6(1): 391-415. DOI: 10.3390/nu6010391.
7. Renaud S.C., Beswick A.D., Fehily A.M., Sharp D.S., Elwood P.C. Alcohol and platelet aggregation: The carefully prospective heart disease study. *Am. J. Clin. Nutr*. 1992; 55: 1012-7.
8. Chuang C.C., McIntosh M.K. Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Ann. Rev. Nutr*. 2011; 31: 155-76. DOI: 10.1146/annurev-nutr-072610-145149.
9. Tsuda T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol. Nutr. Food Res*. 2012; 56: 159-70. DOI: 10.1002/mnfr.201100526.
10. Clifford M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implication for health. *Planta Med*. 2004; 70(12): 1103-14. PMID: 15643541
11. Avidzba A.M., Ageyeva G.P., Guguchkina N.M. *[Red table wines: biochemistry, technology, enotherapy]*. Krasnodar: ООО «Ekoinvest»; 2016. 192 p. (in Russian)
12. de Moura R.F., Ribeiro C., de Oliveira J.A. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br. J. Nutr*. 2009; 101(8): 1178-84. DOI: 10.1017/S0007114508066774.
13. Leshchenko D.V., Kostyuk N.V., Belyakova M.B., Yegorova E.N., Minyaev M.V., Petrova M.B. [Dietally induced animal models of the metabolic syndrome (Review of Literature)]. *Verkhnevolzhskii meditsinskii zhurnal. [Verhnevolzhsky Medical Journal]*. 2015; 14(2): 34-9. (in Russian)
14. Avidzba A.M., Kubyshkin A.V., Guguchkina T.I., Markosov V.A., Katsev A.M., Naumova N.V., Shramko Yu.I., Zaytsev G.P., Chernousova I.V., Ogay Yu.A., Fomochkina I.I. [Antioxidant activity of products of processing of red grape varieties «Cabernet-Sauvignon», «Merlot», «Saperavi»]. *Voprosy pitaniya. [Nutrition]*. 2016; 85(1): 99-109. (in Russian)
15. Kubyshkin A.V., Avidzba A.M., Fomochkina I.I., Ogay Yu.A., Khanferyan R.A., Shramko Yu.I., Markosov V.A., Guguchkina T.I., Ageeva N.M., Zaytsev G.P., Chernousova I.V. [Effectiveness of the use of polyphenol-saturated products of grapes processing for the prevention of metabolic disturbances in the experiment]. *Voprosy pitaniya. [Nutrition]*. 2017; 85(1): 100-7. (in Russian)
16. Kubyshkin A.V., Zaytsev G.P., Chernousova I.V., Ogay Yu.A., Katsev A.M., Fomochkina I.I., Shramko Yu.I., Naumova N.V. [Antioxidant and antiradical properties of products from red grape varieties and the possibility of their use as therapeutic and prophylactic agents]. *Bioantioxidant. IX International Conference*. Moscow; 2015. 94 p. (in Russian)

Сведения об авторах

Шрамко Юлия Ивановна — кандидат биологических наук, доцент кафедры общей и клинической патофизиологии.

Кубышкин Анатолий Владимирович — доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и клинической патофизиологии.

Давыдова Александра Александровна — кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом.

Фомочкина Ирина Ивановна — доктор медицинских наук, профессор кафедры общей и клинической патофизиологии.

Алиев Леонид Леонидович — кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей и клинической патофизиологии.

Чегодарь Денис Владимирович — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры общей и клинической патофизиологии.

УДК: 616.5-006.81-616-009.7-612.82-577.17:612.085.1
DOI:

Нейромедиаторные системы головного мозга самок мышей в динамике роста злокачественной меланомы, воспроизведенной на фоне хронической боли

Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К.,
Бандовкина В.А., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Бликян М.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 344037, Ростов-на-Дону, 14 линия, 63

Известно, что биогенные амины (БА) участвуют в злокачественном росте, их уровень изменяется в ЦНС при болевом воздействии, однако исследований о сочетанном влиянии хронической боли (ХБ) и онкопатологии на динамику БА в головном мозге не проводилось. **Цель:** изучить особенности баланса БА в коре головного мозга в динамике роста меланомы, воспроизведенной на фоне ХБ. **Материалы и методы.** Работа выполнена на 64 мышцах-самках, весом 21–22 г. Животным основной группы меланому B16/F10 пересаживали под кожу спины через 2 недели после перевязки седалищных нервов. Группой сравнения служили мыши с меланомой без боли. Уровни БА: адреналина, норадреналина, дофамина (ДА), серотонина (5-НТ), гистамина, а также 5-ОИУК определяли методом иммуноферментного анализа. **Результаты.** У мышей с ХБ уменьшается содержание большинства БА, однако уровень ДА не изменяется. Метаболизм 5-НТ происходит с участием MAO. Развитие меланомы сопровождается увеличением содержания ДА и 5-НТ, тогда как MAO — ингибируется. Направленность сдвигов БА при развитии меланомы на фоне ХБ оказалась практически такой же, как и без неё. В то же время ХБ ограничивает накопление 5-НТ в коре мозга при меланоме, что сопровождается более агрессивным её течением. **Выводы.** ХБ ограничивает включение стресс-лимитирующих механизмов в головном мозге при развитии меланомы у мышей, что приводит к более агрессивному течению злокачественного процесса.

Ключевые слова: меланوما, хроническая боль, биогенные амины, мыши.

Для цитирования: Кит О.И., Котиева И.М., Франциянц Е.М., Каплиева И.В., Трепитаки Л.К., Бандовкина В.А., Черярина Н.Д., Погорелова Ю.А., Бликян М.В. Нейромедиаторные системы головного мозга самок мышей в динамике роста злокачественной меланомы, воспроизведенной на фоне хронической боли. Патогенез. 2017; 15(4): 49–55

Для корреспонденции: Каплиева Ирина Викторовна, e-mail: super.gormon@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 18.09.2017

Neurotransmitter systems of female mouse brain during growth of malignant melanoma modeled on the background of chronic pain

Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K.,
Bandovkina V.A., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A., Blikyan M.V.

Rostov Research Institute of Oncology, 14-th Liniya 63, Rostov-on-Don 344037, Russian Federation

Biogenic amines (BA) are known to be involved in malignant growth, and their CNS levels change in pain; however, there are no studies of combined effects of chronic pain (CP) and cancer on BA dynamics in the brain. Aim: To study features of BA balance in the cerebral cortex during melanoma growth associated with CP. Material and methods. The study included 64 female mice weighing 21–22 g. In the main groups, B16/F10 melanoma was transplanted under the skin of the back two weeks following sciatic nerve ligation. Mice with melanoma without pain were used as the control. Concentrations of BA: adrenaline, noradrenaline, dopamine (DA), serotonin (5-HT), histamine and 5-HIAA were measured with ELISA. Results. Concentrations of BAs decreased in mice with CP although DA levels did not change. 5-HT metabolism involved MAO. The development of melanoma was accompanied by increases in DA and 5-HT whereas MAO was inhibited. The direction of BA changes during the development of melanoma was the same with and without CP. At the same time, CP with melanoma limited accumulation of 5-HT in the cerebral cortex, which resulted in even more aggressive course of cancer. Conclusion. CP restricted the activation of cerebral stress-limiting mechanisms during the development of melanoma in mice, which resulted in a more aggressive course of disease.

Key words: melanoma, chronic pain, brain, biogenic amines, mice.

For citation: Kit O.I., Kotieva I.M., Frantsiyants E.M., Kaplieva I.V., Trepitaki L.K., Bandovkina V.A., Cheryarina N.D., Pogorelova Yu.A., Blikyan M.V. Neurotransmitter systems of female mouse brain during growth of malignant melanoma modeled on the background of chronic pain. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15(4): 49–55 (in Russian)

For correspondence: Kaplieva Irina Viktorovna, e-mail: super.gormon@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 18.09.2017

Введение

В последнее десятилетие исследования, направленные на изучение патогенеза хронической боли (ХБ), развивались по экспоненте и за рубежом, и в нашей стране. Выявленные многочисленные «находки» указывают, что для ХБ разного генеза характерны специфические нейропластические изменения в периферической и центральной нервной системе, которые проявляются в виде обобщенной гиперчувствительности соматосенсорной системы. Помимо гиперчувствительности восходящей ноцицептивной передачи, есть также свидетельства о нарушениях в эндогенных нисходящих системах ноцицептивной модуляции [1, 2]. Механизмы развития нейропатической боли сложны и многофакторны. Модели животных с повреждением нервов характеризуются повышенной чувствительностью к механическим и тепловым раздражителям и показывают множество изменений, как в периферической, так и в центральной нервной системе (ЦНС). Одним из основных видений, которые возникли из исследований боли, является то, что ХБ является болезнью не только первичных сенсорных нейронов и спинного мозга, но и головного мозга. Множественные изменения, распределенные по всей нервной системе, способствуют сложным болевым фенотипам. Эти изменения включают эктопическую генерацию потенциалов действия, облегчение и растормаживание синаптической передачи, потерю синаптической связи и формирование новых синаптических схем и нейроиммунных взаимодействий. Хотя нейронные повреждения необходимы, их недостаточно для развития нейропатической боли; генетические полиморфизмы, пол, возраст — все влияет на риск развития постоянной боли. ХБ вызывает функциональные и структурные изменения в мозге, а также влияет на другие функции, такие, как эмоции, мотивация и память. Поэтому разработка эффективного лечения боли должна учитывать терапевтическую стратегию, нацеленную на мозг.

Известно, что ХБ после лигирования седалищного нерва вызывает неадекватную нейротрансмиссию серотонина (5-НТ) в головном мозге, увеличивает экспрессию серотонинового транспортера (SERT), уменьшает продукцию 5-НТ и изменяет экспрессию серотониновых рецепторов [3]. В ЦНС эффективность 5-НТ-ергической сигнализации регулируется высвобождением 5-НТ, изменением активности синтезирующего фермента нейротрансмиттера (Trh2), отрицательной динамикой модуляторных ауторецепторов 5-НТ1AR и 5-НТ1BR, которые переносят освобожденный 5-НТ обратно в 5-НТ-ергические нейроны с помощью SERT. Некоторые исследования показывают, что активация медуллярных 5-НТ-ергических ядер ингибирует стимулы, вызывающие ХБ.

Долгосрочная невропатическая боль приводит к нарушениям норадренергической системы. Известно, что ХБ связана с дисрегуляцией locus coeruleus noradrenergic [4]. Несмотря на то, что дофамин (ДА) мозга наиболее известен своей ролью в удовольствии, мотивации и моторном контроле, недавние данные свидетельствуют о том, что он также участвует в модуляции боли. Имеются исследова-

ния, показывающие изменения в ДА-ергических системах у пациентов с ХБ и у грызунов в моделях ХБ [5]. Сообщалось также о снижении уровня ДА в переднем отделе мозга пациентов с фибромиалгией. Были получены дополнительные данные о нарушении ДА-ергической нейротрансмиссии в мозге пациентов с фибромиалгией. Авторы представляют ДА как важное звено в нейрохимическом торможении различий в восприятии боли.

Центральная гистаминовая (Г) система участвует во многих функциях ЦНС: возбуждении, тревожности, активации симпатической нервной системы, связанным со стрессом высвобождением гормонов из гипофиза и центральных аминергических нейротрансмиттеров, антиноцицепции [6]. Предложена роль системы нейронов Г как системы реагирования на опасность.

Целью настоящего исследования явилось изучение содержания биогенных аминов и метаболита 5-НТ — 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) — в коре головного мозга мышей-самок, в динамике роста экспериментальной меланомы В16/Ф10, воспроизведенной на фоне хронической нейрогенной боли.

Материалы и методы

В работе были использованы 64 половозрелых мыши-самки линии С57BL/6 массой 21—22 г, полученные из ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). Опухолевый штамм мышинной меланомы В16/Ф10, метастазирующей в легкие, приобретён в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Животные содержались при естественном режиме освещения и свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Мыши были распределены на группы: первая группа (И) — интактные мыши (n = 7), вторая группа (ХБ) — мыши с воспроизведением модели хронической боли (n = 7), третья группа (И+М) — мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы В16/Ф10 (n = 22), четвертая группа (ХБ+М) — мыши, которым меланому В16/Ф10 перевивали через 2 недели после создания модели ХБ (n = 28).

Хронический болевой синдром моделировали по методу В.В. Кравцова (1961), модифицированный на обе конечности [7]. Животных с лигированными седалищными нервами брали в эксперимент через 2 недели после операции, когда у них развивалась 3 фаза хронической боли, соответствующая периоду дезорганизации функционирования моноаминовой системы в условиях «хронизации» болевого синдрома [7]. Развитие болевого синдрома оценивали по изменению поведения животных: беспокойство, нарушение аппетита, сна, периодическое вылизывание прооперированных лап, периодическое подтягивание прооперированных лап к животу, «подпрыгивающее» пе-

редвижение с опорой на передние конечности, прихрамывание. У 7% животных хронический болевой синдром не развивался, такие животные выбраковывались.

Взвесь опухолевых клеток меланомы В16/F10 в физиологическом растворе в объёме 0,5 мл (в разведении 1:10) вводили мышам (группы И+М и ХБ+М, последним — через 2 недели после операции) одновременно подкожно в область правой лопатки. Контрольными для группы животных ХБ+М служили мыши из группы ХБ, для группы животных И+М — мыши из группы И. Животных с меланомой декапитуировали на гильотине через 1, 2 и 3 недели после перевивки опухолевых клеток. Биогенные амины: адреналин (А), норадреналин (НА), ДА, 5-НТ, Г, и 5-ОИУК в коре головного мозга исследовали методом иммуоферментного анализа (ИФА, IBL international, Germany).

Статистическая обработка материала проводилась с помощью программы «Statistica 10,0» с определением средних значений с указанием стандартных отклонений и коэффициента парной линейной корреляции. Значимость различий средних показателей оценивалась с помощью критерия суммы рангов Вилкоксона. Существенными считали различия при $p < 0,05$. При этом соблюдались общие рекомендации для медицинских исследований.

Результаты и обсуждение

Результаты изучения уровня биогенных аминов в коре головного мозга животных представлены в табл. 1.

Установлено, что ХБ в самостоятельном варианте вызывала в коре головного мозга мышей выраженные изменения в содержании биогенных аминов. Уровни практически всех исследуемых показателей, кроме ДА, снижались: А и НА — в 2,3 раза, Г — в 2,1 раза, 5-НТ — в 1,8 раза, относительно показателя интактных животных. Под влиянием ХБ в коре головного мозга найдено увеличение уровня 5-ОИУК в 3,2 раза. Анализируя коэффициент соотношения НА к А (НА/А) в коре головного мозга животных исследуемых групп, выявлено, что ХБ статистически

значимо его не изменяла, следовательно, нарушений в соотношении НА-ергической и А-ергической трансмиссии не было (табл. 2). Вместе с тем, при оценке соотношения норадреналина к дофамину (НА/ДА) выявлено, что ХБ изменяет значение коэффициента, который оказался ниже показателя в коре головного мозга интактных мышей в 2,2 раза (табл. 2). Это может свидетельствовать о дисфункции ферментных систем, задействованных в обмене нейротрансмиттеров, так как известно, что ДА является предшественником НА. Не обнаружено достоверного изменения под влиянием ХБ коэффициента соотношения А/5-НТ, отражающего степень реципрокных отношений в А-ергической и 5-НТ-ергической медиаторных системах.

Начиная с 1 недели после перевивки экспериментальной меланомы на фоне хронической нейрогенной боли, отмечено увеличение относительно соответствующего контроля уровня практически всех исследуемых биогенных аминов: А — в 1,5 раза ($p < 0,05$), НА — в 1,5 раза ($p < 0,05$), ДА — в 1,4 раза ($p < 0,05$), 5-НТ — в 1,7 раза ($p < 0,05$). Уровень 5-ОИУК при этом снизился в 2,2 раза, а Г — не изменился (табл. 1).

В этот же срок исследования в коре головного мозга мышей из группы сравнения так же произошли своеобразные изменения в уровне биогенных аминов: А снизился в 1,5 раза ($p < 0,05$), 5-НТ и ДА — напротив, повысились, соответственно в 1,5 раза и в 1,4 раза. НА, Г и 5-ОИУК не претерпели достоверных изменений относительно соответствующий контрольных значений (табл. 1).

В результате указанных изменений через 1 неделю после перевивки меланомы в коре головного мозга животных основной группы имели место выраженные отличия от некоторых показателей группы сравнения: уровни НА, Г и 5-НТ был в 1,7 раза ($p < 0,05$), 1,8 раза ($p < 0,05$) и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно снижены. Уровни А, ДА и 5-ОИУК не имели достоверных отличий от значений в группе сравнения (табл. 1).

Анализ коэффициентов НА/А, НА/ДА и А/5-НТ в исследуемых группах показал, что через 1 неделю по-

Таблица 1

Уровень биогенных аминов (нг/г) и 5-ОИУК (мг/г) в коре головного мозга самок мышей с меланомой В16/F10 без и на фоне хронической боли

	Г	А	НА	ДА	5-НТ	5-ОИУК
Контрольные животные						
И	34,9 ± 3,2	8,5 ± 0,7	19,4 ± 1,8	17,5 ± 1,8	0,43 ± 0,03	0,15 ± 0,03
ХБ	16,6 ± 1,5 ¹	3,7 ± 0,4 ¹	8,5 ± 0,9 ¹	17,9 ± 1,6	0,24 ± 0,02 ¹	0,48 ± 0,05 ¹
1 неделя роста меланомы В16/F10						
И+М	34,6 ± 3,2	5,8 ± 0,3 ²	22,3 ± 1,9	23,8 ± 2,2 ²	0,64 ± 0,05 ²	0,20 ± 0,02
ХБ+М	19,6 ± 1,5 ³	5,7 ± 0,5 ²	13,0 ± 1,0 ^{2,3}	25,0 ± 2,3 ²	0,40 ± 0,04 ^{2,3}	0,22 ± 0,02 ²
2 неделя роста меланомы В16/F10						
И+М	32,4 ± 2,8	6,1 ± 0,6 ²	20,2 ± 2,5	30,6 ± 2,9 ^{2,4}	0,64 ± 0,05 ²	0,20 ± 0,01
ХБ+М	31,6 ± 2,5 ^{2,4}	6,1 ± 0,4 ²	20,1 ± 2,0 ^{2,4}	26,4 ± 2,4 ²	0,50 ± 0,04 ²	0,20 ± 0,02 ²
3 неделя роста меланомы В16/F10						
И+М	30,4 ± 2,9	9,0 ± 0,8 ⁴	23,2 ± 2,2	31,0 ± 3,1 ²	0,97 ± 0,05 ^{2,4}	0,23 ± 0,03
ХБ+М	33,6 ± 2,5 ²	5,1 ± 0,4 ^{2,3}	19,0 ± 1,7 ²	27,6 ± 2,4 ²	0,45 ± 0,02 ^{2,3}	0,21 ± 0,01 ²

Примечание. ¹ — достоверные различия между контрольными группами; ² — достоверные отличия относительно соответствующего контроля; ³ — достоверные отличия по отношению к показателям группы сравнения; ⁴ — достоверные отличия по отношению к показателям в предыдущий срок исследования. И+М — группа сравнения, ХБ+М — основная группа

сле перевивки меланомы на фоне ХБ в коре головного мозга мышей отсутствуют значимые изменения в нарушении соотношения НА-ергической и А-ергической трансмиссии, синтеза НА из предшественника и соотношения в А-ергической и 5-НТ-ергической медиаторных системах (табл. 2). Однако серьезные изменения отмечены в группе сравнения. Так, значение коэффициента НА/А увеличилось в 1,7 раза ($p < 0,05$), а А/5-НТ, напротив — снизилось в 2,2 раза (табл. 2). Выявленные особенности свидетельствуют о том, что в ранние сроки после перевивки меланомы происходит усиление НА-ергической и 5-НТ-ергической трансмиссии в коре головного мозга мышей этой группы, на фоне ослабления А-ергической.

Этот период развития злокачественного процесса интересен тем, что, у мышей основной группы появлялись опухоли, у животных группы сравнения меланома появлялась только через 2 недели. Причем, у мышей основной группы в этот срок регистрировались и метастазы в различные органы, а у мышей из группы сравнения метастазы появлялись только через 4 недели. Напрашивается предположение, что такое состояние нейромедиаторного звена коры головного мозга соответствует пусковому моменту метастазирования, однако это требует подтверждения.

Через 2 недели после перевивки животным злокачественной опухоли на фоне ХБ в коре головного мозга мышей отмечено увеличение относительно показателя предыдущего срока исследования и контрольных значений содержания Г в 1,6 раза ($p < 0,05$) и 1,9 раза ($p < 0,05$) соответственно и НА — в 1,5 раза ($p < 0,05$) и 2,4 раза соответственно (табл. 1). Не найдено значимых по сравнению с показателями предыдущего срока исследования изменений уровня А, ДА, 5-НТ и 5-ОИУК. В коре головного мозга животных группы сравнения через 2 недели от момента перевивки опухоли найдено только увеличение уровня ДА в 1,3 раза ($p < 0,05$) относительно показателя в предыдущий срок и в 1,7 раза ($p < 0,05$) относительно значений у интактных мышей (табл. 1).

Анализ коэффициентов НА/А, НА/ДА и А/5-НТ в исследуемых группах показал, что через 2 недели после перевивки меланомы на фоне ХБ в коре головного мозга мышей значение коэффициента НА/А увеличилось относительно предыдущего срока исследования и соответствующего контроля в 1,4 раза ($p < 0,05$) (табл. 2). Значение коэффициента НА/ДА увеличилось в 1,6 раза ($p < 0,05$). Т.е. в этот срок развития опухоли на фоне хронической нейрогенной боли происходит увеличение синтеза НА из предшественника и активация НА-ергической трансмиссии в коре головного мозга животных. В группе сравнения найдено только снижение в 1,3 раза коэффициента НА/ДА относительно контроля (табл.2).

Вместе с тем, привлекают внимание два момента. Первый — уровень всех исследуемых показателей и коэффициентов соотношения в основной группе и группе сравнения через 2 недели после перевивки меланомы не имели достоверных отличий друг от друга (табл. 1, 2). Второй — показатели коэффициентов НА/ДА и А/5-НТ в коре головного мозга мышей группы сравнения приблизились к показателям у мышей основной группы в 1 неделю. В этот срок у животных группы сравнения появились опухоли, но метастазирования не было.

Через 3 недели после перевивки меланомы в коре головного мозга мышей основной группы не отмечено достоверных изменений всех исследуемых показателей относительно значений через 2 недели (табл. 1, 2).

В группе сравнения в этот срок исследования найдено увеличение относительно 2 недели уровня А и 5-НТ в 1,5 раза ($p < 0,05$) и в 2,3 раза соответственно (табл. 1). Из изученных коэффициентов изменения произошли только в соотношении НА/А — его уровень снизился относительно срока 2 недели в 1,3 раза ($p < 0,05$) (табл. 2).

В настоящее время существует много литературных данных, свидетельствующих о том, что ХБ, независимо от причины, связана с изменениями функции мозга, особенно в отношении обработки боли и другой сенсорной информации [8]. Метод нейровизуализации расширил научный подход к изучению боли. Знание ноцицептивной об-

Таблица 2

Соотношение биогенных аминов в коре головного мозга самок мышей с меланомой В16/Ф10 без и на фоне хронической боли

	НА/А	НА/ДА	А/5-НТ
Контрольные животные			
И	2,3 ± 0,1	1,1 ± 0,1	19,8 ± 2,2
ХБ	2,3 ± 0,2	0,5 ± 0,06 ¹	15,4 ± 1,4
1 неделя роста меланомы В16/Ф10			
И+М	3,8 ± 0,4 ²	0,9 ± 0,08	9,0 ± 0,7
ХБ+М	2,3 ± 0,2 ³	0,5 ± 0,05 ³	14,3 ± 1,1
2 неделя роста меланомы В16/Ф10			
И+М	3,3 ± 0,3	0,7 ± 0,05 ²	9,5 ± 0,9
ХБ+М	3,3 ± 0,2 ^{2,4}	0,8 ± 0,04 ^{2,4}	12,2 ± 1,3
3 неделя роста меланомы В16/Ф10			
И+М	2,6 ± 0,2 ⁴	0,7 ± 0,02	9,3 ± 0,8
ХБ+М	3,8 ± 0,3 ^{2,3}	0,7 ± 0,06	11,3 ± 1,0
Примечание. ¹ — достоверные различия между контрольными группами; ² — достоверные отличия относительно соответствующего контроля; ³ — достоверные отличия по отношению к показателям группы сравнения; ⁴ — достоверные отличия по отношению к показателям в предыдущий срок исследования. И+М — группа сравнения, ХБ+М — основная группа			

работки в неповрежденной и поврежденной центральной нервной системе значительно увеличилось за последние два десятилетия [1]. В процессе эволюции животного мира для выживания организма сформировались механизмы, обеспечивающие возникновение боли только на биологически чрезмерный для организма раздражитель. Развитие коры головного мозга способствовало формированию коркового уровня контроля болевой чувствительности, необходимого для условно-рефлекторной и поведенческой деятельности организма. Значимым фактором формирования ХБ является несостоятельность эндогенной антиноцицептивной системы [9]. Значение моноаминов исключительно велико в механизме формирования боли и ее ограничения. Истощение моноаминов в ЦНС усиливает восприятие боли за счет уменьшения эффективности эндогенной антиноцицептивной системы [10]. Дисфункция в центральных системах 5-НТ и НА вызывает депрессию и боль [11]. Антитела к 5-НТ, НА, ДА, снижая тормозные реакции, повышали возбудимость ноцицептивных нейронов и усиливали выраженность невропатической боли, провоцируя развитие аллодинии у животных с невропатической болью [12].

Анализируя полученные результаты, очевидно, что моделирование невропатической ХБ вызывает депрессию моноаминов — участников антиноцицептивной системы в коре головного мозга мышей. Это, вероятно, приводит к срыву адаптационных возможностей организма, нарушению нервных, антиноцицептивных, вегетативных и метаболических механизмов регуляции. То же касается и гистамина — Г, снижение которого в коре головного мозга при хронической невропатической боли отражает степень тормозного антиноцицептивного влияния, уменьшающего медиаторную активность Г. Моноаминовый путь, особенно НА-ергическая и 5-НТ-ергическая передача, является основным компонентом системы эндогенной антиноцицептивной системы [13]. Считается, что сохранение моноаминовых нейротрансмиттеров может быть достигнуто либо путем ингибирования их обратного захвата, либо ингибирования их метаболизма через механизм моноаминоксидазы (МАО) [14]. МАО подразделяется на два типа: А и В в соответствии с их чувствительностью к субстратам специфичности и ацетиловым ингибиторам. Результаты настоящей работы подтверждают это положение, так как установлено, что в коре головного мозга мышей группы ХБ снижение 5-НТ сопровождалось повышением уровня его метаболита 5-ОИУК, что является результатом активности МАО-А. Это возможно экстраполировать и на другие моноамины — НА и А, также являющиеся субстратами МАО-А.

Предыдущие исследования показали, что нейротоксическая или индуцированная повреждением седалищного нерва гипералгезия может быть ослаблена ингибиторами МАО-А [15]. В исследовании Ху и соавт. (2013), установлено, что у мышей с повреждением седалищного нерва активность МАО-А увеличивается, тогда как применяемая феруловая кислота меняла активность МАО-А и восстанавливала уровень моноаминов [16]. Это еще раз указывает на то, что МАО-А может быть тесно связана с дисфункцией нисходящих нейротрансмиттеров, лежащих в основе невропатической боли.

Аксоны содержащие гистамин происходят из одного источника — туберомамиллярного ядра заднего гипоталамуса и иннервируют почти все области центральной нер-

вной системы. Эта компактная клеточная группа с широко распространенными волокнами, функционально сходна с другими аминными системами, такими, как НА-ергическая или 5-НТ-ергическая, и контролирует множество физиологических процессов, включая, в том числе, восприятие боли, обучение, память и эмоции [17]. Известно также, что Г действует как модулятор нескольких нейротрансмиттеров в головном мозге [18]. Вероятно, этим объясняется синхронное снижение Г и моноаминов в коре головного мозга мышей с ХБ, установленное в настоящей работе.

В ответ на различные эндогенные и экзогенные факторы высвобождаются микромолярные концентрации нейротрансмиттеров, которые модулируют биологическое поведение новообразования [19]. Проанализировав динамику изученных показателей в коре головного мозга мышей при росте меланомы, можно предположить следующее. Поскольку, как известно, ДА и 5-НТ являются компонентами стресс-лимитирующей системы, их накопление в коре головного мозга при росте меланомы у мышей и на фоне ХБ, и без неё, направлено на ограничение прогрессирования неоплазмы — как выраженного стрессующего фактора. При этом необходимым условием их действия является ингибирование активности МАО-А, что особенно отчетливо видно в группе мышей с ХБ. Такая гипотеза подтверждается тем, что у мышей из группы сравнения большее увеличение уровня 5-НТ в сочетании с увеличением на ранних стадиях развития неоплазмы 5-НТ-ергической на фоне ослабления А-ергической медиации в коре головного мозга, предполагает более выраженный стресс-лимитирующий эффект и сочетается с более «благоприятным» течением меланомы. В противоположность этому у мышей с развитием меланомы на фоне ХБ, меньшее увеличение концентрации 5-НТ в коре головного мозга, вследствие изначально низкого из-за боли его уровня, сочетается с более агрессивным течением меланомы: ранний выход (через 1 неделю против 2 недель у мышей из группы сравнения), раннее метастазирование (через 1 неделю против 4 недель у мышей из группы сравнения), меньшая продолжительность жизни (средняя продолжительность жизни для мышей основной группы составила $19,17 \pm 1,35$ дней, максимальная — 24 дня; в группе сравнения первая смерть наступила на 24 сутки, средняя продолжительность их жизни составила $30,25 \pm 1,67$ дня, максимальная — 36 дней). Все различия статистически значимы ($p < 0,05$).

Заключение

Итак, мозг является не только центральным органом регуляции, участвующим в ответе организма на стресс, запускающий все защитные механизмы с целью ограничения стресса [20], но и представляет собой основной аналитический центр, определяющий потенциально более угрожающий для жизни повреждающий фактор. С этих позиций, логично предположить, что хроническая боль воспринимается организмом (мозгом) как ситуация стрессорная, но менее угрожающая жизни, чем развитие злокачественного процесса. Видимо, этим и объясняется динамика нейромедиаторов в коре головного мозга у самок-мышей с развитием меланомы на фоне хронической боли, которая была обнаружена в настоящей работе.

Список литературы

References

1. Яхно Н.Н., Кукушкин М.Л. Хроническая боль: медико-биологические и социально-экономические аспекты. *Вестник РАМН*. 2012; 9: 54-8.
2. Malfliet A., Leysen L., Pas R., Kuppens K., Nijs J., Van Wilgen P., Huysmans E., Goodman L., Ikmans K. Modern pain neuroscience in clinical practice: used for post-cancer, pediatric and sports pain. *Braz. J. Phys. Ther.* 2017; 21(4): 225-32. DOI: 10.1016/j.bjpt.2017.05.009.
3. Bobinski F., Franciane B., Ferreira Alarcon T.A., Cordova M.M., Dombroski P.A., da Cunha C., do Espiritu Santo C.K., Poli A., WanderleiPires R.G., Martins-Silva C., Sluka K.A., Soares Santos A.R. The role of brainstem serotonin in the analgesia produced by low intensity on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain*. 2015; 156(12): 2595 — 606. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000372.
4. Borges G., Migueles C., Neto F., Mico Juan A., UgedoLuise, Berrocozo E. The activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) in Locus Coeruleus promotes pain associated with anxiety in men with arthritis. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2017; 20(6): 463. DOI: 10.1093/ijnp/pyx005.
5. Bushnell M.C., Ceco M., Low L. A. Cognitive and emotional control of pain and its violation in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013; 14(7): 502-11. DOI: 10.1038/nrn3516.
6. Haas H.L., Sergeeva O.A., Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.* 2008; 88(3): 1183-241. DOI: 10.1152/physrev.00043.2007.
7. Каплиев А.В., Котиева И.М. Роль дiencephalic моноаминергической дисфункции в генезе хронической нейрогенной боли. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2014; 5: 42-5.
8. Vachon-Preseau E., Centeno M.V., Ren W., Berger S.E., Tetreault P., Ghantous M., Baria A., Farmer M., Baliki M.N., Schnitser T.J., Apkarskiy A. V. Emotional brain as a harbinger and an enhancer of chronic pain. *J. Dent. Res.* 2016; 95 (6): 605-12. DOI: 10.1177/0022034516638027.
9. Шутов А.А., Каракулова Ю.В., Батуева Е.А., Борисова Л.И., Кириченко С.А., Новикова Н.В., Завалина Т.В., Казакова М.С., Третьякова Е.А. Место серотонинергической системы в патогенезе хронических болевых синдромов. *Пермский медицинский журнал*. 2011; 28 (6): 5-10.
10. Овсянников В. Г., Бойченко А.Е., Алексеев В.В., Каплиев А.В., Алексеева Н.С., Котиева И.М., Шумарин А.Е. Антиноцицептивная система. *Медицинский вестник Юга России*. 2014; 3: 46-54.
11. Tamano R., Ishida M., Asaki T., Hasegawa M., Shinohara S. Influence of dysfunction of spinal monoaminergic neuronal system on pain threshold in rats and analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. *Neurosci. Lett.* 2016; 26(615): 78-82. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.025.
12. Игонькина С.И. Модуляция невропатической боли антителами к нейромедиаторам. *Российский журнал боли*. 2011; 2: 9.
13. Zhao X., Wang C., Zhang J.F., Liu L., Liu A.M., Ma Q., Zhou W.H., Xu Y. Chronic curcumin treatment normalizes depression-like behaviors in mice with mononeuropathy: involvement of supraspinal serotonergic system and GABA_A receptor. *Psychopharmacology*. 2014; 231: 2171-87. DOI: 10.1007/s00213-013-3368-2.
14. Suzuki T., Ueta K., Tamagaki S., Mashimo T. Antiallodynic and antihyperalgesic effect of milnacipran in mice with spinal nerve ligation. *Anesth. Analg.* 2008; 106: 1309-15. DOI: 10.1213/ane.0b013e318167889a.
15. Villarinho J.G., Pinheiro K. de V., Pinheiro F. de V., Oliveira S.M., Machado P., Martins M.A., Bonacorso H.G., Zanatta N., Fachinnetto R., Ferreira J. The antinociceptive effect of reversible monoamine oxidase-A inhibitors in a mouse neuropathic pain model. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2013; 44: 136-42. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.02.005.
16. Xu Y., Lin D., Yu X., XieX., Wang L., Lian L., FeiN., Chen J., Zhu N., Wang G., Huang X., Pan J. Antinociceptive action of ferulic acid on neuropathic pains: involvement of the descending monoaminergic system and opioid receptors. *Oncotarget*. 2016; 7(15): 20455-68. DOI: 10.18632/oncotarget.7973
17. Blandina P., Munari L., Provence G., Passani M. B. Histamine-neurons in the tuberomammillary nucleus: a whole center or individual subpopulations? *Front. Syst. Neurosci.* 2012; 6: 33. DOI: 10.3389/fnsys.2012.00033.
18. Passani M.B., Panula P., Lin J.-S. Histamine in the brain. *Front. Syst. Neurosci.* 2014; 8: 64. DOI: 10.3389/fnsys.2014.00064.
19. Li S., Sun Y., Gao D. Role of the nervous system in cancer metastasis (Review). *Oncol. Letters*. 2013; 5 (4): 1101-11. DOI:10.3892/ol.2013.1168
20. Мак Эвен Брюс С. Физиология и нейробиология стресса и адаптации: центральная роль мозга. *Физиологические обзоры*. 2007; 87(3): 873-904.
1. Yakhno N.N., Kukushkin M.L. [Chronic pain: medico-biologic and sotsio-economic aspects]. *Vestnik RAMN [Bulletin of RAMS]*. 2012; 9: 54-8 (in Russian).
2. Malfliet A., Leysen L., Pas R., Kuppens K., Nijs J., Van Wilgen P., Huysmans E., Goodman L., Ikmans K. Modern pain neuroscience in clinical practice: used for post-cancer, pediatric and sports pain. *Braz. J. Phys. Ther.* 2017; 21(4): 225-32. DOI: 10.1016/j.bjpt.2017.05.009.
3. Bobinski F., Franciane B., Ferreira Alarcon T.A., Cordova M.M., Dombroski P.A., da Cunha C., do Espiritu Santo C.K., Poli A., WanderleiPires R.G., Martins-Silva C., Sluka K.A., Soares Santos A.R. The role of brainstem serotonin in the analgesia produced by low intensity on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain*. 2015; 156(12): 2595 — 606. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000372.
4. Borges G., Migueles C., Neto F., Mico Juan A., UgedoLuise, Berrocozo E. The activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) in Locus Coeruleus promotes pain associated with anxiety in men with arthritis. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2017; 20(6): 463. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000372.
5. Bushnell M.C., Ceco M., Low L.A. Cognitive and emotional control of pain and its violation in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013; 14(7): 502-511. DOI: 10.1038/nrn3516.
6. Haas H.L., Sergeeva O.A., Selbach O. Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.* 2008; 88(3): 1183-1241. DOI: 10.1152/physrev.00043.2007.
7. Kapliev A.V., Kotieva I.M. [A role of diencephalic monoaminergic dysfunction in chronic neurogenic pain]. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova [Journal of Neurology and Psychiatry n.a. S.S. Korsakov]*. 2014; 5: 42-5 (in Russian).
8. Vachon-Preseau E., Centeno M.V., Ren W., Berger S.E., Tetreault P., Ghantous M., Baria A., Farmer M., Baliki M.N., Schnitser T.J., Apkarskiy A. V. Emotional brain as a harbinger and an enhancer of chronic pain. *J. Dent. Res.* 2016; 95 (6): 605-12. DOI: 10.1177/0022034516638027.
9. Shutov A.A., Karakulova Yu.V., Batueva E.A., Borisova L.I., Kirichenko S.A., Novikova N.V., Zavalina T.V., Kazakova M.S., Tret'yakova E.A. [Place of serotonergic system in pathogenesis of chronic pain syndromes]. *Permskii meditsinskii zhurnal [Perm Medical Journal]*. 2011; 28(6): 5-10 (in Russian).
10. Ovsyannikov V. G., Boychenko A.E., Alekseev V.V., Kapliev A.V., Alekseeva N.S., Kotieva I.M., Shumarin A.E. [Antinociceptive system]. *Meditsinskii vestnik Yuga Rossii [Medical Bulletin of the South of Russia]*. 2014; 3: 46-54 (in Russian).
11. Tamano R., Ishida M., Asaki T., Hasegawa M., Shinohara S. Influence of dysfunction of spinal monoaminergic neuronal system on pain threshold in rats and analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. *Neurosci. Lett.* 2016; 26(615): 78-82. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.025.
12. Igon'kina S.I. [Modulation of neuropathic pain by antibodies to neurotransmitters]. *Rossiyskii zhurnal boli [Russian Journal of Pain]*. 2011; 2: 9 (in Russian).
13. ZhaoX., WangC., Zhang J.F., Liu L., Liu A.M., Ma Q., Zhou W.H., Xu Y. Chronic curcumin treatment normalizes depression-like behaviors in mice with mononeuropathy: involvement of supraspinal serotonergic system and GABA_A receptor. *Psychopharmacology*. 2014; 231: 2171-87. DOI: 10.1007/s00213-013-3368-2.
14. Suzuki T., Ueta K., Tamagaki S., Mashimo T. Antiallodynic and antihyperalgesic effect of milnacipran in mice with spinal nerve ligation. *Anesth. Analg.* 2008; 106: 1309-15. DOI: 10.1213/ane.0b013e318167889a.
15. Villarinho J.G., Pinheiro K. de V., Pinheiro F. de V., Oliveira S.M., Machado P., Martins M.A., Bonacorso H.G., Zanatta N., Fachinnetto R., Ferreira J. The antinociceptive effect of reversible monoamine oxidase-A inhibitors in a mouse neuropathic pain model. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2013; 44: 136-42. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.02.005.
16. Xu Y., Lin D., Yu X., XieX., Wang L., Lian L., FeiN., Chen J., Zhu N., Wang G., Huang X., Pan J. Antinociceptive action of ferulic acid on neuropathic pains: involvement of the descending monoaminergic system and opioid receptors. *Oncotarget*. 2016; 7(15): 20455-68. DOI: 10.18632/oncotarget.7973
17. Blandina P., Munari L., Provence G., Passani M. B. Histamine-neurons in the tuberomammillary nucleus: a whole center or individual subpopulations? *Front. Syst. Neurosci.* 2012; 6: 33. DOI: 10.3389/fnsys.2012.00033.
18. Passani M. B., Panula P., Lin J.-S. Histamine in the brain. *Front. Syst. Neurosci.* 2014; 8: 64. DOI: 10.3389/fnsys.2014.00064.
19. Li S., Sun Y., Gao D. Role of the nervous system in cancer metastasis (Review). *Oncol. Letters*. 2013; 5 (4): 1101-11. DOI:10.3892/ol.2013.1168
20. Mak Even Bryus S. [Physiology and neurobiology of stress and adaptation: the central role of the brain]. *Fiziologicheskie obzory [Physiological Reviews]*. 2007; 87(3): 873-904 (in Russian).

Сведения об авторах:

Кит Олег Иванович — доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, генеральный директор.

Котиева Инга Мовлиевна — кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.

Франциянц Елена Михайловна — доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.

Каплиева Ирина Викторовна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.

Трепитаки Лидия Константиновна — научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.

Бандовкина Валерия Ахтямовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.

Черярина Наталья Дмитриевна — врач-лаборант лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.

Погорелова Юлия Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.

Бликян Марина Владимировна — младший научный сотрудник лаборатории изучения патогенеза злокачественных опухолей.

УДК 616-092
DOI:

Твёрдофазные структуры спинномозговой жидкости в диагностике раннего асимптомного нейросифилиса

Шатохина С.Н.¹, Кузнецова Н.А.², Шабалин В.Н.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», 129110, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2

Цель проведённого исследования состояла в оценке эффективности визуального анализа твёрдофазных структур спинномозговой жидкости для диагностики ранних форм нейросифилиса. **Методы.** Использован метод краевой дегидратации биологических жидкостей, входящий в состав авторской диагностической технологии «Литос-система». Диагностика раннего асимптомного нейросифилиса заключается в выявлении деструктивных образований в форме овалов в морфологической картине твёрдой фазы спинномозговой жидкости. **Результаты.** Проведён сравнительный анализ результатов исследования спинномозговой жидкости у 19 больных с подтверждённым диагнозом «ранний асимптомный нейросифилис», полученных традиционными лабораторными методами и методом краевой дегидратации. Выявлено, что локализация овалов внутри сферолитов указывает на длительность заболевания нейросифилисом менее трёх лет, а вне сферолитов — от трех до пяти лет. **Заключение.** Метод краевой дегидратации позволяет диагностировать ранний асимптомный нейросифилис по наличию деструктивных образований в форме овалов в морфологической картине твёрдой фазы спинномозговой жидкости.

Ключевые слова: ранний асимптомный нейросифилис, спинномозговая жидкость, технология «Литос-Система», метод краевой дегидратации, анизоморфоны.

Для цитирования: Шатохина С.Н., Кузнецова Н.А., Шабалин В.Н. Твёрдофазные структуры спинномозговой жидкости в диагностике раннего асимптомного нейросифилиса. Патогенез. 2017; 15(4): 56–61

Для корреспонденции: Шатохина Светлана Николаевна, e-mail: sv_n@list.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 25.09.2017

Solid-phase structures of cerebrospinal fluid in diagnosis of early asymptomatic neurosyphilis

Shatokhina S.N.¹, Kuznetsova N.A.², Shabalin V.N.¹

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russia

² M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute, Schepkina Str. 61/2, Moscow 129110, Russian Federation

The **aim** of this study was to evaluate effectiveness of visual analysis of solid-phase structures in cerebrospinal fluid to diagnose early forms of neurosyphilis. **Methods.** We used a method of marginal dehydration of biological fluids as a part of the author's diagnostic technology, Litos-System. Early asymptomatic neurosyphilis is diagnosed based on detection of destructive, oval-shaped formations in the morphological picture of cerebrospinal fluid solid phase. **Results.** Data from analyses of cerebrospinal fluid performed with traditional laboratory methods and the method of marginal dehydration were compared for 19 patients with documented diagnosis of early asymptomatic neurosyphilis. A localization of ovals within spherulites indicated a less than a three-year duration of neurosyphilis while a localization outside spherulites indicated a duration of three to five years. **Conclusion.** The method of marginal dehydration allows detecting early asymptomatic neurosyphilis based on the presence of destructive, oval-shaped formations in the morphological picture of cerebrospinal fluid solid phase.

Key words: early asymptomatic neurosyphilis, cerebrospinal fluid, Litos-System technology, marginal dehydration method, anisomorphons.

For citation: Shatokhina S.N., Kuznetsova N.A., Shabalin V.N. Solid-phase structures of cerebrospinal fluid in diagnosis of early asymptomatic neurosyphilis. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15(4): 56–61 (in Russian)

For correspondence: Shatokhina Svetlana Nikolaevna, e-mail: sv_n@list.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 25.09.2017

Введение

Сифилис в России остается социально значимой инфекцией с высоким уровнем заболеваемости, включая его поздние формы, в частности — нейросифилис. Различают ранний (мезенхимный) нейросифилис (до 5 лет от момента заражения) и поздний (паренхиматозный) нейросифилис, развивающийся через 5 и более лет после заражения. В настоящее время в раннем нейросифилисе выделяют асимптомный нейросифилис, сифилитический менингит, менинговаскулярный нейросифилис [1, 2].

По данным государственной статистической отчетности после пика эпидемии сифилиса в 90-х годах XX века в первые десятилетия текущего столетия отмечается снижение общей заболеваемости сифилисом: если в 1997 г. на 100 000 населения зафиксировано 277,3 случая, то в 2009 г. — 53,3, а в 2014 г. — 24,6 [3]. Одновременно происходит изменение структуры заболеваемости — снижение доли ранних форм сифилиса и увеличение доли скрытых и поздних форм заболевания, включая кардиоваскулярный сифилис и нейросифилис [1]. Так, по данным государственной статистической отчетности в 1999 году в РФ было зарегистрировано 144 случая нейросифилиса, в 2009 — 872, а в 2014 году число больных сифилисом со специфическим поражением нервной системы достигло 1163 [4].

Известно, что, проникнув в организм, бледная трепонема распространяется гематогенным и лимфогенным путями и попадает в нервную систему на ранних стадиях заболевания. При этом бледная трепонема нередко трансформируется в L- и цист-формы, что обеспечивает ей выживание и возможность размножения, а также способствует персистенции возбудителя в тканях в период латентного течения сифилиса [5, 6]. В современных условиях позднее выявление сифилитического поражения нервной системы (спинная сухотка, табопаралич) обусловлено, прежде всего, несвоевременной и неполноценной диагностикой. В результате этого может быть назначено неадекватное лечение, часто с применением дюранных препаратов пенициллина, которые не обеспечивают трепонемощную концентрацию антибиотика в спинномозговой жидкости (СМЖ), что может приводить к необратимым изменениям в ЦНС [7].

В настоящее время из-за слабой чувствительности реакции Вассермана спектр серологических реакций значительно расширился. Разработан нетрепонемный VDRL-тест (Venereal Disease Research Laboratory), который используется в целях первичной диагностики сифилиса, а также для диагностики врожденного и нейросифилиса. Однако неспецифичность кардиолипидных антител, выявляемых с помощью нетрепонемных тестов, даёт достаточно высокий уровень ложноположительных результатов, что не позволяет использовать данный вид исследований для окончательной постановки диагноза. Активно применяются трепонемные тесты, направленные на определение специфических иммуноглобулинов к бледной трепонеме: реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментный анализ (ИФА). Вместе с тем опыт использования этих тестов не привел к ожидаемым результатам, и диагностика нейросифилиса вызывает значительные трудности. Такая ситуация объясняется тем, что широкое использование антибактериальных препаратов значительно изменили как структуру трепонем, так и

иммунный ответ организма на внедрение бледной трепонемы. В результате показатели общеклинических лабораторных исследований СМЖ часто не выходят за пределы референтных значений, а серологические тесты во многих случаях являются малоинформативными, что не даёт возможность диагностировать нейросифилис с достаточной степенью достоверности. В такой ситуации только опыт клинициста является решающим в постановке диагноза. Однако при отсутствии объективных критериев диагностики нейросифилиса, вероятность ошибки субъективного фактора весьма значительна. Эта же проблема имеет место и в оценке эффективности лечения больных нейросифилисом, в результате мнения специалистов в необходимости продолжения курса терапии у таких больных часто расходятся.

Новая диагностическая технология «Литос-система» [8], основанная на исследовании структур твёрдой фазы биологических жидкостей, даёт интегральную информацию о патофизиологическом состоянии организма; выявляет патологический процесс как на самых ранних этапах его развития, так и последующих стадиях, на которых существующие клинические, инструментальные и лабораторные методы еще не дают результата или результаты, полученные с помощью этих методов, вызывают сомнения; позволяет проводить мониторинг больного, быстро оценивать эффективность проводимой терапии и корректировать её по ходу курса лечения; даёт возможность прогнозировать исход заболевания. Технология «Литос-система» открывает широкие перспективы в клинической медицине, так как отличается малой инвазивностью, технической простотой, экономичностью, доступностью для врачей различных специальностей в амбулаторных и стационарных учреждениях здравоохранения независимо от их мощности [8].

В связи с этим *цель исследования* состояла в оценке эффективности анализа твёрдофазных структур спинномозговой жидкости в диагностике ранних форм нейросифилиса.

Материалы и методы

Отбор испытуемых был проведён на основе принципов информированного согласия. Контингент обследованных пациентов был представлен тремя группами — основной и двумя группами сравнения. В основную группу вошли 19 больных с подтверждённым клиническим диагнозом *ранний асимптомный нейросифилис*. В группы сравнения вошли 15 больных с сифилитическим менингитом (первая группа) и 15 больных с неспецифическим (бактериальным) менингитом (вторая группа), диагнозы также клинически подтверждены.

Дизайн исследований включал в себя следующие лабораторные анализы СМЖ: общеклинические (общий белок, количество клеток), нетрепонемный (VDRL) и трепонемные тесты (РИФ с цельным ликвором, РПГА, ИФА-IgG). Также были проведены серологические тесты сыворотки крови: реакция плазменных реагинов (РПР), РПГА, РИФ, иммуноферментный анализ (ИФА-IgM, ИФА-IgG, ИФА-IgM+IgG). Основным методом исследования являлся метод краевой дегидратации СМЖ описанный в разделе диагностические технологии «Литос-Система» [8]. Данный тест позволяет получать специфические биокристаллические структуры — анизоморфоны, свойственные для определённых видов патологии.

Перевод жидкокристаллических структур СМЖ в твёрдофазное состояние методом краевой дегидратации осуществлялся на специальных стеклянных тест-картах диагностического набора «Литос-система». На поверхность тест-карты наносили по 20 мкл СМЖ, которые накрывали покровным стеклом. Для обеспечения адекватной зоны поиска маркерных структур создавали пять аналитических ячеек для каждого образца СМЖ. Визуальную оценку анизоморфонов проводили с помощью микроскопа DM2500 фирмы Leica в поляризованном свете при увеличении от 50 до 700.

Результаты исследования и их обсуждение

Показатели трепонемных и нетрепонемного тестов сыворотки крови 19 больных ранним асимптомным нейросифилисом свидетельствовали о том, что при всех положительных тестах на сифилис только диапазон значений ИФА-IgM в сыворотке крови составлял от отрицательного до слабоположительных значений. Это свидетельствовало о давности заболевания сифилисом, так как присутствие IgM антител к бледной трепонеме является показателем острой фазы заболевания.

При исследовании сыворотки крови у всех больных сифилитическим менингитом (первая группа сравнения) отмечались положительные результаты серологических тестов на сифилис разной степени выраженности, а у больных второй группы сравнения (бактериальный менингит) результаты серологических тестов на сифилис были отрицательными.

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что у больных ранним асимптомным нейросифилисом определялись положительные результаты трепонемных и нетрепонемного тестов в СМЖ. При этом концентрация белка у большинства больных была близка к показателям

нормы, а цитоз отмечался только у 3 (15,8%) больных из 19 (табл. 2).

У больных первой группы сравнения (сифилитический менингит) при позитивных трепонемных тестах в СМЖ положительный нетрепонемный тест VDRL отмечался лишь у 4 больных (26%), что характеризует его недостаточную чувствительность при этой форме нейросифилиса. Общеклинические показатели СМЖ не выходили за пределы нормы у большинства больных. Цитоз от 20 до 250 клеток в 1 мкл отмечался лишь у 3 чел. (20%), протеинария — у 1 больного (7%). Во второй группе сравнения (бактериальный менингит) при отрицательных значениях трепонемных и нетрепонемного тестов в СМЖ (табл. 1), выраженный цитоз отмечался у 10 (66,7%) больных, что характеризовало активную воспалительную реакцию организма при менингите бактериального генеза.

Таким образом, результаты общеклинического исследования СМЖ в большинстве случаев не отражали патологический процесс, происходящий в ЦНС. Более информативным оказался метод визуального анализа анизоморфонов СМЖ с помощью диагностической технологии «Литос-система».

В норме анизоморфоны СМЖ, получаемые методом краевой дегидратации, представлены скоплениями сферолитов мелкого и среднего размера (рис. 1).

При исследовании анизоморфонов СМЖ всех обследованных больных основной группы нами впервые были выявлены специфические образования в виде овалов, окруженных двухслойной мембраной — анизотропной внутренней и изотропной наружной (рис. 2). Центральная область овалов была представлена слабо анизотропной субстанцией.

Детальное изучение особенностей анизоморфонов СМЖ 19 больных с ранним асимптомным нейросифилисом позволило разделить их на две подгруппы. Анизомор-

Таблица 1

Диапазоны значений результатов трепонемных и нетрепонемного тестов СМЖ у обследованных больных разных групп

Группа	Тесты			
	VDRL	РПГА	РИФ	ИФА-IgG
Ранний асимптомный нейросифилис (n = 19)	"2+" — "3+"	"4+"; 1/2560* — "4+"; 1/10240*	"4+"	10,4 — 15,3
Сифилитический менингит (n = 15)	n = 11: "—" n = 4: "2+" — "3+1/2"	"4+"; 1/160* — "4+"; 1/20480*	"3+" — "4+"	7,9 — 16,1
Бактериальный менингит (n = 15)	"—"	"—"	"—"	"—"
Примечание. * — титр теста				

Таблица 2

Диапазоны значений результатов общеклинических тестов СМЖ у обследованных больных разных групп

Группа	Тесты	
	Общий белок (г/л) (норма 0,15 — 0,45)	Количество клеток (10 ⁶ /л) (норма 3 — 5)
Ранний асимптомный нейросифилис (n = 19)	n = 18: 0,19 — 0,45 n = 1: 0,47	n = 16: 3 — 5 n = 3: 14 — 29
Сифилитический менингит (n = 15)	n = 14: 0,15 — 0,44 n = 1: 0,58	n = 12: 3 — 4 n = 3: 20 — 250
Бактериальный менингит (n = 15)	n = 13: 0,46 — 0,81 n = 2: 4,62 — 5,90	n = 5: 3 — 5 n = 10: 479 — 773

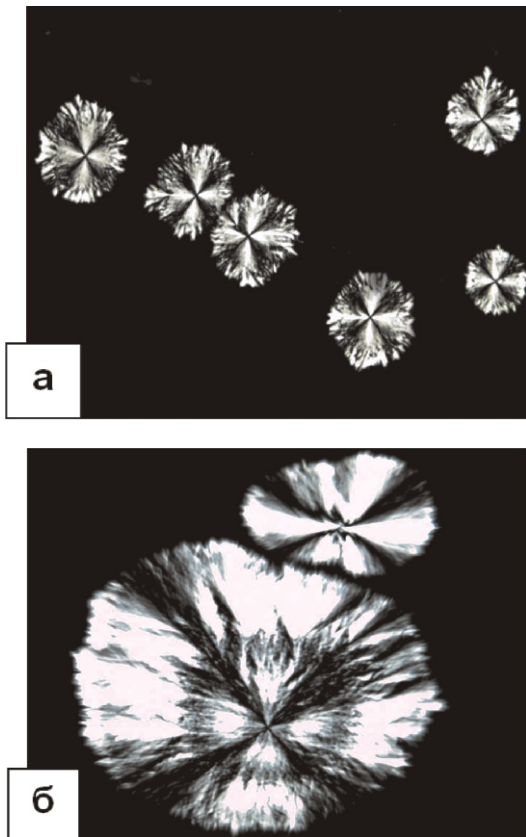


Рис. 1. Анизоморфны спинномозговой жидкости в норме (микроскопия в поляризованном свете): а – х400; б – х700.

фоны СМЖ больных первой подгруппы (11 чел.) были представлены сферолитами, внутри структуры которых (в 30%) присутствовали единичные овалы (рис. 2, а, б).

У больных второй подгруппы (8 человек) около 70% сферолитов имели овалы. При этом часть овалов «выходила» за пределы сферолита и располагалась вокруг его по периферии (рис. 2 в, г). Остальные сферолиты (30%) овалов не имели.

Детальный анализ данных анамнеза показал, что больные первой подгруппы имели длительность заболевания сифилисом менее трех лет, а больные второй подгруппы — от трех до пяти лет. То есть, овальные структуры в сферолитах СМЖ являются морфологическим признаком раннего асимптомного нейросифилиса, а нахождение этих структур за пределами сферолитов указывает на давность патологического процесса, вызванного бледной трепонемой.

По-видимому, увеличение в СМЖ числа сферолитов с овалами и расширение расположения овалов за пределами сферолитов у больных второй подгруппы характеризует нарастание продуктов деградации структур в ЦНС, вызванных более длительным течением заболевания.

Иная картина анизоморфонов СМЖ отмечалась у больных обеих групп сравнения. В их СМЖ определялись специфические шары, которые были образованы скоплениями мелких гранул. Шары располагались изолированно или «набивались» в пространства сферолитов между дендритными отростками (рис. 3).

Необходимо подчеркнуть, что изучение состава анизоморфонов СМЖ больных бактериальным менингитом не

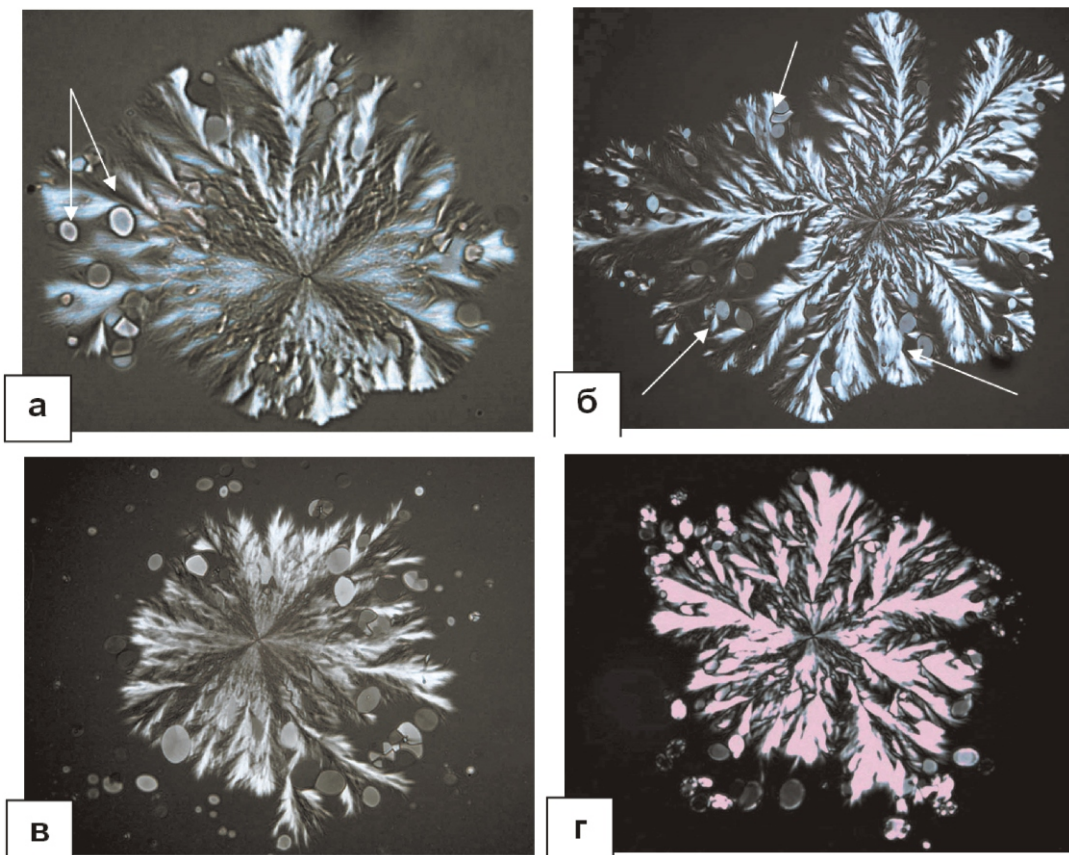
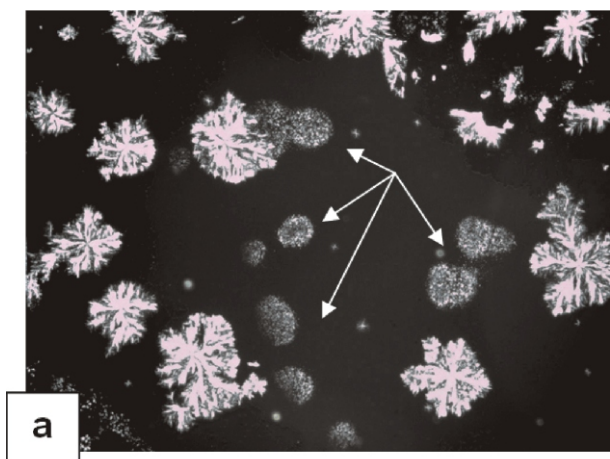
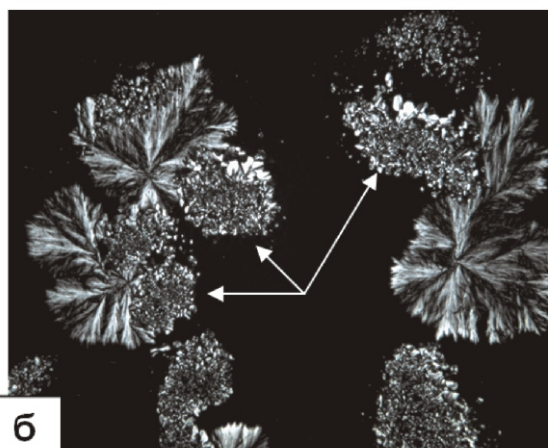


Рис. 2. Анизоморфны СМЖ при раннем асимптомном нейросифилисе: а, б — аморфные овалы внутри сферолитов (показано стрелками); в, г — аморфные овалы внутри и вне структуры сферолита. Микроскопия в поляризованном свете, х200.



а



б

Рис. 3. Анизоморфны СМЖ при сифилитическом менингите: а — шары (стрелки), х50; б — шары внутри структуры сферолита (стрелки). Микроскопия в поляризованном свете. х200.

выявило их отличий от состава анизоморфонов в СМЖ больных сифилитическим менингитом. Следовательно, шаровые структуры не являются специфичными для диагностики менингитов сифилитического генеза и характеризуют деструктивный процесс, вызванный патогенной микрофлорой в тканях ЦНС.

Мы считаем, что признаком деструктивного процесса в ЦНС являются специфические овалы и шары, впервые обнаруженные нами у больных нейросифилисом и больных с бактериальным поражением структур мозга. Защитная реакция на патогенную микрофлору со стороны ЦНС вызывает воспаление в мягких оболочках головного и спинного мозга с участием различных цитокинов. Патоморфологическим механизмом воспалительного процесса в ЦНС являются иммунологические реакции в структурах мезодермального происхождения, в мягких мозговых оболочках и сосудах головного и спинного мозга. Повреждение фосфолипидных мембран клеток и токсические продукты распада тканей, представляющие собой системы «липид-вода», «липид-белок-вода», поступают в СМЖ. В процессе краевой дегидратации из них формируются особые структуры, которые нам удалось наблюдать при

морфологическом исследовании СМЖ с помощью диагностической технологии «Литос-система». При этом продукты деструкции тканей, присутствующие в ликворе, формируют кристалло-аморфные образования в результате стяжения сходных структур по принципу тропности. Эти самоорганизующиеся образования в виде «овалов» и «шаров» указывают на активный деструктивный процесс в тканях ЦНС. Кроме того, небольшое число сферолитов, содержащих овалы и расположение овалов только внутри сферолита указывают на длительность заболевания менее трёх лет, а преобладание сферолитов с овалами и расположение овалов не только внутри сферолита, но и за его пределами по периферии, свидетельствует о длительности заболевания более трёх лет.

Заключение

Метод краевой дегидратации по наличию специфических структур твёрдой фазы СМЖ позволяет объективно диагностировать ранний асимптомный нейросифилис, уточнять давность течения этого заболевания и проводить дифференциальную диагностику с менингитами сифилитического и бактериального генеза.

Список литературы

1. Катунин Г.Л., Фриго Н.В., Ротанов С.В., Мелехина Л.Е., Китаева Н.В., Лесная И.Н. Анализ заболеваемости и качества лабораторной диагностики нейросифилиса в Российской Федерации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2011; 3: 18-26.
2. Яхно Н.Н., Штульман Д.Р. *Болезни нервной системы* (руководство для врачей в двух томах). М.: Медицина, 2001. 367 с.
3. Какорина Е.П., Стародубов В.И., Кубанова А.А. *Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и болезнями кожи (статистические материалы)*. Москва, 2015. 213 с.
4. Кубанова А.А., Лесная И.Н., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Каспирович М.А. Анализ эпидемиологической ситуации и динамика заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем, и дерматозами на территории Российской Федерации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2010; 5: 4-21.
5. Лосева О.К., Тактамышева Э.Ш. Современный нейросифилис: клиника, диагностика, лечение. *Русский медицинский журнал*. 1998; 15: 21-23.
6. Лукьянов А.М. *Нейросифилис: современные аспекты клиники, диагностики, лечения*. Минск: Парадонс, 2009. 392 с.
7. Дмитриев Г.А., Доля О.В., Васильева Т.И. *Сифилис: феномен, эволюция, новация*. М.: Бином. 2010. 303 с.
8. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. *Морфология биологических жидкостей человека*. М.: Хризостом, 2001. 744 с.

References

1. Katunin G.L., Frigo N.V., Rotanov S.V., Melekhina L.E., Kitaeva N.V., Lesnaya I.N. [Analysis of the incidence and quality of laboratory diagnosis of neurosyphilis in the Russian Federation]. *Vestnik dermatologii i venerologii [Bulletin of Dermatology and Venereology]*. 2011; 3: 18-26. (in Russian)
2. Yahno N.N., Shtul'man D.R. [*Diseases of the nervous system (a guide for physicians in two volumes)*]. Moscow, Medicina, 2001. 367 p. (in Russian)
3. Kakorina E.P., Starodubov V.I., Kubanova A.A. [*Resources and activity of healthcare organizations dermatovenereological profile. The incidence of infections, sexually transmitted diseases, infectious skin diseases and skin diseases (statistics)*]. Moscow, 2015. 213 p. (in Russian)
4. Kubanova A.A., Lesnaya I.N., Kubanov A.A., Melekhina L.E., Kaspirovich M.A. [Analysis of the epidemiological situation and the dynamics of incidence of sexually transmitted infections, and dermatoses at the territory of the Russian Federation]. *Vestnik dermatologii i ve-*

nerologii [Bulletin of Dermatology and Venereology]. 2010; 5: 4-21. (in Russian)

5. Loseva O.K., Taktamysheva E.S. [Modern neurosyphilis: clinical features, diagnosis, treatment]. *Russkii meditsinskii zhurnal [Russian Medical Journal]*. 1998; 15: 21-23. (in Russian)

6. Luk'yanov A.M. [*Neurosyphilis: modern aspects of clinic, diagnostics, treatment*]. Minsk: Paradons, 2009. 392 p. (in Russian)

7. Dmitriev G.A., Dolya O.V., Vasil'eva T.I. [*Sifilis: fenomen, evolution, innovation*]. Moscow: Binom. 2010. 303 p. (in Russian)

8. Shabalin V.N., Shatohina S.N. [*Morphology of human biological fluids*]. Moscow: Hrizostom, 2001. 744 p. (in Russian)

Сведения об авторах:

Шатохина Светлана Николаевна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией биокристалломики¹.

Кузнецова Нина Александровна — ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики².

Шабалин В.Н. — доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник лаборатории биокристалломики¹.

УДК 575.174.4 + 57.024:57.026 + 316.62 + 330.16
DOI:

Поиск связи носительства различных вариантов гена COMT с проявлением некоторых черт личности и успешностью в бизнесе

Богданенко Е.В.¹, Власов А.В.^{2,3}, Нурбеков М.К.^{1,4}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Высшая школа бизнес-информатики Национального исследовательского университета «Высшая школа экономики», 101000, Москва ул. Мясницкая, д. 20

³ ООО «DeMontroyal», 440015, Пенза, ул. Байдукова, д. 101А

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский педагогический государственный университет», 109444, Москва, пр. Вернадского, д.88

Различия в проявлении некоторых черт личности человека в последнее время ассоциируют с однонуклеотидными заменами в генах — полиморфизмами. В частности, генотип Met/Met полиморфизм Val158Met гена катехол-орто-метилтрансферазы (COMT) ассоциируют с повышенными обучаемостью и удовлетворенностью жизнью и пониженными тревожностью и стрессоустойчивостью по сравнению с генотипом Val/Val. Следовательно, носительство определенного генотипа должно влиять на успешность человека в избранном им роде деятельности. Для проверки этого предположения 91 человек, успешно занимающиеся одним родом деятельности — бизнесом, прошли генетическое и психологическое тестирование. Психологические тесты MMPI, TAS-20 и SWLS не выявили достоверной разницы как в уровнях тревожности и трудностей в общении, так и в способности выражать свои чувства и удовлетворенности жизнью между носителями генотипов Val/Val и Val/Met. Однако обнаруженное отклонение частот встречаемости генотипов Val/Val и Met/Met у представителей бизнеса от частот, встречающихся в других популяциях (превышение в 1,5 раза и снижение в 25 раз соответственно) позволяют предположить, что успешность в определенной профессии, в частности в бизнесе, может быть связана с определенным генотипом у его обладателя. Значительные успехи в жизни как благоприятный фактор окружающей среды могут через эпигенетическую регуляцию нивелировать проявление врожденных депрессивных черт личности, ассоциируемых с генотипом Val/Val.

Ключевые слова: ген COMT, полиморфизм Val158Met, MMPI, TAS-20, SWLS, успешность в бизнесе.

Для цитирования: Богданенко Е.В., Власов А.В., Нурбеков М.К. Поиск связи носительства различных вариантов гена COMT с проявлением некоторых черт личности и успешностью в бизнесе. Патогенез. 2017; 15 (2): 62–68

Для корреспонденции: Богданенко Елена Валентиновна: e-mail: lenabogdval@mail.ru

Финансирование. Данное исследование выполнено при поддержке DeMontroyal, LLC (e-mail: study@demontroyal.com).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 24.07.2017

Search for associations of carrying different variants of the COMT gene with manifestations of some personality traits and success in business

Bogdanenko E.V.¹, Vlasov A.V.^{2,3}, Nurbekov M.K.^{1,4}

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Higher School of Business Informatics, National Research University, The Higher School of Economics, Myasnitskay Str. 20, Moscow 101000, Russian Federation

³ DeMontroyal LLC, Baydukova Str. 101A, Penza 440015, Russian Federation

⁴ Moscow Pedagogical State University, Prospekt Vernadskogo 88, Moscow 109444, Russian Federation

In recent time, differences in manifestations of some personality traits have been associated with single nucleotide substitutions in genes, polymorphisms. Specifically, the Met/Met genotype of Val158Met polymorphisms in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene is associated with higher ability to learn and be satisfied with life and reduced ability to cope with stress and anxiety as compared with the Val/Val genotype. Therefore, carriage of a certain genotype might influence success of a person in his/her activity. To test this hypothesis, 91 people successfully engaged in the same kind of activity, business, underwent psychological and genetic tests. The Mini-Mult (MMPI), TAS-20, and SWLS psychological tests did not detect any significant differences between Val/Val and Val/Met genotype carriers in levels of anxiety and difficulties in interpersonal communication, ability to express their feelings, and life satisfaction. However, the differences between the Val/Val and Met/Met genotype frequencies in business men and other populations (1.5 times higher and 25 times lower, respectively) suggested

that a successful career in business might be related with a definite genotype. Significant life success as a beneficial environmental factor might neutralize via epigenetic regulation manifestations of congenital depressive personality traits associated with the Val/Val genotype.

Key words: COMT gene, Val158Met polymorphism, MMPI, TAS-20, SWLS, success in business.

For citation: Bogdanenko E.V., Vlasov A.V., Nurbekov M.K. Search for associations of carrying different variants of the COMT gene with manifestations of some personality traits and success in business. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2017; 62—68 (in Russian)

For correspondence: Bogdanenko Elena Valentinovna, e-mail: lenabogdval@mail.ru

Funding. The study was carried out at sponsorship of DeMontroyal, LLC (e-mail: study@demontroyal.com).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 24.07.2017

Введение

Фермент катехол-орто-метилтрансфераза (COMT) синтезируется в пресинаптических нейронах лобных долей головного мозга и катализирует первую стадию разрушения дофамина, адреналина и норадреналина — метилирование. Ген, кодирующий этот белок, находится на 22-й хромосоме. Исходным, «диким» вариантом является фермент с аминокислотой валином в 158-м положении в белковой цепи. Однако у многих людей имеется вариант фермента, в котором на месте валина (*Val*) находится метионин (*Met*) в результате мутации в кодирующем его гене: в позиции 472 гуанин (G) заменен на аденин (A). Такой полиморфизм гена COMT обозначается как *Val158Met*, rs4680 или *472A>G*. У гомозигот *Met/Met* термостабильность фермента COMT более чем в 2 раза ниже, чем у гомозигот *Val/Val*, а у гетерозигот эта величина имеет промежуточное значение. Кроме того, у гомозигот *Val/Val* фермент COMT разрушает катехоламины после их обратной доставки в пресинаптический нейрон в 3—4 раза быстрее, чем у гомозигот *Met/Met* [1—3]. Индивиды, обладающие генотипом *Val/Met*, имеют промежуточный уровень активности фермента по сравнению с генотипами *Met/Met* и *Val/Val* в результате кодминирования обоих аллелей гена COMT. Генотип *Val/Val* связывают с высоким уровнем согласия и добросовестности у его носителей. Но из-за пониженного уровня дофамина в синапсе они получают меньше удовольствия от жизни и более склонны к депрессии, чем носители генотипа *Met/Met*; у них хуже развиты моторные функции, чем у гомозигот *Met/Met* [4—7]. Представители этого генотипа также более стрессоустойчивы, работоспособны и экстравертны, чем гомозиготы *Met/Met*, но они уступают им в обучаемости, чаще страдают шизофренией и биполярным расстройством [8, 9]. Одни из исследований указывают на то, что значения черт тревожного ряда повышены в характере носителей аллеля *Met* [10], другие — у представителей генотипа *Val/Val* [11].

Из всего вышесказанного следует, что наличие определенных комбинаций вариантов гена COMT может влиять на проявление различных личностных черт, что, в свою очередь, должно определять склонность людей к определенным видам деятельности. С целью проверки существования указанных взаимосвязей нами были определены частоты встречаемости аллелей гена COMT и их комбинаций и проведен анализ различий между носителями таких комбинаций по уровню тревожности, способности выражать свои чувства и удовлетворенности жизнью на примере людей, достигших значительных успехов в таком специфическом роде деятельности, как бизнес.

Материалы и методы исследования

В работе исследовались образцы ДНК менеджеров среднего и высшего звена и предпринимателей, выделенной из соскобов из ротовой полости. Среди них было 24 женщины и 67 мужчин (всего 91 чел.) в возрасте от 20 до 64 лет. Эти люди являлись участниками сообщества Института развития лидеров «Агентства стратегических инициатив по продвижению новых проектов» (АСИ). Выделение ДНК проводилось с использованием наборов фирмы «ДНК-технология» по прописи фирмы. Праймеры и флуоресцентно меченые зонды (метки FAM и Hex) для полимеразной цепной реакции (ПЦР) были синтезированы в фирме «Синтол» и сконструированы с использованием пакета программ Primer Express® Software. Реакционную смесь составляли смешиванием двукратного буфера, содержащего Taq-полимеразу, трифосфаты и соли со смесью затравок, зондов и образца ДНК. Амплификации протекала 5 мин при 95°C, затем производилось 40 циклов амплификации в режиме 94°C — 20 с, 60°C — 30 с. Накапливание ПЦР-продукта снимало эффект «гашения» флуоресценции и приводило к постепенному его увеличению. Зонды конструировали комплементарно аллельным формам гена в анализируемом сайте с SNP полиморфизмом (A/G). По накоплению соответствующего меченого продукта идентифицировали аллели A (*Met*) и G (*Val*).

Данные по уровню тревожности и удовлетворенности жизнью были получены с помощью опросника «Мини-Мульт» (сокращенного варианта теста MMPI, многофакторного опросника для исследования личности) [12], состоящего из 71 вопроса. Так как тест обычно используется для индивидуальных опросов, то для получения сравнимых результатов из теста были выбраны те ответы («да» или «нет»), которые касались проявления тревожности, удовлетворенности жизнью и трудностей в общении. Ответы, подтверждающие эти проявления, считались положительными.

Для анализа уровня тревожности участников были взяты такие вопросы:

- 1) по утрам Вы обычно чувствуете, что выпались и отдохнули;
- 2) у Вас прерывистый и беспокойный сон;
- 3) у Вас очень часто бывает чувство, как будто Вы сделали что-то неправильное или нехорошее;
- 4) Вы почти всегда о чем-нибудь тревожитесь;
- 5) у Вас бывают периоды такого беспокойства, что трудно усидеть на месте.

После этого подсчитывалось количество ответов, подтверждающих тревожность в характере людей или опровергающих это качество.

Таким же образом подсчитывались данные по уровню удовлетворенности жизнью, выбрав из опросника «Мини-Мульт» следующие вопросы:

1) большинство людей довольны своей жизнью более, чем Вы;

2) обычно Вы удовлетворены своей судьбой;

3) Вы считаете, что Вас часто незаслуженно наказывали.

Уровень трудностей в общении подсчитывали, используя ответы на такие вопросы:

1) у Вас такое впечатление, что Вас никто не понимает;

2) Вам трудно поддерживать разговор с человеком, с которым Вы только что познакомились;

3) Вы считаете, что Вы слишком застенчивы;

4) Ваши родители и другие члены семьи часто придираются к Вам.

Оценка способности выражать свои чувства определялась с помощью Торонтской алекситимической шкалы TAS-20, состоящей из 20 вопросов и 5 вариантов ответов на каждый вопрос с их последующей оценкой в баллах. Значение TAS от 20 до 51 считается нормальным, от 52 до 60 — повышенным, а от 61 и выше — высоким [13, 14]. Уровень удовлетворенности жизнью обсчитывался также по шкале удовлетворенности жизнью (ШУДЖ, англ. Satisfaction With Life Scale, сокр. SWLS) [15], состоящей из 5 вопросов:

1) почти во всем моя жизнь соответствует моему идеалу;

2) условия моей жизни превосходные;

3) я удовлетворен своей жизнью;

4) пока я достигал в главном всего, чего я хотел в жизни;

5) если бы я смог прожить свою жизнь еще раз, я бы почти ничего в ней не изменил.

Участники должны были дать каждому высказыванию балл от 1 до 7, после чего производился подсчет баллов по каждому человеку.

На каждый массив данных допускалось наличие в общей сложности не более трех вопросов, на которые не был получен ответ. В каждом из этих опросов участвовало 86 человек из 91, у которых брали пробы ДНК. Все эти люди на момент опроса не знали, носителем какого генотипа они являются. Опрашиваемые самостоятельно принимали решения участвовать в исследовании и были информированы о его целях в соответствии со «Всемирной декларацией о биоэтике и правах человека» (статьи 5 и 6).

Математическая обработка данных проводилась с использованием программ Microsoft Office Excel 2003 и Statistica 8,0. Результаты представлены как $M \pm m$, где M — среднее значение, m — стандартная ошибка. После проверки посредством теста Шапиро—Уилка нормальности распределения наших данных достоверность различий в уровнях тревожности, удовлетворенности жизнью и трудностей в общении, а также между средними баллами подшкал «трудности идентификации чувств» шкалы TAS-20 определялась с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Распределение баллов ответов по общей шкале, в подшкалах «трудности с описанием чувств другим людям» и «внешне-ориентированный тип мышления» шкалы TAS-20 как в группе *Val/Val*, так и в группе *Val/Met*, согласно теста Шапиро—Уилка, было нормальным, поэтому достоверность различий между группами определялась с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение

Генотипирование было проведено в общей сложности для 91 человека. Из них генотип *Val/Val* имели 36 чел., генотип *Val/Met* — 54 чел., генотип *Met/Met* — только 1 человек, что составило 39,5%, 59,4% и 1,1% от общего количества соответственно. Частота встречаемости аллеля *Val* составила 0,692, аллеля *Met* — 0,308. В то же время, по данным литературы, частоты встречаемости аллелей *Val* и *Met* составляют в европейской популяции в разных выборках около 0,5 (0,500; 0,490; 0,460 и 0,500; 0,510; 0,540) и, соответственно, частоты гомозиготных генотипов *Val/Val* и *Met/Met* составляют около 0,25 (0,250; 0,240 и 0,210 для *Val/Val* и 0,250; 0,260 и 0,290 для *Met/Met*), а частота генотипа *Val/Met* — около 0,5 [16, 17, 18] (табл. 1). Следовательно, обнаружено очень сильное отклонение частот встречаемости обоих аллелей и гомозиготных генотипов *Val/Val* и *Met/Met* от тех, которые наблюдаются в различных популяциях. Частота встречаемости генотипа *Val/Met* несколько меньше отклоняется от данных литературы, хотя также выше ожидаемой. Таким образом, в нашей выборке произошел сдвиг в частотах встречаемости генотипов в сторону увеличения доли гомозигот *Val/Val* и гетерозигот *Val/Met* за счет уменьшения доли гомозигот по аллелю *Met* (табл. 1). На основании этих результатов можно сделать вывод, что смещение частот встречаемости генотипов в нашей выборке может быть связано с отбором людей по роду их деятельности. Успешное занятие бизнесом определенно предполагает наличие таких черт, как экстравертность, стрессоустойчивость, психическое здоровье и некоторая неудовлетворенность тем, что уже достигнуто в жизни, которые, по литературным данным, связаны с наличием в генотипе людей аллеля *Val* (G), особенно в гомозиготном состоянии [8, 9, 11].

Чтобы оценить «вклад» аллеля *Met* в проявления тревожности, удовлетворенности жизнью, трудностей в общении и способности выражать свои чувства, было проведено тестирование 34 чел. с генотипом *Val/Met* и 51 чел. с генотипом *Val/Val*. Поскольку представитель генотипа *Met/Met* был единственным в нашей выборке, то данные его опроса были непрезентативными и в дальнейших исследованиях не использовались.

Для оценки уровня тревожности у респондентов было использовано 5 вопросов из опросника «Мини-Мульт» [12]. Результаты опроса отражены в табл. 2. Процент положительных ответов, т.е. тех, которые подтверждали тревожность в характере людей, оказался на 6,0% выше для генотипа *Val/Val* по сравнению с генотипом *Val/Met*. Однако при проверке нормальности распределения с помощью теста Шапиро—Уилка обнаружилось, что у большинства респондентов все или 4 из 5 ответов являются отрицательными для обоих генотипов ($p < 0,001$ для *Val/Met* и $p = 0,020$ для *Val/Val*), поэтому для установления достоверности различий в уровнях их тревожности был применен непараметрический тест Манна—Уитни. Полученный результат показал, что эти различия не являются достоверными. Повышение уровня тревожности с увеличением количества аллелей *Val* в генотипе подтверждает одну часть литературных данных, но расходится с частью других [10, 11, 18, 19].

Три вопроса из опросника «Мини-Мульт» были использованы для оценки удовлетворенности жизнью [12]. Они были выбраны нами для проверки имеющих в ли-

тературе данных о недостаточной удовлетворенности жизнью людей с генотипом *Val/Val* по сравнению с двумя другими, что может приводить к развитию депрессии [4].

Доля положительных ответов оказались очень значительной как для представителей генотипа *Val/Val* ($92,1 \pm 2,8\%$), так и для и представителей генотипа *Val/Met* ($84,9\% \pm 4,4\%$). При этом по результатам теста Шапиро—Уилка наблюдался сдвиг в сторону стопроцентно положительных ответов (3 ответа из 3), а различие между полученными результатами оказалось недостоверным согласно теста Манна—Уитни (табл. 2). Таким образом, можно предположить, что достигнутые респондентами жизненные успехи влияют на степень удовлетворенностью жизнью у этих людей не меньше, чем их генотип, так как проценты положительных ответов оказались в обоих случаях очень близкими к 100% и друг к другу.

Шкала удовлетворенности жизнью (ШУДЖ), или шкала субъективного счастья, измеряет эмоциональное переживание индивидом собственной жизни как целого, отражающее общий уровень психологического благополучия. Она должна была дополнить и валидизировать результаты опроса по удовлетворенности жизнью, полученные на основе опросника «Мини-Мульти». Ее основное предназначение — массовые, особенно кросс-культурные и межгрупповые социально-психологические исследования; результаты ШУДЖ оказываются устойчивыми и сравнимыми благодаря простой и однозначной внутренней структуре [15]. Испытуемым предлагалось 5 утверждений, степень согласия с каждым из которых они могли

оценить в баллах от 1 до 7. Обе группы — *Val/Val* и *Val/Met* — показали высокую степень удовлетворенности жизнью и приблизительно равные результаты — средний балл по тесту составил $24,6 \pm 1,8$ и $25,1 \pm 0,8$ соответственно. Тест Шапиро—Уилка показал, что распределение баллов в группе *Val/Met* отличалось от нормального ($p = 0,029$), а критерий Манна—Уитни — что различия между группами были недостоверными ($p = 0,730$). Таким образом, вклад аллеля *Met* в уровень удовлетворенности жизнью у гетерозигот оказался незаметным. Данные ШУДЖ полностью совпали с результатами опроса по тесту «Мини-Мульти» и не подтвердили данные литературы о меньшей склонности к депрессии у носителей аллеля *Met* [4, 7].

Неспособность выражать свои чувства и понимать чувства других людей и, как следствие, невозможность нормально общаться является проявлением такого аффективного расстройства, как алекситимия. В то же время экстравертность и способность свободно общаться с различными людьми являются чертами, необходимыми для успешного ведения бизнеса, поэтому мы предприняли попытку оценить эти черты личности у наших респондентов. Уровень трудностей в общении сначала определялся нами с помощью вопросов из теста «Мини-Мульти», а затем сравнивался с данными, полученными с использованием Торонтской алекситимической шкалы TAS-20. В первом случае после ответа на 4 вопроса из теста «Мини-Мульти» в соответствии с ожиданиями гомозиготы по аллелю *Val/Val* оказались более экстравертными, чем гетерозиготы (табл. 2).

Таблица 1

Частоты встречаемости аллелей гена COMT и генотипов COMT *Val158Met*

Данные	Генотип	Аллель	Генотип	Аллель	Генотип
	<i>Met/Met (A/A)</i>	<i>Met (A)</i>	<i>Val/Met (G/A)</i>	<i>Val (G)</i>	<i>Val/Val (G/G)</i>
Наша выборка	0,011	0,308	0,594	0,692	0,395
Литературные данные					
[1] — европейская популяция	0,250	0,500	0,500	0,500	0,250
[16] — европейская популяция	0,290	0,540	0,500	0,460	0,210
[18] — башкиры	0,184	0,448	0,528	0,522	0,228
[18] — русские	0,194	0,482	0,576	0,518	0,230
[17] — русские	0,220	0,490	0,540	0,510	0,240

Таблица 2

Тревожность, удовлетворенность жизнью и трудности в общении представителей разных генотипов, согласно вопросам из теста «Мини-Мульти» (MMPI)

Черта личности	Общее число ответов	% положительных ответов, $M \pm m$	p#	p*
<i>COMT Val/ Val</i>				
Тревожность	169	$36,7 \pm 5,2$	0,020	
Удовлетворенность жизнью	101	$92,1 \pm 2,8$	< 0,001	
Трудности в общении	136	$15,4 \pm 3,9$	< 0,001	
<i>COMT Val/ Met</i>				
Тревожность	254	$30,7 \pm 4,0$	< 0,001	0,379
Удовлетворенность жизнью	152	$84,9 \pm 4,4$	< 0,001	0,703
Трудности в общении	204	$23,5 \pm 4,2$	< 0,001	0,296

Примечание. p# — вероятность принятия гипотезы о нормальности распределения по критерию Шапиро—Уилка (гипотеза принимается при $p > 0,05$); p* — статистическая значимость межгрупповых различий по непараметрическому критерию Манна—Уитни.

Уровень алекситимии (в баллах) у представителей разных генотипов по результатам теста TAS-20

Название шкалы	Генотип <i>COMT Val/Met</i> (G/A)		Генотип <i>COMT Val/Val</i> (G/G)		p*, p!	M ± m по [20]
	M ± m	p#	M ± m	p#		
Общая	45,94 ± 1,56	0,287	41,85 ± 1,94	0,558	>0,05! (<i>t_d</i> < 2)	45,57 ± 0,26
Трудности идентификации чувств	15,24 ± 0,87	0,009	13,48 ± 0,93	0,013	0,197*	14,38 ± 0,12
Трудности с описанием чувств другим людям	13,43 ± 0,64	0,055	12,3 ± 0,79	0,053	>0,05! (<i>t_d</i> < 2)	12,5 ± 0,09
Внешне-ориентированный тип мышления	17,27 ± 0,52	0,640	16,0 ± 0,73	0,307	>0,05! (<i>t_d</i> < 2)	18,7 ± 0,11

Примечание. p# — вероятность принятия гипотезы о нормальности распределения по критерию Шапиро—Уилка (гипотеза принимается при $p > 0,05$); статистическая значимость межгрупповых различий обозначена «*» при оценке по непараметрическому критерию Манна—Уитни; «!» — при оценке по t-критерию Стьюдента (выделено жирным шрифтом).

Однако тест Шапиро—Уилка показал, что распределение ответов как в группе *Val/Val*, так и в группе *Val/Met* отличалось от нормального ($p < 0,001$), при этом в обеих наблюдался сдвиг в сторону стопроцентно отрицательных ответов. По критерию Манна—Уитни различия между группами были недостоверными ($p = 0,296$). В тесте TAS-20 люди должны были оценить степень своего согласия или несогласия с представленными им утверждениями, касающимися описания различных чувств, в баллах от 1 до 5. В тесте имеются общая шкала и три подшкалы: трудности идентификации чувств (ТИЧ), трудности с описанием чувств другим людям (ТОЧ), внешне-ориентированный тип мышления (ВОМ). В нем также есть сравнительная шкала для оценки полученных после специального обсчета результатов. Значение TAS-20 от 20 до 51 считается нормальным, от 52 до 60 — повышенным, а от 61 и выше — высоким [13, 14]. Шкала TAS-20 показала, что разница по уровню алекситимии между группами *Val/Val* и *Val/Met* была небольшой и недостоверной, но устойчивой: по средним баллам всех подшкал гетерозиготы оказались менее способными к общению (табл. 3).

Эти баллы у обоих генотипов были близки к данным соответствующих подшкал по англоязычным взрослым людям без разделения по полу [20], однако у генотипа *Val/Val* средние баллы подшкалы «внешне-ориентированный тип мышления» и общей шкалы были ниже соответствующих показателей на 14,4 и 8,2% соответственно. Кроме того, балл общей шкалы в группе *Val/Val* был ниже, чем в группе *Val/Met*, на 8,9%. Таким образом, результаты обработки ответов на вопросы из теста «Мини-Мульт» совпали с результатами шкалы TAS-20. Они подтверждают литературные данные об отрицательном вкладе аллеля *Met* в степень экстравертности их носителей по сравнению с гомозиготами *Val/Val* [9]. Существенно более низкие средние баллы подшкалы «внешне-ориентированный тип мышления» и общей шкалы баллы у генотипа *Val/Val* позволяют предположить, что сдвиг в сторону увеличения частоты его встречаемости не был случайным.

Заключение

На основании полученных нами данных можно сделать вывод, что успешность в какой-либо профессии может быть связана с носительством определенного генотипа. В частности, что касается гена *COMT*, подавляющее

большинство менеджеров и предпринимателей из нашей выборки оказались носителями генотипов *Val/Val* и *Val/Met* со значительным преобладанием гомозигот *Val/Val* и с почти полным выпадением представителей генотипа *Met/Met* против ожидаемого по данным литературы. Несколько большая тревожность представителей комбинации *Val/Val* не помешала этим людям достичь значительных успехов в жизни, так как благодаря этой же комбинации они обладают высокой работоспособностью, экстравертностью и устойчивостью к стрессу [8, 9]. Такие успехи в жизни как благоприятный фактор окружающей среды могут влиять на эпигенетические механизмы регуляции поведения, в частности, нивелировать проявление депрессивных черт личности, что проявилось в том, что носители генотипа *Val/Val* продемонстрировали не меньшую удовлетворенность жизнью, чем носители генотипа *Val/Met*. Такой вывод не противоречит данным о различии в метилировании регуляторных областей гена *COMT* в зависимости от социоэкономического статуса человека [21]. Есть работы, подтверждающие связь между генотипом и успешностью в спорте, т.е. отбор по генотипу при выборе определенного рода деятельности возможен [22]. Очевидно, требуется провести дополнительные исследования по влиянию генотипа на успешность как в бизнесе, так и в других родах деятельности.

Список литературы

1. Palmatier M.A., Kang A.M., Kidd K.K. Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol. Psychiatry*. 1999; 46(4): 557-67. PMID: 10459407
2. Syvanen A.C., Tilgmann C., Rinne J., Ulmanen I. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT): correlation of genotype with individual variation of S-COMT activity and comparison of the allele frequencies in the normal population and parkinsonian patients in Finland. *Pharmacogenetics*. 1997; 7(1): 65-71. PMID: 9110364
3. Lachman H.M., Papolos D.F., Saito T., Yu Y.M., Szumlanski C.L., Weinshilboum R.M. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*. 1996; 6(3): 243-50. PMID: 8807664
4. Wang M., Ma Y., Yuan W., Su K., Li M.D. Meta-analysis of the COMT Val158Met polymorphism in major depressive disorder: effect of ethnicity. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2016; 11(3): 434-45. DOI: 10.1007/s11481-016-9651-3.
5. Kotyuk E., Duchek J., Head D., Szekely A., Goate A.M., Balota D.A. A genetic variant (COMT) coding dopaminergic activity predicts personality traits in healthy elderly. *Pers. Individ. Dif.* 2015; 82: 61-66. DOI: 10.1016/j.paid.2015.03.012

References

1. Clelland C.L., Drouet V., Rilett K.C., Smeed J.A., Nadrich R.H., Rajparia A., Read L.L., Clelland J.D. Evidence that COMT genotype and proline interact on negative-symptom outcomes in schizophrenia and bipolar disorder. *Transl. Psychiatry*. 2016; 6(9): e891. DOI: 10.1038/tp.2016.157.
2. Klebe S., Golmard J.-L., Nalls M.A., Saad M., Singleton A.B., Bras J.M. The Val158Met COMT polymorphism is a modifier of the age at onset in Parkinson's disease with a sexual dimorphism. *J. Neurosurg. Neurosurg. Psychiatry*. 2013; 84(6): 666-73. DOI: 10.1136/jnnp-2012-304475.
3. Mier D., Kirsch P., Meyer-Lindenberg A. Neural substrates of pleiotropic action of genetic variation in COMT: A meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2010; 15(9): 918-27. DOI: 10.1038/mp.2009.36.
4. Wacker J., Gatt J.M. Resting posterior versus frontal delta/theta EEG activity is associated with extraversion and the COMT VAL(158)MET polymorphism. *Neurosci. Lett*. 2010; 478(2): 88-92. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.04.071.
5. Hetteema J.M., An S.S., Bukszar J., van den Oord E.J., Neale M.C., Kendler K.S., Chen X. Catechol-O-methyltransferase contributes to genetic susceptibility shared among anxiety spectrum phenotypes. *Biol. Psychiatry*. 2008; 64(4): 302-10. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.03.014.
6. Pelka-Wysiecka J., Zietek J., Grzywacz A.A., Kucharska-Mazur J., Bienkowski P., Samochowiec J. Association of genetic polymorphisms with personality profile in individuals without psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2012; 39(1): 40-46. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2012.04.009.
7. Kincannon J.C. Prediction of the standard MMPI scale scores from 71 items: The Mini-Mult. *J. Consult. Clin. Psychol*. 1968; 32(3): 319-25. DOI: 10.1037/h0025891.
8. Bagby R.M., Parker J.D., Taylor G.J. The twenty-item Toronto alexithymia scale-I. Item selection and cross-validation of the factor structure. *J. Psychosom. Res*. 1994; 38(1): 23-32. PMID: 8126686
9. Bagby R.M., Taylor G.J., Parker J.D. The twenty-item Toronto alexithymia scale-II. Convergent, discriminant, and concurrent validity. *J. Psychosom. Res*. 1994; 38(1): 33-40. PMID: 8126688
10. Diener E., Emmons R.A., Larsen R.J., Griffin S. The Satisfaction with life scale. *J. Pers. Assess*. 1985; 49(1): 71-5. DOI: 10.1207/s15327752jpa4901_13
11. McLeod H.L., Syvanen A.C., Githang'a J., Indalo A., Ismail D., Dewar K., Ulmanen I., Sludden J. Ethnic differences in catechol O-methyltransferase pharmacogenetics: frequency of the codon 108/158 low activity allele is lower in Kenyan than Caucasian or South-west Asian individuals. *Pharmacogenetics*. 1998; 8(3): 195-9. PMID: 9682265
12. Алфимова М.В., Голимбет В.Е., Коровайцева Г.И., Аксенова Е.В., Лежейко Т.В., Абрамова Л.И., Колесина Н.Ю., Ануа И.М., Савельева Т.М. Ассоциация генов COMT и DRD2 со способностью больных шизофренией к пониманию психического состояния других людей. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2013; 8: 50-6.
13. Хидиятова И.М., Ахмадеева Г.Н., Гилязова И.Р. Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Байтимеров А.Р., Демчук Н.Д., Магжанов Р.В., Хуснутдинова Э.К. Исследование влияния полиморфизма гена COMT на характер клинического течения болезни Паркинсона. *Неврологический журнал*. 2013; 3: 22-7.
14. Qiu A., Tuan T.A., Ong M.L., Li Y., Chen H., Rifkin-Graboi A., Broekman B.F., Kwek K., Saw S.M., Chong Y.S., Gluckman P.D., Fortier M.V., Holbrook J.D., Meaney M.J. COMT haplotypes modulate associations of antenatal maternal anxiety and neonatal cortical morphology. *Am. J. Psychiatry*. 2015; 172(2): 163-72. DOI: 10.1176/appi.ajp.2014.14030313.
15. Parker J.D., Taylor G.J., Bagby R.M. The 20-Item Toronto alexithymia scale. III. Reliability and factorial validity in a community population. *J. Psychosom. Res*. 2003; 55(3): 269-75. PMID: 12932802
16. Swift-Scanlan T., Smith C.T., Bardowell S.A., Boettiger C.A. Comprehensive interrogation of CpG island methylation in the gene encoding COMT, a key estrogen and catecholamine regulator. *BMC Med Genomics*. 2014; 7: 5. DOI: 10.1186/1755-8794-7-5
17. Моссэ И.Б., Гончар А.Л., Жур К.В., Моссэ Н.И., Кундас Л.А., Бышнёв Н.И., Малашевич П.Н., Семеняков А.В. Сравнение генотипов спортсменов разной специализации по комплексу генов спортивной успешности. Под ред. Кильчевского А.В. *Молекулярная и прикладная генетика. Сборник научных трудов. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск: Право и экономика*; 2012. 13: 19-24 с.
1. Palmatier M.A., Kang A.M., Kidd K.K. Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol. Psychiatry*. 1999; 46(4): 557-67. PMID: 10459407
2. Syvanen A.C., Tilgmann C., Rinne J., Ulmanen I. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT): correlation of genotype with individual variation of S-COMT activity and comparison of the allele frequencies in the normal population and parkinsonian patients in Finland. *Pharmacogenetics*. 1997; 7(1): 65-71. PMID: 9110364
3. Lachman H.M., Papolos D.F., Saito T., Yu Y.M., Szumlanski C.L., Weinshilboum R.M. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*. 1996; 6(3): 243-50. PMID: 8807664
4. Wang M., Ma Y., Yuan W., Su K., Li M.D. Meta-analysis of the COMT Val158Met polymorphism in major depressive disorder: effect of ethnicity. *J. Neuroimmune Pharmacol*. 2016; 11(3): 434-45. DOI: 10.1007/s11481-016-9651-3.
5. Kotyuk E., Duchek J., Head D., Szekeley A., Goate A.M., Balota D.A. A genetic variant (COMT) coding dopaminergic activity predicts personality traits in healthy elderly. *Pers. Individ. Dif*. 2015; 82: 61-66. DOI: 10.1016/j.paid.2015.03.012
6. Clelland C.L., Drouet V., Rilett K.C., Smeed J.A., Nadrich R.H., Rajparia A., Read L.L., Clelland J.D. Evidence that COMT genotype and proline interact on negative-symptom outcomes in schizophrenia and bipolar disorder. *Transl. Psychiatry*. 2016; 6(9): e891. DOI: 10.1038/tp.2016.157.
7. Klebe S., Golmard J.-L., Nalls M.A., Saad M., Singleton A.B., Bras J.M. The Val158Met COMT polymorphism is a modifier of the age at onset in Parkinson's disease with a sexual dimorphism. *J. Neurosurg. Neurosurg. Psychiatry*. 2013; 84(6): 666-73. DOI: 10.1136/jnnp-2012-304475.
8. Mier D., Kirsch P., Meyer-Lindenberg A. Neural substrates of pleiotropic action of genetic variation in COMT: A meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2010; 15(9): 918-27. DOI: 10.1038/mp.2009.36.
9. Wacker J., Gatt J.M. Resting posterior versus frontal delta/theta EEG activity is associated with extraversion and the COMT VAL(158)MET polymorphism. *Neurosci. Lett*. 2010; 478(2): 88-92. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.04.071.
10. Hetteema J.M., An S.S., Bukszar J., van den Oord E.J., Neale M.C., Kendler K.S., Chen X. Catechol-O-methyltransferase contributes to genetic susceptibility shared among anxiety spectrum phenotypes. *Biol. Psychiatry*. 2008; 64(4): 302-10. DOI: 10.1016/j.biopsych.2008.03.014.
11. Pelka-Wysiecka J., Zietek J., Grzywacz A.A., Kucharska-Mazur J., Bienkowski P., Samochowiec J. Association of genetic polymorphisms with personality profile in individuals without psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2012; 39(1): 40-46. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2012.04.009.
12. Kincannon J.C. Prediction of the standard MMPI scale scores from 71 items: The Mini-Mult. *J. Consult. Clin. Psychol*. 1968; 32(3): 319-25. DOI: 10.1037/h0025891.
13. Bagby R.M., Parker J.D., Taylor G.J. The twenty-item Toronto alexithymia scale-I. Item selection and cross-validation of the factor structure. *J. Psychosom. Res*. 1994; 38(1): 23-32. PMID: 8126686
14. Bagby R.M., Taylor G.J., Parker J.D. The twenty-item Toronto alexithymia scale-II. Convergent, discriminant, and concurrent validity. *J. Psychosom. Res*. 1994; 38(1): 33-40. PMID: 8126688
15. Diener E., Emmons R.A., Larsen R.J., Griffin S. The Satisfaction with life scale. *J. Pers. Assess*. 1985; 49(1): 71-5. DOI: 10.1207/s15327752jpa4901_13
16. McLeod H.L., Syvanen A.C., Githang'a J., Indalo A., Ismail D., Dewar K., Ulmanen I., Sludden J. Ethnic differences in catechol O-methyltransferase pharmacogenetics: frequency of the codon 108/158 low activity allele is lower in Kenyan than Caucasian or South-west Asian individuals. *Pharmacogenetics*. 1998; 8(3): 195-9. PMID: 9682265
17. Алфимова М.В., Голимбет В.Е., Коровайцева Г.И., Аксенова Е.В., Лежейко Т.В., Абрамова Л.И., Колесина Н.Ю., Ануа И.М., Савельева Т.М. Ассоциация генов COMT и DRD2 со способностью больных шизофренией к пониманию психического состояния других людей. *Журнал неврологии и психиатрии*. 2013; 8: 50-6.
18. Хидиятова И.М., Ахмадеева Г.Н., Гилязова И.Р. Насибуллин Т.Р., Туктарова И.А., Байтимеров А.Р., Демчук Н.Д., Магжанов Р.В., Хуснутдинова Э.К. Исследование влияния полиморфизма гена COMT на характер клинического течения болезни Паркинсона. *Неврологический журнал*. 2013; 3: 22-7.
19. Qiu A., Tuan T.A., Ong M.L., Li Y., Chen H., Rifkin-Graboi A., Broekman B.F., Kwek K., Saw S.M., Chong Y.S., Gluckman P.D., Fortier M.V., Holbrook J.D., Meaney M.J. COMT haplotypes modulate associations of antenatal maternal anxiety and neonatal cortical morphology. *Am. J. Psychiatry*. 2015; 172(2): 163-72. DOI: 10.1176/appi.ajp.2014.14030313.
20. Parker J.D., Taylor G.J., Bagby R.M. The 20-Item Toronto alexithymia scale. III. Reliability and factorial validity in a community population. *J. Psychosom. Res*. 2003; 55(3): 269-75. PMID: 12932802
21. Swift-Scanlan T., Smith C.T., Bardowell S.A., Boettiger C.A. Comprehensive interrogation of CpG island methylation in the gene encoding COMT, a key estrogen and catecholamine regulator. *BMC Med Genomics*. 2014; 7: 5. DOI: 10.1186/1755-8794-7-5
22. Моссэ И.Б., Гончар А.Л., Жур К.В., Моссэ Н.И., Кундас Л.А., Бышнёв Н.И., Малашевич П.Н., Семеняков А.В. Сравнение генотипов спортсменов разной специализации по комплексу генов спортивной успешности. Под ред. Кильчевского А.В. *Молекулярная и прикладная генетика. Сборник научных трудов. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск: Право и экономика*; 2012. 13: 19-24 с.

its symptoms]. *Neurologicheskii Zhurnal [Neurological Journal]*. 2013; 3: 22-27. (in Russian)

19. Qiu A., Tuan T.A., Ong M.L., Li Y., Chen H., Rifkin-Graboi A., Broekman B.F., Kwek K., Saw S.M., Chong Y.S., Gluckman P.D., Fortier M.V., Holbrook J.D., Meaney M.J. COMT haplotypes modulate associations of antenatal maternal anxiety and neonatal cortical morphology. *Am. J. Psychiatry*. 2015; 172(2): 163-72. DOI: 10.1176/appi.ajp.2014.14030313.

20. Parker J.D., Taylor G.J., Bagby R.M. The 20-Item Toronto alexithymia scale. III. Reliability and factorial validity in a community population. *J. Psychosom. Res.* 2003; 55(3): 269-75. PMID: 12932802

21. Swift-Scanlan T., Smith C.T., Bardowell S.A., Boettiger C.A. Comprehensive interrogation of CpG island methylation in the gene encoding COMT, a key estrogen and catecholamine regulator. *BMC Med Genomics*. 2014; 7: 5. DOI: 10.1186/1755-8794-7-5

22. Mosse I.B., Gonchar A.L., Zhur K.V., Mosse N.I., Kundas L.A., Byshnev N.I., Malashevich P.N., Semenjakov A.V. *Comparison of the genotypes of athletes of different specializations on the complex of genes of sports success*. In: Kil'chevskiy A.V., ed. *Molecular and applied genetics*. Collection of scientific papers. Institute of Genetics and Cytology. National Academy of Sciences of Belarus. Minsk: Law and Economics; 2012. 13: 19-24 p. (in Russian)

Сведения об авторах:

Богданенко Елена Валентиновна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ болезней зависимости¹.

Власов Андрей Васильевич — преподаватель²; консультант³.

Нурбеков Малик Кубанычбекович — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных основ болезней зависимости¹, заведующий лабораторией социогеномики⁴.

УДК 616-092
DOI:

Компьютерное моделирование степени хаотичности процесса фибрилляции желудочков у человека и собак

Мезенцева Л.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К.Анохина». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Для анализа фибрилляторного хаоса в настоящее время используются методы математического моделирования и теории детерминированного хаоса. Ранее нами была разработана математическая модель, позволяющая выполнять компьютерное моделирование фибрилляции желудочков в условиях различного числа источников ритмической активности (эктопических фокусов). Модель позволяет выполнять оценку количества фокусов по экспериментальным записям электрической активности сердца у животных и человека. **Целью** настоящего исследования является использование этой модели для изучения взаимосвязи между степенью хаотичности процесса фибрилляции желудочков и количеством эктопических фокусов, функционирующих в миокарде желудочков у человека и собак. **Методом** компьютерного моделирования рассчитывали теоретические зависимости степени хаотичности фибриллярных осцилляций от количества импульсных потоков. Результаты вычислительных экспериментов сравнивали с результатами экспериментов, выполненных на собаках, и клиническими записями фрагментов ЭКГ у больных с эпизодами фибрилляции желудочков. Степень хаотичности электрической активности сердца оценивали с помощью энтропии, корреляционной размерности хаоса и фазовых портретов амплитуд фибриллярных осцилляций. Далее методом наименьших квадратов решали задачу поиска вариантов моделей, наилучшим образом аппроксимирующих экспериментальные записи фибриллярных осцилляций. Это позволяло рассчитать количество эктопических фокусов и их амплитудно-частотные характеристики. **Результаты исследований** показали, что степень хаотичности фибриллярных осцилляций зависит от числа эктопических фокусов, функционирующих в миокарде желудочков. Расчетные значения числа эктопических фокусов у собак превышали аналогичные значения для человека. Если для собак были характерны многоочаговые типы моделей фибрилляции желудочков (4–5 фокусов), то для человека были характерны 2–3-фокусные модели. Показатели степени хаотичности фибриллярных осцилляций у собак также были выше, чем у человека. **Заключение.** Результаты, исследований свидетельствуют о наличии взаимосвязи между количеством независимых источников высокочастотной ритмической активности, функционирующих в миокарде желудочков, и показателями степени хаотичности фибрилляторного хаоса.

Ключевые слова: фибрилляция желудочков; математическое моделирование; хаос; эктопические фокусы.

Для цитирования: Мезенцева Л.В. Компьютерное моделирование степени хаотичности процесса фибрилляции желудочков у человека и собак. Патогенез. 2017; 15(4): 69–73

Для корреспонденции: Мезенцева Лариса Валентиновна, e-mail: l.v.mezentseva@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 09.09.2017

Computer modeling of chaoticity degree of ventricular fibrillations in humans and dogs

Mezentseva L.V.

P.K. Anokhin Institute of Normal Physiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

For analysis of fibrillation chaos, methods of mathematical modeling and the theory of determined chaos are currently used. Earlier we have proposed a mathematical model, which allows computer modeling of ventricular fibrillation in the conditions of different number of pacemakers (ectopic foci). The model estimates the number of ectopic foci on experimental records of heart electric activity in animals and humans. **The aim** of this work was to use this model for studying the interrelation between degrees of ventricular fibrillation chaoticity and quantity of ectopic foci in the myocardium of humans and dogs. **Methods.** Theoretical dependences of fibrillation oscillation chaoticity degree on pacemaker numbers were constructed using computer modeling. Results of computer experiments were compared with those of physiological experiments on dogs and clinical records of ECG fragments from patients with episodes of ventricular fibrillation. The degree of chaoticity of heart electric activity was estimated by entropy, correlation dimension of chaos and phase portraits of fibrillary oscillation amplitudes. Further, the method of least squares was used to solve the task of finding the best model characteristics for achieving optimum correspondence between results of computed and real physiological experiments. This allowed us to calculate the number of ectopic foci and their amplitude-frequency characteristics. **The results** showed that the degree of chaoticity of fibrillation oscillations depended on the number of active ectopic foci in the myocardium. Calculated values for the number of ectopic foci for dogs exceeded similar values for humans. While multifocal types of

models of ventricular fibrillation (4–5 foci) were characteristic of dogs, bi- and three-focal models were characteristic of humans. Characteristics of the chaoticity degree of fibrillation oscillations for dogs were also higher than similar values for humans. **Conclusion.** The study results showed an interrelation between the number of independent myocardial sources of high-frequency rhythmic activity and the degree of chaoticity of fibrillation chaos.

Keywords: ventricular fibrillation; entropy; mathematical modeling; chaos; ectopic focuses.

For citation: Mezentseva L.V. Computer modeling of chaoticity degree of ventricular fibrillations in humans and dogs. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2017; 15(4): 69–73 (in Russian)

For correspondence: Mezentseva Larisa Valentinovna, e-mail l.v.mezentseva@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 09.09.2017

Введение

В разное время исследователи пытались ответить на вопрос — является ли фибрилляция желудочков (ФЖ) сердца полностью случайным процессом (шумом), или же в нем присутствует детерминированная составляющая. Проведённые исследования продемонстрировали наличие динамического детерминизма в процессе ФЖ. Если ранее термин «хаотический» использовался экспериментаторами и клиницистами для качественной характеристики нерегулярных осцилляций ЭКГ и некоординированных сокращений умирающего сердца, то в настоящее время для количественного анализа степени нерегулярности электрической активности сердца при ФЖ используются методы математического моделирования и теории детерминированного хаоса [1–5]. Для объяснения механизмов возникновения фибрилляторного хаоса в разное время выдвигались различные гипотезы: реентри, эктопические пейсмекеры и другие. В работе [6] авторы пришли к заключению, что в формировании фибрилляторного хаоса одновременно принимают участие и эктопические пейсмекеры, и реентри: временные интервалы с высокой степенью нерегулярности фибриллярных осцилляций обусловлены механизмом реентри, а временные интервалы с высокой степенью синхронизации обусловлены возникновением в волокнах Пуркинью эктопических пейсмекеров, подавляющих реентри и синхронизирующих составные импульсные потоки. Однако общим для всех этих представлений является тот факт, что при ФЖ в миокарде желудочков функционирует несколько источников ритмической активности с различными амплитудными и частотными характеристиками. Ранее нами была разработана математическая модель процесса ФЖ [7], позволяющая выполнять компьютерное моделирование ФЖ в условиях различного количества источников ритмической активности (эктопических фокусов) и выполнять оценку количества фокусов по экспериментальным записям электрической активности сердца у разных видов животных и человека. Настоящая работа посвящена компьютерному моделированию хаотической динамики процесса ФЖ с целью изучения взаимосвязи между фибрилляторным хаосом и количеством функционирующих эктопических фокусов у человека и собак.

Материалы и методы исследования

Анализировали 32 фрагмента клинических записей ЭКГ во II стандартном отведении (длительностью 10–20 с) у 5 пациентов с приступами внезапной ФЖ и 30 фрагментов экспериментально вызванной ФЖ у 5 наркотизированных собак (небутал, 40 мг/кг) массой 8–16 кг. ФЖ у собак вы-

зывали пачкой электрических импульсов длительностью 5 мс, наносимых в ранимый период сердечного цикла (восходящая часть зубца Т на ЭКГ) через электроды, расположенные на миокарде левого желудочка. Амплитуду стимулов постепенно увеличивали до достижения порога ФЖ (ПФЖ). ЭКГ во II стандартном отведении регистрировали с помощью мингографа-82 фирмы Siemens. Экспериментальные записи ЭКГ сравнивали с расчетными, полученными методом компьютерного моделирования. В основу математической модели было положено предположение, что анализируемый ЭКГ-сигнал представляет собой суммарную электрическую активность $F(t)$, которую можно записать в виде суммы N независимых импульсных потоков (эктопических фокусов) $F_i(t-x_i)$ с прямоугольной формой импульса, постоянной частотой (f_i) и амплитудой (A_i) и различными величинами сдвигов фаз x_i между потоками:

$$F(t) = \sum_{i=1}^N F_i(t-x_i), \quad i = 1, 2, \dots, N$$

Компьютерное моделирование проводили с помощью специально разработанной программы MODVF [8]. Программа позволяет исследовать зависимость суммарной электрической активности $F(t)$ от количественных характеристик импульсных потоков: N , F_i , A_i , x_i . Вычислительные эксперименты проводились при различных вариантах комбинаций параметров: $N = 2-5$, $f_i = 3-20$ Гц, $A_i = 1-8$ усл. Ед., $x_i = 0-5$ усл. ед. Длительности импульсов предполагались много меньшими, чем величины соответствующих межимпульсных интервалов, и поэтому в расчет не принимались. Поиск характеристик модели, при которых достигается наилучшее соответствие между результатами вычислительных экспериментов и реальными записями ЭКГ-сигнала, осуществлялся с помощью метода наименьших квадратов (МНК-метод). С этой целью была выполнена аппроксимация экспериментальных распределений амплитуд фибриллярных осцилляций $P_{\text{exp}}(A_i)$ теоретическими распределениями $P_{\text{th}}(A_i)$. Для оценки отклонения функции $P_{\text{exp}}(A_i)$ от $P_{\text{th}}(A_i)$, и поиска той теоретической функции, которая наиболее близко соответствовала экспериментальной, использовали критерий минимума среднего квадратичного отклонения

$$\int [P_{\text{exp}}(A_i) - P_{\text{th}}(A_i)]^2 dA_i \rightarrow \min$$

Практическая реализация этого алгоритма осуществлялась путем построения гистограмм распределения амплитуд фибриллярных осцилляций и поиска минимума функции

$$D = \int [P_i(\text{эксп}) - P_i(\text{мод})]^2 \rightarrow \min$$

где $i = 1, 2, \dots, m$ — номера столбцов экспериментальной ($P_i(\text{эксп})$) и рассчитанной с помощью модели ($P_i(\text{мод})$) гистограммы; m — число разрядов гистограммы.

Расчеты по МНК-методу выполняли с учетом соответствующего данному эксперименту масштабирования характеристик теоретических ЭКГ, что достигалось умножением на корректирующие коэффициенты, позволяющие перевести шкалу частот эктопических фокусов из усл. ед. в Гц. Методом компьютерного моделирования были проведены расчеты теоретических временных рядов фибриллярных осцилляций для различных вариантов комбинаций параметров. Затем визуальным сравнением расчетных гистограмм распределения амплитуд с экспериментальными гистограммами, отбирали 10 наиболее близких вариантов, после чего из них МНК-методом находили оптимальный вариант. Степень хаотичности процесса ФЖ оценивали с помощью энтропии, корреляционной размерности хаоса $PD2$ [9], частотных характеристик и фазовых портретов амплитуд фибриллярных осцилляций. Величину энтропии оценивали по формуле

$$S = -k \int P(x, t) \log(P(x, t)) dx$$

где $P(x, t)$ — плотность вероятности того или иного состояния системы в данный момент времени t , оцениваемая по гистограмме распределения амплитуд, k — коэффициент пропорциональности, мы полагали $k = 1$. Хаос-анализ экспериментальных и расчетных кривых проводили с использованием специально разработанной программы «СНАОС». Статистический анализ экспериментальных и теоретических ЭКГ проводили с использованием стандартных средств, входящих в пакет прикладных программ Excel for Windows, v.6.0. Статистическую значимость различия показателей оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты исследования показали, что в целом хаотическая динамика ЭКГ у человека имеет картину, сходную с результатами экспериментальных исследований на собаках. Это можно видеть на рис. 1, где представлены фрагменты ЭКГ при ФЖ у собаки и человека. На рис. 2 показаны типичные хаосграммы, характерные для собак (рис. 2, А) и человека (рис. 2, Б). Можно видеть, что как у собак, так и у человека хаосграммы имеют эллиптическую форму, вытянутую вдоль диагонали фазовой плоскости.

Визуально геометрические формы хаосграмм также не имели значительных качественных различий. Однако дальнейшие модельные исследования позволили выявить количественные различия хаотической динамики фибриллярных осцилляций у человека и собак. Мы исходили из предположения о том, что количественные характеристики степени хаотичности процесса фибриллярных осцилляций зависят от числа функционирующих в миокарде желудочков эктопических фокусов. Методом компьютерного моделирования рассчитывали теоретические процессы ФЖ для моделей с различным числом эктопических фокусов и различными вариантами комбинаций их амплитудно-частотных характеристик и осуществляли поиск варианта модели, наилучшим образом аппроксимирующего экспериментальные записи ЭКГ. Исследования показали, что расчетные значения числа функционирующих в миокарде эктопических фокусов у чело-

века имели более низкие значения, чем у собак. Эта величина составляла $2,7 \pm 0,32$ для человека против $4,6 \pm 0,4$ для собак. Показатели степени хаотичности фибриллярных осцилляций у человека также были ниже, чем у собак, что можно видеть из таблицы: величина размерности хаоса при ФЖ у человека составляла $2,6 \pm 0,3$, а у собак $3,2 \pm 0,2$. То же самое справедливо и по отношению к показателю энтропии: у человека этот показатель составлял $1,5 \pm 0,3$, а у собак $2,3 \pm 0,2$. Результаты компьютерного моделирования показали, что расчетные значения числа

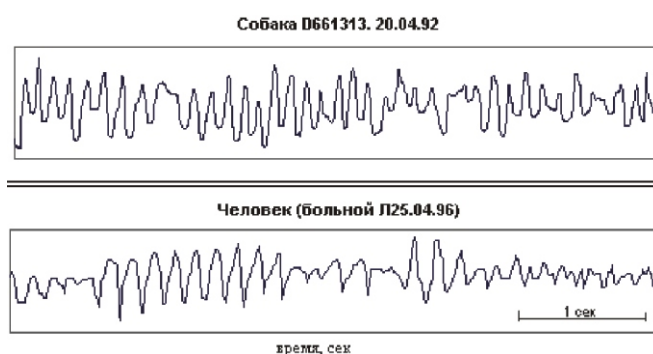


Рис. 1. Фрагменты исходных записей ЭКГ-сигнала при ФЖ у собаки и человека. Ось абсцисс — время, с; ось ординат — амплитуда фибриллярных осцилляций (A_i , усл. ед.).

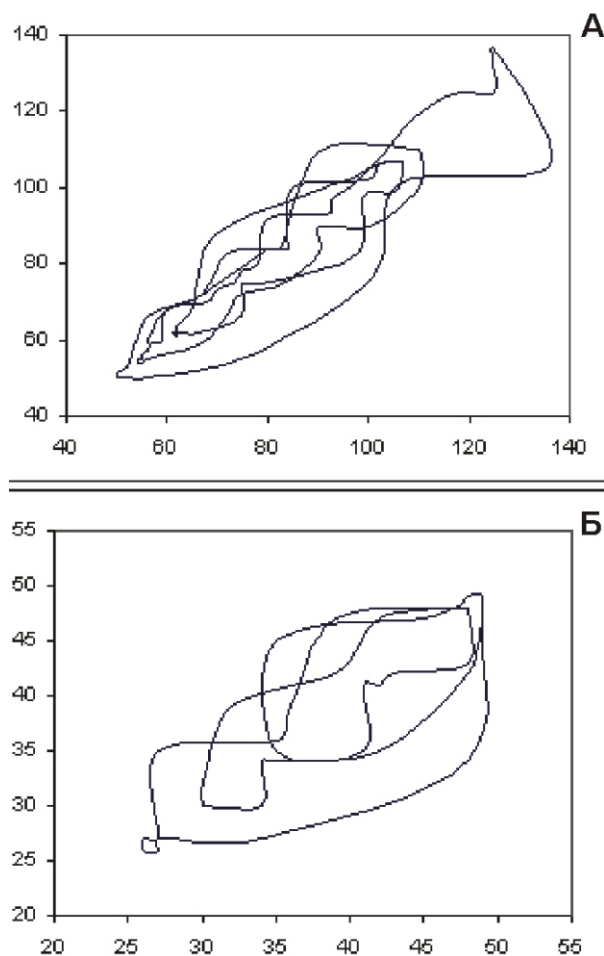


Рис. 2. Хаосграммы ЭКГ при ФЖ у собаки (А) и человека (Б). Ось абсцисс — предыдущее значение амплитуды ЭКГ-сигнала, ось ординат — последующее значение амплитуды ЭКГ-сигнала (усл. ед.).

Сравнительные характеристики показателей амплитудно-временной упорядоченности процессов ФЖ у человека и собак

Показатели	Человек (M ± m)		Собаки (M ± m)	
	Запись ЭКГ	Модель	Запись ЭКГ	Модель
Число эктопических фокусов	—	2,7 ± 0,32	—	4,6 ± 0,4 *
Энтропия (S), усл. ед.	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2 *	2,4 ± 0,3 *
Размерность хаоса PD2, усл. ед.	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,4	3,2 ± 0,2	3,4 ± 0,5
Частота фибриллярных осцилляций, Гц	6,9 ± 0,8	6,1 ± 0,8	10,1 ± 0,8 *	9,6 ± 0,6 *

Примечание. * — $p < 0,05$ (по t-критерию Стьюдента) по сравнению с собаками

эктопических фокусов обнаруживают такие же тенденции. Расчеты показали, что для человека оптимальными были 2—3-фокусные модели ФЖ. В отличие от человека, оптимальными моделями для собак были модели много — очаговой ФЖ, как это можно видеть из таблицы. Проведенные исследования позволяют заключить, что у собак число эктопических фокусов больше, чем у человека, поэтому степень хаотичности процесса ФЖ у собак также выше. Таким образом, результаты компьютерного моделирования показали, что чем больше число эктопических фокусов функционирует в миокарде желудочков при ФЖ, тем выше степень хаотичности этого процесса.

Полученные нами результаты касаются степени хаотичности фибриллярных осцилляций. Они описывают временную составляющую общей пространственно-временной гетерогенности электрической активности сердца, которая складывается из двух составляющих: пространственной гетерогенности и временной гетерогенности. Для регистрации разных составляющих используются разные экспериментальные методики.

Если для изучения временной составляющей требуются классические записи ЭКГ, дополненные современным программным обеспечением их обработки и анализа, то для изучения пространственной гетерогенности используются различные виды картирования сердца [10—15]. Однако, несмотря на большое разнообразие применяемых в настоящее время методов картирования, вопросы пространственного распределения электрической негетерогенности миокарда желудочков при ФЖ и решения проблемы локализации эктопических фокусов при ФЖ у человека до сих пор остаются открытыми. Причиной тому является жизнеугрожающий характер этой аритмии, относящейся к медицине критических состояний, когда минуты решают все. Поэтому большая часть информации относительно динамических паттернов пространственной гетерогенности электрической активности миокарда при ФЖ получена либо методом математического моделирования, либо в экспериментах на животных.

Заключение

Результаты проведенных нами модельных исследований временных характеристик фибриллярных осцилляций согласуются с результатами исследований пространственной гетерогенности ФЖ у животных [15] и свидетельствуют том, что число функционирующих эктопических фокусов в миокарде желудочков определяет показатели степени хаотичности фибриллярных осцилляций и степень тяжести аритмии. Результаты настоящих исследова-

ний могут быть использованы в клинической практике для оценки тяжести состояния больных при ФЖ и прогнозирования исхода реанимационных процедур.

Список литературы

1. Maruyama T., Sakaguchi H. Spiral chaos, ventricular fibrillation and defibrillation: simulation study toward painless defibrillation. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2014; 105(6): 131-8.
2. Zheng Y., Wei D., Zhu X., Chen W., Fukuda K., Shimokawa H. Ventricular fibrillation mechanisms and cardiac restitution: An investigation by simulation study on whole-heart model. *Comput. Biol. Med.* 2015; 261-8. DOI: 10.1016/j.compbio.2014.06.014
3. Cappiello G., Das S., Mazomenos E.B., Maharatna K., Koulaouzis G., Morgan J., Puddu P.E. A statistical index for early diagnosis of ventricular arrhythmia from the trend analysis of ECG phase-portraits. *Physiol. Meas.* 2015; 36(1): 107-31. DOI: 10.1088/0967-3334/36/1/107
4. Ganesan A.N., Kuklik P., Gharaviri A., Brooks A., Chapman D., Lau D.H., Roberts-Thomson K.C., Sanders P. Origin and characteristics of high Shannon entropy at the pivot of locally stable rotors: insights from computational simulation. *PLoS One*. 2014; 9(11): e110662. DOI: 10.1088/0967-3334/36/1/107
5. Mysiak A., Kobusiak-Prokopowicz M., Kaaz K., Jarczewska K., Glabisz W. Characteristics of chaotic processes in electrocardiographically identified ventricular arrhythmia. *Cardiol. J.* 2017; 24(2): 151-8. DOI: 10.5603/CJ.a2016.0088
6. Robichaux R.P., Dosdall D.J., Osorio J., Garner W., Li L., Huang J., Ideker R.E. Periods of highly synchronous, non-reentrant endocardial activation cycles occur during long-duration ventricular fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2010; 21(11): 1266. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2010.01803.x
7. Mezentseva L.V. Computer Modeling of Ventricular Fibrillation. *Biophysic.* 2012; 57(2): 247-52. DOI: 10.1134/S0006350912020145
8. Мезенцева Л.В. Программа MODVF — математическое моделирование фибрилляции желудочков. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011610618 от 23 марта 2011 г.
9. Skinner J.E., Carpeggiani C., Landisman C.E., Fulton K.W. The correlation-dimension of the heartbeat is reduced by myocardial ischemia in conscious pigs. *Circ. Res.* 1991; 68: 966-76.
10. Кузьмин В.С., Розенштраух Л.В. Изучение распространения возбуждения в миокарде легочных вен крысы с использованием метода оптического картирования. *Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова*. 2012; 98; 9: 1119-30. (in Russian)
11. Ревиншвили А.Ш., Рзаев Ф.Г., Джетыбаева С.К. Электрофизиологическая диагностика и интервенционное лечение сложных форм нарушений ритма сердца с использованием системы трехмерного электроанатомического картирования. *Вестник аритмологии*. 2004; 34: 32-7.
12. Струтынский А.В., Глазунов А.Б., Цыганков Е.В., Банзелок Е.Н., Каллаева А.Н. Возможности выявления электрической негетерогенности миокарда у больных с желудочковыми аритмиями при многополюсном поверхностном ЭКГ-картировании сердца. *Международный медицинский журнал*. 2004; 2: 17-21.
13. Cheng K.A., Dosdall D.J., Li L., Rogers J.M., Ideker R.E., Huang J. Evolution of activation patterns during long-duration ventricular fibrillation in pigs. *Am. J. Physiol.* 2012; 302: 992-1002. DOI: 10.1152/ajpheart.00419.2011
14. Huang J., Rogers J.M., Killingsworth C.R., Singh K.P., Smith W.M., Ideker R.E. Evolution of activation patterns during long

duration ventricular fibrillation in dogs. *Am. J. Physiol.* 2004; 286: 1193-200. DOI:10.1152/ajpheart.00773.2003

15. Park SA, Gray RA. Optical Mapping of Ventricular Fibrillation Dynamics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015; 859: 313-42. DOP: 10.1007/978-3-319-17641-3_13

References

1. Maruyama T., Sakaguchi H. Spiral chaos, ventricular fibrillation and defibrillation: simulation study toward painless defibrillation. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 2014; 105(6): 131-8.

2. Zheng Y., Wei D., Zhu X., Chen W., Fukuda K., Shimokawa H. Ventricular fibrillation mechanisms and cardiac restitution: An investigation by simulation study on whole-heart model. *Comput. Biol. Med.* 2015; 261-8. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2014.06.014

3. Cappiello G., Das S., Mazomenos E.B., Maharatna K., Koulaouzidis G., Morgan J., Puddu P.E. A statistical index for early diagnosis of ventricular arrhythmia from the trend analysis of ECG phase-ports. *Physiol. Meas.* 2015; 36(1): 107-31. DOI: 10.1088/0967-3334/36/1/107

4. Ganesan A.N., Kuklik P., Gharaviri A., Brooks A., Chapman D., Lau D.H., Roberts-Thomson K.C., Sanders P. Origin and characteristics of high Shannon entropy at the pivot of locally stable rotors: insights from computational simulation. *PLoS One.* 2014; 9(11): e110662. DOI: 10.1088/0967-3334/36/1/107

5. Mysiak A., Kobusiak-Prokopowicz M., Kaaz K., Jarczewska K., Glabisz W. Characteristics of chaotic processes in electrocardiographically identified ventricular arrhythmia. *Cardiol. J.* 2017; 24(2): 151-8. DOI: 10.5603/CJ.a2016.0088

6. Robichaux R.P., Dossall D.J., Osorio J., Garner W., Li L., Huang J., Ideker R.E. Periods of highly synchronous, non-reentrant endocardial activation cycles occur during long-duration ventricular fibrillation. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 2010; 21(11): 1266. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2010.01803.x

7. Mezentseva L.V. Computer Modeling of Ventricular Fibrillation. *Biophysics.* 2012; 57(2): 247-52. DOI: 10.1134/S0006350912020145

8. Mezentseva L.V. [Program MODVF — Mathematical Modeling of Ventricular Fibrillation]. The certificate on the state registration of the computer program № 2011610618. 23.03. 2011. (in Russian)

9. Skinner J.E., Carpegiani C., Landisman C.E., Fulton K.W. The correlation-dimension of the heartbeat is reduced by myocardial ischemia in conscious pigs. *Circ. Res.* 1991; 68: 966-76.

10. Kuz'min V.S., Rozenshtrauh L.V. [Excitation Conduction in the Rat Pulmonary Veins Myocardium assessed by the optical *Rossiyskiy fiziologicheskij zhurnal im. I.M.Sechenova [I.M.Sechenov Russian Physiological Journal]*. 2012; 98 (9): 1119-30. (in Russian)

11. Revishvili A.Sh., Rzaev F.G., Dzhetybaeva S.K. [Electrophysiological diagnostics and catheter treatment of complex cardiac arrhythmias with the use of three-dimensional electro-anatomical mapping]. *Vestnik Aritmologii [Journal of Arrhythmology]*. 2004; 34: 32-7. (in Russian)

12. Strutynskij A.V., Glazunov A.B., Cygankov E.V., Banzeljuk E.N., Kallaeva A.N. [Capabilities of revealing myocardium electrical inhomogeneity in patients with ventricular arrhythmias at multipole superficial ECG-mapping of the heart]. *Mezhdunarodny medicinskiy zhurnal [International Medical Journal]*. 2004; 2: 17-21. (in Russian)

13. Cheng K.A., Dossall D.J., Li L., Rogers J.M., Ideker R.E., Huang J. Evolution of activation patterns during long-duration ventricular fibrillation in pigs. *Am. J. Physiol.* 2012; 302: 992-1002. DOI: 10.1152/ajpheart.00419.2011

14. Huang J., Rogers J.M., Killingsworth C.R., Singh K.P., Smith W.M., Ideker R.E. Evolution of activation patterns during long duration ventricular fibrillation in dogs. *Am. J. Physiol.* 2004; 286: 1193-200. DOI:10.1152/ajpheart.00773.2003

15. Park SA, Gray RA. Optical Mapping of Ventricular Fibrillation Dynamics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015; 859: 313-42. DOP: 10.1007/978-3-319-17641-3_13

Сведения об авторе

Мезенцева Лариса Валентиновна — доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории системных механизмов эмоционального стресса.

УДК 616.8-092
DOI:

О регенерации мозга (Лекция I)

Пальцын А.А.^{1,2}, Свиридкина Н.Б.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «российская медицинская Академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

В лекции рассматриваются общие вопросы регенерации мозга при патологических изменениях его в старости. Такие же изменения развиваются в мозге при многих самых распространенных болезнях современного человечества: атеросклероз, гипертоническая болезнь, воспалительные заболевания, диабет, рак, инсульт, саркопения, деменция. На большинстве территорий мозга нет постнатального обновления нейронов. На части этих территорий число нейронов в течение жизни остается неизменным, на других — уменьшается. В зонах постнатального нейрогенеза его скорость с возрастом снижается. Пропорционально возрасту уменьшается объем белого вещества, диаметр дендритов, нарастает демиелинизация. Уменьшается число синапсов и прочность синаптических контактов. Снижается скорость экспрессии генов и, прежде всего, генов, ответственных за клеточные коммуникации. Всё перечисленное действует в одном направлении, а именно нарушает суть нервной системы — нарушает связи. Решившись приняться за такую тему, как «Мозг, Старость, Регенерация» авторы пытались написать понятно и интересно для врачей и биологов любой специальности.

Ключевые слова: старение мозга; оксидативный стресс; нейрогенез; синаптические связи нейронов; экспрессия генов.

Для цитирования: Пальцын А.А., Свиридкина Н.Б. О регенерации мозга (Лекция I). Патогенез. 2017; 15(4): 74–80

Для корреспонденции: Пальцын Александр Александрович, e-mail: lrrp@mail.ru

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 17.08.2017

About regeneration of the brain (Lecture I)

Paltsyn A.A.^{1,2}, Sviridkina N.B.¹

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Barrikadnaya Str. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

The lecture focuses on general issues of brain regeneration in pathological changes related with old age. Similar changes develop in the brain in many common diseases of modern humanity, such as atherosclerosis, hypertension, inflammatory diseases, diabetes, cancer, stroke, sarcopenia, and dementia. In most areas of the brain, postnatal renewal of neurons is absent. In some of these areas, the number of neurons remains unchanged throughout the life whereas in others it decreases. In zones of postnatal neurogenesis, its rate decreases with age. The volume of white matter and diameter of dendrites decrease with the age and progressive demyelination. The number of synapses and stability of synaptic contacts reduce. The rate of gene expression decreases, particularly that of genes responsible for cell-to-cell communication. All of these mechanisms act in one direction, namely, they break the essence of the nervous system, communications. Having decided to launch into such topic as Brain, Old Age, Regeneration, the authors tried to write a clear and interesting lecture for doctors and biologists of any specialty.

Key words: aging of a brain; oxidative stress; neurogenesis; synaptic communications of neurones; expression of genes.

For citation: Paltsyn A.A., Sviridkina N.B. About regeneration of the brain (Lecture I). Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15(4): 74–80 (in Russian)

For correspondence: Paltsyn Alexandr Alexandrovich, e-mail: lrrp@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 17.08.2017

Введение

В этой лекции мы обращаемся к общим вопросам регенерации мозга, держаась, по возможности, в русле общей патологии. В качестве основного патологического процесса будет обсуждаться старость, как наиболее распространенное страдание сегодня, с тенденцией быстрого нарастания распространенности в будущем. Старость проявляется в нарушениях работы всех органов и систем организма. Предрасполагает к развитию большинства известных медицине болезней. Регенерация мозга при этих болезнях осуществляется по рассматриваемым в лекции механизмам.

Структурно-функциональная разнородность отделов мозга выражается в существенных региональных различиях его возрастных изменений. Самая общая характеристика этих изменений может быть обозначена, словом *атрофия*. Функциональным проявлением её является снижение сенсорной, моторной и когнитивной способностей. Атрофия выражается уменьшением объема серого и белого вещества и увеличением объема цереброспинальной жидкости [1]. Опубликована цифра годового уменьшения объема мозга у взрослых людей — 0,45% [2] Другие авторы [3], по результатам томографических исследований, указывают близкие цифры 0,2—0,5%.

Гистологические исследования показывают, что эти макроскопические изменения обусловлены, прежде всего, оскудением нейропиля и, в меньшей степени уменьшением числа нейронов [4]. Более того, сообщают о сохранении числа нейронов во фронтальной и темпоральной коре во временном промежутке от 56 до 103 лет [5]. В то же время, прижизненные томографические исследования показывают, что фронтальная кора — область наиболее заметного возрастного сокращения объема [3, 6, 7].

Следует заметить, что данные о сохранении числа нейронов во фронтальной коре и об уменьшении её объема на первый взгляд противоречивые, могут и не содержать противоречия. Мы уже говорили о возрастной утрате нейропиля. Эта утрата может обусловить уменьшение объема коры без уменьшения числа нейронов. Причинами сжатия мозга могут быть уменьшение не числа, а объема нейронов, истончение отростков, прежде всего массивных дендритов, уменьшение плотности расположения синапсов, утрата глиальных клеток, гипомиелинизация, обеднение сосудистой сети.

Объемы различных компонентов и различных областей мозга сейчас интенсивно исследуются прижизненно-томографическими методами. Общую тенденцию снижения объема серого и белого вещества по мере старения можно считать доказанной [8]. Распространенное уменьшение объема белого вещества начинается раньше, уже у молодых людей (23—40 лет). Уменьшение объема серого вещества (в коре и подкорковых образованиях, миндалинах, гиппокампе) начинаются со среднего возраста (41—59 лет) с более ранним развитием во фронтальной коре.

Снижение когнитивных, сенсорных и моторных способностей в старости не только общеизвестно на бытовом уровне, но и уточнено многими научными медицинскими исследованиями. В многолетнем изучении большой (>10000) выборки белых жителей Лондона обоого пола, с образованием от неполного среднего до университетского, в возрасте от 45 до 70 лет [9], было установлено снижение когнитивных способностей уже в 45—49 лет,

ускоряющееся в старших группах. В исследовании 1138 более старых людей (средний возраст 79,6 лет) нашли общее снижение когнитивных способностей, хотя и существенно отличающееся по выраженности в зависимости от образа жизни [10]. Необозримое количество подобных сообщений, практически однозначных, согласуется с теперь уже твердо установленным *уменьшением объема мозга при старении*. Причинно-следственная связь этих явлений естественна, материалистична, логична и философски безупречна. Мозг — структура, когнитивная активность — функция. Доказывать их обусловленность друг другом излишне — это значит убеждать «с ученым видом знатока» в существовании связи структуры и функции, материи и движения. Хотим обратить внимание читателя на возрастную деграцию белого вещества, поскольку она влияет на самую суть нервной деятельности — связи. В исследованиях методом магнитно-резонансной томографии обнаружили положительную связь степени сохранности белого вещества со скоростью усвоения информации [11].

Деграция белого вещества, кроме всего прочего, означает демиелинизацию, снижение скорости прохождения импульса. В магнитно-резонансных изображениях белого вещества обнаруживается необычная область увеличения сигнала, усиливающаяся с возрастом — гиперинтенсивность белого вещества. Сейчас известно, что гиперинтенсивность белого вещества отражает его повреждение. В большинстве исследований нашли снижение различных когнитивных показателей при увеличении гиперинтенсивности белого вещества.

Многообразие функций мозга, конечно, отражается и в скорости возрастной утраты нейронов. Она различна в зависимости от области мозга и типа нейронов. Есть сообщения о сохранении в старости числа нейронов у людей и макак в областях мозга, обеспечивающих память: гиппокампе и энторинальной коре [12—14]. У старых крыс количество нейронов в этих областях сохранялось даже при нарушении памяти [15] и пониженной способностью к обучению [16]. Сохранение у старых мышей числа нейронов V слоя коры, пирамидных и гранулярных нейронов в гиппокампе, нейронов стриатума и таламуса сочеталось с 25% сокращением численности клеток Пуркинье мозжечка у тех же животных [17].

Механизм повреждения нейронов

Основной причиной повреждения или гибели нейронов и нарушения функций мозга в старости считается накопление ошибок в структуре ядерной и митохондриальной ДНК [17, 18]. Главным механизмом повреждения ДНК является оксидативный стресс — действие реактивных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS): супероксидного аниона, гидроксила, перекиси водорода, других окислителей и свободных радикалов. Эти вещества — продукты нормального метаболизма, но содержание их может увеличиваться под влиянием сверхнагрузки, а также многих факторов среды: ультрафиолета, ионизирующего излучения, промышленных загрязнений. Конечно, оксидативный стресс развивается при таких распространенных патологиях, как воспалительные заболевания, атеросклероз, гипертоническая болезнь, диабет, рак.

Нейроны особенно чувствительны к оксидативному стрессу по причине повышенного потребления кислорода,

высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот [19, 20]. Когда количество оксидантов превышает норму, меняется структура не только ДНК, но также белков и липидов [19, 20]. Описано связанное с возрастом нарастание повреждений оксидантами генов, обеспечивающих нейральные функции и, в частности, когнитивные способности [21].

Различают более сотни вариантов повреждения ядерной ДНК [9]. Наиболее часты среди них одноцепочечные разрывы (single-strand breaks — SSBs). Будучи нормальным продуктом метаболизма, реактивные формы кислорода, конечно, вызывают повреждения ДНК и в физиологических концентрациях при действии не чрезвычайных, а обычных факторов среды. За сутки в клетке действием реактивных форм кислорода совершаются тысячи одноцепочечных разрывов. В общей философской форме это очевидно, поскольку жизнь есть взаимодействие разрушения и восстановления. Замечательно то, что этому принципиальному положению есть экспериментальное подтверждение в обсуждаемой нами теме. В 2013 году Suberbielle с соавторами [22] описали увеличение числа двухцепочечных разрывов ДНК у молодых взрослых мышей под действием физиологической нагрузки — исследования незнакомого окружения. Наибольшее число двухцепочечных разрывов было в зубчатой извилине — области ответственной за обучение и память. Возврат к исходному уровню двухцепочечных разрывов происходил через 24 часа. Увеличение нейрональной активности сенсорной стимуляцией, увеличивало выраженность двухцепочечных разрывов.

Разумеется, при интенсивном разрушении ядерной ДНК нормальными и, тем более, экстремальными раздражителями, жизнь была бы невозможна, если бы не существовала система репарации ДНК [23, 24]. Различные молекулярные варианты повреждения ДНК репарируются различными молекулярными механизмами. Один из них — удаление поврежденных оснований (base excision repair — BER) [24]. Следует иметь в виду, что гены, обеспечивающие работу всех механизмов репарации, подвергаются оксидативному стрессу и другим повреждениям, также как и все прочие

гены организма. Поэтому эффективность системы репарации ДНК с возрастом снижается [25]. Конечным выражением всех восстановительных механизмов является репаративный синтез ДНК, совершающийся в интерфазе, в отличие от репликативного синтеза ДНК в S-периоде, не свойственного нейронам взрослых млекопитающих [23].

Изучение репаративного синтеза в отдельных видах нейронов в возрастном аспекте показало снижение его уровня у стареющих мышей в V слое пирамидных клеток коры, в пирамидных и гранулярных клетках гиппокампа, нейронах стриатума, но не в клетках Пуркинье мозжечка. Соответственно этому, при исследовании повреждений ДНК найдено связанное со старостью накопление одноцепочечных разрывов в ядерной ДНК пирамидных нейронов V слоя, пирамидных и гранулярных нейронах гиппокампа, нейронах стриатума и отсутствие этого признака в клетках Пуркинье. Нейроны Пуркинье отличаются наивысшим, но независимым от возраста уровнем одноцепочечных разрывов. Высокая частота разрывов в клетках Пуркинье согласуется с их повышенной, сравнительно с другими нейронами, чувствительностью к гипоксии [26, 27]. Нельзя утверждать, что указанная выше значительная утрата клеток Пуркинье в старости есть прямое следствие частоты разрывов в них, но, возможно, это связанные явления. Из сопоставления внутриклеточных репаративных процессов в нейронах Пуркинье и других упомянутых ранее нейронах вырисовывается интересное предположение. Можно допустить, что нейроны, в которых репарация ДНК, хотя и не устраняет все повреждения, но достаточна для предотвращения старческой гибели клетки, могут в дальнейшем из-за накопления геномных ошибок стать уязвимыми для патологических изменений, обусловить когнитивную недостаточность и подверженность патоморфозу Альцгеймеровского типа. Нейроны же, подобные клеткам Пуркинье, которые вследствие высокой повреждаемости или низкой репарации утрачиваются с возрастом, представляют, по сути, вариант отбора дефектных форм. Их популяция избавляется, таким образом, от старческой дегенерации.

Нейрогенез

В связи с вопросом об изменении числа нейронов в мозге, следует иметь в виду данные по размножению нейронов — нейрогенезу. В мозге есть области, в которых нейроны у взрослых и даже старых млекопитающих могут не только утрачиваться, но и появляться вновь. Понятно, что эти области представляют наибольший интерес для заместительной клеточной терапии. Нейральные стволовые клетки (neural stem cells — NSCs) есть во многих областях мозга, но их пролиферация и дифференцировка обеспечивает пополнение числа нейронов только в зубчатой извилине гиппокампа (рис. 1) и в обонятельных луковицах [28]. Новорожденные нейроны мигрируют в участки постоянной локализации: из субгранулярного в гранулярный слой зубчатой извилины и из субвентрикулярного слоя боковых желудочков в обонятельные луковицы. Здесь у них окончательно формируются дендриты и аксоны, и они встраиваются как промежуточные нейроны в местные сети. В многочисленных сообщениях о новообразованных нейронах за пределами гиппокампа и боковых желудочков не удалось доказать интеграции этих клеток в нейронные сети. В глиоциты NSCs, конечно дифференцируются, во всех областях мозга.

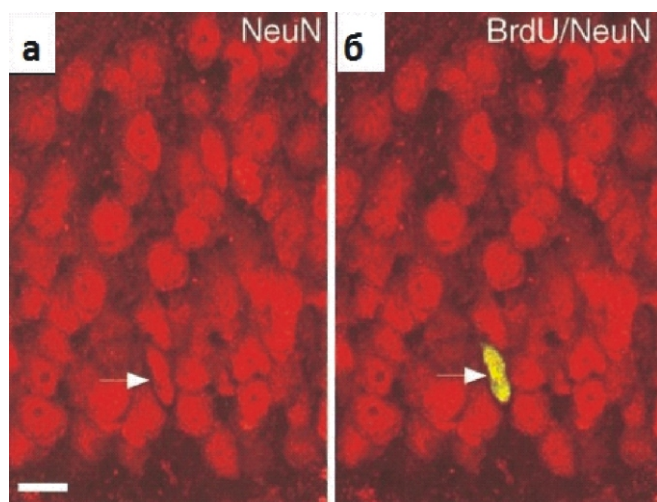


Рис. 1. Иммуноцитохимическое доказательство нейрогенеза в мозге взрослой макаки. За месяц до фиксации мозга животное получало инъекции предшественника ДНК — BrdU, меченого зеленой флуоресцентной меткой: а — гранулярный слой зубчатой извилины гиппокампа. Окраска мечеными красной меткой антителами к специфическому нейрональному белку NeuN; б — кадр а, снятый с фильтром для зеленой флуоресценции. Ядро, указанное стрелкой в кадре «а» и «б», сочетает красную и зеленую флуоресценцию, следовательно, это нейрон, в котором месяц назад происходил синтез ДНК [28].

Нейрогенез — один из ключевых факторов синаптической пластичности взрослого мозга [29, 30]. От уровня нейрогенеза в зубчатой извилине зависят связанные с гиппокампом процессы обучения и памяти [29, 31]. Хотя нейрогенез продолжается в течение всей жизни, скорость его резко снижается у старых животных. Содержание нейробластов у мышей среднего возраста (7–9 месяцев) по сравнению с молодыми (2 месяца) снижается на 80% [32]. Подавляется не только пролиферация NSCs, но и их дифференцировка в нейральные прогениторные клетки (neural progenitor cells — NPCs), дифференцировка NPCs в нейроны и выживание нейронов [33]. Так, у старых обезьян-мармозеток (8–15 лет) по сравнению с молодыми (<3 лет) нейрогенез снижался на 90% [34]. Методом магнитно-резонансной спектроскопии [35] удалось идентифицировать метаболиты, специфичные для нейрональных прогениторных клеток в человеческом мозге *in vivo*. У взрослых людей эти маркеры не обнаруживаются в коре, но обнаруживаются в гиппокампе. Уменьшение сигнала этих маркеров у взрослых людей сравнительно с юными, согласуется с установленным традиционными методами возрастным подавлением нейрогенеза у млекопитающих. Подавление нейрогенеза (облучением, цитостатиками) ухудшает обучаемость и память [36, 37].

Итак, анализ современных сведений по старению мозга убеждает, что старческой утрате подвержены не все виды нейронов и не во всех областях мозга. Поэтому утратой нейронов нельзя объяснить все проявления старения мозга. Более существенной причиной старческого угасания мозговых функций сейчас представляется развивающаяся с возрастом *недостаточность синаптических связей* [38, 39].

Возрастные изменения синапсов

Синапсы — способ и инструмент нервной деятельности, и главный объект возрастных изменений в работе мозга. Поэтому рассказ о них хотим предварить небольшим отклонением в историю становления нейронной теории и современного понимания роли синапсов. Впервые идею о межклеточных контактах нейронов как структурной основе памяти выдвинул Alexander Bain в 1872 г. [40]. Он писал: «Для каждого акта памяти, каждого возникновения мысли, необходима особая группировка, особый вариант клеточных соединений». Современники не смогли оценить и принять идею Bain'a. Она оставалась незамеченной более 20 лет до появления подобных высказываний Сантьяго Кахаля, основанных на его опыте изучения отростков нервных клеток [41]. Сейчас представление о том, что память и вообще мыслительная деятельность осуществляется перестройками синаптических связей, является общепринятым [42].

Обнаружено зависимое от возраста уменьшение числа синапсов (рис. 2). У стареющих макак оно сочеталось со снижением когнитивной функции [43].

В электронно-микроскопическом исследовании префронтальной коры у макак резус Peters et al. [44] обнаружили старческое уменьшение на 30% числа синапсов, сочетающееся со снижением когнитивной способности (сравнивали обезьян в возрасте 5 и 30 лет). Установлено уменьшение числа дендритных шипиков (в ассоциативных зонах париетальной и медиальной префронтальной коры) у старых когнитивно нормальных, и ещё более — у старых когнитивно ушербных крыс сравнительно с молодыми животными [45]. У старых макак (24–25 лет) по

сравнению с молодыми (9–12 лет) уменьшались: плотность расположения шипиков, диаметр, длина и разветвленность апикальных дендритов префронтальной коры. Это сочеталось с угасанием когнитивных способностей. В последнее время появилась возможность с помощью двухфотонного микроскопа хронически прижизненно регистрировать изображения дендритных шипиков и аксональных бутонов [46–48]. В эксперименте, длящемся месяцы, показали рост и перестройку дендритного дерева нейронов в коре головного мозга у мышей. В этих работах удивительные представления Bain'a и Кахаля были подтверждены непосредственным видением роста и перестройки отростков взрослых нейронов. Они вытягивали и сокращали ветви, а в некоторых случаях образовывали новые ответвления. Пластичность взрослого мозга можно было воспринимать и оценивать прямым наблюдением.

Есть сообщения о внутрисинаптических изменениях, связанных с возрастом. Описано возрастное снижение синтеза нейротрансмиттеров и плотности их рецепторов [49, 50]. Эти изменения проявлялись снижением скорости проведения импульса, увеличением порога для потенциала действия в пирамидальных клетках гиппокампа и пирамиде третьего слоя соматосенсорной коры [51]. Упомянутые нами и подобные им исследования внесли существенные изменения в понимание сути синаптической недостаточности [52]. Она может быть обусловлена не только снижением численности синапсов, но и уменьшением *прочности синаптических связей*.

Отсутствие нейрогенеза в большинстве областей мозга согласуется со способностью нейронов пожизненно хранить информацию. По современным представлениям информация (память) «записывается» в связях нейронов. Получается, что для длительного и, тем более, пожизненного сохранения чего-то запомненного должна сохраняться связь некой комбинации синапсов. В то же время аксональным бутонам присуща высокая скорость формирования, дестабилизации и элиминации. Без способности синаптических связей к быстрым изменениям и перестройкам не было бы и столь же необходимой как память пластичности мозга. Не было бы формирования па-

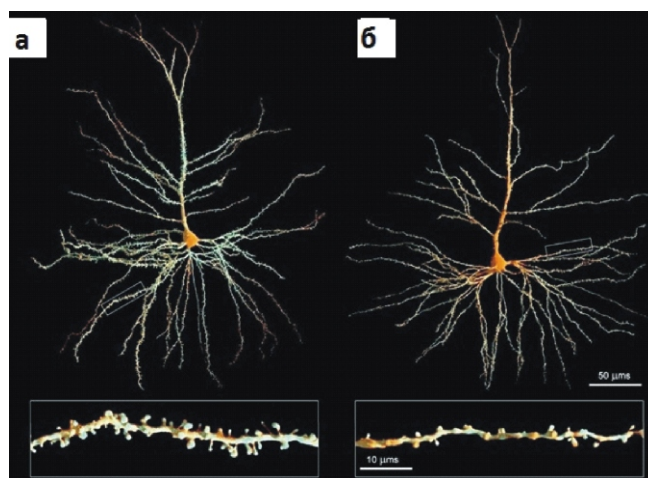


Рис. 2. Уменьшение числа синапсов с возрастом: а — нейрон префронтальной коры молодой обезьяны; б — нейрон префронтальной коры пожилой обезьяны. Во врезках под каждым нейроном — фрагмент его базального дендрита под большим увеличением. При отсутствии существенной разницы между нейронами по числу дендритов, видно резкое уменьшение количества шипиков на дендрите пожилой обезьяны [43].

мяти — запоминания впечатлений. Диалектическое условие сочетать память и пластичность, пока в конкретном выражении ещё неясно представляемое, всё-таки находит экспериментальное подтверждение в данных морфологических и молекулярно-биологических исследований. Описано ускоренное образование дендритных шипиков при увеличении сенсорной и моторной нагрузки [47, 48].

Возрастные изменения экспрессии генов

В качестве переходного от синаптических к генетическим событиям представляем исследование Веегі с сотрудниками [53], проводившееся в течение 20 лет. Авторы определяли содержание белка и мРНК семи синаптических маркеров (complexin-1, complexin-2, synaptophysin, synaptobrevin, syntaxin, SNAP-25, septin-5). Из более 1600 образцов мозга, полученных от стариков в возрасте от 70 до 103 лет, авторы выбрали для изучения всего 111 образцов, но эти образцы были от тех людей, которые не ранее чем за полгода до смерти проходили нейропсихиатрическое обследование с определением когнитивного статуса. Сравнение уровня экспрессии маркерных белков и их генов у когнитивно интактных и когнитивно уязвимых индивидуумов сопоставимого возраста обнаружило значительное снижение его у уязвимых. При деменции уменьшалось содержание всех маркеров, независимо от их роли в синаптической функции.

Появление метода ДНК-микрочипов (DNA microarray) позволило исследовать возрастные особенности экспрессии множества генов в мозге. Изучая возрастные (с 13 до 79 лет) изменения экспрессии 588 генов, Sibille [54] описал наибольшее снижение в старости экспрессии генов клеточных коммуникаций и сигнальных функций. Коллектив авторов из академии постдипломного образования (РМАНПО) и МГУ методом РНК-секвенирования большого числа генов, обнаружил, что наиболее резкие различия старого мозга от мозга взрослого человека относятся к нарушениям экспрессии генов, контролирующих клеточные сигнальные системы в неокортексе [55].

Хотим подчеркнуть, что все обусловленные возрастом многообразные повреждения мозга — уменьшение числа нейронов и скорости их обновления в нейрогенных зонах, уменьшение объема белого вещества и демиелинизация, уменьшение числа синапсов и прочности синаптических контактов, снижение скорости экспрессии генов и, прежде всего, генов, ответственных за клеточные коммуникации — всё перечисленное действует в одном направлении, а именно *нарушает суть нервной системы — нарушает связи.*

Список литературы

1. Lemaitre H., Goldman A.L., Sambataro F., Verchinski B.A., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R., Mattay V.S. Normal age-related brain morphometric changes: Nonuniformity across cortical thickness, surface area and grey matter volume? *Neurobiol. Aging*. 2012; 33(3): 617-9. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.07.013
2. Fotenos A.F., Snyder A.Z., Gorton L.E., Morris J.C., Buckner R.L. Normative estimates of cross-sectional and longitudinal brain volume decline in aging and AD. *Neurology*. 2005; 64(6): 1032-39. DOI: 10.1212/01.WNL.0000154530.72969.11
3. Salthouse T.A. Neuroanatomical substrates of age-related cognitive decline. *Psychol. Bull.* 2011; 137(5): 753-84. DOI: 10.1037/a0023262
4. Pakkenberg B., Pelvig D., Marnar L., Bundgaard M.J., Gundersen H.J., Nyengaard J.R., Regeur L. Aging and the human neocortex. *Exp. Gerontol.* 2003; 38(1-2): 95-9.
5. Freeman S.H., Kandel R., Cruz L., Rozkalne A., Newell K., Frosch M.P., Hedley-Whyte E.T., Locascio J.J., Lipsitz L.A., Hy-

man B.T. Preservation of Neuronal Number Despite Age-Related Cortical Brain Atrophy In Elderly Subjects Without Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67(12): 1205-12. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31818fc72f

6. Tisserand D.J., Pruessner J.C., Sanz Arigita E.J., van Boxtel M.P., Evans A.C., Jolles J., Uylings H.B. Regional frontal cortical volumes decrease differentially in aging: an MRI study to compare volumetric approaches and voxel-based morphometry. *Neuroimage*. 2002; 17(2): 657-69.

7. Good C.D., Johnsrude I.S., Ashburner J., Henson R.N., Friston K.J., Frackowiak R.S. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage*. 2001; 14(1 Pt. 1): 21-36. DOI: 10.1006/nimg.2001.0786

8. Giorgio A., Santelli L., Tomassini V., Bosnell R., Smith S., De Stefano N., Johansen-Berg H. Age-related changes in grey and white matter structure throughout adulthood. *Neuroimage*. 2010; 51: 943-51. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2010.03.004

9. Singh-Manoux A., Kivimaki M., Glymour M.M., Elbaz A., Berr C., Ebmeier K.P., Ferrie J.E., Dugravot A. Timing of onset of cognitive decline: results from Whitehall II prospective cohort study. *BMJ*. 2012; 344: 7622. DOI: 10.1136/bmj.d7622

10. James B.D., Wilson R.S., Barnes L.L., Bennett D.A. Late-Life Social Activity and Cognitive Decline in Old Age. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2011; 17(6): 998-1005. DOI: 10.1017/S1355617711000531

11. Penke L., Maniega S.M., Bastin M.E., Valdes Hernandez M.C., Murray C., Royle N.A., Starr J.M., Wardlaw J.M., Deary I.J. Brain white matter tract integrity as a neural foundation for general intelligence. *Mol. Psychiatry*. 2012; 17(10): 1026-30. DOI: 10.1038/mp.2012.66

12. West M.J., Gundersen H.J. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1990; 296: 1-22. DOI: 10.1002/cne.902960102

13. West M.J., Coleman P.D., Flood D.G., Troncoso J.C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1994; 344: 769-72.

14. Gazzaley A.H., Thakker M.M., Hof P.R., Morrison J.H. Preserved number of entorhinal cortex layer II neurons in aged macaque monkeys. *Neurobiol. Aging*. 1997; 18: 549-53.

15. Merrill D.A., Chiba A.A., Tuszynski M.H. Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. *J. Comp. Neurol.* 2001; 438: 445-56.

16. Rapp P.R., Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 9926-30.

17. Brasnjevic I., Hof PR, Steinbusch HW, Schmitz C. Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *DNA Repair (Amst)*. 2008; 7(7): 1087-97. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.03.010

18. Rutten B.P., Schmitz C., Gerlach O.H., Oyen H.M., de Mesquita E.B., Steinbusch H.W., Korff H. The aging brain: accumulation of DNA damage or neuron loss? *Neurobiol. Aging*. 2007; 28: 91-8. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.10.019

19. Лукьянова Л.Д. Митохондриальная дисфункция — молекулярный механизм гипоксии. *Патогенез*. 2003; 1: 52-67.

20. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы адаптации к гипоксии. Сигнальные механизмы и их роль в системной регуляции. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2011; 1: 3-19.

21. Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J., Yankner B.A. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 2004; 429(6994): 883-91. DOI: 10.1038/nature02661

22. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V., Wang X., Ho K., Eilertson K., Devidze N., Kreitzer A.C., Mucke L. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* 2013; 16(5): 613-21. DOI: 10.1038/nn.3356

23. Caldecott K.W. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair*. 2004; 3: 875-82. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.04.011

24. Bosshard M., Markkanen E., van Loon B. Base Excision Repair in Physiology and Pathology of the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(12): 16172-222. DOI: 10.3390/ijms131216172

25. Li W., Vijg J. Measuring Genome Instability in Aging — A Mini-Review. *Gerontology*. 2012; 58(2): 129-38. DOI: 10.1159/000334368

26. Welsh J.P., Yuen G., Placantonakis D.G., Vu T.Q., Haiss F., O'Hearn E., Molliver M.E., Aicher S.A. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv. Neurol.* 2002; 89: 331-59.

27. Ardeshiri A., Kelley M.H., Korner I.P., Hurn P.D., Herson P.S. Mechanism of progesterone neuroprotection of rat cerebellar

Purkinje cells following oxygen-glucose deprivation. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 24(9): 2567-74. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.05142.x

28. Kornack D.R., Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(10): 5768-73.

29. Zhao C., Deng W., Gage F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008; 132(4): 645-60. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.033

30. Lazarini F., Lledo P.M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci.* 2011; 34(1): 20-30. DOI: 10.1016/j.tins.2010.09.006

31. Drapeau E., Nora A.D. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell.* 2008; 7(4): 569-89. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00369.x

32. Demars M.P., Hollands C., Zhao Kda T., Lazarov O. Soluble amyloid precursor protein- α rescues age-linked decline in neural progenitor cell proliferation. *Neurobiol. Aging.* 2013; 34(10): 2431-40. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.016

33. Lee S.W., Clemenson G.D., Gage F.H. New neurons in an aged brain. *Behav. Brain Res.* 2012; 227: 497-507. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.10.009

34. Bunk E.C., Stelzer S., Hermann S., Schafers M., Schlatt S., Schwamborn J.C. Cellular organization of adult neurogenesis in the Common Marmoset. *Aging Cell.* 2011; 10(1): 28-38. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00639.x

35. Manganas L.N., Zhang X., Li Y., Hazel R.D., Smith S.D., Wagshul M.E., Henn F., Benveniste H., Djuric P.M., Enikolopov G., Maletic-Savatic M. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science.* 2007; 318: 980-5. DOI: 10.1126/science.1147851

36. Dupret D., Revest J.M., Koehl M., Ichas F., De Giorgi F., Costet P., Abrous D.N., Piazza P.V. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One.* 2008; 3(4): 1959. DOI: 10.1371/journal.pone.0001959

37. Winocur G., Wojtowicz J.M., Sekeres M., Snyder J.S., Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus.* 2006; 16(3): 296-304.

38. Morrison JH, Baxter MG. Synaptic health. *JAMA Psychiatry.* 2014; 71(7): 835-7. DOI: 10.1002/hipo.20163

39. Jellinger K.A., Attems J. Neuropathological approaches to cerebral aging and neuroplasticity. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2013; 15(1): 29-43.

40. Bain A. *Mind and body. The Theories of their Relation.* New York: D. Appleton & Company, 1872.

41. Cajal S.R. The croonian lecture. La fine structure des centres nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London.* London: Harrison and Sons; 1894; LV: 444-68.

42. Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Progress in Neurobiology.* 2003; 71: 83-248.

43. Morrison J.H., Baxter M.G. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012; 13(4): 240-50. DOI: 10.1038/nrn3200

44. Peters A., Sethares C., Luebke J.I. Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2008; 152(4): 970-81. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.07.014

45. Allard S., Scardochio T., Cuellar A.C., Ribeiro-da-Silva A. Correlation of cognitive performance and morphological changes in neocortical pyramidal neurons in aging. *Neurobiol. Aging.* 2012; 33(7): 1466-80. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.10.011

46. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science.* 1990; 5: 73-6.

47. Kim S.K., Eto K., Nabekura J. Synaptic structure and function in the mouse somatosensory cortex during chronic pain: in vivo two-photon imaging. *Neural Plast.* 2012; Available at: <http://www.hindawi.com/journals/np/2012/640259/> DOI: 10.1155/2012/640259

48. Tjia M., Yu X., Jammu L.S., Lu J., Zuo Y. Pyramidal Neurons in Different Cortical Layers Exhibit Distinct Dynamics and Plasticity of Apical Dendritic Spines. *Front Neural Circuits.* 2017; 11: 43. DOI: 10.3389/fncir.2017.00043

49. Kaiser L.G., Schuff N., Cashdollar N., Weiner M.W. Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: 1H MR spectroscopy study at 4 T. *Neurobiol. Aging.* 2005; 26(5): 665-72. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.001

50. Ota M., Yasuno F., Ito H., Seki C., Nozaki S., Asada T., Suhara T. Age-related decline of dopamine synthesis in the living human brain measured by positron emission tomography with L-[beta-11C]DOPA. *Life Sci.* 2006; 79(8): 730-6. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.02.017

51. Miller D.B., O'Callaghan J.P. Review Effects of aging and stress on hippocampal structure and function. *Metabolism.* 2003; 52(10, Suppl 2): 17-21.

52. Mostany R., Anstey J.E., Crump K.L., Maco B., Knott G., Portera-Cailliau C. Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *J. Neurosci.* 2013; 33(9): 4094-104. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4825-12.2013

53. Beeri M.S., Haroutunian V., Schmeidler J., Sano M., Fam P., Kavanaugh A., Barr A.M., Honer W.G., Katsel P. Synaptic protein deficits are associated with dementia irrespective of extreme old age. *Neurobiol. Aging.* 2012; 33(6): 1125.e1-1125.e8. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.017

54. Sibille E. Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2013; 15(1): 53-65.

55. Naumova O.Y., Palejev D., Vlasova N.V., Lee M., Rychkov S.Y., Babich O.N., M Vaccarino F., Grigorenko E.L. Age-related changes of gene expression in the neocortex: Preliminary data on RNA-Seq of the transcriptome in three functionally distinct cortical areas. *Dev. Psychopathol.* 2012; 24(4): 1427-42. DOI: 10.1017/S0954579412000818

References

1. Lemaitre H., Goldman A.L., Sambataro F., Verchinski B.A., Meyer-Lindenberg A., Weinberger D.R., Mattay V.S. Normal age-related brain morphometric changes: Nonuniformity across cortical thickness, surface area and grey matter volume? *Neurobiol. Aging.* 2012; 33(3): 617-9. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.07.013

2. Fotenos A.F., Snyder A.Z., Giron L.E., Morris J.C., Buckner R.L. Normative estimates of cross-sectional and longitudinal brain volume decline in aging and AD. *Neurology.* 2005; 64(6): 1032-39. DOI: 10.1212/01.WNL.0000154530.72969.11

3. Salthouse T.A. Neuroanatomical substrates of age-related cognitive decline. *Psychol. Bull.* 2011; 137(5): 753-84. DOI: 10.1037/a0023262

4. Pakkenberg B., Pelvig D., Marner L., Bundgaard M.J., Gundersen H.J., Nyengaard J.R., Regeur L. Aging and the human neocortex. *Exp. Gerontol.* 2003; 38(1-2): 95-9.

5. Freeman S.H., Kandel R., Cruz L., Rozkalne A., Newell K., Frosch M.P., Hedley-Whyte E.T., Locascio J.J., Lipsitz L.A., Hyman B.T. Preservation of Neuronal Number Despite Age-Related Cortical Brain Atrophy In Elderly Subjects Without Alzheimer Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2008; 67(12): 1205-12. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31818fc72f

6. Tisserand D.J., Pruessner J.C., Sanz Arigita E.J., van Boxtel M.P., Evans A.C., Jolles J., Uylings H.B. Regional frontal cortical volumes decrease differentially in aging: an MRI study to compare volumetric approaches and voxel-based morphometry. *Neuroimage.* 2002; 17(2): 657-69.

7. Good C.D., Johnsrude I.S., Ashburner J., Henson R.N., Friston K.J., Frackowiak R.S. A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage.* 2001; 14(1 Pt. 1): 21-36. DOI: 10.1006/nimg.2001.0786

8. Giorgio A., Santelli L., Tomassini V., Bosnell R., Smith S., De Stefano N., Johansen-Berg H. Age-related changes in grey and white matter structure throughout adulthood. *Neuroimage.* 2010; 51: 943-51. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2010.03.004

9. Singh-Manoux A., Kivimaki M., Glymour M.M., Elbaz A., Berr C., Ebmeier K.P., Ferrie J.E., Dugravot A. Timing of onset of cognitive decline: results from Whitehall II prospective cohort study. *BMJ.* 2012; 344: 7622. DOI: 10.1136/bmj.d7622

10. James B.D., Wilson R.S., Barnes L.L., Bennett D.A. Late-Life Social Activity and Cognitive Decline in Old Age. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 2011; 17(6): 998-1005. DOI: 10.1017/S1355617711000531

11. Penke L., Maniega S.M., Bastin M.E., Valdes Hernandez M.C., Murray C., Royle N.A., Starr J.M., Wardlaw J.M., Deary I.J. Brain white matter tract integrity as a neural foundation for general intelligence. *Mol. Psychiatry.* 2012; 17(10): 1026-30. DOI: 10.1038/mp.2012.66

12. West M.J., Gundersen H.J. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 1990; 296: 1-22. DOI: 10.1002/cne.902960102

13. West M.J., Coleman P.D., Flood D.G., Troncoso J.C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet.* 1994; 344: 769-72.

14. Gazzaley A.H., Thakker M.M., Hof P.R., Morrison J.H. Preserved number of entorhinal cortex layer II neurons in aged macaque monkeys. *Neurobiol. Aging.* 1997; 18: 549-53.

15. Merrill D.A., Chiba A.A., Tuszynski M.H. Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. *J. Comp. Neurol.* 2001; 438: 445-56.

16. Rapp P.R., Gallagher M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 9926-30.
17. Brasnjevic I, Hof PR, Steinbusch HW, Schmitz C. Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *DNA Repair (Amst)*. 2008; 7(7): 1087-97. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.03.010
18. Rutten B.P., Schmitz C., Gerlach O.H., Oyen H.M., de Mesquita E.B., Steinbusch H.W., Korh H. The aging brain: accumulation of DNA damage or neuron loss? *Neurobiol. Aging*. 2007; 28: 91-8. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.10.019
19. Luk'janova L.D. [Mitochondrial dysfunction — molecular mechanism of hypoxia]. *Patogenez [Pathogenesis (Russian Federation)]*. 2003; 1: 52-67 (in Russian)
20. Luk'janova L.D. [Modern problems of adaptation to hypoxia. Signal pathways and their role in the system of regulation]. *Patologicheskaja fiziologija i eksperimental'naja terapija [Pathological physiology and experimental therapy]*. 2011; 1: 3-19. (in Russian)
21. Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J., Yankner B.A. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 2004; 429(6994): 883-91. DOI: 10.1038/nature02661
22. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V., Wang X., Ho K., Eilertson K., Devidze N., Kreitzer A.C., Mucke L. Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* 2013; 16(5): 613-21. DOI: 10.1038/nn.3356
23. Caldecott K.W. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. *DNA Repair*. 2004; 3: 875-82. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.04.011
24. Bosshard M., Markkanen E., van Loon B. Base Excision Repair in Physiology and Pathology of the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13(12): 16172-222. DOI: 10.3390/ijms131216172
25. Li W., Vijg J. Measuring Genome Instability in Aging — A Mini-Review. *Gerontology*. 2012; 58(2): 129-38. DOI: 10.1159/000334368
26. Welsh J.P., Yuen G., Placantonakis D.G., Vu T.Q., Haiss F., O'Hearn E., Molliver M.E., Aicher S.A. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. *Adv. Neurol.* 2002; 89: 331-59.
27. Ardeshiri A., Kelley M.H., Korner I.P., Hurn P.D., Herson P.S. Mechanism of progesterone neuroprotection of rat cerebellar Purkinje cells following oxygen-glucose deprivation. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 24(9): 2567-74. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.05142.x
28. Kornack D.R., Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(10): 5768-73.
29. Zhao C., Deng W., Gage F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 2008; 132(4): 645-60. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.033
30. Lazarini F., Lledo P.M. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci.* 2011; 34(1): 20-30. DOI: 10.1016/j.tins.2010.09.006
31. Drapeau E., Nora A.D. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell*. 2008; 7(4): 569-89. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00369.x
32. Demars M.P., Hollands C., Zhao Kda T., Lazarov O. Soluble amyloid precursor protein- α rescues age-linked decline in neural progenitor cell proliferation. *Neurobiol. Aging*. 2013; 34(10): 2431-40. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.016
33. Lee S.W., Clemenson G.D., Gage F.H. New neurons in an aged brain. *Behav. Brain Res.* 2012; 227: 497-507. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.10.009
34. Bunk E.C., Stelzer S., Hermann S., Schafers M., Schlatt S., Schwamborn J.C. Cellular organization of adult neurogenesis in the Common Marmoset. *Aging Cell*. 2011; 10(1): 28-38. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00639.x
35. Manganas L.N., Zhang X., Li Y., Hazel R.D., Smith S.D., Wagshul M.E., Henn F., Benveniste H., Djuric P.M., Enikolopov G., Maletic-Savatic M. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science*. 2007; 318: 980-5. DOI: 10.1126/science.1147851
36. Dupret D., Revest J.M., Koehl M., Ichas F., De Giorgi F., Costet P., Abrous D.N., Piazza P.V. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*. 2008; 3(4): 1959. DOI: 10.1371/journal.pone.0001959
37. Winocur G., Wojtowicz J.M., Sekeres M., Snyder J.S., Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*. 2006; 16(3): 296-304.
38. Morrison JH, Baxter MG. Synaptic health. *JAMA Psychiatry*. 2014; 71(7): 835-7. DOI: 10.1002/hipo.20163
39. Jellinger K.A., Attems J. Neuropathological approaches to cerebral aging and neuroplasticity. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2013; 15(1): 29-43.
40. Bain A. *Mind and body. The Theories of their Relation*. New York: D. Appleton & Company, 1872.
41. Cajal S.R. The croonian lecture. La fine structure des centres nerveux. *Proceedings of the Royal Society of London*. London: Harrison and Sons; 1894; LV: 444-68.
42. Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Progress in Neurobiology*. 2003; 71: 83-248.
43. Morrison J.H., Baxter M.G. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat. Rev. Neurosci.* 2012; 13(4): 240-50. DOI: 10.1038/nrn3200
44. Peters A., Sethares C., Luebke J.I. Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience*. 2008; 152(4): 970-81. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2007.07.014
45. Allard S., Scardochio T., Cuello A.C., Ribeiro-da-Silva A. Correlation of cognitive performance and morphological changes in neocortical pyramidal neurons in aging. *Neurobiol. Aging*. 2012; 33(7): 1466-80. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.10.011
46. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990; 5: 73-6.
47. Kim S.K., Eto K., Nabekura J. Synaptic structure and function in the mouse somatosensory cortex during chronic pain: in vivo two-photon imaging. *Neural Plast.* 2012; Available at: <http://www.hindawi.com/journals/np/2012/640259/> DOI: 10.1155/2012/640259
48. Tjia M., Yu X., Jammu L.S., Lu J., Zuo Y. Pyramidal Neurons in Different Cortical Layers Exhibit Distinct Dynamics and Plasticity of Apical Dendritic Spines. *Front Neural Circuits*. 2017; 11: 43. DOI: 10.3389/fncir.2017.00043
49. Kaiser L.G., Schuff N., Cashdollar N., Weiner M.W. Age-related glutamate and glutamine concentration changes in normal human brain: 1H MR spectroscopy study at 4 T. *Neurobiol. Aging*. 2005; 26(5): 665-72. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.07.001
50. Ota M., Yasuno F., Ito H., Seki C., Nozaki S., Asada T., Suhara T. Age-related decline of dopamine synthesis in the living human brain measured by positron emission tomography with L-[beta-11C]DOPA. *Life Sci*. 2006; 79(8): 730-6. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.02.017
51. Miller D.B., O'Callaghan J.P. Review Effects of aging and stress on hippocampal structure and function. *Metabolism*. 2003; 52(10, Suppl 2): 17-21.
52. Mostany R., Anstey J.E., Crump K.L., Maco B., Knott G., Portera-Cailliau C. Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *J. Neurosci.* 2013; 33(9): 4094-104. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4825-12.2013
53. Beeri M.S., Haroutunian V., Schmeidler J., Sano M., Fam P., Kavanaugh A., Barr A.M., Honer W.G., Katsel P. Synaptic protein deficits are associated with dementia irrespective of extreme old age. *Neurobiol. Aging*. 2012; 33(6): 1125.e1-1125.e8. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.017
54. Sibille E. Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2013; 15(1): 53-65.
55. Naumova O.Y., Palejev D., Vlasova N.V., Lee M., Rychkov S.Y., Babich O.N., Vaccarino F., Grigorenko E.L. Age-related changes of gene expression in the neocortex: Preliminary data on RNA-Seq of the transcriptome in three functionally distinct cortical areas. *Dev. Psychopathol.* 2012; 24(4): 1427-42. DOI: 10.1017/S0954579412000818

Сведения об авторах

Пальцын Александр Александрович — доктор биологических наук, профессор, лауреат Государственной премии СССР, главный научный сотрудник¹, профессор кафедры общей патологии и патофизиологии².
Свиридкина Надежда Борисовна — кандидат биологических наук, руководитель клиники подопытных животных¹.

УДК [616-092.9+61 6.25]:61(09)
DOI:

Основные моменты становления медицинского эксперимента. Биоэтика

Копаладзе Р.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

В мире ежегодно используется более 100 миллионов позвоночных животных в научных исследованиях, тестировании лекарств и обучении. Польза, получаемая от использования животных в научных исследованиях, неоспорима, но методы, с помощью которых достигается эта польза, должны быть максимально гуманными. В статье подчёркнута важность соблюдения биоэтических принципов 3Rs (Refinement, Reduction, Replacement) для повышения эффективности и гуманности медицинских экспериментов. Выделены основные моменты становления медицинского эксперимента и принципов биоэтики, обсуждены национальные и международные законодательства и правила, регулирующие использование животных в научных исследованиях.

Ключевые слова: становление медицинского эксперимента, лабораторные животные, биоэтика, законодательство.

Для корреспонденции: Копаладзе Реваз Александрович, revazkop@mail.ru

Для цитирования: Копаладзе Р.А. Основные моменты становления медицинского эксперимента. Биоэтика. Патогенез. 2017; 15(4): 81—89

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила: 03.10.2017

The milestones in development of medical experiments. Bioethics

Kopaladze R.A.

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow125315, Russian Federation

More than 100 million vertebrates are used in the world annually in scientific research, drug testing and training. The benefits derived from the use of animals in scientific research are undeniable, but the methods by which this benefit is achieved should be as humane as possible. The article emphasizes the importance of observing the bioethical principles of 3Rs (Refinement, Reduction, Replacement) to increase the effectiveness and humanity of medical experiments. The milestones in the development of the medical experiment and the principles of bioethics are singled out; national and international laws and regulations governing the use of animals in scientific research are discussed.

Keywords: development of medical experiment, laboratory animals, bioethics, legislation.

For correspondence: Revaz A. Kopaladze, revazkop@mail.ru

For citation: Kopaladze R.A. The milestones in development of medical experiments. Bioethics. Patogenez [Pathogenesis]. 2017; 15(4): 81—89 (in Russian)

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received: 03.10.2017

«Если используется набор принципов экспериментирования на животных, то критерии гуманности являются лучшим из того, что мы можем предложить».

У. Рассел и Р. Бэрч

В мире ежегодно используется более 100 миллионов позвоночных животных в научных исследованиях, тестировании лекарств и обучении. Так, в статистическом отчете Британского союза за отмену вивисекции было показано, что за 2005 год в 179 странах мира было использовано 115, а за 2012 год — 118 миллионов лабораторных животных [1, 2]. Польза от использования животных в био-

медицинских исследованиях для медицины неоспорима. Однако польза неизбежно предполагает этическую ответственность. В основе оценки этической приемлемости использования животных в научных исследованиях, как правило, лежит философия утилитаризма, которая применительно к медицинским экспериментам на животных звучит следующим образом: польза, полученная в результате эксперимента для людей, должна перевешивать ущерб, нанесённый подопытным животным. В связи с этим все больше внимания уделяется неинвазивным методам исследования, уменьшению количества животных в экспериментах, а когда это возможно, полной замене их альтернативными методами.

Движение против вивисекции берет начало в Британии со второй половины XIX века. Члены общественного движения выступали против вивисекции не только с целью защиты животных, но и из-за обеспокоенности тем, что результаты экспериментов на животных не могут быть применены к людям [3]. Мнения о сомнительной пользе результатов научных исследований с использованием животных и в настоящем придерживаются некоторые исследователи. Разумеется, то, что является эффективным для одного вида животных, не всегда является таковым для других и для людей. Но это не значит, что метод моделирования на животных не может удовлетворять запросам медицины, напротив, его необходимо совершенствовать.

Анализ становления методологии медицинского эксперимента на животных, принципов биоэтики, национальных и международных законодательств и правил важен, для эффективного использования этих достижений в настоящем и для формирования научных программ.

Исследования на животных известны с древних времён. Так, согласно имеющимся данным, еще в VI веке до н.э. в древней Греции представитель Кротонской медицинской школы, ученик Пифагора Алкмеон путем вивисекции на животных установил роль нервов, идущих от органов чувств (глаза и уши) к мозгу [4, 5]. Аристотель в работе «История животных» закладывает основы сравнительной анатомии, а в работе «О душе» — сравнительной психологии. Аристотель — биолог и философ, с одинаковым интересом наблюдавший как строение червя и моллюска, так и движение звёзд — ввёл понятие «энтелехия», учение о внутренней силе, потенциально заключающей в себе цель и окончательный результат. В работе «О душе» Аристотель развивал антропоцентристские представления в этике. *Антропоцентризм выступает в качестве кардинальной линии во все времена, и либо усиливается, либо ослабевает в зависимости от других мировоззренческих позиций той или иной эпохи.*

Нет сведений о том, что в период от Алкмеона до Аристотеля вскрывали человеческие трупы в научных целях. Известно о вскрытиях человеческих трупов, предпринятых Александрийскими врачами Герофилом и Эразистратом (320-е г. до н.э.) [6—8]. И в то время был сделан вывод, что кровь закладывается только в венах, в артериях же обращается один воздух. Это ошибочное представление, как подчеркивал И.П.Павлов, связано с тем, что Эразистрат изучал только трупы и не использовал метод вивисекции на животных [9]. И только в начале нашей эры Римский врач К.Гален (130—200 гг.), накладывая лигатуры на артерии живых коз в двух местах, показал, что в артериях содержится кровь, а не воздух. Гален также оперировал на свиньях и обезьянах, и объяснял это тем, что строение органов этих животных наиболее похоже на строение человеческих органов. Но он не проводил публичные операции на обезьянах, мотивируя это тем, что вид этих животных, и то, как они выражают свои страдания, производят тягостное впечатление на присутствующих [10]. Свинья послужила Галену основным объектом изучения мышечной системы, костей и суставов, пищеварения, физиологии мочеточников, движения, зрения, дыхания. По мнению некоторых, авторов Галена можно назвать основателем нейрофизиологии, в частности он обнаружил, что если у свиней перерезаны нервы, идущие к гортани, животные утрачивают способность издавать звуки, и сделал вывод, что гортанью управляют собственные нервы [11]. По-

пытка глубже разобраться в строении и функции человеческого тела привела Галена к методам сравнительной анатомии, но перенос анатомических данных с животных на человека послужил источником многих ошибок в его анатомических взглядах, и впоследствии они были опровергнуты, главным образом, работами Везалия. В связи с этим уместно привести слова знаменитого австрийского философа К. Поппера «Опровержения часто рассматривались как неудача ученого или, по крайней мере, созданной им теории. Следует подчеркнуть, что это — индуктивное заблуждение. Каждое опровержение следует рассматривать как большой успех, и успех не только того ученого, который опроверг теорию, но также и того ученого, который создал опровергнутую теорию и тем самым первым, хотя бы и косвенно, предложил опровергаемый эксперимент» [12]. Творчество Галена является завершающим этапом античной медицины. Достижения античных врачей и философов оказали значительное влияние на развитие науки и этики в последующие периоды.

С крушением античного мира в Западной Европе преобладали религиозные догмы. Христианский богослов Августин Аврелий (354—430 гг.) утверждал, что без веры нет знания, нет истины. Если в Античности превалировало стремление к знанию, то в средние века проявляется тенденция перехода от знания к вере, от разума к воле. Августин признавал, что животные чувствуют боль, но не считал нужным уподоблять боль животных таковой у человека по той причине, что у животных, как он полагал, отсутствует рациональная душа [13]. В период раннего Средневековья центр научной мысли перемещается из Римской империи в Арабский мир. Благодаря арабам сохранились тексты медиков и философов Древней Греции и Рима. Постулаты Корана запрещали изучение трупов, поэтому арабские медики часто в исследованиях использовали животных, в частности, для оценки действия лекарств [14]. В странах Европы на пороге XII и XIII веков активизируется философское мышление. Труды Аристотеля католическая церковь вначале запретила, но затем принялась «осваивать» их, адаптировать соответственно своим нуждам. С этой задачей успешно справился Фома Аквинский (1225—1274), учение которого (*Summa Theologica*) позже было канонизировано в папской энциклике (1879) как истинно католическая философия. Аквинский же отстаивал одну истину — религиозную, «нисходящую свыше». Он, как и Аристотель признавал прогрессивное усложнение жизни от растений к человеку и отмечал, что растения и животные существуют ради пользы человека. В средние века не были созданы новые научные программы в области биомедицины: деятели того времени пользовались достижениями античных врачей, особенно Галена, пытаясь внести в них новое истолкование. Запрет религией анатомирования трупов и вивисекции препятствовал прогрессу научного знания, но не смог его остановить [15]. В XVI веке появляются сведения об исследованиях на животных, которые проводились в медицинских учебных заведениях Италии. Католическая церковь запрещала вскрытие человека, и поэтому животные использовались в качестве физиологических и анатомических моделей [16].

Историки медицины отмечают, что в XVII веке многие фундаментальные открытия в физиологии были получены в экспериментах на животных. Так, в 1628 году Гарвеем было описано кровообращение, перед этим он про-

извёл многочисленные эксперименты на животных разных видов (Harvey, 1628), Пеке демонстрировал функции лимфатической системы у собак (Pescue, 1647), а Глиссон — функции печени (Glisson, 1654). Мальпиги с помощью микроскопа открыл кровеносные капилляры в легких лягушки (Malpighi, 1661). Гук описал функцию легких у кролика (Hooke, 1667), Хейлс измерил артериальное давление крови лошадей (Hales, 1733) [6, 17, 18].

Открытие Гарвеем кровообращения считается датой основания физиологии. И не только потому, что впервые была изучена одна из важнейших функций организма, но и потому, что само открытие кровообращения стало возможным благодаря методу вивисекции на животных.

В то же время Р. Декарт (Descartes 1596—1650) открыл всеобщие принципы функционирования живых систем и предложил схему рефлекса. Декарт считал, что существуют несводимые друг с другом две субстанции — душа и тело. У животных, по его мнению, нет души, и они не могут рационально мыслить. Декарт ориентировался на модель организма как механически работающей машины. Тем самым живое тело, которое во всей прежней истории знаний рассматривалось как одушевленное, т.е. управляемое душой, освобождалось от ее влияния. Философский трактат «Рассуждение о методе» (1637) известен как источник знаменитой фразы: «Я мыслю, следовательно, я существую» (*Cogito ergo sum*). Декарт считал животных нечувствительными механизмами, а реакцию животных на боль — простым ответным рефлексом, напоминающим действия автомата. В качестве примеров рефлекторного действия Декарт приводил мигание при внезапном появлении предмета перед глазами или отдергивание руки от огня, и называл эти движения произвольными [19]. Однако картезианские представления о животных как о нечувствительном механизме разделялись не всеми. Так, Вольтер писал: «Отвечай, ты, полагающий, что организм — машина, неужели природа вложила в это животное органы чувств, чтобы оно ничего не ощущало? Неужели оно обладает нервами для того, чтобы быть бесчувственным? Не приписывай природе такое безрассудное противоречие» [20]. Английский врач-физиолог Р. Витт (Whytt, 1763) развил новый взгляд на рефлекс, введя понятие «чувственный принцип» (*sentient principle*), подразумевающий постоянное наличие в центральной нервной системе чувственного элемента, который, благодаря внешнему стимулу, способствует организации того или иного ответного акта. Так, Витт писал, что свет, падающий на глаз, вызывает сужение зрачка не потому, что он действует на него непосредственно, а потому, что между стимулом и реакцией в качестве посредника выступает нематериальный фактор — *чувство*. Витту были известны эксперименты с удаленным головным мозгом. Он вынужден был чувственный принцип распространить и на спинной мозг, предвосхищая тем самым теорию «спинномозговой души» Пфлюгера, более того, он вынужден был распространить чувственный принцип и на изолированные мышцы. Как отмечал П.К. Анохин, недаром Витт получил философскую оценку от историков медицины, назвавших его «полуанимистом» [21].

В XVII веке и конце XVIII века превалировала механистическая картина природы, классическая механика стала методологической основой стратегии научного поиска. В этот период эксперименты на животных были частыми, инвазивными и болезненными. Физиолог XVII века был

аналитиком, дробил и разъединял живой организм. В этот период вивисекция становится, чуть ли не синонимом науки, что вызывало протесты общественности. Как протестовавшие против экспериментов на животных, так и исследователи, и философы в большинстве придерживались антропоморфных представлений о животных — животные чувствуют боль и страдают, как и человек. В отличие от этого, немецкий философ И. Кант (1724—1804) не разделял антропоморфные взгляды на животных, но отстаивал культуру сочувствия к животным, как необходимое условие нравственного достоинства человеческой личности. В труде «Метафизика нравов» он выразил свое эстетическое и этическое отношение, как к неживой, так и живой природе. «В отношении прекрасного», — пишет Кант, — «хотя и неживого в природе, склонность к разрушению противна долгу человека перед самим собой». Однако, по его мнению, жестокое отношение к животным «еще более противно долгу человека перед самим собой». Кант допускает вивисекцию лишь в исключительных случаях, если ей нет альтернатив. «Мучительные же физические опыты в интересах лишь одной спекуляции, если цель могла бы быть достигнута и без них, отвратительны» [22]. Кант был одним из первых, провозгласившим принцип о недопустимости причинения подопытному животному ненужного мучительства («*unnötig zu qualen*») [23].

В основе отношения человека к животным в Великобритании лежала философия утилитаризма, согласно которому все действия должны оцениваться с точки зрения их последствий, а действие считается правильным, если в результате превалирует польза для большинства людей. Видный представитель утилитаризма, английский правовед Дж. Бентам (J. Bentham, 1789) писал: «Вопрос не в том, могут ли животные думать и могут ли они говорить, а могут ли они страдать?». Бентам допускал использование животных в качестве средства для удовлетворения человеческих потребностей, только если польза перевешивает вред, который наносится животному [24]. Врач и физиолог М. Холл (M. Hall, 1790—1857), предложил основные принципы использования животных в эксперименте с целью дискуссии об этом в научном сообществе: использовать животных только тогда, когда отсутствуют альтернативы; когда ясна цель исследования; исключать повторение опыта, когда достаточен только один; минимизировать боль и страдания животных. М. Холл также писал, что необходима полная и подробная публикация результатов экспериментов [3, 18].

Можно выделить два основных подхода к вопросу отношения к животным — утилитарный и правовой подход. Главное их различие заключается в определении этичности поступка. Утилитаристы судят об этичности поступков по их последствиям. Сторонники же правового подхода считают, что поступок, независимо от его последствий, является либо этичным, либо нет.

В первой половине XIX века произошел резкий рост научных исследований в Великобритании и других странах. В 1811 году английский невролог Чарлз Белл опубликовал трактат о новой анатомии мозга, в котором показал различие функций задних и передних корешков спинномозговых нервов [25]. В 1922 году открытие Белла было независимо подтверждено французским физиологом Ф. Мажанди, который сообщил об экспериментах на собаках, приведших его к открытию двигательной функции передних и чувствительной функции задних корешков

спинномозговых нервов [26, 27]. Когда в 1824 году Мажанди посетил Лондон и демонстрировал там свои опыты, некоторые члены Палаты общин Британии резко выступили против вивисекционных опытов. Даже спустя много лет после смерти Мажанди британские антививисекционисты писали о нем как о «чудовище вивисекции», который был, по их мнению, «самым отъявленным преступником, когда-либо жившим» [28]. Закон Белла-Мажанди — это крупное достижение первой половины XIX века, его сравнивают по значению для физиологии с открытием Гарвеем кровообращения.

В середине XIX века в развитии науки о жизни произошли революционные события. Наиболее крупные из них касались эволюционного учения Ч. Дарвина, клеточной теории Т. Шванна, учения о постоянстве внутренней среды К. Бернара. В это же время Р. Вирхов обосновал клеточную теорию патологии, сложились представления об инфекционных процессах и иммунитете (Пастер, Кох, Мечников). В 1865 году Г. Мендель сформулировал ряд основополагающих закономерностей наследственности, которые получили признание и развитие лишь в начале XX века. Во второй половине XIX века, во многом под влиянием К. Бернара, понимание сущности процессов живых систем существенно изменилось, наметился переход от механицизма к биологическому детерминизму. Все жизненные механизмы, по К. Бернару, сколь бы разнообразными они не были, служат одной-единственной цели — сохранению постоянства условий внутренней среды организма. К. Бернар подчеркивал, что клетки как части организма всегда подчинены его системной целостности. Уже в XX веке американский физиолог У. Кеннон, расширив учение К. Бернара о постоянстве внутренней среды, сформулировал концепцию гомеостаза (Cannon, 1922). Смена парадигмы механицизма на биологический детерминизм под влиянием Дарвина и Бернара изменила не только понимание сущности биологических процессов, но и повысила «этическую планку» отношения к живой природе.

Движение против вивисекции значительно усилилось в 1860-х годах. В 1874 году французский ученый Е. Magnan в Британской медицинской ассоциации продемонстрировал индукцию экспериментальной эпилепсии у собаки путем внутривенной инъекции абсента. Королевское общество по предупреждению жестокости к животным (RSPCA) возбудило уголовное дело за жестокость продемонстрированного эксперимента. Magnan, срочно вернулся во Францию, чтобы не отвечать на обвинения [3, 29]. В 1875 году Британская журналистка Ф.П. Кобб (Frances Power Cobbe 1822—1904) основала первую в мире организацию, выступающую против вивисекции, и обратила внимание правительства на жестокости в отношении экспериментальных животных. В 1876 году в Британии был принят закон, регулирующий использование животных для научных исследований — «Cruelty to Animals Act», 1876 [30]. В подготовке этого первого в мире закона, принимал участие Ч. Дарвин [31].

К. Бернар не поддерживал антививисекционистов. «Непосредственным предметом занятий экспериментальной медицины», — пишет К. Бернар, — «является не человек, но животное: человек — это только цель, который всегда присутствует в мыслях, но он остается вне опасных опытов». «В наше время этика справедливо осудила бы самым решительным образом», — пишет К. Бернар, —

«всякий опыт на человеке, который мог бы повредить пациенту или не имел бы целью явной и непосредственной пользы» [32]. Полностью сохранила свое значение высказанная К. Бернаром мысль, что «нужно думать не столько об увеличении числа физиологических экспериментов, сколько о том, чтобы свести их к небольшому количеству решающих опытов» [28]. К. Бернар впервые сформулировал методологические основы медицинского эксперимента на животных, во многом превосходящая основные положения, отраженные в труде «Логика и рост научного знания» К. Поппера [12] — крупнейшего специалиста в области философии и методологии науки XX века.

Весьма знаменательно, что в год принятия английского закона об экспериментах на животных («Cruelty to Animals Act» 1876) немецкий врач Р. Кох опубликовал работу «Этиология сибирской язвы», где экспериментально на животных впервые доказал, что бактерии могут вызвать заболевание у животных и человека [33], открыл палочку туберкулеза и разработал методы культивирования бактерий. В это же время 1878 году Луи Пастер получил вакцину против сибирской язвы. В 1882 году Пастер приступил к изучению бешенства. В ходе научной работы возникла необходимость в трепанации черепа у собаки для введения инфекционного материала, но Пастер не дал согласия на такую операцию, обеспокоенный тем, что для животных эта процедура будет слишком мучительна. И только после того как его сотрудник Э. Ру (без ведома Пастера) под наркозом, успешно провел эту операцию, Пастер вынужден был дать согласие на такую операцию [34]. Работы под руководством Пастера показали, что введение на протяжении нескольких недель все менее ослабленных вытяжек тканей спинного мозга кролика собакам обеспечивало полную защиту собак от бешенства. Впервые от этого смертельного заболевания был спасен 9-летний Йозеф Майстер 6 июля 1885 года [35]. В лабораториях разных стран мира наладили производство подобных вытяжек. От бешенства перестали умирать. *Эти известные факты приводятся как примеры конфликта между этическим принципом благоговения перед жизнью и использованием человеком животных в эксперименте с целью самосохранения.*

Открытие микроорганизмов стимулировало работы по выращиванию животных в стерильных условиях и становлению гнотобиологии как новой научной дисциплины. Первая попытка получения безмикробных морских свинок была предпринята в 1895 году Д. Нуттлем и Г. Тирфельдером [36]. В лаборатории И.И. Мечникова также были предприняты усилия для получения безмикробных цыплят, головастика лягушек и мух [37]. Указанные опыты не позволили тогда убедительно ответить на вопрос, возможна ли жизнь без микробов. Прорыв в гнотобиологической технологии был связан с производством надежных гнотобиологических изоляторов в XX веке. В 1963 году появилась монография Т.Д. Лаки «Жизнь без микробов и гнотобиология» [38]. Гнотобиологические подходы легли в основу стандартизации лабораторных животных по микробному фактору. На данном этапе применяются различные варианты категоризации качества лабораторных животных по принципу микробной контаминации: *конвенционные животные* — обычные, не содержащие патогенной флоры, находящиеся в открытой системе близких к естественным условиям содержания, *животные свободные от специфических возбудителей инфекционных заболева-*

нии (SPF — Specific Pathogen Free) и *безмикробные животные* (germfree). Гнотобиот (греч. Gnotos — известный, и флора и фауна) — термин Лаки (Luskey, 1963), обозначает животных (организмы) с известным микробиологическим статусом или свободных от микробов. Использование гнотобиотов легло в основу многих исследований на новом методологическом уровне.

К. Бернар и Р. Вирхов, восприняв одно из крупных завоеваний первой половины XIX века — открытие клетки, не приняли другое очень важное завоевание биологии — эволюционную теорию Дарвина. Этот пробел заполнил И.И. Мечников (1845—1916), спроецировав понятие о целесообразности на клеточный уровень, как реакцию клеток организма на преодоление болезнетворного фактора. И.И. Мечникова по праву считают основоположником междисциплинарного синтеза эволюционной теории и медицины, а также одним из родоначальников иммунологии. И.И. Мечников использовал в своих исследованиях животных разных видов, начиная от беспозвоночных до высших приматов. Он писал: «Великие законы, управляющие инфекционными болезнями, и ценные средства борьбы с ними никогда не были бы найдены без вивисекции или даже при одном ограничении ее. Для того чтобы оправдать вивисекцию, ученые становятся на точку зрения теории утилитарной нравственности, оправдывающей всякое средство, полезное человеку» [39].

Большим прорывом в экспериментальной медицине на рубеже XIX и XX веков следует считать разработанный И.П. Павловым метод физиологического синтеза, взамен острого эксперимента, что привело к освобождению животных от «излишнего вреда», сокращению количества животных, используемых в эксперименте и повышению эффективности научных результатов [9, 40]. Понятие о целесообразности, считал Павлов, должно быть непременно сохранено, но в контексте принципа системности. Термины павловского языка (сигнал, подкрепление, временная связь и др.) могут выступить как в физиологическом, так и в психологическом ракурсе, и делают более понятными механизмы гомеостаза. Исключительность человека как системы Павловым усматривалась в том, что саморегуляцию поведения человека обеспечивают две сигнальные системы. Для животных действительность сигнализируется почти исключительно только раздражениями и следами их в больших полушариях, непосредственно приходящими в специальные клетки зрительных, слуховых и других рецепторов организма. Это первая сигнальная система действительности, общая у нас и животных. Но слово составило вторую, специальную нашу сигнальную систему действительности, будучи сигналом первых сигналов. Эти мысли были впервые изложены Павловым в статье «Условный рефлекс», которую Павлов написал по заказу «Большой медицинской энциклопедии». *Идея рефлекса, предложенная Декартом, стимулировала аналитический подход в физиологии, тогда как открытие Павловым условного рефлекса ознаменовало переход от аналитического подхода к методу физиологического синтеза, от физиологии спинного мозга к учению о высшей нервной деятельности (поведение).*

Работы И.П. Павлова легли в основу возникновения бихевиоризма — науки о поведении. Американский ученый Дж. Уотсон (1878—1958) в качестве основной единицы поведения животного и человека рассматривал жесткую схему: «стимул → реакция». Другой американец

Э. Толмен для объяснения своих данных ввел представление о промежуточных переменных, т.е. внутренних (когнитивных) процессах. Эти процессы «вклиниваются» между стимулом и ответной реакцией, и хотя они недоступны прямому наблюдению, но, тем не менее, они могут быть исследованы строго объективно, по их функциональному проявлению в поведении [41]. Применительно к бихевиоризму принято говорить о классическом и неклассическом (когнитивном) бихевиоризме, но в литературе нет сведений о постнеоклассическом (трансцендентном) бихевиоризме. Вместе с тем, создание науки о поведении на новом методологическом уровне, учитывающим не только биологические, но и нравственные потребности (способность выбора между добром и злом), могло бы способствовать более осмысленному проведению линии демаркации между животным и человеком и соответственно их правами [42, 43].

Теория эволюции, учение о гомеостазе и высшей нервной деятельности (поведении), а также учение о второй сигнальной системе делают возможным рассматривать жизнь и поведение животных вне рамок «механицизма» и «антропоморфизма». Это позволяет смягчать противоречия между утилитаризмом и правовым подходом в отношении животных, между сторонниками и противниками использования животных в научных исследованиях.

В начале XX века произошло революционное событие — переоткрытие законов генетики. В 1903 году В. Иогансен (Johannsen 1857—1927) на основе опытов с инбредными линиями бобовых растений развил учение о чистых линиях. Предложенные Иогансеном понятия — *генотип, фенотип, ген, чистая линия* — стали основными понятиями генетики и были использованы при выведении множества различных, генетически контролируемых, линий лабораторных животных. Первая инбредная линия мышей для научных исследований была получена в 1909 году К. Литтлом в США линия DBA (C.C. Little). К этому времени уже было известно, что органы, пересаженные от генетически различных особей, отторгаются. В 40-е годы Дж. Снелл (Snell), используя инбредных мышей для выделения генов, отвечающих за отторжение трансплантата, открыл область в хромосоме, получившую название *главный комплекс гистосовместимости* (Major histocompatibility complex — МНС) [44]. Это открытие стало основой подбора доноров для успешной трансплантации тканей и органов. Вторым (после мышей), наиболее часто используемым в лабораториях, животным является крыса. Наиболее распространенный в мире сток лабораторных крыс создан в институте «The Wistar Institute of Anatomy and Biology». Этот сток образовался из четырех пар белых крыс, принесенных туда Н.Н. Дональдсоном из Чикагского университета. С этого времени (1906) начались работы по стандартизации крыс для научных экспериментов [45]. Эта порода лабораторных крыс-альбиносов до сих пор является наиболее часто используемой во всем мире. В этот период начали разводить и других генетически однородных животных (морские свинки, хомяки, кролики). Отдельно следует отметить, что в начале XX века был сформулирован закон популяционной генетики — закон Харди—Вайнберга. Этот закон послужил стимулом для разработки в 60-е годы XX века методов разведения аутбредных животных по схеме максимального избегания инбридинга в колониях с ограниченным количеством особей [46]. В США в первой четверти XX века уже существовали два

профильных учреждения по лабораторным животным — Институт Вистар, основанный 1892 году и Джексонская лаборатория, в которой содержится множество лабораторных животных разных линий.

Необходимость адекватного использования лабораторных животных для моделирования патологических процессов и испытания лекарств потребовала выращивания и использования для биомедицинского эксперимента только здоровых, стандартных животных с определенными биологическими характеристиками. Возникла идея об отдельной дисциплине. В 1944 году в США на первой конференции по содержанию колоний лабораторных животных было заявлено о выделении новой отрасли знания — «науки о лабораторных животных» (laboratory animal science). Были определены следующие ее направления: болезни лабораторных животных, их кормление, разведение и генетика, содержание лабораторных животных [47]. С наукой о лабораторных животных тесно связаны проблемы моделирования болезней человека. М. Фестинг указывает, что смысл модели состоит не в том, чтобы иметь животное, подобное человеку, а в том, чтобы изучить какое-либо воздействие или патогенез заболеваний в более чистом виде и более короткие сроки [48].

В 1956 году под эгидой ООН по инициативе UNESCO, Совета международных медицинских научных организаций (CIOMS) и Международного научно-биологического союза (IUBS) образован Международный Совет по науке о лабораторных животных — ICLAS, который является неправительственной организацией, координирующей развитие науки о лабораторных животных в мире. ICLAS развивает международное сотрудничество по контролю за качеством и характеристиками лабораторных животных, собирает и распространяет информацию, способствует гуманному обращению с экспериментальными животными, ведет учебную работу, сотрудничает с ВОЗ, издает «ICLAS-Bulletin», каждые четыре года организует Генеральную Ассамблею с научным симпозиумом [42, 49].

С 60 годов XX века возникли национальные центры по лабораторным животным в Великобритании, США, Франции, ФРГ, СССР, а также в Японии, Китае, Австралии, Аргентине, Южно-Африканском Союзе. Большое внимание развитию науки о лабораторных животных в СССР уделяли академики АМН Б.В. Петровский, В.Д. Тимаков, А.М. Чернух, Н.А. Федоров, Б.А. Лапин, Н.П. Бочков, Г.Н. Крыжановский, А.А. Кубатиев и академики АН Ю.А. Овчинников, Р.В. Петров, О.Г. Газенко. В 1970 году генеральный секретарь Международного Совета по науке о лабораторных животных (ICLAS) С. Эриксен (S. Erichsen), посетивший АМН СССР, оставил свои пожелания в отношении развития науки о лабораторных животных в России и подчеркнул, что лекарства могут быть конкурентноспособными только тогда, когда они проконтролированы на стандартизованных лабораторных животных. В 1975 году Правление ICLAS в здании АМН СССР провело научную конференцию по науке о лабораторных животных. В то время национальным представителем от СССР в ICLAS был специалист в этой области В.А. Душкин. В 1980 году вышел сборник материалов всесоюзной конференции «Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных» под редакцией А.М. Чернуха и В.А. Душкина. Во вступительной статье Академик АМН СССР А.М. Чернух отметил: «Поскольку

эксперименты проводятся на животных, которые значительно отличаются друг от друга в эволюционном отношении, каждый результат эксперимента должен оцениваться с позиции сравнительной патологии, поскольку конечной целью является разрешение клинических проблем болезни человека. ... Принципом экспериментатора является — никаких напрасных мучительств животных, не оправданных необходимостью клиники!». Приоритетным было развитие в СССР приматологии. В 1927 году была создана в Сухуми «Станция по разведению обезьян Московского института эндокринологии», которая в 1957 году получила статус Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии АМН СССР (НИИ ЭПТ АМН СССР). С 1958 года Институт возглавил Б.А. Лапин, под руководством которого институт превратился в приматологический центр. Посетивший в начале 60-х годов XX-го столетия этот Центр доктор J. Watt (директор Национального кардиологического института США) отметил значимость НИИЭПТ как крупного исследовательского учреждения по исследованиям на приматах [50]. Академик Б.А. Лапин неоднократно подчеркивал, что «к обезьяне как к объекту исследования следует обращаться только в следующих случаях: когда цель эксперимента связана с решением важного глобального вопроса; при отсутствии альтернативных биологических моделей; когда испытываемому виду не угрожает исчезновение, или, что предпочтительнее, когда используются обезьяны, рожденные в питомниках».

С 1992 года действует Российский Национальный комитет по биоэтике (РНКБ) под руководством академика Р.В. Петрова и член-корр. РАН Б.Г. Юдина под эгидой Российской Академии наук. В 1993 году по инициативе академика РАН О.Г. Газенко, проф. А.М. Генина и И.Д. Пестова в Институте медико-биологических проблем РАН (ранее Министерства здравоохранения РФ) создана биоэтическая комиссия ИМБП РАН. Эта комиссия значительное внимание уделяет этической экспертизе планов научных экспериментов с использованием животных. В настоящее время в ИМБП РАН под руководством д.м.н. Е.А. Ильина действует «Комиссия по биомедицинской этике», которая состоит при физиологической секции Российского комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО.

Начиная с 70-х годов прошлого столетия теоретические вопросы этики отношения к животным стали приобретать особую актуальность. В 1975 году английский психолог Р. Рейдер ввел термин «видовой шовинизм» (Speciesism) для обозначения дискриминации человеком остальных животных [51]. Австралийский философ П. Сингер указывает, что нет никакого морального основания для неравенства в рассмотрении главных потребностей существ — человеческой и нечеловеческой природы. П. Сингер — приверженец утилитаризма и допускает использование животных в эксперименте, если это приносит пользу человечеству [52]. В отличие от этого американский философ Т. Реган стоит на почве правового подхода. Он сторонник строгого кантианского принципа — никого не следует приносить в жертву ради чего-либо [53]. Но не следует забывать, что сам Кант говорил об этих правилах, рассуждая только о людях. Теории прав животных разделяется не всеми. Так, философ К. Коэн (США) выступает против наделяния животных личностными характеристиками человека и утверждает, что «обладатели прав должны осознавать силу обязанностей, которые распространяются и на них самих»

[54]. Британский философ Р. Скрутон оценивает появление движения за права животных как «наиболее странный культурный сдвиг в либеральном мировоззрении». Он обвиняет защитников прав животных в «донаучном» антропоморфизме, в наделении животных характеристиками «из сказок». Понятие «право» по мнению Скрутона чуждо миру животных [55]. Видный мыслитель XX века немецкий философ-экзистенциалист М. Хайдеггер пишет: «Наверное из всего сущего, какое есть, всего труднее нам осмыслить живое существо, потому что, с одной стороны, оно неким образом наш ближайший родственник, а с другой стороны, оно все-таки отделено целой пропастью от нашего экзистирующего существа» [56]. *Между крайними точками зрения «за» и «против» использования животных в научных исследованиях лежит реальная позиция, широко поддерживаемая во всем мире — использование животных в эксперименте, если цель важна и приносит пользу обществу, соблюдение принципов гуманности.*

Лидером в деле защиты подопытных животных была и остается Британия. В 1958 году в этой стране У. Расселем и Р. Барчем были разработаны принципы гуманной методологии эксперимента — «Концепция 3Rs» (*Reduction Refinement Replacement*) [57]. 3Rs — единая концепция, в результате использования которой можно сократить количество животных в эксперименте (*Reduction*) или усовершенствовать эксперимент настолько, чтобы животные минимально испытывали боль и дистресс (*Refinement*), а также исключить их из исследований путем замены (*Replacement*) животных альтернативными методами: культура тканей и клеток (*in vitro*), срезы тканей, изолированные органы, бактерии, биохимические системы и др. В 1986 году Парламент Великобритании принял новый закон — Акт о научных процедурах на животных (*Animal Scientific Procedures Act 1986*) [58]. В этом же году Совет Европы принял «Конвенцию по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и других научных целях и Директивы Совета 86/609/ЕЕС» [59, 60]. В этих документах концепция У. Расселя и Р. Бэрча была поддержана законодательно. *Концепция трех «Rs» возникла в рамках науки о лабораторных животных и оказывает мощное влияние на ее развитие. Усиливается международная кооперация в направлении более интенсивного применения принципов трех «Rs» по совершенствованию экспериментирования на животных, выработке международных стандартов на тестирование лекарств, определению боли и разработке правил содержания лабораторных животных.*

С 1978 года функционирует Федерация ассоциаций по науке о лабораторных животных европейских стран (FELASA), которая объединила специалистов по этой проблеме. В рамках FELASA проводятся ежегодные научные конференции по различным направлениям науки о лабораторных животных. По инициативе FELASA в научных учреждениях создаются комитеты по оценке этической приемлемости научных проектов с использованием животных. В 1993 году Европейским Союзом был образован Европейский центр по валидации альтернативных методов (ECVAM), который располагается в Северной Италии. ECVAM способствует разработке альтернативных методов, проверяет и утверждает адекватность новых или уже имеющихся методов, организует научные конференции и семинары. Информация об альтернативных методах публикуется в журнале *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)*. Специальные центры по альтернативным методам действуют в США, Нидерландах, Швеции, Италии, Германии, Японии. *Успехи, достигнутые с помощью альтернативных методов, трудно переоценить, но, к сожалению, замена лабораторных животных альтернативными методами не всегда возможна.*

В настоящее время в развитых странах большое внимание уделяется ежегодным статистическим отчетам использования лабораторных животных. В отчетах указывается количество животных, вид животных, используемых по разным направлениям науки, в фармакологии и токсикологии, для обучения. Регулярно публикуются и сравнительные данные об общих количествах использованных животных (таблица).

Этот отчет свидетельствует о том, что, несмотря на развитие альтернативных методов за период с 2005 по 2012 гг., всё же отмечается в ряде стран небольшой рост общего количества используемых лабораторных животных, особенно за счет работы с генетически модифицированными животными.

Развитию медико-биологических наук в России может способствовать ведение ежегодного статистического учета количества используемых лабораторных животных в стране с подробной расшифровкой, какие виды животных и в каких направлениях науки были использованы, а также публикации этих данных в центральных научных журналах. *Анализ полученных статистических данных важен для оценки динамики развития медико-биологических наук, построения долгосрочных научных программ, повышения научной и экономической эффективности исследований, гуманизации экспериментальной медицины.*

Таблица

Сравнительные данные по количеству использованных лабораторных животных в разных странах [2]

Страны	Количество животных, используемых в эксперименте		Разница в количествах используемых животных, %
	2005 год	2012 год	
США	17 317 147	16 194 103	-6,49
Великобритания	1 874 207	2 738 500	46,12
Германия	1 822 424	1 566 377	-14,05
Канада	2 316 281	3 333 683	43,92
Франция	2 325 398	2 200 152	-5,39
Италия	896 966	781 815	-12,84
Австрия	2 389 813	2 614 834	9,42
Испания	595 597	900 127	51,13

Список литературы

1. Taylor K., Gordon N., Langley G., Higgins W. Estimates for Worldwide Laboratory Animal Use in 2005. *ATLA*. 2008; 36: 327-342.
2. *A Global View of Animal Experiments 2014*. 42pp http://www.lushprize.org/wp-content/uploads/Global_View_of-Animal_Experiments_2014.pdf. Дата обращения: 29.09.2017
3. *The ethics of research involving animals*. Nuffield Council on Bioethics. UK. London: Latimer Trend & Company Ltd, 2005. 335 p.
4. Hirschberg J. Alkmaion's verdienst um die Augenkunde. *Arch. Ophthalmol.* 1921; 105: 129-133.
5. Моковельский А.О. *Досократики*. Ч. 1. Казань: Издание книжного магазина М.А. Голубева: 200-210.
6. Singer C. *A Short History of Anatomy and Physiology from the Greeks to Harvey*. New York: Dover, 1957. 209 p.
7. *The Herophilus the Art of Medicine in Early Alexandria* / Ed. Heinrich von Staden. UK: Cambridge University Press, 1988. 651 p.
8. Russo L. *The forgotten revolution: how science was born in 300 BC and why it had to be reborn*. Berlin: Springer, 2004. 492 p.
9. Павлов И.П. *Живосечение*. В кн.: Эйленбург А., Афанасьев М. Реальная энциклопедия медицинских наук. Т. 7. СПб.: Тип. Эттингера, 1893: 238-247.
10. Guerrini A. Experimenting with Humans and Animals: From Galen to animal rights. *JAMA*. 2004; 291: 2133-2134.
11. Fulton J.F. *Selected Readings in the History of Physiology*. Baltimore: Springfield, 1930. 251 p.
12. Поппер К.Р. *Логика и рост научного знания*. М.: Прогресс, 1983. 606 с.
13. Regan T., Singer P. *Animal Rights and Human Obligations*. USA, Prentice Hall: Upper Saddle River: 1989.
14. Bunch B., Hellems A. *The History of Science and Technology*. Boston: Houghton Mifflin Company, 2004. 785 p.
15. Cohen B.J., Loew F.M. *Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives*. In: *Laboratory Animal Medicine*. Ed. J.G. Fox, B.J. Cohen and F.M. Loew. Chapter 1. Orlando: Academic Press, 1984: 1-17.
16. Hill R.B., Anderson R.E. *The Autopsy — Medical Practice and Public Policy*. London: Butterworth, 1988. 320 p.
17. Smith I.B. The impact of Stephen Hales on medicine. *J. Roy. Soc. Med.* 1993; 86: 349-352.
18. Rupke N.A. *Vivisection in Historical Perspective*. London: Crom Helm, 1987.
19. Fearing F. Reflex action. *A Study in the History of Physiological Psychology*. Cambridge: MIT Press, 1970. 335 p.
20. Вольтер. *Бог и люди*. Том 2. 1960. М.: Издательство АН СССР, 1960. 426 с.
21. Анохин П.К. *От Декарта до Павлова*. М.: Медгиз, 1945. 170 с.
22. Кант И. *Сочинения в 6 томах*. М.: Мысль, 1965: 4 (2): 381-383.
23. Wittke G. *Kommentar zu den ethischen Leitsätzen*. Deutsche Tierärzteschaft E.V. Codex experiendi (Leitsätze für Experimente mit Tieren) Stand von 27.9.1983: 14-29.
24. Remfry J. *Ethical aspects of animal experimentation*. In: *Laboratory Animals: An Introduction New Experimenters* / Ed. A.A. Tuffery. Chichester: J.Wiley and Sons Ltd., 1987: 25-30.
25. Bell Ch. *An Idea of a New Anatomy of the Brain; submitted for the observations of his friends*. London: Privately printed pamphlet, 1811.
26. Magendie F. Experiences sur les fonctions des racines des nerfs rachidiens. *Journal de physiologie experimentale et de pathologie*, 1822; 2: 276-279.
27. Magendie F. Experiences sur les fonctions des racines des nerfs qui naissent de la moëlle epiniere. *Journal de physiologie experimentale et de pathologie*, 1822; 2: 366-371.
28. Карлик Л.Н. *Клод Бернар*. М.: Наука, 1964. 267 с.
29. Ноплей Е. *Campaigning Against Cruelty — The hundred year history of the British Union for the Abolition of Vivisection*. London: BUAV, 1998.
30. Radford M. *Animal Welfare Law in Britain: Regulation and responsibility*. Oxford: Oxford University Press, 2001.
31. Hume C.W. *The legal protection of laboratory animals*. In: *The UFAU Handbook on the care and management of laboratory animals*. London: UFAU, 1957: 1-14
32. Бернар К. *Лекции по экспериментальной патологии*. М.-Л.: Изд-во Наркомздрава СССР, 1937. 512 с.
33. Koch R. Die Aetiologie der Milzbrand — Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis. *Beilage Biologie der Pflanzen*. 1876; 2: 277-310.
34. Ульянкина Т.И. *Зарождение иммунологии*. М.: Наука. 1994. 318 с.
35. Friedman M., Friedland G.W. *Medicine's 10 greatest discoveries*. New Haven -London: Yale Univ. Press, 1998. 296 p.
36. Nuttal G., Thierfeld H. Weitere Untersuchungen über bakterienfreie Tiere. *Arch. Physiol.* 1886: 365-364.
37. Чахава О.В. Мечников и гнотобиология. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1970. (5):14-18.
38. Luckey T.D. *Germfree life and gnotobiology*. New York: Academic Press, 1963. 512 p.
39. Мечников И.И. *Наука о нравственности*. В кн. Академическое собрание сочинений. Т. 12. М.: Гос. изд-во мед. литературы, 1956: 242-262.
40. Kopaladze R.A. Ivan Pavlov's view on vivisection. *Integrative Physiological and Behavioural Science*. 2000. (4): 266-271.
41. Tolmen E.C. *Purposive behavior in animals and men*. N.Y. — London, 1932. 343 p.
42. Kopaladze R.A. *Transcendental behaviorism*. In: *Neuroscience for medicine and psychology: XII International interdisciplinary congress*. Sudak, Crimea, Russia, June 1-11, 2016. Proceeding of Congress. Edited by E.V. Loseva, A.V. Kruchkova, N.A. Loginova. Moscow: MAKSPress, 2016: 220.
43. Kopaladze R.A. *Plurality of possible worlds, a method of comparative analyses of animals' and man's right*. In: *Frontiers in Laboratory Animal Science — XI ICLAS General Assembly and Joint Conference of ICLAS, ScandLAS and FinLAS*. Finland, Helsinki, July 2-6 1995: 160.
44. Бландова З.И., Душкин А.В., Малашенко А.М., Шмидт Е.Ф. *Линии лабораторных животных в медико-биологических исследованиях*. М.: Наука. 1983. 190 с.
45. Logan C.A. Before there were standards: the role of test animals in the production of empirical generality in physiology. *Journal of the History of biology*. 2002. 35: 329-363.
46. Festing M.F.W., Kondo K., Loosli R., Pooley S.M., Spiegel A. International standardized nomenclature for outbred stocks of laboratory animals. *ICLA Bull.* 1972. 30: 4-17.
47. Yager R.H., Anderson M.J. *Laboratory Animal Science in the United States*. In: *Proceeding of the ICLAS Asian Pacific Meeting on Laboratory Animals*. Tokyo, Inuyama: 1973: 61-71.
48. Festing M. In: *Animal Quality and Models in Biomedical Research*. Stuttgart. 1980, 59-66.
49. Hanninen O. Biomedical research needs laboratory animal science: International Collaboration. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*. 1995; 22 (Suppl.1): 19-29.
50. Bownden D.M., Smith O.A. The Russian primate center's international impact on biomedical research. *Baltic Journal of Laboratory Animal Science*. 2001. 2: 70-73.
51. Ryder R. *Victims of Science: The Use of Animals in Research*. London: Open Gate Press, 1975. 279 p.
52. Singer P. *Animal Liberation*. New York: HarperCollins, 1975. 297 p.
53. Regan T. *The Case for Animal Rights*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 1983. 243 p.
54. Cohen C. The Case for the Use of Animals in Biomedical Research. *New England Journal of Medicine*, 1986; 315(14): 865-870.
55. Scruton R. *Animal rights and wrongs*. London: Creative Commons, 2000. 109 p.
56. Хайдеггер М. *Время и бытие*. М.: Республика, 1993. 445 с.
57. Russell W.M.S., Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Ltd., 1959. 238 p.
58. Balls M. Animal (Scientific Procedures). Act 1986: The Animal Procedures Committee. *ATLA*. 1986. 14(1): 6-13.
59. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes*. Strasbourg: Council of Europe, 1986. 51 p.
60. Council Directive of 24 November 1986 on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animals Used for Experimental and Other Purposes Directive (86/609/EEC). *Official Journal of the European Communities*. 1986; 262: 1-29.

References

1. Taylor K., Gordon N., Langley G., Higgins W. Estimates for Worldwide Laboratory Animal Use in 2005. *ATLA*. 2008; 36: 327-342.
2. *A Global View of Animal Experiments 2014*. 42pp http://www.lushprize.org/wp-content/uploads/Global_View_of-Animal_Experiments_2014.pdf. Дата обращения: 29.09.2017
3. *The ethics of research involving animals*. Nuffield Council on Bioethics. UK. London: Latimer Trend & Company Ltd, 2005. 335 p.

4. Hirschberg J. Alkmaion's verdienst um die Augenkunde. *Arch. Ophthalmol.* 1921; 105: 129-133.
5. Mokovelskiy A.O. *Dosocratiki*. Ch.1. Kazan: Издательство, 1914: 200-210. (in Russian)
6. Singer C. *A Short History of Anatomy and Physiology from the Greeks to Harvey*. New York: Dover, 1957. 209 p.
7. *The Herophilus the Art of Medicine in Early Alexandria* / Ed. Heinrich von Staden. UK: Cambridge University Press, 1988. 651 p.
8. Russo L. *The forgotten revolution: how science was born in 300 BC and why it had to be reborn*. Berlin: Springer, 2004. 492 p.
9. Pavlov I.P. [Vivisection]. In: [Real Encyclopedia of Medical Sciences]. V. 7. SPb: Ettinger Ed., 1893: 238-247. (in Russian)
10. Guerrini A. Experimenting with Humans and Animals: From Galen to animal rights. *JAMA*. 2004; 291: 2133-2134.
11. Fulton J.F. *Selected Readings in the History of Physiology*. Baltimore: Springfield, 1930. 251 p.
12. Popper K.R. [The logic of scientific discovery]. M.: Progress, 1983. 606 p. (in Russian)
13. Regan T., Singer P. *Animal Rights and Human Obligations*. USA, Prentice Hall: Upper Saddle River: 1989.
14. Bunch B., Hellems A. *The History of Science and Technology*. Boston: Houghton Mifflin Company, 2004. 785 p.
15. Cohen B.J., Loew F.M. *Laboratory Animal Medicine: Historical Perspectives*. In: Laboratory Animal Medicine. Ed. J.G. Fox, B.J. Cohen and F.M. Loew. Chapter 1. Orlando: Academic Press, 1984: 1-17.
16. Hill R.B., Anderson R.E. *The Autopsy — Medical Practice and Public Policy*. London: Butterworth, 1988. 320 p.
17. Smith I.B. The impact of Stephen Hales on medicine. *J. Roy. Soc. Med.* 1993; 86: 349-352.
18. Rupke N.A. *Vivisection in Historical Perspective*. London: Crom Helm, 1987.
19. Fearing F. Reflex action. *A Study in the History of Physiological Psychology*. Cambridge: MIT Press, 1970. 335 p.
20. Volter. [God and people]. V. 2. Moscow: Publishing house of the USSR Academy of Sciences. 1960. 426 p. (in Russian)
21. Anokhin P.K. [From Descartes to Pavlov]. Moscow: Medgiz, 1945. 170 p. (in Russian)
22. Kant I. *Works in 6 volumes*. Moscow: Mysl': 1965: 4 (2): 381-383. (in Russian)
23. Wittke G. *Kommentar zu den ethischen Leitsätzen*. Deutsche Tierärzteschaft E.V. Codex experiendi (Leitsätze für Experimente mit Tieren) Stand von 27.9.1983: 14-29.
24. Remfry J. *Ethical aspects of animal experimentation*. In: Laboratory Animals: An Introduction New Experimenters. Ed. A.A. Tuffery. Chichester: J. Wiley and Sons Ltd., 1987: 25-30.
25. Bell Ch. *An Idea of a New Anatomy of the Brain; submitted for the observations of his friends*. London: Privately printed pamphlet, 1811.
26. Magendie F. Experiences sur les fonctions des racines des nerfs rachidiens. *Journal de physiologie expérimentale et de pathologie*, 1822; 2: 276-279.
27. Magendie F. Experiences sur les fonctions des racines des nerfs qui naissent de la moëlle epiniere. *Journal de physiologie expérimentale et de pathologie*, 1822; 2: 366-371.
28. Karlik L.N. [Claude Bernard]. M: Nauka. 1964. 267 p. (in Russian)
29. Hopley E. *Campaigning Against Cruelty — The hundred year history of the British Union for the Abolition of Vivisection*. London: BUAV, 1998.
30. Radford M. *Animal Welfare Law in Britain: Regulation and responsibility*. Oxford: Oxford University Press, 2001.
31. Hume C.W. *The legal protection of laboratory animals*. In: The UFAU Handbook on the care and management of laboratory animals. London: UFAU, 1957: 1-14
32. Bernard K. [Lectures on experimental pathology]. Moscow — Leningrad: Izdatelstvo Narkomzdrava SSSR, 1937. 512 p. (in Russian)
33. Koch R. Die Aetiologie der Milzbrand — Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des Bacillus Anthracis. *Bitrage Biologie der Pflanzen*. 1876; 2: 277-310.
34. Ul'iankina T.I. [The emergence of immunology]. M.: Nauka, 1994. 318 p. (in Russian)
35. Friedman M., Friedland G.W. *Medicine's 10 greatest discoveries*. New Haven -London: Yale Univ. Press, 1998. 296 p.
36. Nuttal G., Thierfeld H. Weitere Untersuchungen über bakterienfreie Tiere. *Arch. Physiol.* 1886: 365-364.
37. Chakhava O.V. [Mechnikov and Gnotobiology]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology]*. 1970. (5):14-18. (in Russian)
38. Luckey T.D. *Germfree life and gnotobiology*. New York: Academic Press, 1963. 512 p.
39. Mechnikov I.I. [The science of morality]. In: [Academic collection of works]. V. 12. Akademicheskoe sobranie. Moscow, state publishing house of medical, 1956: 242-262 (in Russian)
40. Kopaladze R.A. Ivan Pavlov's view on vivisection. *Integrative Physiological and Behavioural Science*. 2000. (4): 266-271.
41. Tolmen E.C. *Purposive behavior in animals and men*. N.Y. — London, 1932. 343 p.
42. Kopaladze R.A. *Transcendental behaviorism*. In: Neuroscience for medicine and psychology: XII International interdisciplinary congress. Sudak, Russia, June 1-11, 2016. Proceeding of Congress. Edited by E.V. Loseva, A.V. Kruchkova, N.A. Loginova. — Moscow: MAKSPress, 2016: 220
43. Kopaladze R.A. *Plurality of possible worlds, a method of comparative analyses of animals' and man's right*. In: Frontiers in Laboratory Animal Science — XI ICLAS General Assembly and Joint Conference of ICLAS, ScandLAS and FinLAS. Finland, Helsinki, July 2-6 1995: 160.
44. Blandova Z.I., Dushkin A.V., Malashenko A.M., Shmidt E.F. [Lines of laboratory animals in biomedical research]. M.: Nauka, 1983. 190 p. (in Russian)
45. Logan C.A. Before there were standards: the role of test animals in the production of empirical generality in physiology. *Journal of the History of biology*. 2002. 35: 329-363.
46. Festing M.F.W., Kondo K., Loosli R., Pooley S.M., Spiegel A. International standardized nomenclature for outbred stocks of laboratory animals. *ICLA Bull.* 1972. 30: 4-17.
47. Yager R.H., Anderson M.J. *Laboratory Animal Science in the United States*. In: Proceeding of the ICLAS Asian Pacific Meeting on Laboratory Animals. Tokyo, Inuyama: 1973: 61-71.
48. Festing M. In: Animal Quality and Models in Biomedical Research. Stuttgart. 1980, 59-66.
49. Hanninen O. Biomedical research needs laboratory animal science: International Collaboration. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*. 1995; 22 (Suppl.1): 19-29.
50. Bownden D.M., Smith O.A. The Russian primate center's international impact on biomedical research. *Baltic Journal of Laboratory Animal Science*. 2001. 2: 70-73.
51. Ryder R. *Victims of Science: The Use of Animals in Research*. London: Open Gate Press, 1975. 279 p.
52. Singer P. *Animal Liberation*. New York: HarperCollins, 1975. 297 p.
53. Regan T. *The Case for Animal Rights*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 1983. 243 p.
54. Cohen C. The Case for the Use of Animals in Biomedical Research. *New England Journal of Medicine*, 1986; 315(14): 865-870.
55. Scruton R. *Animal rights and wrongs*. London: Creative Commons, 2000. 109 p.
56. Haydegger M. [Time and being]. M.: Respublika, 1993. 445 p. (in Russian)
57. Russell W.M.S, Burch R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Ltd., 1959. 238 p.
58. Balls M. Animal (Scientific Procedures). Act 1986: The Animal Procedures Committee. *ATLA*. 1986. 14(1): 6-13.
59. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes*. Strasbourg: Council of Europe, 1986. 51 p.
60. Council Directive of 24 November 1986 on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animals Used for Experimental and Other Purposes Directive (86/609/EEC). *Official Journal of the European Communities*. 1986; L262: 1-29.

Сведения об авторе

Копаладзе Реваз Александрович — кандидат биологических наук, ведущий специалист клиники подопытных животных, член «Комиссии по биомедицинской этике» — физиологической секции Российского Комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО.

Правила для авторов

К публикации в журнале «Патогенез» принимаются ранее не опубликованные работы по профилю журнала: теоретические и обзорные статьи, результаты завершённых оригинальных исследований, краткие сообщения, описания клинических случаев, рецензии на книги, комментарии читателей к ранее опубликованным статьям и письма к редактору, информация о научных мероприятиях. В соответствии с международными этическими правилами публикации научных работ (<https://publicationethics.org/>), подача к рассмотрению ранее опубликованного материала и плагиат приведут к безусловному отказу в опубликовании. Не принимаются к печати статьи, представляющие собой отдельные этапы незавершённых исследований, а также статьи, посвящённые исследованиям, выполненным с нарушением этических норм и правил и норм гуманного обращения с биообъектами.

Решение о публикации принимается редколлегией журнала после рецензирования рукописи с учетом научной значимости и актуальности представленных материалов. При рассмотрении полученных авторских материалов редакционная коллегия руководствуется «Едиными требованиями к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» (www.ICMJE.org) и «Рекомендациями для авторов по подготовке и оформлению научных статей в журналах, индексируемых в международных наукометрических базах данных», подготовленными Минобрнауки России (<http://минобрнауки.рф>). Статьи, отклоненные редакционной коллегией, повторно не принимаются и не рассматриваются.

Статья должна быть написана на русском или английском языке, представлена в одном печатном экземпляре в формате любой версии текстового редактора Microsoft Word for Windows и прислана в электронном виде на e-mail редакции. Статья должна сопровождаться направлением (сопроводительным письмом) от учреждения, где была выполнена научная работа. Направление также присылается в бумажной и электронной формах.

I. Рукопись. Направляется в редакцию в электронном варианте на адрес patoniopp2017@yandex.ru. Файл со статьей должен быть представлен в формате Microsoft Word (иметь расширение *.doc, *.docx, *.rtf).

1. Рекомендуемый объем полного текста рукописи (оригинальные исследования, лекции, обзоры), включая резюме, таблицы и список литературы, не должен превышать 6000 слов. Объем статей, посвященных описанию клинических случаев, не более 4000 слов; краткие сообщения и письма в редакцию — в пределах 1500 слов. Количество слов в тексте можно узнать через меню Word («Файл» — «Просмотреть свойства документа» — «Статистика»). Если превышение рекомендованного объема статьи, по мнению автора, оправдано, и текст не может быть уменьшен, решение о публикации принимается на заседании редколлегии по рекомендации рецензента.

2. Формат текста рукописи. Текст должен быть напечатан шрифтом Times New Roman, иметь размер 12 pt и межстрочный интервал 1,5 pt. Отступы с каждой стороны страницы 2 см. Выделения в тексте можно проводить ТОЛЬКО курсивом или полужирным начертанием букв,

но НЕ подчеркиванием. Из текста необходимо удалить все повторяющиеся пробелы и лишние разрывы строк (в автоматическом режиме через сервис Microsoft Word «найти и заменить»).

3. Файл с текстом статьи должен содержать всю информацию для публикации (в том числе рисунки с подписями и таблицы с заголовком). Структура рукописи должна соответствовать шаблону:

Русскоязычная аннотация

Название статьи.

Авторы статьи. При написании авторов статьи фамилию следует указывать до инициалов имени и отчества (Иванов П.С., Петров С.И., Сидоров И.П.)

Название учреждения. Необходимо привести официальное ПОЛНОЕ название учреждения (без сокращений) и адрес электронной почты для контактов с авторами. Если в написании рукописи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо соотнести названия учреждений и ФИО авторов путем добавления цифровых индексов в верхнем регистре перед названиями учреждений и фамилиями соответствующих авторов.

Резюме статьи должно быть (если работа оригинальная) структурированным: актуальность, цель, материалы и методы, результаты, выводы. Резюме должно полностью соответствовать содержанию работы. Объем текста резюме должен быть в пределах 100—300 слов.

Ключевые слова. Необходимо указать ключевые слова — от 3 до 10, способствующих индексированию статьи в поисковых системах. Ключевые слова должны попарно соответствовать на русском и английском языках.

Англоязычная аннотация

Article title. Англоязычное название должно быть грамотно с точки зрения английского языка, при этом по смыслу полностью соответствовать русскоязычному названию;

Author names. ФИО необходимо писать в соответствии с заграничным паспортом, или так же, как в ранее опубликованных в зарубежных журналах статьях. Авторам, публикующимся впервые и не имеющим заграничного паспорта, следует воспользоваться стандартом транслитерации BGN/PCGN (см. ниже);

Affiliation. Необходимо указывать ОФИЦИАЛЬНОЕ АНГЛОЯЗЫЧНОЕ НАЗВАНИЕ УЧРЕЖДЕНИЯ и адрес электронной почты для контактов с авторами. Наиболее полный список названий учреждений и их официальной англоязычной версии можно найти на сайте РУНЭБ eLibrary.ru;

Abstract. Англоязычная версия резюме статьи должна по смыслу и структуре полностью соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка;

Keywords. Для выбора ключевых слов на английском следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США — Medical Subject Headings (MeSH).

Полный текст (на русском, английском или обоих языках) должен быть структурированным по разделам. Структура полного текста рукописи, посвященной описа-

нию результатов оригинальных исследований, должна соответствовать общепринятому шаблону и содержать разделы: введение (актуальность), цель и задачи, материалы и методы (пациенты и методы), результаты, выводы, обсуждение (дискуссия).

Дополнительная информация (на русском, английском или обоих языках)

Информация о конфликте интересов. Авторы должны раскрыть потенциальные и явные конфликты интересов, связанные с рукописью. Конфликтом интересов может считаться любая ситуация (финансовые отношения, служба или работа в учреждениях, имеющих финансовый или политический интерес к публикуемым материалам, должностные обязанности и др.), способная повлиять на автора рукописи и привести к сокрытию, искажению данных, или изменить их трактовку. Наличие конфликта интересов у одного или нескольких авторов не является поводом для отказа в публикации статьи. Выявленное редакцией сокрытие потенциальных и явных конфликтов интересов со стороны авторов может стать причиной отказа в рассмотрении и публикации рукописи.

Информация о спонсорстве. Необходимо указывать источник финансирования как научной работы, так и процесса публикации статьи (фонд, коммерческая или государственная организация, частное лицо и др.). Указывать размер финансирования не требуется.

Благодарности. Авторы могут выразить благодарности людям и организациям, способствовавшим публикации статьи в журнале, но не являющимся её авторами.

Сведения об авторах: ученая степень, учёное звание, должность, e-mail.

Список литературы. В библиографии (пристатейном списке литературы) каждый источник следует помещать с **новой** строки под порядковым номером.

В списке все работы перечисляются в порядке цитирования, а НЕ в алфавитном порядке.

Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях и лекциях допускается до 20, в обзорах — до 60 источников;

В тексте статьи ссылки на источники приводятся в квадратных скобках арабскими цифрами.

В библиографическом описании каждого источника должны быть представлены **ВСЕ АВТОРЫ**. Недопустимо сокращать название статьи. Название англоязычных журналов следует приводить в соответствии с каталогом названий базы данных MedLine. Если журнал не индексируется в MedLine, необходимо указывать его полное название. Названия отечественных журналов сокращать нельзя.

Формат пристатейных списков литературы должен соответствовать требованиям и стандартам MedLine (U.S. National Information Standards Organization NISO Z39.29-2005 [R2010]), что обеспечит в дальнейшем индексирование статьи в международных базах данных (см. раздел «Оформление библиографии»).

При ссылке на журнальные статьи (наиболее частый источник информации для цитирования) следует придерживаться шаблона:

Автор А.А., Соавтор Б.Б. Название статьи. *Название журнала* Год; Том(Номер): стр.—стр. При возможности указать DOI.

Название статьи и журнала не следует разделять знаком «//». Для описания даты выхода, тома, номера журнала и страниц, на которых опубликована статья, следует использовать сокращенный формат записи. Пример:

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *NEJM* 2002; 347(4): 284—287. DOI: 10.1056/NEJMs020632

Дедов И.И., Шестакова М.В. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений. *Сахарный диабет* 2010; (3): 17—22.

При ссылке на книгу: Автор А.А. *Название книги*. Город (где издана): название издательства; год издания. Если ссылка дается на главу книги: (авторы); название главы. После точки ставится “В кн.:" или “In:” и фамилия(и) автора(ов) или редактора(ов), затем название книги и выходные данные. Пример:

Paxinos G., Watson Ch. *The rat brain in the stereotaxic coordinates*. N.Y.: Academic Press, 1982.

Максимова Т.М. Физическое развитие детей и подростков в возрасте 7—15 лет в Российской Федерации и в мире. В кн.: *Физическое развитие детей и подростков Российской Федерации*. Сб. мат-лов (выпуск VI). Под ред. акад. РАН и РАМН А.А. Баранова, член-корр. РАМН В.Р. Кучмы. М.: Издательство «ПедиатрЪ», 2013: 180—181.

Для электронных изданий указывается дата обращения в формате дд.мм.гггг (на русском языке: Дата обращения 07.07.2017; на английском языке: Retrieved: 07.07.2017).

II. Английский язык и транслитерация. При публикации статьи часть или вся информация должна быть дублирована на английский язык или транслитерирована (написана латинскими буквами). При транслитерации рекомендуется использовать стандарт BGN/PCGN (United States Board on Geographic Names / Permanent Committee on Geographical Names for British Official Use), рекомендованный международным издательством Oxford University Press, как «British Standard». Для транслитерации текста в соответствии со стандартом BGN можно воспользоваться ссылкой <http://ru.translit.ru/?account=bgn>.

Список литературы, имеющий русскоязычные источники, в обязательном порядке переводится на английский язык (References). При этом названия статей на русском языке переводятся на английский и даются в квадратных скобках, названия журналов даются в транслитерации, и переводятся на английский язык. В конце пишется (in Russian). Пример:

Grier K., Ressler L. [The investigation of the sensorimotor feedback performance in obese and normal-weight teenagers during physical activity]. *Lechebnaya fizkul'tura i sportivnaya meditsina [Exercise therapy and Sports Medicine]*. 2013; 1(109): 30—36. (In Russian)

III. В статьях, публикуемых журналом «Патогенез», обязательна статистическая обработка количественных данных. В разделе Материалы и методы должно присутствовать описание статистических методов, указан статистический пакет, применявшийся при обработке результатов, и номер его версии. Выбор статистических критериев и алгоритмов должен быть обоснован в тексте статьи.

IV. Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не

должны дублировать представленную в нём информацию. Ссылки на таблицы в тексте обязательны.

V. Рисунки (графики, диаграммы, схемы, чертежи и другие иллюстрации, рисованные средствами MS Office) должны быть контрастными и четкими. Объем графического материала минимальный (за исключением работ, где это оправдано характером исследования). Допускается применение цветной графики. Каждый рисунок должен быть помещен в текст и сопровождаться нумерованной подрисуночной подписью. Ссылки на рисунки в тексте обязательны.

VI. Фотографии, отпечатки экранов мониторов (скриншоты) и другие нерисованные иллюстрации необходимо дублировать в виде отдельных файлов формата *.jpeg, *.bmp, *.gif (*.doc и *.docx — в случае, если на изображение нанесены дополнительные пометки). Разрешение изображения должно быть >300 dpi. Файлам изображений необходимо присвоить название, соответствующее номеру рисунка в тексте.

VII. Соответствие нормам этики. Для публикации результатов оригинальной работы с участием людей необхо-

димо указать, подписывали ли участники исследования информированное согласие. В случае проведения исследований с участием животных — соответствовал ли протокол исследования этическим принципам и нормам проведения биомедицинских исследований с участием животных. В обоих случаях необходимо указать, был ли протокол исследования одобрен этическим комитетом (с приведением названия соответствующей организации, её расположения, номера протокола и даты заседания комитета).

VIII. Сопроводительные документы. При подаче рукописи в редакцию журнала необходимо дополнительно прислать файлы, содержащие сканированные изображения заполненных и заверенных сопроводительных документов (в формате *.pdf). К сопроводительным документам относится сопроводительное письмо с места работы автора с печатью и подписью руководителя организации, а также подписями всех соавторов.