

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА РАМН

ISSN 2226-5988

№ 2 (6) / 2013

«Клиническая и экспериментальная морфология»

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Учредитель

ФГБУ «Научно-исследовательский
институт морфологии человека»
РАМН

117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

Адрес редакции

117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

Телефоны редакции:

+7 (499) 120-80-65

+7 (499) 129-51-33

e-mail: morfolhum@mail.ru

Издается с 2012 года

Тираж 500 экземпляров

**Подписной индекс
в каталоге Агентства «Роспечать» –
70045 (на полугодие)**

Перепечатка и любое воспроизведение
материалов и иллюстраций в печатном
или электронном виде из журнала
«Клиническая и экспериментальная
морфология» допускаются только
с письменного разрешения издателя

Свидетельство о регистрации средства
массовой информации
ПИ № ФС77-47183
от 2 ноября 2011 г.

© ФГБУ «Научно-исследовательский
институт морфологии человека» РАМН

Главный редактор

член-корреспондент РАМН, профессор Л.В. Кактурский

Заместители главного редактора

профессор О.В. Зайратьянц

профессор О.В. Макарова

Ответственные секретари

д.б.н., профессор М.Н. Болтовская

к.м.н. М.В. Мнихович

Редакционная коллегия

Член-корр. РАМН *Н.М. Аничков*

Член-корр. РАМН *В.В. Банин*

Профессор *М.Н. Болтовская*

Д.б.н. *Г.Б. Большакова*

Д.м.н. *С.В. Буравков*

Акад. РАМН *Ю.И. Денисов-Никольский*

Д.б.н. *А.М. Ковригина*

Д.б.н. *М.В. Кондашевская*

Профессор *И.А. Казанцева*

Профессор *И.И. Марков*

Профессор *А.П. Милованов*

Д.м.н. *Л.П. Михайлова*

К.м.н. *В.А. Мхитаров*

Профессор *Н.П. Омеляненко*

Профессор *Ю.Г. Пархоменко*

Профессор *С.В. Савельев*

Академик РАМН *М.Р. Сапин*

Академик РАМН *Ю.Н. Соловьев*

Профессор *А.Б. Шехтер*

Профессор *А.Л. Черняев*

Профессор *В.В. Яглов*

Д.м.н. *Н.В. Яглова*

Редакционный совет

Н. Булаева (Хьюстон, США)

И.Н. Волощук (Москва)

Ю.И. Гуминский (Винница,
Украина)

А.Е. Доросевич (Смоленск)

Л.М. Ерофеева (Москва)

В.В. Климачев (Барнаул)

А.В. Кононов (Омск)

М. Кочуков (Хьюстон, США)

А.Э. Мационис (Ростов-на-Дону)

О.Д. Мишнев (Москва)

Л.М. Михалева (Москва)

Л.М. Непомнящих (Новосибирск)

Е.В. Новичков (Киров)

В.В. Новочадов (Волгоград)

А.Н. Романюк (Сумы, Украина)

М.Г. Рыбакова (Санкт-Петербург)

И.В. Твердохлеб (Днепропетровск,
Украина)

В.А. Туманский (Запорожье,
Украина)

М.Г. Узбеков (Москва)

Ю.И. Ухов (Рязань)

Л.В. Фомина (Винница, Украина)

Н.М. Хмельницкая
(Санкт-Петербург)

В.П. Черников (Москва)

В.Ф. Чехун (Киев, Украина)

И. Швари (Тель-Авив, Израиль)

А.Н. Яцковский (Москва)

ПЕРЕДОВЫЕ СТАТЬИ, ЛЕКЦИИ EDITORIALS, LECTURES

- | | | |
|---|----|---|
| <i>Е.Н. Гласко, И.Б. Капланская</i>
Классификация и дифференциальная диагностика
миелодиспластических синдромов | 4 | <i>E.N. Glasko, I.B. Kaplanskaya</i>
Classification and differential diagnosis
of myelodysplastic syndromes |
| <i>И.А. Казанцева, С.В. Лищук</i>
Новая системная патология – IgG4-связанная
склерозирующая болезнь | 12 | <i>I.A. Kazantseva, S.V. Lishchuk</i>
IgG4-related sclerosing disease – a new systemic
pathology |

КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ CLINICAL MORPHOLOGY

- | | | |
|--|----|--|
| <i>С.В. Вернигородский, М.В. Мнихович</i>
Диагностическое и прогностическое значение
иммуногистохимических маркеров кишечной
метаплазии слизистой оболочки желудка | 18 | <i>S.V. Vernygorodskiy, M.V. Mnikhovich</i>
Diagnostic and prognostic value
of immunohistochemical markers of intestinal
metaplasia of mucous membrane of the stomach |
| <i>Н.А. Старосветская, Л.Е. Гуревич,
М.Н. Болтовская, Н.А. Корсакова, А.А. Степанов</i>
Экспрессия гликоделина
в опухолях поджелудочной железы | 23 | <i>N.A. Starosvetskaya, L.E. Gurevich,
M.N. Boltovskaya, N.A. Korsakova, A.A. Stepanov</i>
Glycodelin expression in pancreatic tumors |
| <i>Л.Е. Гаганов, И.А. Казанцева</i>
Прогностическое значение
иммуногистохимических маркеров рака желудка | 29 | <i>L.E. Gaganov, I.A. Kazantseva</i>
Prognostic significance of immunohistochemical
markers of stomach cancer |
| <i>Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов,
А.Е. Прощина, С.В. Савельев</i>
Иммуногистохимическое исследование
распределения транскрипционного фактора
neuroD1 в поджелудочной железе
плодов человека | 37 | <i>Y.S. Krivova, V.M. Barabanov,
A.E. Proshchina, S.V. Saveliev</i>
Immunohistochemical study of the distribution
of transcriptional factor neurod1 in the human fetal
pancreas |

*И.А. Казанцева, В.Б. Банина,
Т.В. Безуголова, В.П. Черников*
Опухоль из юктагломерулярных клеток
(описание наблюдения)

43

*I.A. Kazantseva, V.B. Banina,
T.W. Bezuglova, V.P. Tchernikov*
Tumor from the juxtaglomerular cells
(description of observation)

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

Н.В. Булякова, В.С. Азарова
Регенерация скелетных мышц
и состояние тимуса у стареющих крыс
в условиях лазерного воздействия
и последующей аллопластики мышечной ткани
от новорожденных крысят

48

N.V. Bulyakova, V.S. Azarova
Regeneration of skeletal muscles and state of thymus
in aging rats under laser irradiation and newborn
muscle tissue alloplasty

*О.В. Тарнопольская, И.А. Горошинская,
А.И. Шихлярова, П.С. Качесова, Ю.Н. Крохмаль*
Возможность определения цисплатина в клетках
опухоли по флуоресценции АНС и ДСМ

57

*O.V. Tarnopolskaya, I.G. Goroshinskaya,
A.I. Shikhlyarova, P.S. Kachesova, J.N. Krochmal*
Determination possibility of cisplatin in tumor cells
by ANS and DSM fluorescence

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин
Регуляторная роль тучных клеток
в морфогенетических процессах органов
иммунной системы потомства мышей,
перенесших активацию иммунной системы
в ранние сроки беременности

62

N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin
Role of mast cells in development of immune system
in offspring of exposed to activation of immunity
in early pregnancy and intact murine dams

МЕТОДИКИ METHODS

Т. Гудлетт, И.В. Твердохлеб
Компьютерный трехмерный анализ камер сердца
у ранних плодов человека

69

T. Goodlett, I.V. Tverdokhle
Computerized three-dimensional analysis
of cardiac chambers in early human fetuses

*А.В. Волков, А.В. Васильев, О.А. Рачинская,
Г.Б. Большакова, Д.В. Гольдштейн*
Применение флуоресцентных меток для оценки
регенерации костной ткани на модели
критических дефектов теменных костей крыс
с использованием адаптированного метода
гистоморфометрии

73

*A. V. Volkov, A. V. Vasiliev, O. A. Rachinskaya,
G. B. Bolshakova, D. V. Goldstein*
Of fluorescent markers for bone regeneration
assessment on the model of critical parietal bone defect
rats using adapted methods hystomorphometry

КЛАССИФИКАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИХ СИНДРОМОВ

Е.Н. Гласко, И.Б. Капланская

ФГБУ «Гематологический научный центр Минздрава России», Москва

Статья посвящена гистологической диагностике миелодиспластических синдромов на основе современных представлений об их биологическом поведении. Приводятся данные об особенностях гистологических вариантов миелодиспластического синдрома и обсуждаются вопросы дифференциальной диагностики с заболеваниями системы крови и негематологическими заболеваниями.

Ключевые слова: миелодиспластический синдром, гистологическая диагностика, гемопоэз

Миелодиспластический синдром (МДС) – гетерогенная группа нарушений гемопоэза, характеризующаяся дисплазией в клетках разных линий кроветворения, клональными нарушениями и вероятной трансформацией в острый миелобластный лейкоз (ОМЛ). С середины прошлого столетия МДС рассматривался как предлейкоз, дремлющий или малопрцентный лейкоз (1949 г.), а в 80-е годы для продромальных синдромов ОМЛ был введен термин «миелодиспластический синдром». В 1982 г. Франко-Американо-Британская (ФАБ) группа разработала классификацию первичных (идиопатических) МДС, основанную на данных изменений в периферической крови и миелограмме. В последующие годы классификационные схемы МДС совершенствовались в соответствии с биологической эволюцией этого синдрома. В последней классификации (ВОЗ, 2008), основанной, как и предыдущие, на данных гемо- и миелограмм, предусмотрено 8 вариантов МДС.

1. Рефрактерная анемия (РА).
2. РА с ринг-сидеробластами.
3. Рефрактерная цитопения с мультилинейной дисплазией (РЦМД).
4. РЦМД с ринг-сидеробластами.
5. РЦМД 1-го типа с наличием в миелограмме 5–9% бластов, что соответствует РАИБ-1.
6. РЦМД 2-го типа с наличием в миелограмме 10–19% бластов (РАИБ-2).
7. МДС с делецией 5-й хромосомы (5q-синдром), характеризующийся наличием не более 5% бластов в миелограмме и возможным тромбоцитозом в периферической крови.
8. Неклассифицируемый МДС.

По сравнению с предыдущими схемами в последней увеличено число вариантов и снижено предельное для МДС количество бластов в миелограмме с 30% до 19%.

МДС встречается у больных старшей возрастной группы. Основным клиническим симптомом МДС – длительный цитопенический синдром, чаще проявляющийся анемией, причину которого установить не удастся.

Стандарт диагностики МДС основан на данных цитологического и цитогенетического исследования костного мозга и гемограммы с наличием в них количественных и качественных (диспластических) изменений в клетках разных линий гемопоэза. Наиболее частое проявление количественных изменений – длительная одно- и более ростковая цитопения крови неустановленной этиологии, неподдающаяся стандартной терапии. Диспластические изменения в клетках разных ростков гемопоэза в миело- и гемограмме проявляются в эритроидной линии наличием мегалобластного и мегалобластного вида клеток, дву- и многоядерных эритробластов, кольцевидных или ринг-сидеробластов – нормобластов, в митохондриях перинуклеолярной зоны которых выявляются реакцией Перлса гранулы железа, PAS-положительных эритробластов. Дисплазия клеток гранулоцитопоэза характеризуется наличием гипо-, гипер- или асегментированных лейкоцитов (пельгеровская аномалия), палочек Ауэра в бластных клетках. В мегакариоцитарной линии выявляются микроформы, клетки с гипо- и, реже, гиперсегментированным ядром, которые диспластически изменены и функционально неполноценны. Указанные цитологические особенности клеток костного мозга не являются основополагающими для диагноза «миелодиспластический синдром», так как подобные изменения могут иметь место при ряде гематологических и негематологических заболеваний, регенераторных процессах в кроветворной ткани и др. [3, 5].

Цитогенетические нарушения при МДС, обнаруживаемые примерно у 50–70% больных, широко

варьируют. Наиболее часты из них утрата Y-хромосомы, делеция 5-й, 7-й и 20-й хромосом, трисомия 8 и др. Комбинации хромосомных aberrаций прогностически неблагоприятны [12, 14].

Патогенез МДС многообразен, недостаточно изучен и во многом определяется нарушениями в хромосомах и генах, регулирующих клеточный цикл, транскрипционных и супрессивных факторах, а также изменением баланса процессов апоптоза и пролиферации. Постулируемая клональная природа МДС нередко проявляется целым спектром хромосомных aberrаций, что может указывать как на различия в факторах, способствующих его возникновению, так и на гетерогенность лейкозогенеза при МДС. Ранние стадии МДС характеризуются ускоренным апоптозом клеток гемопоэза в костном мозге, что соответствует понятию «неэффективный гемопоэз», и обусловлены нарушениями в таких протоапоптатических протеинах семейства Bcl как Bax, Bad и Bim. Необычным является тот факт, что апоптоз в большей части клеток происходит в S-фазе при вероятном участии cyclin D1(E2F1). Определенное значение в гибели клеток гемопоэза придается и микроокружению – дефициту ряда интерлейкинов, нарушенной супрессорной функции Т-лимфоцитов, редукции предшественников В-лимфоцитов и увеличению паракринного влияния клеток гемопоэза и таких компонентов внеклеточного матрикса как фактор роста эндотелия сосудов и фактор роста фибробластов. На поздних стадиях МДС происходит инактивация гена супрессии опухолей p53 [13, 18, 21]. Морфологически проявлениями влияния указанных факторов служат нарушения пролиферации, дифференцировки и продолжительности жизни клеток кроветворной ткани [15, 19, 20, 21].

С середины XX века наряду с цитологическими разрабатывались критерии прижизненной гистологической диагностики МДС по трепанобиоптатам костного мозга [1, 2, 6, 17]. Этот метод позволяет достоверно

выявить нарушения в структуре костного мозга, оценить его клеточность, клеточно-клеточные и клеточно-стромальные взаимоотношения, выявить нарушения в дифференцировке и типичной локализации клеток разных линий гемопоэза, охарактеризовать состояние стромы, ее васкуляризацию, характер иммунных и воспалительных реакций на плацдарме костного мозга, что не находит отражения в миелограмме. Исследование трепанобиоптатов в динамике дает возможность проследить эволюцию МДС и оценить эффект предпринятого лечения, включая трансплантацию костного мозга. В последние десятилетия в диагностике обнаруженных в костном мозге изменений большое значение придается иммуногистохимическому исследованию (ИГХ), позволяющему уточнить фенотип и уровень дифференцировки клеток гемопоэза, выраженность изменений во внеклеточном матриксе, степени васкуляризации стромы. Для оценки этих параметров при МДС рекомендуется следующая панель антител: миелопероксидаза, гликофорин А или С, триптаза, CD34, CD31, CD42 или CD61, CD68 (PG-M1), CD114, CD117, а также CD3, CD20. В зависимости от обнаруженных изменений перечень используемых антител может быть расширен [4, 13].

По данным литературы и собственных исследований, в 60–70% наблюдений при разных вариантах МДС выявляется гиперплазия кроветворной ткани, примерно в 20% – нормоклеточный и в 14–20% – гипоклеточный костный мозг.

Повышенная клеточность кроветворной ткани отмечается примерно в 60% наблюдений (рис. 1). Чаще всего она обусловлена гиперплазией эритроидной линии клеток. Среди эритрокариоцитов выявляется значительное число мегалобластоидного вида клеток, иногда немногочисленные дву- и многоядерные и ШИК-положительные эритробласты (рис. 2). Нередко при этом обнаруживаются сидерофаги и отложения внеклеточного гемосидерина. Нарушения в обмене же-

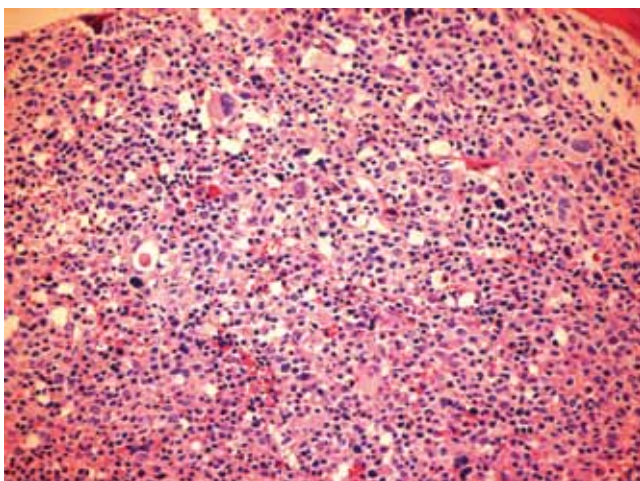


Рис. 1. Гиперпластический вариант МДС. Умеренная гиперплазия клеток эритропоэза и мегакариоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. × 100

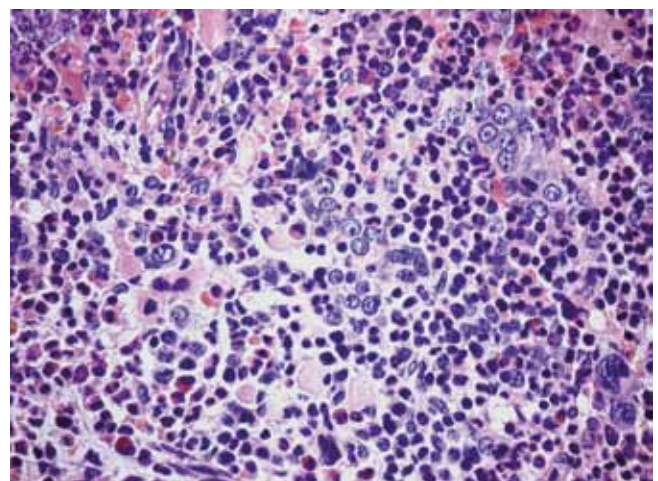


Рис. 2. Гиперплазия эритроидной линии клеток с наличием мегалобластоидных форм и двуядерных эритробластов. Окраска гематоксилином и эозином. × 400

леза при МДС обычно обусловлены усиленной трансфузионной терапией, часто осложняющейся дефектом его утилизации (сидероахрезией), и не являются отражением увеличенного числа ринг-сидеробластов. Эти клетки не определяются в трепанобиоптатах реакцией Перлса из-за изменения тинкториальных свойств цитоплазмы эритрокариоцитов в процессе гистологической обработки. Количество клеток гранулоцитопоэза, как правило, соответствует норме или несколько снижено, но без задержки дифференцировки в них. Количество мегакариоцитов при гиперплазии эритроидной линии клеток широко варьирует, но всегда имеет место дизмегакариоцитопоэз, проявляющийся преобладанием микроформ и мегакариоцитов, чаще с гипо- и реже с гиперсегментированным ядром. Значительная часть мегакариоцитов при этом утрачивает типичную парасинусоидальную локализацию (рис. 3). Подобные изменения в кроветворной ткани характерны для наблюдаемых при РА по классификации ВОЗ. В отличие от МДС при анемических синдромах другого генеза, за исключением B_{12} - и фолиеводефицитных анемий, выраженный дизэритропоэз и диспластические изменения в клетках других ростков не наблюдаются. В небольшом числе наблюдений на фоне эритроидной гиперплазии выявляется нарушение созревания клеток гранулоцитарного ростка и их типичного расположения. Локализация промежуточных форм и бластов (CD34+ клеток) вне паратрабекулярных зон – атипичная локализация миелоидных предшественников (АЛМП, англ. ALIP) – один из характерных гистологических признаков МДС (рис. 4 А, Б). ALIP и количество бластов являются важным диагностическим и прогностическим морфологическим признаком вероятностной начальной стадии трансформации МДС в ОМЛ. В таких наблюдениях необходимо повторное, с небольшим временным интервалом, исследование костномозгового кроветворения [3, 6].

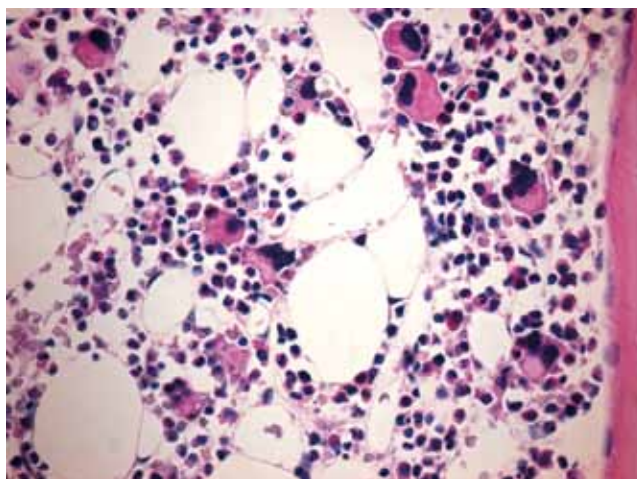


Рис. 3. Гиперпластический вариант МДС с диспластическими изменениями мегакариоцитов – микроформы, клетки с гипо- и несегментированным ядром, локализующиеся вне связи с синусами. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Большие диагностические сложности при предполагаемом диагнозе «миелодиспластический синдром» представляет выявляемая в трепанобиоптатах умеренно выраженная гиперплазия кроветворной ткани за счет миелоидной и иногда мегакариоцитарной линий клеток. Сочетание таких признаков как небольшой сдвиг в сторону промежуточных форм в гранулоцитарной линии, преобладание микроформ среди увеличенного числа мегакариоцитов, умеренно выраженный дизэритропоэз, отсутствие выраженного фиброза стромы крайне сложно для нозологической верификации и дифференциации 5q-синдрома (классификация ВОЗ) с хроническими миелопролиферативными заболеваниями (рис. 5). В подобных наблюдениях важная роль в диагностике принадлежит цитогенетическим исследованиям (Vcr-abl, JAK2, del 5-й хромосомы и другим нарушениям). Только анализ совокупных дан-

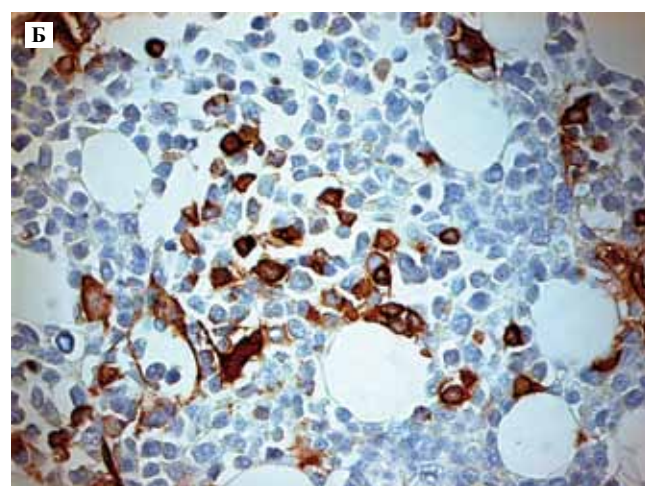
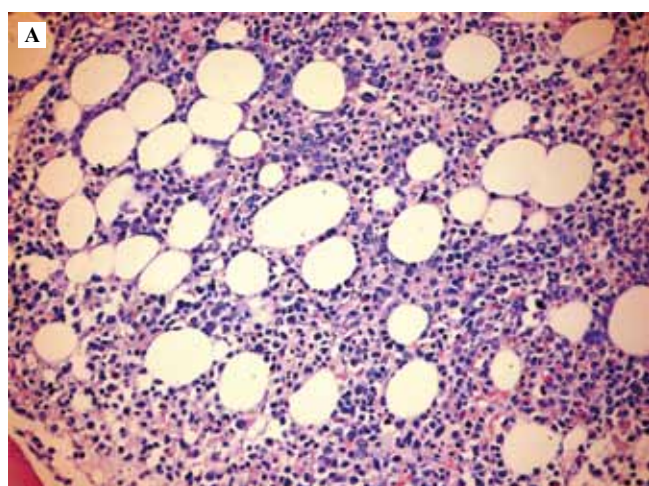


Рис. 4. А. Группы бластных и промежуточных форм клеток гранулоцитарного ростка вне зон эндоста. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$. Б. Атипично расположенные CD34+ бластные клетки. ИГХ. $\times 400$

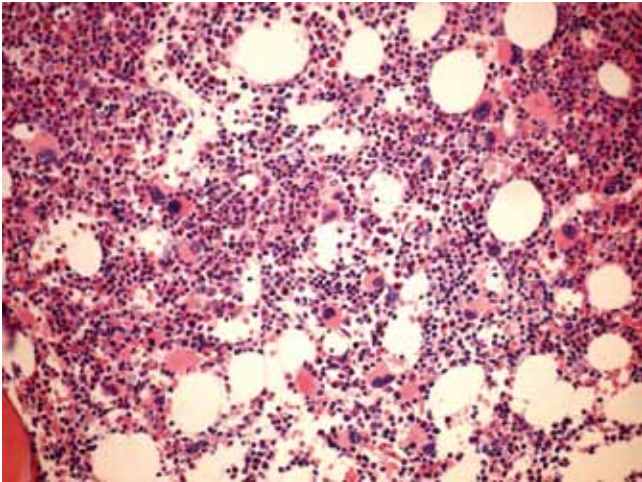


Рис. 5. Гиперплазия кроветворной ткани с увеличением количества клеток гранулоцитарного ряда и мегакариоцитов – 5q-синдром. Окраска гематоксилином и эозином. × 200

ных позволяет диагностировать в части таких случаев 5q-синдром в соответствии с классификацией ВОЗ [8, 9, 10].

Повышение клеточности кроветворной ткани за счет миелоидного ряда с примесью моноцитов и возможной незначительной гиперплазией эритроидной линии с дисплазией эритрокариоцитов, наличием диспластически измененных мегакариоцитов также является сложной задачей для диагностики. Сочетание пролиферативных и диспластических изменений по рекомендации ВОЗ отнесено к группе МДС/МПЗ, включающей такие нозологические формы как хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), относившийся по ФАБ-классификации 1982 г. к МДС, ювенильный ХММЛ, атипичный *Vcr-abl* – отрицательный лейкоз, а также РА с ринг-сидеробластами и тромбоцитозом периферической крови. Эти заболевания не являются предметом рассмотрения в данной работе, но должны учитываться в дифференциально-диагностическом плане при нозологической верификации МДС [9, 10, 17].

Гипопластический вариант МДС характеризуется редукцией клеток всех трех ростков гемопоэза с нарушением лейко/эритробластического соотношения в сторону эритроидной линии, наличием диспластических изменений в немногочисленных эритрокариоцитах и мегакариоцитах (рис. 6). При этом в резко сниженном числе элементов гранулоцитопоэза не отмечаются нарушения созревания. Нередко выявляются в небольшом числе сидерофаги. Этот морфологический вариант МДС также сложен для гистологической диагностики, в частности для дифференциации с апластической анемией. Существенные отличия апластической анемии от МДС – отсутствие в трепанобиоптате при ней мегакариоцитов, хромосомных aberrаций, характерных для МДС, и более выраженные нарушения в обмене железа с увеличенным числом сидерофагов и отложениями внеклеточного гемосидерина в строме.

Значительные трудности имеются в дифференциации гипопластической формы МДС с гипопластическим вариантом ОМЛ, при котором в гипопластичной кроветворной ткани с разной степенью выраженности диспластических изменений в ее клетках определяются, как правило, мелкие группы атипично расположенных CD34-положительных клеток (АИР). Нарушение дифференцировки в гранулоцитарной линии клеток со сдвигом в сторону незрелых и бластных форм, утрата ими типичной топографии служат несомненным подтверждением ОМЛ, возникшим *de novo* или, что существенно реже, трансформировавшимся из гипопластического варианта МДС [7].

При нормоклеточном варианте МДС могут наблюдаться все описанные изменения: нарушение соотношения клеток эритро- и гранулоцитопоэза, степени дифференцировки и типичной локализации клеток, наличие диспластических изменений в них, нарушения в строме.

В строме при всех гистологических вариантах МДС выявляется фиброз разной степени выраженности, чаще имеющий очаговый характер, отек и кровоизлияния. Развитие фиброза в костном мозге связывают с гипоксией, стимулирующей суперэкспрессию генов, активирующих фибробласты и клетки эндотелия, а также с рядом цитокинов, протромбоцитарным фактором мегакариоцитов и тромбосподином (рис. 7 А, Б). Указанные факторы фиброгенеза пока недостаточно изучены. Некоторые исследователи [15, 16] относят фиброзирование стромы к неблагоприятным факторам прогноза, однако это не находит однозначного подтверждения в литературе и по данным наших исследований. В костных структурах обычно выявляются резорбтивные изменения, свойственные старшей возрастной группе, составляющей большую часть пациентов, страдающих МДС. Репаративный процесс

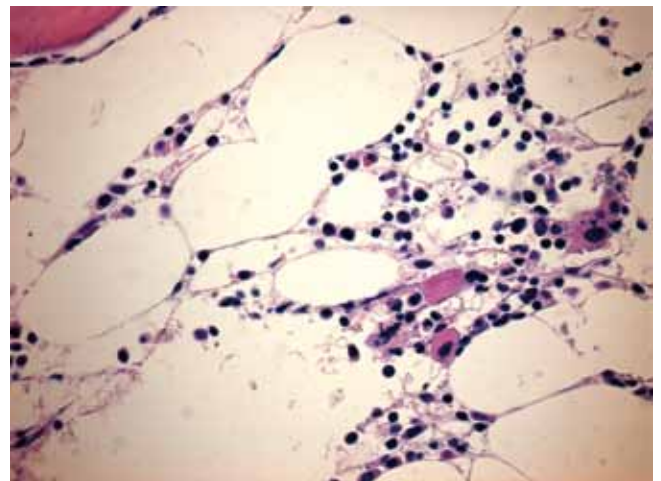


Рис. 6. Гипопластический вариант МДС. Кроветворная ткань сниженной клеточности с наличием мегакариоцитов с гипосегментированным ядром. Окраска гематоксилином и эозином. × 200

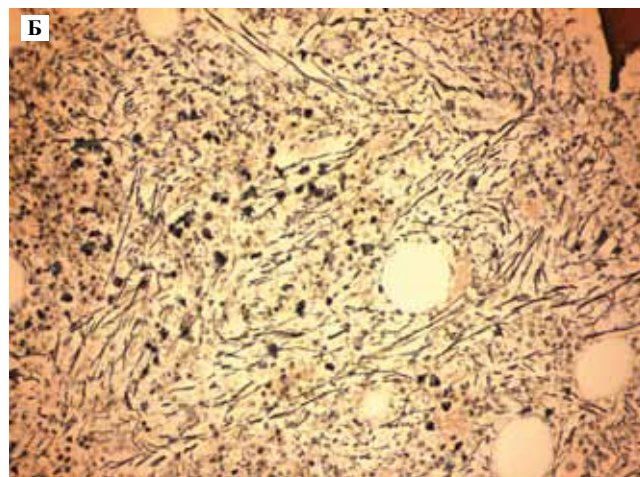
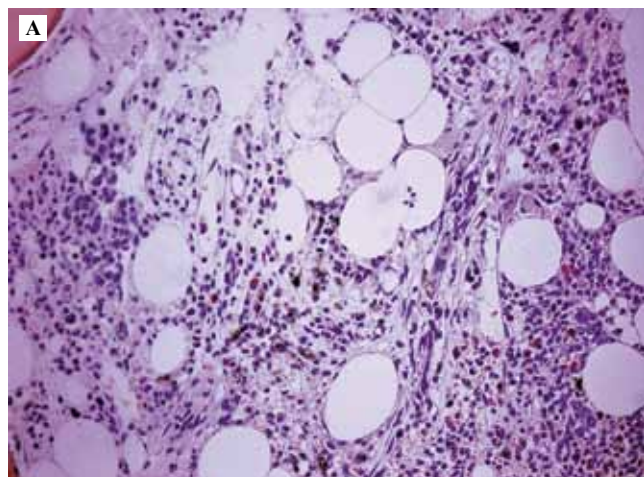


Рис. 7. А. Очаги фиброза в строме. Окраска гематоксилином и эозином. × 100
 Б. Очаги фиброза в строме. МФ-2. Окраска на ретикулин. × 200

в костных trabeculaх выражен незначительно, выявляются лишь немногочисленные остеобласты по краю отдельных из них. Как правило, наблюдаются так называемые воспалительно-реактивные изменения в строме с рассеянными и/или мелкоочаговыми скоплениями лимфоидных клеток типа малых лимфоцитов, немногочисленными плазмочитами, эозинофилами, сидерофагами, тучными клетками (рис. 8). Вазкуляризация кроветворной ткани при всех вариантах МДС повышена, что подтверждается выявлением как отдельно расположенных CD31+ и FУ111+ эндотелиальных клеток, так и небольших новообразованных сосудов капиллярного типа, выявляемых ИГХ методом. Неоангиогенез пропорционален количеству бластов и при РАИБ-1 и РАИБ-2 схож с выявляемым при ОМЛ.

Основные гистологические признаки МДС суммированы в таблице 1.

Гистологическая верификация МДС иногда осложняется несовпадением основных морфологических параметров с данными анализов крови. В нормо-

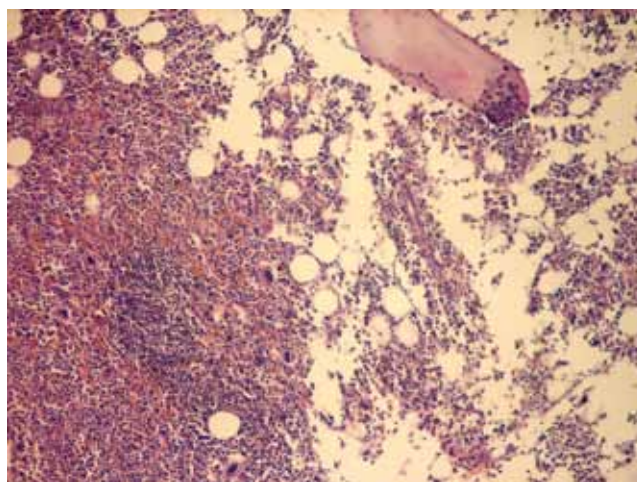


Рис. 8. Очаговое скопление мелких лимфоидных клеток типа малых лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. × 100

Таблица 1

Основные гистологические критерии МДС

Гиперплазия кроветворной ткани (клеточность выше возрастной нормы)	Гипоплазия кроветворной ткани (клеточность ниже возрастной нормы)
1. Гиперплазия клеток 1–3 линий	1. Гипоплазия клеток 3 линий гемопоэза
2. Дисплазия в клетках не менее чем двух ростков гемопоэза	2. Дисплазия в клетках двух ростков гемопоэза
3. Нарушение нормальной локализации клеток гемопоэза	3. Нарушение нормальной локализации клеток гемопоэза
4. Задержка созревания клеток грануцитарной линии (5–19% бластов)	4. Бластов <5%
5. Изменения в строме (фиброз, воспалительные и реактивные изменения)	5. Изменения в строме

клеточной или умеренно гиперплазированной кроветворной ткани выявляется выраженная дисплазия в клетках гемопоэза (не менее 10% измененных клеток 2–3 ростков) с наличием в них хромосомных нарушений, присущих МДС, или без них. При этом в течение не менее 6 месяцев цитопенический синдром отсутствует. Такого рода изменения P. Valent et al. [22] обозначили как идиопатическую дисплазию неопределенного значения (ИДНЗ, англ. IDUS). При этом авторы не исключали ее прогрессию в типичный МДС, ОМЛ, МДС/МПЗ или миелопролиферативное заболевание. Латентный период трансформации IDUS в МДС может широко варьировать. Остается неясным, каким образом сохраняется продукция нормальных клеток гемопоэза при выраженных клональных нарушениях. Авторы допускают, что сохраняющийся клон нормальных стволовых клеток обеспечивает близкую к норме выработку нормальных клеток или клетки патологического клона в течение какого-то промежутка времени сохраняют способность к дифференцировке, взаимодействуя с дифференцировочными цитокинами клеточного и внеклеточного матрикса. При этом клональные (коммитированные) клетки чаще имеют проэритропоэтические особенности, способствующие увеличению продукции эритрокариоцитов, особенно при дефектности JAK2V617F. Основные цитогенетические механизмы, лежащие в основе IDUS, остаются мало изученными. Изолированные диспластические изменения клеток, касающиеся, как правило, 1–2 ростков, при нормальном кариотипе могут быть следствием самых разных факторов (регенераторные и инфекционные процессы, аутоиммунные и заболевания другой природы, лучевая и химиотерапия, трансплантация костного мозга и т.д.). Постлучевая, постцитостатическая и дисплазия при хронической гепатите кроветворных клеток относятся к так называемым вторичным МДС [23, 24, 25].

В 2006 г. В. Vain предложил понятие «предполагаемый МДС» для случаев с персистирующей в течение не менее 6 месяцев 1- или 2-ростковой цитопенией с минимальными диспластическими изменениями (не

более 10% клеток) в 1 или 2 линиях кроветворной ткани нормальной либо умеренно увеличенной клеточности, без или также с минимальными кариологическими нарушениями. Этот гематологический синдром дискордатного количественного соотношения клеток кроветворной ткани и крови получил название «идиопатическая цитопения неясного значения» (ИЦНЗ, англ. ICUS). D. De Smet et al. (2012) показали, что при проточной цитометрии CD34-позитивные клетки костного мозга пациентов с прогностически благоприятными вариантами МДС коэкспрессируют CD117, CD123 и характеризуются атипичной экспрессией CD45. Авторы полагают, что эти маркеры являются достоверными для дифференциации МДС и цитопений другого генеза. ICUS может быть и своеобразной компенсаторно-регенераторной реакцией по поддержанию кроветворного гомеостаза, возникающей при разного рода патологических процессах и в период возрастных изменений кроветворной ткани. Потенциально IDUS и ICUS способны к эволюции как одно в другое, так и МДС и ОМЛ, что позволяет рассматривать их как предфазу развернутого МДС. Они крайне сложны для диагностики, а больные с такими нарушениями нуждаются в обязательном исследовании костного мозга в динамике [5, 7, 25, 26, 27, 28, 29].

Дифференциально-диагностические признаки цитопений при МДС, ICUS и апластической анемии приведены в таблице 2.

Приведенные данные указывают на необходимость гистологического исследования костного мозга при цитопении крови неясного генеза. При трактовке гистологических изменений должны учитываться анамнестические сведения, клинические проявления заболевания, лабораторные показатели и проводиться дифференциальная диагностика с МДС, ICUS, IDUS, апластической анемией, МДС/МПЗ и т.д. [26, 28, 29].

Прогностическая значимость гистологического исследования определяется в трепанобиоптате количеством бластных и промежуточных форм гранулоцитопоеза, наличием ALIP и выраженностью дисплазии

Таблица 2

Изменения в костном мозге при цитопенических синдромах

Морфологические признаки / нозологическая форма	МДС	ICUS	Апластическая анемия
1. Клеточность	Повышена / снижена	Нормальная / умеренно повышена	Снижена
2. Диспластические изменения	В клетках 2–3 ростков	В клетках 1, реже 2 ростков	В единичных клетках
3. Бласты	5–19%	Отсутствуют	Не более 1–2%
4. ALIP	+ –	– +	–
5. Изменения в строме	+	Могут отсутствовать	+ –
6. Цитогенетические изменения	+	– +	–

в клетках других линий гемопоэза. Эти морфологические особенности соответствуют таким худшим в прогностическом плане, выделенным в классификации ВОЗ формам, как РАИБ-1 и РАИБ-2, однако поиск факторов прогноза МДС продолжает быть предметом изучения. В 1997 г. P. Greenberg et al. предложили интернациональную прогностическую счетную систему (ИПСС), в которой основными факторами развития ОМЛ и уровня общей выживаемости у нелеченых больных являлись 1) выраженность цитопенических изменений в крови, 2) количество бластов в миелограмме (до 30%) и 3) цитогенетические отклонения. Общая выживаемость пациентов с МДС имела обратную зависимость от возраста, так как с его повышением возрастает вероятность присоединения интеркуррентных заболеваний, существенно отягощающих течение МДС. Возраст пациентов не являлся фактором прогноза и эволюции в ОМЛ. ИПСС на основании наличия хромосомных aberrаций выделены 4 группы риска развития ОМЛ. Пациенты с комбинацией хромосомных нарушений, цитопенией и разной выраженностью бластоза в крови и миелограмме составили группу высокого риска, а больные с нормальным кариотипом или делецией только 20-й или 5-й хромосомы, утратой Y-хромосомы имели более благоприятный прогноз [11, 16].

В 2002 г. была разработана Всемирная прогностическая счетная система (ВПСС), значимыми критериями в которой являлись 1) нарушения кариотипа, 2) принадлежность к варианту МДС по классификации ВОЗ и 3) потребность в трансфузионной терапии. В соответствии с ВПСС в зависимости от выраженности и комбинации указанных факторов определены 5 групп риска снижения общей выживаемости и эволюции в ОМЛ. В ВПСС, в отличие от ИПСС, указанные факторы имели прогностическую значимость не только у нелеченых пациентов с МДС, но и у больных после проведенной терапии. Выявление ранее не изученных патогенетических механизмов МДС дает основания для поиска новых прогностических факторов. При этом следует отметить, что данные прижизненного гистологического исследования костного мозга сохраняют высокую значимость в диагностическом и прогностическом плане.

Заключение

По современным представлениям, миелодиспластический синдром (МДС) – это клональное заболевание с характерными, но не патогномоничными, хромосомными aberrациями, результатом которых являются нарушения в гистоархитектонике костного мозга, клинически проявляющиеся 1–2-ростковой или панцитопенией, то есть неэффективным гемопоэзом. В достаточных по объему трепанобиоптатах костного мозга последний характеризуется нарушениями количественных соотношений линий гемопоэза, пролиферативной активности, дифференцировки и локализации гемопоэтических клеток разных ростков с наличием в них диспластиче-

ских изменений и реакциями стромы. Гистологическое исследование позволяет охарактеризовать также состояние внеклеточного матрикса, степень васкуляризации стромы, выраженность реактивно-воспалительных изменений в ней. Гистологические изменения в кровяной ткани, существенно дополняющие данные миелограммы, важны, но недостаточны для окончательной верификации МДС как нозологической формы в соответствии с классификацией ВОЗ. Диагностическая трактовка выявленных в костном мозге изменений должна быть комплексной с обязательным учетом анамнестических данных, анализов периферической крови и миелограммы, размеров органов облигатного кроветворения. Определенные сложности возникают при нозологической идентификации 1-ростковой гиперплазии разных линий гемопоэза, которая может сопровождаться умеренно выраженной дисплазией пролиферирующих клеток и обычно является отражением репаративного процесса. Диспластические изменения разной степени выраженности возможны при так называемом вторичном МДС, обусловленном целым рядом негематологических заболеваний, постцитостатической и лучевой терапией. Наличие умеренно выраженных диспластических и кариологических изменений в клетках костного мозга без персистирующей цитопении в периферической крови также не позволяет диагностировать МДС. Правомерность диагноза пред-МДС (идиопатическая цитопения неясного значения и идиопатическая дисплазия неопределенного значения) по трепанобиоптату должна быть строго обоснованной.

Литература

1. Гласко Е.Н. К вопросу о гистологической диагностике миелодиспластических синдромов по данным трепанобиоптатов. В сб.: Патогенез, диагностика и лечение миелодисплазий / Хохлова М.П., Цветаева Н.В. Рига, 1987. С. 83–88.
2. Франк Г.А. Гистологическая диагностика миелодиспластических синдромов / Е.Н. Гласко, Н.В. Цветаева, М.А. Заводенко // Российский онкологический журнал. 1997. № ??? С. 35–39.
3. Глузман Д.Ф. Новая классификация миелодиспластических (предлейкозных) синдромов / В.А. Надгорная, Л.М. Складенко, Т.С. Ивановская // Онкология. 2010. № 3. С. 276–281.
4. Френкель М.А. Современная диагностика миелолипролиферативных синдромов у взрослых / А.Д. Ширин // Клиническая онкология. 2010. № 3. С. 243–251.
5. Albitas M. Myelodysplastic syndrome is not merely “preleukemia” / T. Manchouri, Ju. Shea et al. // Blood. 2012. V. 100. P. 3791–98.
6. Bartl R. Morphologic classification of myelodysplastic syndromes (MDS) combined of bone marrow aspirates and trephine biopsies / B. Frisch, R. Baumgart // Leuk. Res. 1992. V. 16. N. 1. P. 15–33.
7. Bennett J.M. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndrome and aplastic anemia; recommendation for standardized approach / A. Orazi // Haematologica. 2009. V. 94 (2). P. 264–8.

8. *Boulwood J.* The 5-q syndrome / S. Lewis, J.S. Waincoat // *Blood.* 1994. V. 84. N. 10. P. 3253–60.
9. *Cazzola M.* Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms / L. Malcovatti, R. Invenizzi // *ASH Education Book.* 2011. V. 1. P. 264–77.
10. *Foucar K.* Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms // *Am J Clin Pathology.* 2009. V. 132. P. 281–89.
11. *Greenberg P.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes / Ch. |Cox, M. LeBeau et al. // *Blood.* 1997. V. 89. N. 6. P. 2079–88.
12. *Hofmann Wolf-K.* Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow / S. de Vos, M. Komor et al. // *Blood.* 2002. V. 100. N. 10. P. 3553–60.
13. *Jue L.Z.* Expression of CD123 and CD114 on the bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndrome / H.Q. Wang, L.J. Li et al. // *Clin Med J (Engl).* 2010. V. 123. P. 2034–37.
14. *Komorokji R.S.* Myelodysplastic syndromes classification and risk stratification. / L. Zhang, J.M. Bennet // *Hematol Oncol Clin N Am.* 2010. V. 24. P. 443–57.
15. *Kreipe H.* Myelofibrosis: molecular and cell biological aspect / G. Busche, O. Bock, K. Hussein // *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012. V. 5. (Supl).
16. *Malkovati L.* Time- depend prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes / U. Gerning, A. Kuendgen et al. // *J Clin Oncology.* 2007. V. 25. N 23. P. 3503–10.
17. *Orazi A.* Myelodysplastic Syndromes / M.B. Czader // *Am J Clin Pathology.* 2009. V. 132. P. 290–305.
18. *Orazi A.* Hiopathology in diagnosis and classication of acute leukemia, myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative diseases // *Pathobiology.* 2007. V. 74. P. 97–114.
19. *Parker J.E.* The role of apoptosis, proliferation and the Bcl-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS / Ch.J. Mufti, F. Rasool, A. Mijovic et al. // *Blood.* 2000. V. 96. N 12. P. 3932–8.
20. *Sternberg A.* Evidence for reduced B-cell progenitor in early (low-risk) myelodysplastic syndrome / S. Kollick, T. Zittlewood // *Blood.* 2005. V. 106. N 9. P. 2982–91.
21. *Sugimori Ch.* Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome / A.F. List, P. Epling-Bumetle // *Hematol rep.* 2010. V. 9. P. 352–56.
22. *Valent P.* Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS / H.P. Horny // *Eur J Clin Invest.* 2009. V. 39. P. 548–53.
23. *Valent P.* Idiopathic bone marrow dysplasia of unknown significance (IDUS): definition, pathogenesis, follow up, and prognosis / E. Jager, G. Mitterbauer-Hohendanner et al. // *Am J Cancer Res.* 2011. V. 1. P. 531–41.
24. *Valent P.* Standart and impact of hematopathology in myelodysplastic syndromes (MDS) / A. Orazi, G. Busche et al. // *Oncotarget.* 2010. V. 1, (7). P. 483–95.
25. *Valent P.* Idiopathic cytopenia of underterminated significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS / B.J. Bain, J.M. Bennet et al. // *Leuc Res.* 2011. V. 36. P. 1–5.
26. *Wang S.A.* Diagnosis of myelodysplastic syndromes in cytopenic patients // *Hemat Oncol Clin N Am.* 2011. V. 25. P. 1085–110.
27. *Weinzierl E.P.* The differential diagnosis and bone marrow evaluation of new-onset pancytopenia // *Am J Clin Pathology.* 2013. V. 139. P. 9–29.
28. *Wimazal F.* Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) versus low risk MDS: The diagnostic interface / C. Fonatsch, R. Thalhammer et al. // *Leucemia Res.* 2007. V. 3.P. 1461–8.
29. *De Smet D.* Diagnostic potencial of CD34+ cell antigen expression in myelodysplastic syndromes / F. Trullemans, K. Jochmans et al. // *Am J cling pathology.* 2012. V. 138. P. 732–43.

CLASSIFICATION AND DIFFERENTIAL DIAGNOSIS MYELOYDYSPLASTIC SYNDROMES

E.N. Glasko, I.B. Kaplanskaya

This article is devoted to modern aspects of histological diagnostics of MDS meaning different biological behaviour. The peculiarities of histological variants MDS and their differential diagnostics are discussed by authors.

Key words: myelodysplastic syndrome, histological diagnosis, hematopoiesis

Информация об авторах

И.Б. Капланская – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник Гематологического научного центра. Телефон 8 (495) 612-6112. E mail: irinak@blood.ru

Материал поступил в редакцию 12 апреля 2013 года.

© Казанцева И.А., Лищук С.В., 2013

УДК:616.61-06:616:61-003.821]-07

НОВАЯ СИСТЕМНАЯ ПАТОЛОГИЯ – IgG4-СВЯЗАННАЯ СКЛЕРОЗИРУЮЩАЯ БОЛЕЗНЬ

И.А. Казанцева, С.В. Лищук

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МНИКИ)
им. М.Ф. Владимирского», Москва
Группа компаний «Европейский медицинский центр», Москва

В публикации проведен обзор современных данных о IgG4-связанной склерозирующей болезни. Продемонстрирован многогранный характер клинических проявлений в зависимости от преобладающей органопатологии. Значительное внимание уделено роли патолога в диагностике и подтверждении данного заболевания. Учитывая редкость болезни и ее относительно недавнее выделение в самостоятельную нозологическую форму, в данной публикации продемонстрированы основные критерии, которые должны ориентировать врача – клинициста и патолога в диагностике и выборе адекватного подхода к ведению пациента.

Ключевые слова: аутоиммунный панкреатит, IgG4, IgG4-связанная склерозирующая болезнь, воспалительные псевдоопухоли

IgG4-связанная склерозирующая болезнь (IgG4-ССБ) – полиорганная патология, характеризующаяся значительным повышением титра IgG4 в сыворотке крови, с широким спектром клинических проявлений, отвечающих на стероидную терапию.

Концепция IgG4-ССБ сформировалась на основании результатов исследования биоптатов пациентов с аутоиммунным (псевдотуморозным) панкреатитом (АИП), позволивших установить воспалительно-склеротическую природу ассоциированных с АИП объемных процессов, клинически диагностируемых как опухоли [11].

Типичными проявлениями IgG4-ССБ помимо АИП являются поражения гепатобилиарного тракта, слюнных и слезных желез, однако в настоящее время установлено, что в патологический процесс могут быть вовлечены многие органы и ткани – лимфатические узлы, мягкие ткани шеи и средостения, аорта, верхние отделы дыхательного и пищеварительного тракта, легкие, почки, клетчатка забрюшинного пространства, предстательная железа, гипофиз, твердая мозговая оболочка, щитовидная железа, вилочковая железа, кожа, молочные железы.

Сходство патоморфологических проявлений этих поражений предполагает, что они представляют собой варианты манифестации единой болезни. Клинические симптомы заболевания полиморфны, зависят от спектра вовлеченных органов и стадии процесса.

Пусковые механизмы и патогенез системной IgG4-ССБ и ее органных проявлений, в том числе АИП, окон-

чательно не изучены, но необычно высокий уровень сывороточного IgG4 предполагает его центральную роль в возникновении и прогрессировании болезни.

Известно, что IgG4 является самым редким изотипом класса IgG, составляя в норме всего 3–6% сывороточных IgG. У пациентов с IgG4-ССБ титр IgG4 значительно возрастает и превышает 135 mg/dL.

Продукция IgG4, как и IgE, стимулируется CD4+ Т-лимфоцитами (цитокинами Th2) и реализуется путем взаимодействия IL4 и IL10 с нативными В-лимфоцитами. Высказано предположение об аутоиммунной природе IgG4-ССБ с участием Th1 или Th2 аутоиммунных реакций, однако превалирование Th2 и регуляторных иммунных реакций не исключает участия аллергических механизмов в ее патогенезе [5, 30].

Лабораторные исследования при IgG4-ССБ выявляют повышенный уровень сывороточного глобулина, IgG, IgG4 и IgE, часто определяются аутоантитела (антинуклеарные, ревматоидный фактор). Болезнь поддается стероидной терапии, но ее течение характеризуется появлением новых очагов поражения, определяемых спустя много лет после установления диагноза «аутоиммунный панкреатит».

Основные патоморфологические изменения при IgG4-ССБ включают лимфоцитарно-плазмноклеточную инфильтрацию, формирование лимфоидных фолликулов, грубый склероз и облитерирующий флебит, сопровождающиеся атрофией паренхимы пораженных органов.

В зависимости от превалирования воспалительной инфильтрации или склероза выделяют псевдолимфоматозный, склеротический и смешанный варианты гистологических изменений. При иммуногистохимическом окрашивании в лимфоплазмочитарных инфильтратах выявляется большое количество IgG4+ плазматических клеток (ПК), при этом соотношение IgG4+ ПК/IgG ПК часто превышает 30–40% (в группах сравнения этот показатель обычно составляет <10%).

Объемные поражения, развивающиеся при IgG4-ССБ, с клинических позиций можно отнести к воспалительным псевдоопухолям (ВПО). Они описаны в поджелудочной железе, печени, орбите, легком, гипофизе, вилочковой железе, коже и других органах [19].

Патоморфология большинства ВПО идентична тем воспалительно-фиброзирующим изменениям, которые характерны для IgG4-ССБ; в этих образованиях так же резко повышается количество IgG4+ ПК и вырастает соотношение IgG4+ ПК/IgG ПК, состоящие преимущественно из плазматических клеток и лимфоцитов, описаны как плазмноклеточные гранулемы или псевдолимфомы [16].

Реже с IgG4-ССБ ассоциированы объемные образования, представленные пролиферирующими миофибробластами и примесью клеток воспаления с преобладанием плазматических. За последние 10–15 лет концепция биологической сущности и прогноза таких образований претерпела существенные изменения, из разряда ВПО они перешли в разряд воспалительных миофибробластических опухолей (ВМО), способных к трансформации в саркомы низкой степени злокачественности [18].

Можно предположить, что ВМО являются опухолевым аналогом ВПО. Установлено, что в отличие от последних в них выявляются генная транслокация ALK (anaplastic lymphoma kinase) или гиперэкспрессия протеина ALK, считавшиеся ранее специфичными маркерами крупноклеточной анапластической лимфомы.

Органопатология IgG4-ССБ включает прежде всего АИП [5], который известен как лимфоплазмочитарный склерозирующий панкреатит. Болеют преимущественно пожилые мужчины, средний возраст составляет 66,5 года (25–83 года), соотношение мужчин и женщин 4:1, частые клинические симптомы – механическая желтуха, связанная со стенозом интрапанкреатической части общего желчного протока, нарушения экзокринной и эндокринной функции поджелудочной железы.

Диагностические критерии АИП разработаны Japan Pancreatic Society [20]: 1) диффузное или локальное увеличение ПЖ по данным КТ; диффузное или сегментарное неравномерное сужение главного панкреатического протока; 2) повышение уровня сывороточного IgG и/или IgG4, наличие аутоантител; 3) гистологические изменения: фиброз и лимфоплазмочитарная инфильтрация; 4) ассоциация с другими (экстрапанкреатическими) аутоиммунными заболеваниями. Учи-

тывается также положительный ответ на стероидную терапию.

В типичных случаях АИП имеется диффузное увеличение (так называемая колбасообразная форма) ПЖ. Воспаление и фиброз распространяются на перипанкреатическую клетчатку, поэтому ПЖ окружена широкой псевдокапсулой; кальцификаты и псевдокисты редки. Случаи фокального увеличения ПЖ с узлообразованием как на макроскопическом, так и микроскопическом уровне трудно дифференцировать с опухолью, в том числе карциномой, особенно в небольших по объему биоптатах. Это объясняется тем, что в воспалительном инфильтрате остаточные протоковые структуры и отдельные скопления персистирующих клеток протокового эпителия имитируют аденокарциному [9].

IgG4-связанный склерозирующий холангит (IgG4-ССХ) часто ассоциирован с АИП и изредка с другими аутоиммунными болезнями, относящимися к группе IgG4-ССБ. В отличие от первичного склерозирующего холангита (ПСХ), который развивается в более молодом возрасте (30–40 лет), нередко ассоциирован со неспецифическим язвенным колитом, вовлекает внутрипеченочные желчные протоки и не отвечает на стероидную терапию. При IgG4-ССХ стеноз общего желчного протока локализуется в нижнем его отрезке и приводит к механической желтухе [27].

Гистологические изменения аналогичны таковым при АИП: трансмуральный фиброз, плотный лимфоплазмочитарный инфильтрат стенки желчного протока, распространение этих изменений на перипортальные отделы печени, облитеративный флебит. Воспаление более выражено в наружных отделах стенки протока, билиарный эпителий обычно интактен, тогда как при ПСХ часто наблюдаются эрозии слизистой ЖП; нейтрофилы в воспалительном инфильтрате, обычно выявляемые при ПСХ, для IgG4-ССХ нехарактерны.

Описаны многочисленные случаи IgG4-ССХ без панкреатических изменений. У пациентов с IgG4-ССХ часто наблюдается повышение сывороточного IgG4, и они, в отличие от страдающих ПСХ, прекрасно отвечают на стероидную терапию.

IgG4-связанная склерозирующая лимфаденопатия (ЛАП) с плазматизацией и склерозом ткани лимфатических узлов считается одним из возможных проявлений IgG4-ССБ [24] и в различной степени выражена у пациентов с АИП, однако описаны случаи, когда она была единственной клинической манифестацией болезни. Выделяют следующие основные гистологические варианты ЛАП при IgG4-ССБ: фолликулярная гиперплазия; изменения типа ангиофолликулярной гиперплазии (болезни Кастаньяна), особенно в ее плазмноклеточном варианте; интерфолликулярная пролиферация плазматических клеток и иммунобластов; интерфолликулярный склероз.

Описаны единичные случаи злокачественной лимфомы, предположительно развившейся на базе IgG4-

связанной ЛАП и IgG4-связанного хронического склерозирующего дакриoadенита.

На основании сопоставления данных лучевого исследования и патоморфологических изменений в резецированной легочной ткани выделены следующие основные клинико-морфологические варианты проявлений IgG4-ССБ с поражением легких: солидный нодулярный тип (воспалительная псевдоопухоль легкого); мелкие округлые образования типа «матовых стекол»; интерстициальный тип поражения и формирование сотового легкого; бронховаскулярный тип с утолщением бронховаскулярных тяжей и междолевой плевры, преимущественно в прикорневых отделах.

Гистологические изменения при легочной манифестации IgG4-ССБ включают фиброзно-воспалительные объемные поражения, воспалительную миофибробластическую опухоль (вариант с большим количеством IgG4+ плазматических клеток), воспалительную псевдоопухоль типа плазмоклеточной гранулемы [13], интерстициальный пневмонит [25], напоминающий идиопатическую неспецифическую интерстициальную пневмонию, и диссеминированные очаговые поражения, ранее расцениваемые как вариант злокачественной лимфомы Grade I – лимфоматоидный гранулематоз. В биоптатах легочной ткани обычно находят лимфогистиоцитарный инфильтрат, богатый плазматическими клетками, увеличение количества IgG4+ плазматических клеток с возрастанием индекса IgG4+ ПК/IgG+ ПК до 10–72%, фиброз, эндovasкулиты с поражением артерий и вен [31].

IgG4-связанный склерозирующий сиалоаденит (ССА) проявляется как увеличение и уплотнение одной СЖ, которое трудно отличить от истинной опухоли (опухоль Kuttner'a), или как болезнь Микулича (БМ), проявляющаяся двусторонним безболезненным симметричным уплотнением околоушных и подчелюстных слюнных, а также слезных желез. У пациентов с БМ часто повышен уровень сывороточного IgG4 [21]; в слезной и слюнных железах определяется инфильтрация IgG4 позитивными плазматическими клетками. Уплотнение СЖ определяется у 24% пациентов с АИП и ассоциируется с шейной и медиастинальной лимфаденопатией. Эти изменения обычно проходят после стероидной терапии. В СЖ определяются IgG4+ плазмоклеточная инфильтрация и фиброз с атрофией ацинарных структур [23].

Идиопатический IgG4-связанный забрюшинный фиброз (ЗФ) обычно имеет неспецифические клинические проявления (слабость, утомляемость, лихорадка, потеря веса). Патогномоничный признак ЗФ – массивная фиброзная масса, окутывающая брюшную аорту и сдавливающая мочеточники. В 70% случаев причина ЗФ неизвестна, он развивается у 8% пациентов с АИП и поддается стероидной терапии [4, 7]. Таким образом, некоторые случаи ЗФ могут быть расценены как проявление системной IgG4-ССБ. Наряду с ЗФ описаны идиопатический медиастинальный

фиброз, фиброз мягких тканей шеи, в части которых имеются морфологические признаки IgG4-ССБ в виде лимфоплазмочитарных инфильтратов и облитеративного флебита.

IgG4-связанный тубулоинтерстициальный нефрит (ТИН) ассоциируется с АИП в 30–35% случаев, однако встречается и вариант с высоким уровнем сывороточного IgG4 без признаков поражения ПЖ [4]. Описаны случаи АИП с множественными узловыми поражениями почек, симулирующими метастатические опухоли. Гистологические изменения, характерные для IgG4-ССБ, – наличие IgG4+ ПК в интерстициальных инфильтратах, фиброз, облитеративный ангиит.

Другими возможными проявлениями IgG4-ССБ могут быть склерозирующий холецистит, так как утолщение стенки желчного пузыря выявлено при УЗИ и/или КТ у 32% пациентов с АИП [28]; аутоиммунный склерозирующий гепатит; IgG4-связанный простатит, как ассоциированный, так и не ассоциированный с АИП [14]; фиброз щитовидной железы, симулирующий струму Риделя; IgG4-связанный склерозирующий мастит [17]; IgG4-связанный склерозирующий пахименингит; некоторые так называемые псевдолимфомы кожи (В-клеточная лимфоидная гиперплазия) и лимфоматоидный гранулематоз GI, IgG4-связанная воспалительная аневризма брюшной аорты.

Поражение вилочковой железы при IgG4-ССБ – это редкость. В доступной литературе мы нашли описание единственного случая и имеем собственное наблюдение опухолеподобного увеличения вилочковой железы с плазматической инфильтрацией, очаговым облитерирующим флебитом, атрофией тимической ткани и прогрессирующим фиброзом.

Особой формой IgG4-ССБ считается так называемый эозинофильный ангиоцентрический фиброз (Dashrando et al., 1911) с опухолеподобными изменениями в орбите и верхних дыхательных путях. При этом имеются все характерные клинико-морфологические признаки IgG4-ССБ, однако в воспалительных инфильтратах преобладают эозинофилы и определяется поражение мелких артерий с развитием вокруг них склероза, напоминающего луковичный (концентрические кольца коллагеновых волокон).

Заключение

Имеющиеся к настоящему времени многочисленные публикации и собственный многолетний диагностический опыт позволяют полагать, что IgG4-связанная склерозирующая болезнь (IgG4-ССБ) – это новая системная патология, распознавание органных проявлений которой имеет чрезвычайно важное значение для выбора тактики лечения больного, а в ряде случаев помогает избежать ненужного хирургического вмешательства и назначить патогенетически обоснованную и весьма эффективную стероидную терапию. Отсутствие точных знаний об этиологических, патогенетических и клеточно-молекулярных механизмах

IgG4-ССБ диктует необходимость выработки алгоритма ее дифференциальной диагностики с другими аутоиммунными системными патологическими процессами и онкологическими заболеваниями с

использованием современных патоморфологических и гено-молекулярных методик, поэтому участие патолога в уточненной диагностике IgG4-ССБ часто имеет решающее значение.

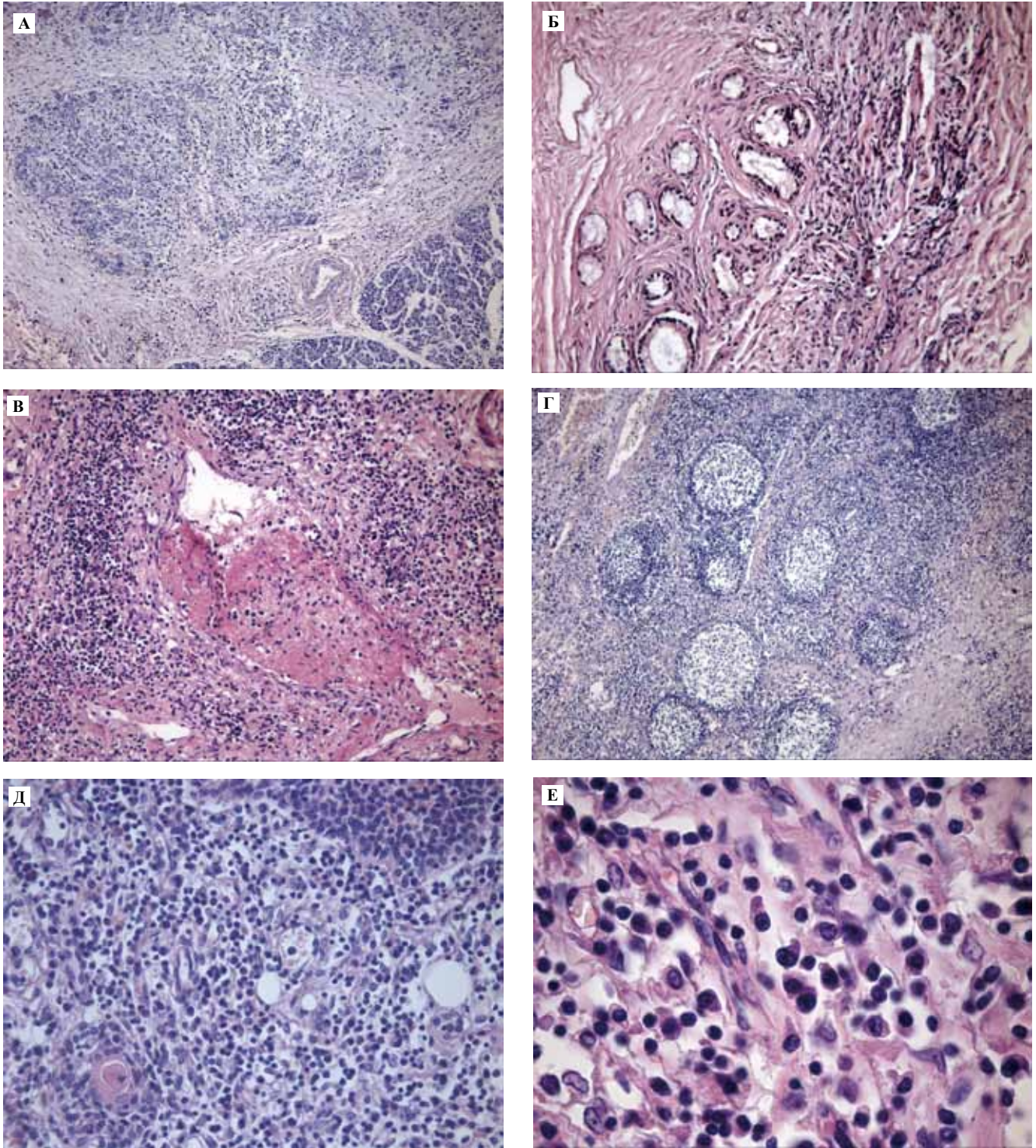


Рис. 1. Патоморфология IgG4-ССБ.

А. Узловая форма АИП. $\times 40$; Б. Фиброз с полной атрофией ацинарной ткани и пролиферацией протоков ПЖ. $\times 100$; В. Облитеративный флебит парапанкреатической клетчатки. $\times 100$; Г. ЛАП. Диффузный склероз, фолликулярная гиперплазия. $\times 100$; Д. Плазмноклеточная инфильтрация вилочковой железы. $\times 100$; Е. Тот же препарат. $\times 400$.

А–Е, 3. Окраска гематоксилином и эозином

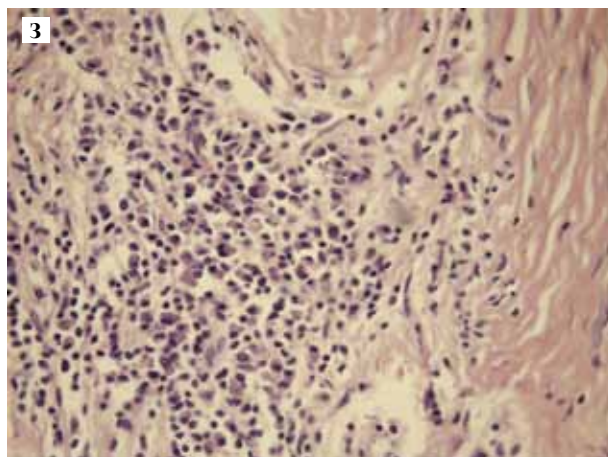
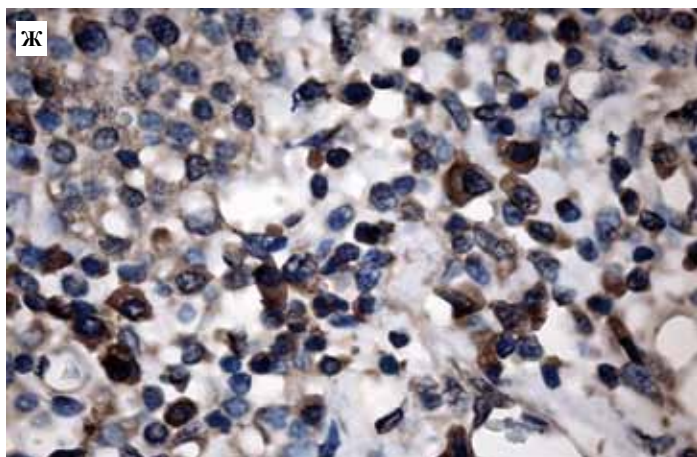


Рис. 1. Патоморфология IgG4-ССБ.

Ж. IgG4+ плазматические клетки в воспалительном инфильтрате. ИГХ окрашивание с АТ к IgG4. x 400
 3. Воспалительная псевдоопухоль легкого типа плазматической гранулемы, фибросклероз. x 200
 Окраска гематоксилином и эозином

Литература

1. Наблюдение IgG4-связанной склерозирующей болезни с лимфаденопатией и поражением вилочковой железы / Казанцева И.А., Лишук С.В., Гуревич Л.Е. и др. // Архив патологии. 2012. Т. 74. № 4. С. 43–45.
2. Казанцева И.А. IgG4-связанная склерозирующая болезнь / Казанцева И.А., Лишук С.В. // Архив патологии. 2011. Т. 73. № 3. С. 40–43.
3. A new clinicopathological entity of IgG4-related inflammatory abdominal aortic aneurysm / S. Kasashima, Y. Zen, A. Kawashima et al. // J Vasc Surg. 2009. N. 49. P. 1264–71.
4. Autoimmune pancreatitis metachronously associated with retroperitoneal fibrosis with IgG4-positive plasma cell infiltration. T. Kamisawa, P.Y. Chen, Y. Tu et al. // World J Gastroenterol. 2006. N. 12. P. 2955–7.
5. Autoimmune-related pancreatitis is associated with antibodies and a Th1/Th2-type cellular immune response / K. Okazaki, K. Uchida, M. Ohana et al. // Gastroenterology. 2000. N. 118. P. 573–81.
6. Chronic Sclerosing Sialadenitis (Küttner Tumor) Is an IgG4-associated Disease / J.T. Geyer, J.A. Ferry, N.L. Harris et al. // Am J Surg Pathol. 2010. N. 34. P. 202–10.
7. Close relationship between autoimmune pancreatitis and multifocal fibrosclerosis / T. Kamisawa, N. Funata, Y. Hayashi et al. // Gut. 2003. N. 52. P. 683–7.
8. Cornell L.D. Pseudotumors due to IgG4 Immune-Complex Tubulointerstitial Nephritis Associated With Autoimmune Pancreatocentric Disease / L.D. Cornell, S.L. Chicano, V. Deshpande // Am J Surg Pathol. 2007. N. 31. P. 1586–97.
9. Deshpande V. Subclassification of Autoimmune Pancreatitis: A Histologic Classification With Clinical Significance / V. Deshpande, R. Gupta, N. Sainani // Am J Surg Pathol. 2011. N. 35. P. 26–35.
10. Eosinophilic Angiocentric Fibrosis Is a Form of IgG4-related Systemic Disease / V. Deshpande, A. Khosroshahi, G.P. Nielsen et al. // Am J Surg Pathol. 2011. N. 35. P. 701–6.
11. Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens / G. Zamboni, J. Luttges, P. Capelli et al. // Virchows Arch. 2004. N. 445. P. 552–63.
12. IgG4-positive plasma cells in inflammatory abdominal aortic aneurysm: the possibility of an aortic manifestation of IgG4-related sclerosing disease / N. Sakata, T. Tashiro, N. Uesugi et al. // Am J Surg Pathol. 2008. N. 32. P. 553–9.
13. IgG4-positive plasma cells in inflammatory pseudotumor (plasma cell granuloma) of the lung / Y. Zen, S. Kitagawa, H. Minato et al. // Hum Pathol. 2005. N. 36. P. 710–7.
14. IgG4-related autoimmune prostatitis: two cases with or without autoimmune pancreatitis / I. Nishimori, T. Kohsaki, S. Onishi et al. // Intern Med. 2007. N. 46. P. 1983–9.
15. IgG4-related sclerosing disease incorporating sclerosing pancreatitis, cholangitis, sialadenitis and retroperitoneal fibrosis with lymphadenopathy / T. Kamisawa, H. Nakajima, N. Egawa et al. // Pancreatol. 2006. N. 6. P. 132–7.
16. IgG4-related Sclerosing disease: a potential new etiology of cutaneous pseudolymphoma / W. Cheuk, K.C. Lee, L.Y. Chong et al. // Am J Surg Pathol. 2009. N. 33(11). P. 1713–9.
17. IgG4-related sclerosing mastitis: description of a new member of the IgG4-related sclerosing diseases / W. Cheuk, A.C. Chan, W.L. Lam et al. // Am J Surg Pathol. 2009. N. 33(7). P. 1058–64.
18. Inflammatory Myofibroblastic Tumor Versus IgG4-related Sclerosing Disease and Inflammatory Pseudotumor A Comparative Clinicopathologic Study / Y. Yamamoto, Y. Yamaguchi, S. Aishima et al. // Am J Surg Pathol. 2009. N. 33. P. 1330–40.
19. Inflammatory pseudotumors in multiple organs associated with elevated serum IgG4 level: recovery by only a small replacement dose of steroid / H. Tsuboi, S. Inokuma, K. Setoguchi et al. // Intern Med. 2008. N. 47. P. 1139–42.
20. Japanese consensus guidelines for management of autoimmune pancreatitis: III. Treatment and prognosis of AIP / T. Kamisawa, K. Okazaki, S. Kawa et al. // J Gastroenterol. 2010. N. 45. P. 471–7.

21. *Kamisawa T.* Close relationship between chronic sclerosing sialadenitis and IgG4. / T. Kamisawa, H. Nakajima, T. Hishima // *Intern Med J.* 2006. N. 36. P. 527–9.
22. *Kamisawa T.* IgG4-related sclerosing disease / T. Kamisawa, A. Okamoto // *World J Gastroenterol.* 2008. N. 14(25). P. 3948–55.
23. *Kitagawa S.* Abundant IgG4-Positive Plasma Cell Infiltration Characterizes Chronic Sclerosing Sialadenitis (Küttner's Tumor) / S. Kitagawa, Y. Zen, K. Kenichi Harada // *Am J Surg Pathol.* 2005. N. 29. P. 783–91.
24. Lymphadenopathy of IgG4-related sclerosing disease / W. Cheuk, H.K. Yuen, S.Y. Chu et al. // *Am J Surg Pathol.* 2008. N. 32(5). P. 671–81.
25. Nonspecific interstitial pneumonia with abundant IgG4-positive cells infiltration, which was thought as pulmonary involvement of IgG4-related autoimmune disease / H. Takato, M. Yasui, Y. Ichikawa et al. // *Intern Med.* 2008. N. 47. P. 291–4.
26. Ocular adnexal lymphoma associated with IgG4+ chronic sclerosing dacryoadenitis: a previously undescribed complication of IgG4-related sclerosing disease / W. Cheuk, H.K. Yuen, A.C. Chan et al. // *Am J Surg Pathol.* 2008. N. 32(8). P. 1159–67.
27. Sclerosing cholangitis associated with autoimmune pancreatitis differs from primary sclerosing cholangitis / T. Kamisawa, K. Takuma, H. Anjiki et al. // *World J Gastroenterol.* 2009. N. 15. P. 2357–60.
28. Sclerosing cholecystitis associated with autoimmune pancreatitis / T. Kamisawa, Y. Tu, H. Nakajima et al. // *World J Gastroenterol.* 2006. N. 12. P. 3736–9.
29. *Shilo K.* Diffuse Thymic Fibrosis Histologic Pattern of Injury or Distinct Entity? / K. Shilo, H. Mani, C. Deshpande // *Am J Surg Pathol.* 2010. N. 34. P. 211–5.
30. Th2 and regulatory immune reactions are increased in immunoglobulin G4-related sclerosing pancreatitis and cholangitis / Y. Zen, T. Fujii, K. Harada et al. // *Hepatology.* 2007. N. 45. P. 1538–46.
31. *Yamashita K.* Lung Involvement in IgG4-related Lymphoplasmacytic Vasculitis and Interstitial Fibrosis Report of 3 Cases and Review of the Literature / K. Yamashita, H. Haga, Y. Kobashi // *Am J Surg Pathol.* 2008. N. 32. P. 1620–6.
32. *Zen Y.* Coronary artery pseudotumor: IgG4-related disease versus localized Castleman disease / Y. Zen, Y. Matsumoto // *Human Pathology.* 2009. N. 40. P. 279–80.

IGG4-RELATED SCLEROSING DISEASE – A NEW SYSTEMIC PATHOLOGY

I.A. Kazantseva, S.V. Lishchuk

The article is to review modern knowledge on IgG4-related sclerosing disease. Many-sided clinical manifestations depending on prevalent organ pathology have been demonstrated. Much attention is paid to the pathologist part for diagnosis and confirmation of the disease. Regarding disease rarity and relative recently marked out nosologic pattern, the publication is demonstrating main features, which should orient clinical specialist and pathologist when making patient management decision.

Key words: autoimmune pancreatitis, IgG4, IgG4 –related sclerosing disease, inflammatory pseudotumors

Информация об авторах

Казанцева Ирина Александровна – докт. мед. наук, профессор, руководитель патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина д. 61/2. Телефон +7 (495) 684-4498. E-mail: leycom@mail.ru

Лишук Сергей Владимирович – руководитель патоморфологического отделения Группы компаний «Европейский медицинский центр».

Адрес: 127018, Москва, ул. Октябрьская, д. 33А. Телефон +7 933-6655, добавочный 2404. E-mail: lslischchuk@emcmos.ru

Материал поступил в редакцию 20 февраля 2013 года.

ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КИШЕЧНОЙ МЕТАПЛАЗИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА

С.В. Вернигородский¹, М.В. Мнихович²

¹ Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Винница, Украина

² ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

На основе патоморфологического анализа гастробиопсий изучена экспрессия иммуногистохимических маркеров при кишечной метаплазии (КМ) слизистой оболочки желудка (СОЖ). Показано, что наибольшую прогностическую и диагностическую ценность имеют транскрипционный фактор кишечной дифференциации (CDX2), цитокератин 7 (СК7), муцин (MUC 5 AC) и маркер пролиферативной активности Ki-67. Предложен алгоритм патоморфологической диагностики КМ СОЖ с использованием данных иммуногистохимических маркеров.

Ключевые слова: иммуногистохимические маркеры, кишечная метаплазия слизистой оболочки желудка

В структуре злокачественных новообразований рак желудка (РЖ) занимает одно из ведущих мест, уступая только раку легкого. Удельный вес этой патологии в структуре онкологических заболеваний составляет 12,3% (у мужчин рак желудка занимает 2-е место – 14,2%, у женщин 3-е место – 10,4%). Наиболее часто РЖ выявляется у лиц в возрасте 45–59 лет, хотя основной пик заболеваемости приходится на возрастную группу 70–74 года. Мужчины болеют почти в 2 раза чаще, чем женщины, причем эта разница с возрастом увеличивается [5]. Несмотря на некоторое снижение уровня заболеваемости раком желудка во всех странах мира, своевременная диагностика и лечение опухолей желудка остаются сложной и актуальной проблемой современной онкологии. Решение ее невозможно без определения основных факторов риска данного заболевания, выявления предраковых состояний и изменений слизистой оболочки желудка (СОЖ). Прогнозирование течения диспластических и метастатических процессов в СОЖ и формирование групп риска по РЖ позволит улучшить качество диагностики и снизить число больных им.

Предраковые изменения давно привлекают особое внимание исследователей, однако возможность морфологической диагностики предрака до настоящего времени дискутируется. Это объясняется тем, что понятие предрака является прогностическим, а постановка подобного диагноза конкретному пациенту может повлечь за собой лечебные мероприятия, оправданность которых должна быть полностью аргументирована. Как известно, предупредить опухолевую прогрессию можно только при раннем выявлении злокачественного

новообразования или своевременном лечении предопухолевых заболеваний, поэтому столь важную роль должно играть рациональное формирование групп онкологического риска.

В настоящее время к основным предраковым состояниям относят хронический активный гастрит (ХАГ) и инфекцию *Helicobacter pylori*, а к основным предраковым морфологическим изменениям – кишечную метаплазию и дисплазию эпителия СОЖ [1, 7]. Центральное место в проблеме предраковых состояний желудка занимает ХАГ.

При целенаправленном эндоскопическом скрининге населения ранний РЖ обнаруживается в среднем на 10 лет раньше, чем местно распространенные опухоли. Рутинные методы обследования пациентов с РЖ и предраковыми состояниями практически не позволяют распознать патологический процесс на ранних стадиях [2, 3]. Это делает актуальным поиск чувствительных и специфичных методов диагностики, базирующихся на выявлении вовлеченных в формирование и прогрессию РЖ и предраковых состояний молекулярно-биологических маркеров.

Целью нашей работы было изучение закономерностей экспрессии молекулярно-биологических маркеров в клетках СОЖ при кишечной метаплазии для обоснования их диагностической и прогностической ценности.

Материалы и методы

В течение 6 лет обследовано 336 пациентов, которые были направлены в эндоскопические отделения и

кабинеты для уточнения клинического диагноза. Мужчин среди них было 192 (57%), женщин – 144 (43%). За основную группу принято 68 больных с ХАГ и наличием КМ из-за подавляющей ассоциации последней с ХАГ. В группу сравнения вошли 30 человек, больных ХАГ без КМ. Средний возраст пациентов, которые были обследованы в динамике, составил $52,96 \pm 1,13$ года, средняя продолжительность заболевания на момент диагностики КМ – $2,6 \pm 0,63$ года. В процессе фиброэзофагогастроуденоскопии и хромоэндоскопии с 0,5% водным раствором метиленового синего выполняли множественные биопсии (по 2 биоптата из тела и антрального отдела желудка и 1 из области угла желудка) с учетом требований модифицированной Сиднейской системы диагностики хронического гастрита и из покрашенных участков СОЖ с последующим гистологическим изучением биоптатов. Биопсийный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине и после общепринятой обработки изготавливали парафиновые блоки, а из них – срезы толщиной 5–7 мкм. Для определения метапластических изменений СОЖ использовали следующие методики: гистологические (окраска гематоксилином и эозином), гистохимические (окраска железистым диамином по Спайсеру, орсеином в сочетании с альциановым синим, альдегид фуксином по Гомори, альциановым синим при pH 1,0 и 2,5 в сочетании с ШИК-реакцией). Определение персистенции *H. pylori* в СОЖ проводилось с использованием быстрого уреазного теста, цитологического метода по Папенгейму, гистологического – окраской по Романовскому–Гимзе и толуидиновым синим. Иммуногистохимические исследования выполняли на парафиновом срезе с использованием стрептавидин-биотинового метода (DAKO, Дания, LSAB2 Systems, HRP). Демаскировки антигена проводили в цитратном буфере с pH 6,0. В качестве первичных антител применяли мышинные и кроличьи моноклональные антитела. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера в течение 15–60 секунд. Проллиферативную активность клеток оценивали с помощью мышинных моноклональных антител к ядерному антигену Ki-67 (DAKO, клон MIB-1, Дания) по методу T. Scholzen, 2000 [8]. В препаратах при 400-кратном увеличении микроскопа определяли индекс пролиферации (ядерная метка Ki-67) и индекс апоптоза (перинуклеарная или цитоплазматическая метка CPP32 - caspase-3) в 5 случайно выбранных полях зрения (≥ 500 клеток) как долю в процентах положительно окрашенных ядер эпителиоцитов СОЖ в трех компартментах (1-й – поверхностный и ямочный эпителий; 2-й – перешеечная зона, 3-й – основа желез, средняя и нижняя треть желез базальных отделов). Аналогичным образом определяли индекс метки p53 – маркера повреждения

ДНК, bcl-2 – супрессора апоптоза и CDX2 – транскрипционного фактора кишечной дифференциации. Для оценки экспрессии муцинов (MUC1, MUC2, MUC 5AC), цитокератинов (СК7, СК20) и карциноэмбрионального антигена (СЕА) в СОЖ в аналогичных участках использовалась полуколичественная шкала оценки интенсивности окраски: 0 (отсутствует) – отсутствие положительной реакции в клетках, 1 (слабая) – до 30% клеток, которые отреагировали позитивно, 2 (умеренная) – 31–60%, 3 (сильная) – 60% и более окрашенных клеток [6].

Результаты и обсуждение

Среди иммуногистохимических маркеров, которые были использованы нами, наиболее эффективными в динамике оказались CDX2, СК7, СК20, MUC 5AC, MUC2, HER2, Ki 67, p53, СЕА.

MUC1 и bcl-2 не показали существенных изменений на протяжении 6 лет ($p < 0,05$). Нами отмечены преобладание пациентов с CDX2-положительным фактором при полной КМ (ПКМ) и неполной КМ (НКМ) во время первичного обследования (рис. 1) и достоверное ($p < 0,05$) уменьшение экспрессии CDX2 при повторных обследованиях.

Экспрессия цитокератина 7 усиливалась со временем преимущественно в случаях с НКМ и при изменении гистологического фенотипа с полной на неполную КМ, экспрессия СК20 также усиливалась, однако преобладала у пациентов с ПКМ и при появлении тонкокишечного фенотипа у больных с НКМ. Весьма информативной в динамике оказалась экспрессия MUC 5AC. Так, в течение 6 лет у пациентов с диспластическими изменениями, формирующимися микроаденомами его маркировка уменьшалась от выраженной (++++) к слабой (+). После эрадикации *H. pylori* наблюдалось

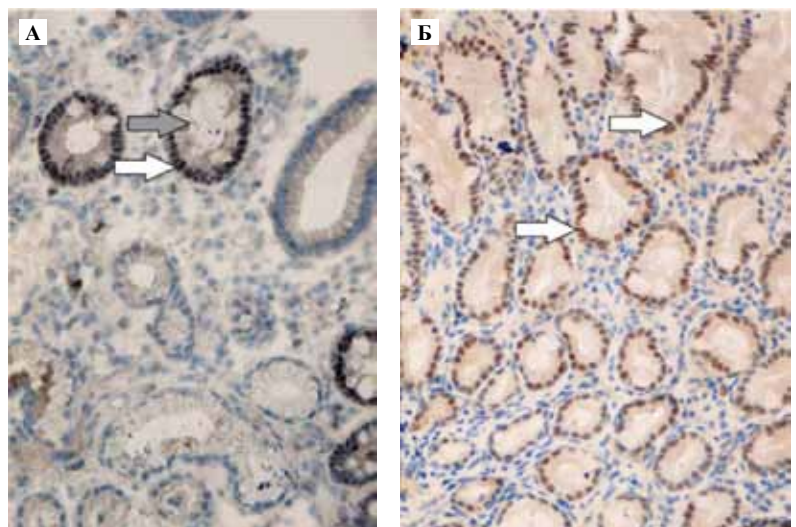


Рис. 1. Сильная экспрессия CDX2 в ядрах абсорбтивных эпителиоцитов, бокаловидных клеток и желудочного эпителия. Хронический атрофический гастрит с полной кишечной метаплазией. Иммуногистохимическая окраска CDX2. А $\times 400$, Б $\times 200$

незначительное повышение экспрессии MUC 5AC (рис. 2), но выявленные изменения были недостоверными ($p>0,05$).

Маркировка MUC2 со временем усиливалась и не зависела от инфицирования *H. pylori*. Экспрессия трансмембранного рецептора тирозинкиназы HER2 была характерной для НКМ и усиливалась на протяжении всего периода наблюдения. Положительная экспрессия p53 проявлялась преимущественно у пациентов с НКМ и дисплазией тяжелой степени. Карциноэмбриональный антиген встречался только в щеточной каемке больных с ПКМ и определялся в цитоплазме призматических клеток при прогрессировании НКМ. В динамике отмечали появление как ПКМ, так и НКМ, а у 53% пациентов присутствовали оба типа КМ в СОЖ. При динамическом наблюдении в случаях ПКМ гистологический тип не менялся у 41% больных в течение 6 лет, как у *H. pylori* положительных (+), так и у отрицательных (-) пациентов. Дисплазия легкой степени в участках, прилегающих к ПКМ, развилась в 6% случаев. В 59% у *H. pylori* (+) больных наряду с полным типом КМ был обнаружен неполный. У пациентов с НКМ отмечали прогрессирование диспластических изменений с возникновением дисплазии тяжелой степени в 30%, аденом – в 15% случаев в течение 2 лет. У 3 больных с НКМ и 1 с ПКМ был обнаружен РЖ при повторном обследовании через 5 месяцев в течение 1 года с момента первичной диагностики КМ, однако им выполняли повторную биопсию после диагностики КМ через 3 и 5 месяцев и проводили забор 6 гастробиоптатов для гистологического исследования. Это означает, что вскоре после постановки первоначального

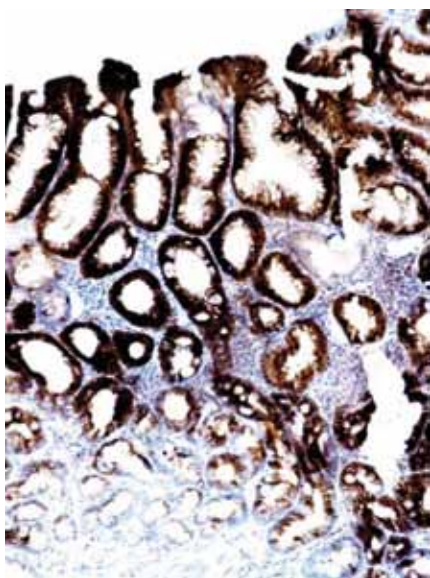


Рис. 2. Выраженная экспрессия MUC 5AC в желудочных эпителиоцитах и призматическом эпителии в участках полной и неполной кишечной метаплазии после эрадикации *H. pylori*. Иммуногистохимическая окраска MUC 5AC. $\times 200$

диагноза нужно проводить тщательную эндоскопическую и гистологическую оценку и в случае эндоскопически видимых поражений необходима резекция либо при помощи эндоскопии (эндоскопическая резекция слизистой) либо хирургическая. Наряду с неполным и полным типом КМ у 53% больных присутствовали оба типа КМ в СОЖ.

Из 30 пациентов с ХАГ без КМ у 3% отмечали появление дисплазии. Формирования аденом и возникновения рака не наблюдали.

В нашем исследовании распространение КМ коррелировало с возрастом больных и инфицированием *H. pylori*. Так, КМ наблюдалась преимущественно у пациентов старше 45 лет (средний возраст – $57,23 \pm 1,59$ года). Мы не обнаружили определенной зависимости между степенью активности ХАГ и распространенностью КМ. По нашим данным, распространение КМ останавливалось у больных, которым была проведена эрадикация *H. pylori*, и прогрессировала у пациентов без таковой. При этом у последних на протяжении 6 лет площадь КМ увеличилась на 25% и у 18% пациентов перешла из субтотального в тотальный тип. Регрессивных изменений КМ после эрадикации инфекции мы не зарегистрировали.

Сопоставление результатов эндоскопической диагностики при общепринятой гастроскопии и хромогастроскопии с метиленовым синим доказало достоверно ($p<0,05$) большую эффективность хромогастроскопии. Информативность метода очень высока, о чем свидетельствует совпадение результатов хромоэндоскопии с данными патогистологического исследования биоптатов в 98% случаев против 75,5% при эндоскопии. Использование магнификационной (НМЕ) и узкоспектральной (NBI) эндоскопии по сравнению с хромогастроскопией позволяет определить макроскопические дифференциально-диагностические критерии КМ: для ПКМ характерна ворсинчатая структура поверхности СОЖ, для НКМ – преимущественно сетчатая. Степень распространенности КМ имеет решающее значение для прогноза диспластических и неопластических изменений СОЖ. При ее объеме, который превышает 20% поверхности СОЖ, создаются условия для развития дисплазии и аденокарциномы желудка.

Таким образом, динамическое наблюдение за пациентами с ХАГ с КМ позволяет выявить диспластические изменения эпителия и появление неопластических изменений на ранних этапах. В соответствии с нашими данными, наряду с прогрессированием диспластических изменений у больных с неполной КМ, а именно распространением КМ из антрального отдела на тело и кардиальный отдел, является прогностически неблагоприятным в плане дальнейшей опухолевой трансформации.

Полученные результаты позволили предложить следующую алгоритм патоморфологической диагностики кишечной метаплазии СОЖ с использованием иммуногистохимических маркеров (рис. 3, 4).



Рис. 3. Алгоритм определения транскрипционного фактора кишечной дифференциации у больных ХАГ с КМ. ЖЭ – желудочный эпителий. ПЭ – призматические эпителиоциты. БК – бокаловидные клетки



Рис. 4. Дополнительные прогностические маркеры прогрессии КМ

1. Определение транскрипционного фактора кишечной дифференциации CDX2.

2. Определение дополнительных прогностических молекулярно-биологических маркеров в очагах КМ (СК7, MUC5AC, Ki-67).

Выводы

Анализ литературы и наших исследований позволил выделить среди больных хроническим активным гастритом с кишечной метаплазией группу риска в плане развития РЖ и определить программу их наблюдения с целью более глубокого и всестороннего клинико-инструментального исследования.

1. Пациенты, страдающие хроническим атрофическим гастритом с явлениями кишечной метаплазии слизистой оболочки желудка. Для наблюдения может быть использована общая схема при полной (тонкоки-

шечной) слабой (занимает до 5% поверхности желудка) и умеренной (до 20%) метаплазии.

2. Общая схема наблюдения: чередование хромоэндоскопического исследования с морфологическим изучением многочисленных биоптатов любых очаговых изменений СОЖ с кратностью 1 раз в 2 года у лиц в возрасте 35–49 лет и ежегодно у лиц старше 50 лет. Ежегодное не реже 1 раза в год эндоскопическое наблюдение с гистологическим и цитологическим исследованием нескольких биоптатов при прогрессировании процесса – переходе от умеренной до тяжелой полной метаплазии (более 20%) или выявления очагов неполной метаплазии.

3. Пациенты с хроническим атрофическим гастритом и явлениями дисплазии СОЖ. Для наблюдения может быть использована общая схема при слабой дисплазии. Прогрессирование процесса (появление признаков умеренной дисплазии) требует перехода к схеме с ежегодным (1 раз в год) гистологическим исследованием нескольких биоптатов. Дальнейшее ухудшение степени дисплазии (тяжелая) не исключает онкотрансформацию, поэтому решается вопрос о последующем наблюдении (эндоскопическое исследование 1 раз в 3 месяца, не менее 2 раз в год). Легкую и умеренную дисплазию рассматривают как регенераторную атипию, а не предрак. Ухудшение степени дисплазии свидетельствует о прогрессировании малигнизации, что повышает вероятность возникновения рака. Схема зависит от результатов гистологического исследования [4].

Таким образом, группы риска необходимо формировать по морфологическим критериям, общим для всех предраковых состояний желудка. Наличие неполной метаплазии, тяжелой дисплазии эпителия на фоне атрофического гастрита является, по данным многих авторов, абсолютным показанием к динамическому наблюдению за больными, включению их в группы высокого риска развития рака желудка. Необходимо более тесное сотрудничество врачей патогистологических лабораторий с клиницистами, что будет способствовать улучшению диагностики и дальнейшей тактики ведения пациентов с предраковыми состояниями и изменениями СОЖ.

Использование иммуногистохимических маркеров наряду с хорошо известными и широко применяемы-

ми гистохимическими прогностическими факторами позволит более точно проводить диагностику кишечной метаплазии СОЖ, прогнозировать течение заболевания и своевременно осуществлять коррекцию лечения.

Литература

1. *Бабак О.Я.* Хронический атрофический гастрит – точка отсчета начала канцерогенеза / О.Я. Бабак, Ю.В. Протас // Сучасна гастроентерологія. 2005. № 5 (25). С. 9–14.
2. *Поддубный Б.К.* Современное состояние эндоскопической диагностики и лечения ранних форм рака пищевода и желудка / Б.К. Поддубный, Ю.П. Кувшинов, О.Н. Ефимов // Современная онкология. 2000. № 2. С. 68–72.
3. *Заридзе Д.Г.* Эпидемиология и этиология злокачественных заболеваний / Д.Г. Заридзе // Канцерогенез. М.: Научный мир, 2000. С. 26–30.
4. Формирование групп риска по раку желудка / Л.Е. Денисов, О.Н. Минушкин, Е.Г. Бурдина и др. // Кремлевская медицина. Клинический вестник. 1999. № 1. С. 13–17.
5. *Шаназаров Н.А.* Рак желудка: Учебное пособие / Под ред. А.В. Важенина // Челябинск, 2001. 29 с.
6. *Cassaro M.* Indefinite for non-invasive neoplasia lesions in gastric intestinal metaplasia: the immunophenotype / M. Cassaro, M. Rugge, C. Tieppo et al. // J. Clin. Pathol. 2007. V. 60. P. 615–21.
7. *Stanley R.* Hamilton Lauri A. Aaltonen. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press. Lyon, 2000. 314 p.
8. The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure / T. Scholzen, E. Endl, C. Wohlenberg et al. // J. Pathol. 2002. V. 196. P. 135–44.

DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC VALUE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF INTESTINAL METAPLASIA OF MUCOUS MEMBRANE OF THE STOMACH

S.V. Vernygorodskyi

The expression of molecular and biological markers in the intestinal metaplasia (IM) of the gastric mucosa on the basis of pathomorphological analysis was studied. It is shown that the follow useful prognostic and diagnostic value have been used: differentiation of intestinal transcription factor (CDX2), cytokeratin 7 (CK7), mucin (MUC 5 AC) and a marker of proliferative activity - Ki-67. The algorithm for pathomorphological diagnosis of gastric mucosa IM with using of immunohistochemical markers was suggested.

Key words: molecular and biological markers, intestinal metaplasia of the gastric mucosa

Информация об авторах

Вернигородский С.В. – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии с курсами судебной медицины и права Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

Адрес: 21018, Украина, Винница, ул. Пирогова, д. 56. Телефон 380 (432) 50-03-60. E-mail: vernsot@rambler.ru

Мнихович Максим Валерьевич – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: mnichmaxim@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 2 марта 2013 года.

ЭКСПРЕССИЯ ГЛИКОДЕЛИНА В ОПУХОЛЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

*Н.А. Старосветская¹, Л.Е. Гуревич², М.Н. Болтовская¹,
Н.А. Корсакова², А.А. Степанов¹*

¹ ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МОНКИ) им. М.Ф. Владимирского», Москва

Исследована экспрессия гликоделина (ГД) и рецепторов прогестерона (РП) в 19 нейроэндокринных, 14 солидно-папиллярных, 10 экзокринных опухолях поджелудочной железы с использованием оригинальных моноклональных антител к ГД и антител к РП типа А и В. Цитоплазматический тип экспрессии ГД оценивали в баллах (1–3+), ядерную экспрессию РП – как процент окрашенных ядер (РП-индекс) и в H-Score по аналогии с оценкой рецепторов в раке молочной железы. Интенсивная экспрессия ГД и РП выявлена в солидно-папиллярных (1,5 балла, 82,9% клеток, N=166,1) и высокодифференцированных нейроэндокринных опухолях G1 (1,95 балла, 79,8% клеток, N=154,3). В нейроэндокринных опухолях G2 экспрессия ГД и РП уменьшалась (0,69 балла, 55,0% клеток, N=65,0). В экзокринных опухолях экспрессия ГД и РП отсутствовала. Таким образом, экспрессия ГД характерна для РП-позитивных солидно-псевдопапиллярных и высокодифференцированных нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы и может рассматриваться в качестве критерия их более благоприятного прогноза.

Ключевые слова: гликоделин, опухоли поджелудочной железы, иммуноморфология

Определение степени злокачественности и критериев прогноза опухолей – одна из главных проблем онкоморфологии, поэтому поиск новых молекулярно-биологических маркеров, которые позволят более адекватно оценивать злокачественный потенциал опухолей и прогнозировать их чувствительность к химио- и гормонотерапии, очень актуален. В ряде работ показано, что в качестве критерия прогноза рака молочной железы и эндометрия, а также серозной карциномы яичников можно рассматривать экспрессию гликоделина – прогестеронзависимого гликопротеина, который продуцируется в железистом эпителии органов репродуктивной системы человека. ГД обладает иммуносупрессорной и ангиогенной активностью, участвует в регуляции апоптоза и межклеточной адгезии, а его экспрессия в гормональнозависимых опухолях расценивается как благоприятный признак, характеризующий более высокую степень дифференцировки клеток железистого эпителия [9].

Данные об экспрессии ГД в эпителии органов, не относящихся к репродуктивному тракту, крайне ограничены. Он был выявлен в эпителии бронхов крысы [13], парабронхиальных железах легкого [7], а также в клетках бифазных синовиальных сарком [6] и цистаденом поджелудочной железы (ПЖ) [7].

Клетки высокодифференцированных нейроэндокринных (НЭО) и солидно-псевдопапиллярных опу-

холей ПЖ (СППО) обычно экспрессируют рецепторы к прогестерону (РП) в ядрах опухолевых клеток и могут рассматриваться как гормональнозависимые опухоли [3, 4, 16], поэтому мы предположили возможность продукции в их клетках ГД. Целью работы стало исследование экспрессии ГД и РП в опухолях ПЖ разных типов и степени злокачественности.

Материалы и методы

Было исследовано 43 образца ткани опухолей ПЖ: 19 НЭО, 14 СППО и 10 экзокринных (2 муцинокистозные, 2 внутрипротоковые, 5 аденокарцином и 1 анапластическая опухоль). Окружающую внеопухолевую ткань ПЖ в тех образцах, где она имела, использовали как внутренний контроль.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование. В качестве первичных антител для выявления экспрессии ГД были использованы оригинальные мышиные моноклональные антитела (МКА) против ГД, полученные в НИИ морфологии человека РАМН. МКА выделяли из асцитной жидкости высаливанием 50% сульфатом аммония с последующей очисткой методом хроматографии на Protein A Agarose (Fast Flow 50% (v/v), Sigma). Для ИГХ были выбраны МКА A4f8 (субкласс IgG1, концентрация 2,7 мг/мл, рабочее разведение 1:800). В качестве референс-антител использовали моноклональные кроличьи антитела АЕР/

PEG/Glycodelin, клон EP870Y (EPITOMICS, США) в разведении 1:30.

Рецепторы прогестерона (типа А и В) выявляли с использованием кроличьих моноклональных антител (LabVision, США, клон SP2) в разведении 1:600. Для восстановления антигенности депарафинированные срезы предварительно обрабатывали в MW-режиме (680 Вт, цитратный буфер pH 6,0, дважды по 10 минут).

Для визуализации реакции использовали универсальную систему UltraVision (LabVision, США) с DAB в качестве хромогена. Срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Оценка ИГХ реакции. Экспрессию ГД оценивали полуколичественно, как принято для большинства цитоплазматических маркеров (0 – отсутствие реакции, 1 – слабое окрашивание, 2 – умеренное окрашивание (до 50% опухолевых клеток), 3 – интенсивное окрашивание (большинства клеток), а интенсивность реакции в каждой группе условно оценивали как среднее значение в баллах. Экспрессию РП оценивали количественно как РП-индекс, то есть как процент (%) меченых ядер на 100 ядер опухолевых клеток при подсчете не менее 200 клеток опухоли в репрезентативных полях зрения (исключая зоны некроза, артефициальные зоны). Экспрессию РП дополнительно оценивали в баллах (H-score) аналогично тому, как оценивают рецепторный статус опухолей молочной железы: $H = Ax1 + Bx2 + Cx3$, где А – число меченых ядер с интенсивностью окрашивания 1+, В – число меченых ядер с интенсивностью окрашивания 2+, С – число меченых ядер с интенсивностью окрашивания 3+.

Статистическая обработка. Данные были проанализированы с помощью программы Sigma Stat 6 (Systat Software, Inc.). При сравнении РП-индекса определяли среднее арифметическое и стандартную ошибку по формуле для долей, сравнение двух выборочных долей проводили с помощью z-критерия. Интенсивность окрашивания в баллах представляли как среднее арифметическое и стандартную ошибку. Оценку различий между двумя выборками проводили по критерию Манна–Уитни, различия считали значимыми при 5% уровне достоверности.

Результаты

Опухоли ПЖ были верифицированы в соответствии с классификацией ВОЗ на основании клинической картины, гистологического строения и иммунофенотипа клеток, который определяли при ИГХ исследовании. Все НЭО ПЖ экспрессировали общие нейроэндокринные маркеры синаптофизин и хромогранин А. 10 НЭО были высокодифференцированными Grade 1 (ВД НЭО, G1) – 8 инсулином и 2 нефункционирующие опухоли, 9 – высокодифференцированными НЭО Grade 2 (ВД НЭО, G2) – 2 инсулиномы и 7 нефункционирующих опухолей.

МКА А4f8 ранее были использованы для выявления ГД в эндометрии [2] и опухолях молочной желе-

зы [1]. Для оценки специфичности взаимодействия МКА А4f8 с клетками ПЖ провели сравнительный анализ иммунодетекции ГД с использованием оригинальных и коммерческих референс-антител АЕР/PEG/Glycodelin, клон EP870Y. Оба антитела в стандартизированных условиях постановки давали идентичную по локализации ИГХ реакцию, но интенсивность реакции с МКА А4f8 была более выраженной, чем с антителами АЕР/PEG/Glycodelin, поэтому для дальнейшего исследования выбрали оригинальные МКА против ГД.

При ИГХ исследовании внеопухолевой ткани ПЖ в клетках эндокринных островков наблюдались интенсивная цитоплазматическая экспрессия ГД (рис. 1 А) и высокий уровень ядерной экспрессии РП (рис. 2 А). Клетки экзокринной ткани ПЖ ГД и РП не экспрессировали.

Экспрессия ГД была обнаружена в 13 из 14 исследованных СППО (93%), во всех 10 ВД НЭО-G1 и в 7 из 9 ВД НЭО-G2 (78%). В клетках экзокринных опухолей ПЖ экспрессию ГД не выявили, при этом положительная реакция на ГД наблюдалась в клетках окружающих эндокринных островков и эндокринных клетках, ассоциированных с опухолью (рис. 1 Д).

В преобладающем большинстве клеток СППО (рис. 1 Б) и ВД НЭО-G1 (рис. 1 В) ГД выявлялся в виде равномерного гранулярного цитоплазматического окрашивания, чаще всего с интенсивностью 2–3+, в среднем 1,5 и 1,95 балла, соответственно. В клетках ВД НЭО-G2, часть из которых метастазировала, экспрессия ГД имела неравномерный, часто очаговый характер (рис. 1 Г), ее интенсивность (0,69 балла) статистически значимо уменьшалась по сравнению с СППО и ВД НЭО-G1 (табл.).

Таблица

Экспрессия гликоделина и рецепторов прогестерона в опухолях поджелудочной железы

Тип опухоли	ГД M ±m	РП M ±m	
		H-score	РП-индекс
СППО (А)	1,50±0,22	166,09±9,36	82,93±2,93
ВД НЭО-G1 (В)	1,95±0,22	154,33±5,89	79,78±3,39
ВД НЭО-G2 (С)	0,69±0,21	65,00±17,88	55,00±11,07
Достоверность различий			
А-В	P=0,175	P=0,342	P=0,487
А-С	P=0,025	P=0,001	P=0,022
В-С	P=0,002	P=0,001	P=0,060

РП-положительными были все СППО (рис. 2 Б) и все ВД НЭО-G1 (рис. 2 В), причем РП экспрессировались в ядрах большинства опухолевых клеток.

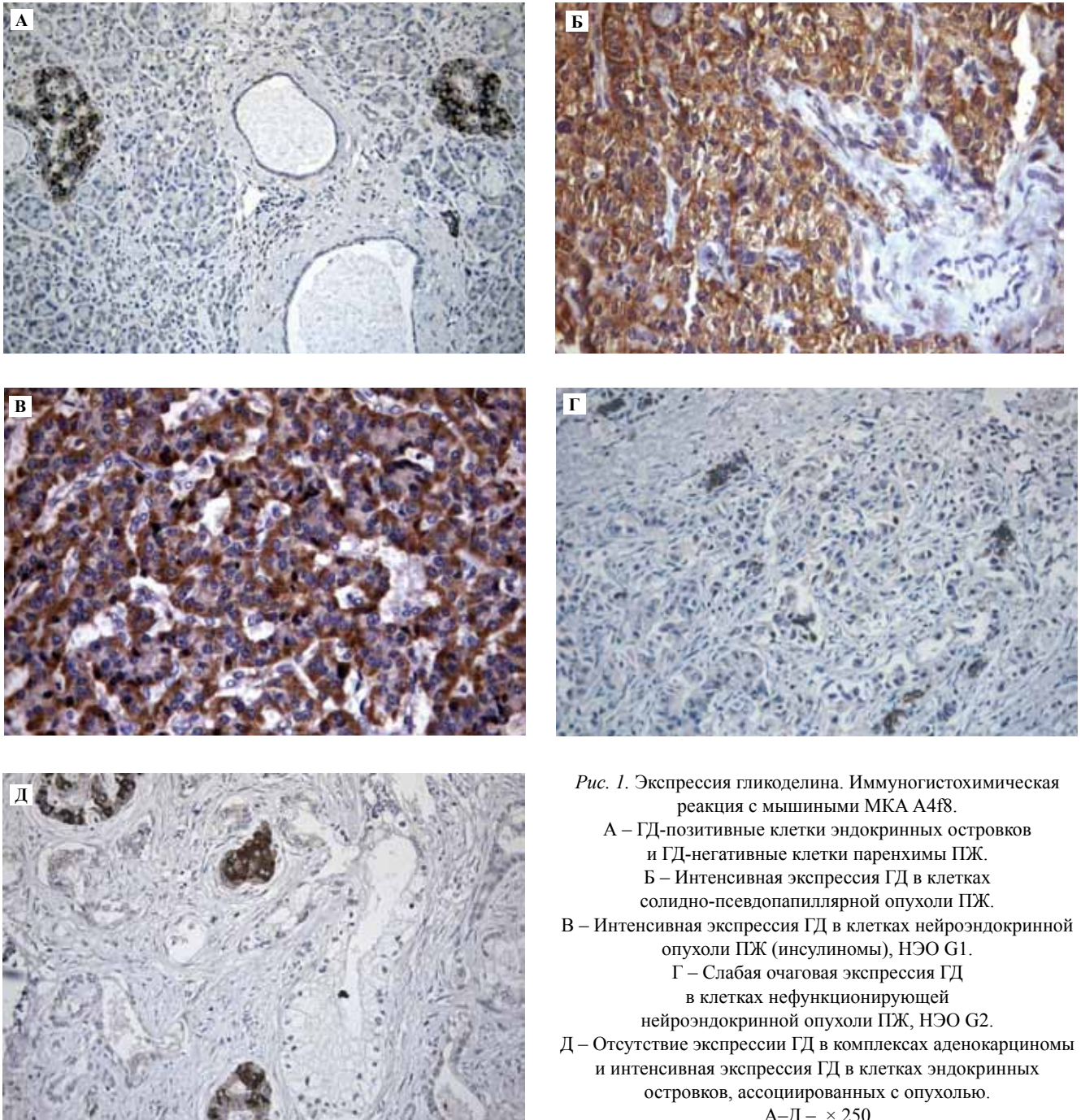


Рис. 1. Экспрессия гликоделина. Иммуногистохимическая реакция с мышиными МКА А4f8.
 А – ГД-позитивные клетки эндокринных островков и ГД-негативные клетки паренхимы ПЖ.
 Б – Интенсивная экспрессия ГД в клетках солидно-псевдопапиллярной опухоли ПЖ.
 В – Интенсивная экспрессия ГД в клетках нейроэндокринной опухоли ПЖ (инсулиномы), НЭО G1.
 Г – Слабая очаговая экспрессия ГД в клетках нефункционирующей нейроэндокринной опухоли ПЖ, НЭО G2.
 Д – Отсутствие экспрессии ГД в комплексах аденокарциномы и интенсивная экспрессия ГД в клетках эндокринных островков, ассоциированных с опухолью.
 А–Д – × 250

РП выявлены в 7 из 9 ВД НЭО-G2 (рис. 2 Г). Все эндокринные опухоли ПЖ были РП-негативными. Средний РП-индекс для СППО составил 82,9%, N=166,1, для ВД НЭО-G1 – 79,8% и N=154,3, соответственно. В клетках ВД НЭО-G2 по сравнению с СППО и ВД НЭО-G1 достоверно снижалась экспрессия РП (N=65,0), уменьшение количества РП-позитивных ядер в ВД НЭО-G2 (55,0%) было статистически значимым по сравнению с СППО (табл. 1).

Анализ взаимосвязи между экспрессией РП и наличием ГД показал, что в РП-положительных опухо-

лях ПЖ наблюдалась и интенсивная экспрессия ГД: в 13 из 14 случаев СППО (93%) и 100% случаев ВД НЭО-G1, в 7 из 9 случаев ВД НЭО-G2 (78%). Экспрессия ГД и РП во всех опухолях ПЖ не зависела от возраста и пола пациентов.

Таким образом, для клеток эндокринных островков внеопухолевой ткани ПЖ, СППО и ВД НЭО-G1 была характерна коэкспрессия ГД и РП, а с увеличением степени злокачественности опухолей интенсивность экспрессии этих двух маркеров существенно уменьшалась.

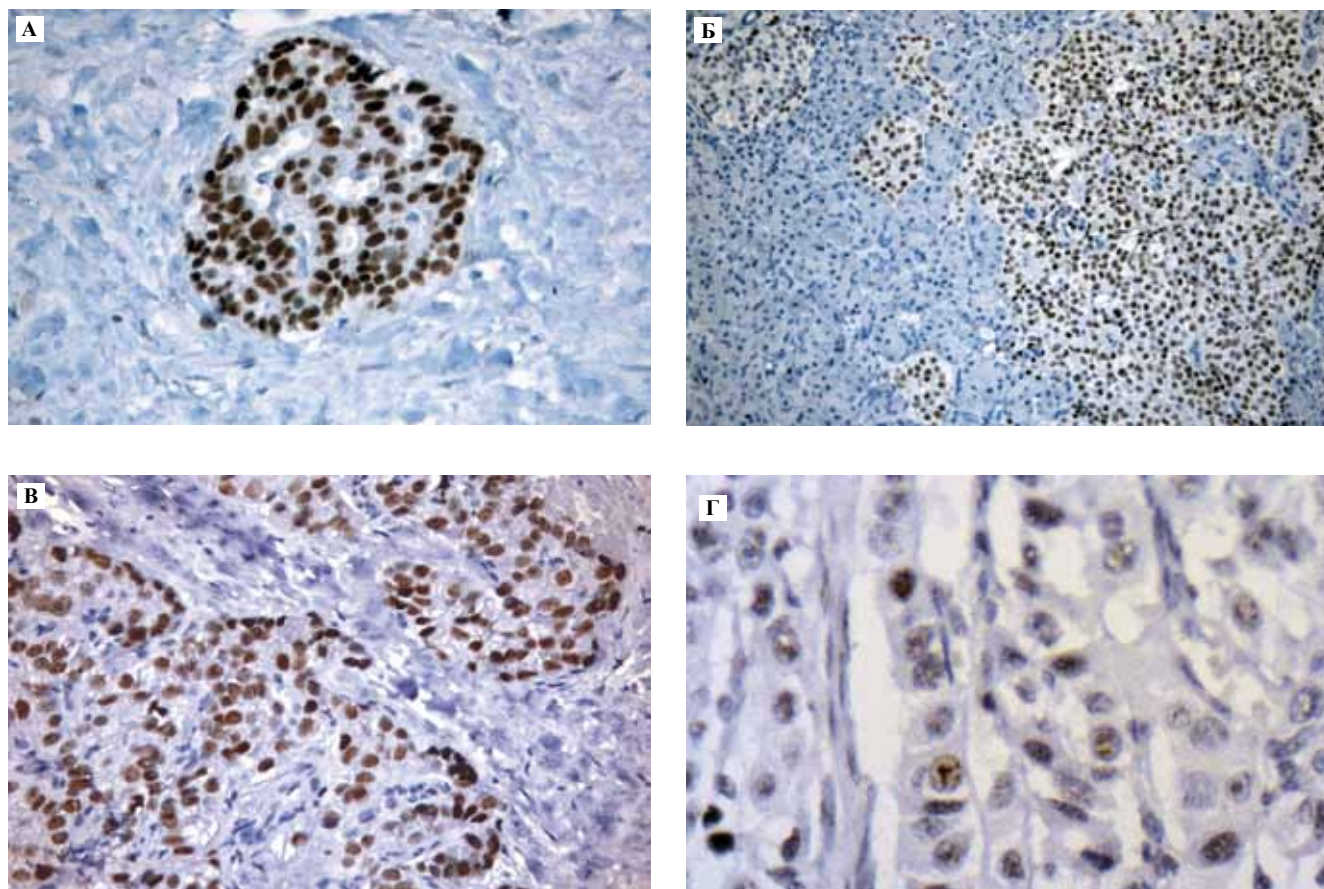


Рис. 2. Экспрессия рецепторов прогестерона. Иммуногистохимическая реакция с кроличьими МКА RP(A+B), клон SP2.

А – Экспрессия РП в клетках эндокринных островков внеопухолевой ткани ПЖ.

Б – Экспрессия РП в ядрах преобладающего большинства клеток солидно-псевдопапиллярной опухоли и отсутствие в клетках паренхимы ПЖ.

В – Экспрессия РП в ядрах преобладающего большинства клеток нейроэндокринной опухоли ПЖ (инсулиномы), НЭО G1.

Г – Слабая экспрессия РП в клетках нефункционирующей нейроэндокринной опухоли ПЖ, НЭО G2.

А, В, Г – $\times 400$, Б – $\times 250$

Обсуждение

Интенсивная экспрессия РП в ядрах клеток эндокринных островков внеопухолевой ткани ПЖ согласуется с данными Е.М. Targagona et al. и С. Doglioni et al. об экспрессии этих рецепторов в 40–75% клеток островков Лангерганса. Авторы предположили, что прогестерон может регулировать функциональную активность эндокринной части ПЖ [12, 14]. Полученные нами результаты совпадают с данными предыдущих исследований об экспрессии РП во всех исследованных СППО [3, 15] и ее отсутствии в экзокринных опухолях ПЖ [12, 14], однако, на нашем материале, экспрессия РП в 94,7% НЭО была существенно выше, чем это было показано в более ранних исследованиях, в которых уровень экспрессии варьировал от 38,9% до 58,3% [5, 12, 16], что может объясняться использованием нами более специфичных моноклональных кроличьих антител. Прогностическое значение РП статуса для НЭО ПЖ обсуждается и требует более углубленного исследования, в том числе с точки зрения возможного ис-

пользования этих рецепторов в качестве мишеней для гормональной терапии. Имеются данные о наличии положительной корреляции между экспрессией РП и менее злокачественным биологическим потенциалом НЭО [16] и обратной зависимости между пролиферативной активностью клеток опухолей (Ki-67, PCNA) и индексом РП в функционирующих и нефункционирующих НЭО [5]. С другой стороны, хорошо известно, что РП-позитивные СППО отличаются благоприятным клиническим течением и крайне редко дают метастазы. Нами впервые обнаружена экспрессия ГД в большинстве СППО и НЭО ПЖ независимо от пола и возраста пациентов. При этом в СППО, ВД НЭО-G1 и части НЭО-G2 с достаточно выраженной экспрессией ГД также наблюдалась интенсивная экспрессия РП, что может свидетельствовать о более благоприятном прогнозе, чем в случае соответствующих ГД- и РП-негативных опухолей ПЖ. Экспрессия ГД и РП существенно уменьшалась в части ВД НЭО-G2, в том числе с наличием метастазов. Ранее было показано, что

в опухолях молочной железы и яичников ГД выявляется преимущественно в более дифференцированных вариантах этих новообразований, а выживаемость пациентов с ГД-положительными опухолями была выше, чем с ГД-отрицательными [8, 10].

В пользу того, что ГД-экспрессирующие опухоли имеют более доброкачественное клиническое течение и, соответственно, лучший прогноз, чем ГД-негативные, свидетельствуют и результаты экспериментальных работ. Так, в культивируемых клетках рака молочной железы и эндометрия с индуцированным синтезом ГД экспрессировались маркеры, характеризующие более высокую степень дифференцировки клеток эпителия, такие как E-кадгерин, цитokerатины 8 и 18, в них уменьшались уровень пролиферации и экспрессия опухолеассоциированных генов [7, 11]. Таким образом, очевидно, что одновременная экспрессия ГД и РП в опухолях ПЖ может рассматриваться в качестве критерия более высокой степени дифференцировки их клеток и более благоприятного прогноза.

Выводы

Впервые показана экспрессия гликоделина в половых рецепторах прогестерона клетках эндокринных островков неопухолевого ткани поджелудочной железы, в клетках солидно-псевдопапиллярных опухолей и высокодифференцированных нейроэндокринных опухолей (НЭО). РП-отрицательные экзокринные опухоли поджелудочной железы не экспрессируют гликоделин.

При увеличении степени злокачественности НЭО (G2) уровень экспрессии гликоделина и рецепторов прогестерона снижается по сравнению с солидно-псевдопапиллярными опухолями и НЭО (G1) низкой степени злокачественности.

Коэкспрессию гликоделина и рецепторов прогестерона в опухолях поджелудочной железы можно рассматривать в качестве критерия их более благоприятного прогноза.

Литература

1. Альфа2-микроглобулин фертильности (АМГФ) как потенциальный маркер рака молочной железы / С.Г. Силенко и др.: Сборник научных трудов «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». М., 2004. С. 99–101.
2. Получение комплекса моноклональных антител для иммуногистохимических исследований в области физиологии и патологии репродукции / Н.А. Старосветская и др. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 2. С. 22–27.
3. Characterisation of oestrogen receptor, progesterone receptor, trefoil factor 1, and epidermal growth factor and its receptor in pancreatic cystic neoplasms and pancreatic ductal adenocarcinoma / T.S. Yeh et al. // Gut. 2002. V. 51. N 5. P. 712–6.
4. E-cadherin/beta-catenin and CD10: a limited immunohistochemical panel to distinguish pancreatic endocrine neoplasm from solid pseudopapillary neoplasm of the pancreas on endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspirates of the pancreas / H. Burford et al. // Am. J. Clin. Pathol. 2009. V. 132. N 6. P. 831–9.
5. Endocrine tumors of the pancreas: Ki-67 immunoreactivity on paraffin sections is an independent predictor for malignancy: a comparative study with proliferating-cell nuclear antigen and progesterone receptor protein immunostaining, mitotic index, and other clinicopathologic variables / G. Pelosi et al. // Hum Pathol. 1996. V. 27. N11. P. 1124–34.
6. Epithelial expression of glyco delin in synovial sarcomas / M. Kamarainen et al. // Int. J. Cancer. 1998. V. 76. P. 487–90.
7. Expression of glyco delin in MCF-7 breast cancer cells induces differentiation into organized acinar epithelium / M. Kamarainen et al. // Lab. Invest. 1997. V. 77. N 6. P. 565–73.
8. Expression of glyco delin protein and mRNA in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive ductal carcinomas, their lymph node and distant metastases, and ductal carcinomas with recurrence / U. Jeschke et al. // Oncol. Rep. 2005. V. 13. N 3. P. 413–9.
9. Glyco delin in reproductive endocrinology and hormone-related cancer / M. Seppälä et al. // Eur. J. Endocrinol. 2009. V. 160. N 2. P. 121–33.
10. Glyco delin in ovarian serous carcinoma: association with differentiation and survival / E. Mandelin et al. // Cancer Res. 2003. V. 63. N 1. P. 6258–64.
11. Glyco delin reduce carcinoma-associated gene expression in endometrial adenocarcinoma cells / H. Koistinen et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. 2005. V. 196. N 6. P. 1955–60.
12. Immunocytochemical localization of progesterone receptors in endocrine cells of the human pancreas / C. Doglioni et al. // Am. J. Pathol. 1990. V. 137. N 5. P. 999–1005.
13. Increased expression of glyco delin mRNA and protein in rat lungs during ovalbumin-induced allergic airway inflammation / C. Kunert-Keil et al. // Histochem. Cell Biol. 2009. V. 131. N 3. P. 383–90.
14. Is exocrine pancreatic cancer a hormone-dependent tumor? A study of the existence of sex hormone receptors in normal and neoplastic pancreas / E.M. Targarona et al. // Hepatogastroenterology. 1991. V. 38. N 2. P. 165–9.
15. Papillary cystic tumors of the pancreas: assessment of malignant potential by analysis of progesterone receptor, flow cytometry, and ras oncogene mutation / W.Y. Lee et al. // Anticancer Res. 1997. V. 17. N 4A. P. 2587–91.
16. Progesterone receptor immunoreactivity in pancreatic endocrine tumors. An immunocytochemical study of 156 neuroendocrine tumors of the pancreas, gastrointestinal and respiratory tracts, and skin / G. Viale et al. // Cancer. 1992. V. 70. N 9. P. 2268–77.

GLYCODELIN EXPRESSION IN PANCREATIC TUMORS

N.A. Starosvetskaya, L.E. Gurevich, M.N. Boltovskaya, N.A. Korsakova, A.A. Stepanov

Glycodelin (GD) and progesterone receptor (PR) expression in 19 neuroendocrine tumors, 14 solid-pseudopapillary tumors, 10 exocrine carcinomas of the pancreas were examined using original anti-glycodelin monoclonal antibodies and anti-progesterone receptor A+B antibodies (LabVision). We used semiquantitative method to evaluate cytoplasmic type of GD expression in tumor cells (1-3+); to evaluate progesterone receptor (PR) expression used PR-index (%) and H score similar to one, used in breast cancers. GD and PR intense expression was demonstrated in solid-pseudopapillary tumors (GD 1.5; PR index 82.9; H 166.1) and well-differentiated G1 neuroendocrine tumors (GD 1.95; PR index 79.8; H 154.3). GD and PR expression were markedly reduced in G2 neuroendocrine tumors (GD 0.69; PR index 55.0; H 65.00). No GD and PR expression was detected in all exocrine pancreatic carcinomas. Thus, GD expression is characteristic of progesterone-related solid-pseudopapillary tumors and well-differentiated neuroendocrine tumors and might be considered as predictor of its favorable prognosis.

Key words: glycodelin, pancreatic tumors, immunomorphology

Информация об авторах

Старосветская Нелли Андрониковна – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E mail: starnell@mail.ru

Гуревич Лариса Евсеевна – докт. биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Адрес: Москва, ул. Щепкина, д. 61/2. E mail: larisgur@mail.ru

Болтовская Марина Николаевна – докт. биол. наук, профессор, заведующая лабораторией клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E mail: maribolt@mail.ru

Корсакова Нина Анатольевна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Адрес: Москва, ул. Щепкина, д. 61/2.

Степанов Александр Алексеевич – научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Материал поступил в редакцию 18 марта 2013 года.

© Гаганов Л.Е., Казанцева И.А., 2013

УДК: 618.146-006.66-078.33

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА ЖЕЛУДКА

Л.Е. Гаганов, И.А. Казанцева

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МОНКИ)
им. М.Ф. Владимирского», Москва

На материале публикаций и результатах собственных исследований проведен анализ зависимости злокачественного потенциала карциномы желудка от функционального иммунофенотипа опухолевых клеток и интенсивности экспрессии ИГХ маркеров, ассоциированных с опухолевым ростом. Показано, что смешанный иммунофенотипический вариант карциномы желудка, низкая иммунореактивность опухолевых клеток к gal-3 и cad-e, высокая иммунореактивность к MMP-2 и MMP-3 являются достоверными прогностическими признаками, ассоциированными с худшей выживаемостью. Вместе с тем прогностическая ценность пролиферативной активности опухолевых клеток, определяемая по индексу Ki-67, а также значимость мембранного и аномального типов экспрессии молекулы межклеточной адгезии cad-e для прогноза рака желудка, по-видимому, переоценены.

Ключевые слова: рак желудка, прогноз, иммунофенотип, муцины, CD10, Ki-67, gal-3, cad-e, MMP-2, MMP-3

Рак желудка (РЖ) в структуре онкологической заболеваемости и смертности в России по-прежнему остается на достаточно высоком уровне, составляя, соответственно, 7,3% и 11,5% [3].

Как известно, РЖ отличается значительным полиморфизмом. Карциномы различаются по клеточному составу, направлениям и степени клеточной дифференцировки, способности формировать железистые структуры, типам роста, образованию стромы, неопластическому и выраженности местной иммунной реакции. Гетерогенность карцином желудка послужила причиной создания ряда гистологических классификаций, большинство из которых систематизирует новообразования по указанным морфологическим признакам. Некоторые из этих признаков одновременно рассматривают в качестве критериев злокачественного потенциала опухоли и факторов прогноза РЖ. Чаще всего для данной цели используют степень дифференцировки и тип роста карциномы.

Полиморфизм карцином желудка объясняется сложностью строения слизистой оболочки этого органа – неоднородной структуры с определенными закономерностями дифференцировки шеечного эпителия и высокими темпами клеточного обновления, а также особенностями строения в каждом из анатомических отделов и переходных зонах между ними. Поверхность слизистой оболочки, желудочные ямки и железы выстланы разными морфофункциональными типами эпителиальных клеток. Перестройка слизистой оболочки желудка, которая сопровождает течение хрони-

ческого гастрита, делает ее эпителиальный состав еще более разнообразным, в том числе в функциональном отношении.

Преобладающими биологическими маркерами, экспрессируемыми слизистой оболочкой желудка, являются высокомолекулярные гликопротеины. Самые распространенные гликопротеины желудка, которые выявляются методом иммуногистохимии (ИГХ), – муцины (MUC), а наиболее важные из них в функциональном отношении – MUC1, MUC5AC и MUC6.

В неопухоловой слизистой оболочке желудка MUC1 экспрессирует фовеолярный эпителий антрального отдела, а также париетальные и главные клетки, MUC5AC – фовеолярный эпителий кардиального и фундального отделов, а MUC6 – эпителий пилорических желез и шеек всех отделов желудка. При атрофии и кишечной метаплазии слизистой оболочки набор экспрессируемых гликопротеинов может меняться с исчезновением характерных для этой локализации муцинов и появлением не свойственных желудку MUC2 и CD10 [19].

Как известно, опухолевые клетки РЖ в большинстве случаев независимо от гистологического строения карциномы сохраняют способность экспрессировать биологически активные вещества, присущие исходному неопухоловому эпителию, что отражается на биологических свойствах новообразования. Зависимость злокачественного потенциала карциномы от морфофункциональной дифференцировки опухолевых клеток послужила основой создания ряда современных клас-

сификаций РЖ. В качестве критерия функциональной активности раковых клеток определялась ИГХ экспрессия биологических маркеров слизистой оболочки желудка, ассоциированных с опухолевым ростом.

Одним из онкомаркеров, отражающим функциональные свойства карциномы желудка, является MUC1, который фиксирован на мембране клетки и состоит из двух субъединиц, образующих гетеродимер. В физиологических условиях внеклеточная субъединица представлена характерной для всех муцинов гликозилированной цепочкой, выполняющей защитную функцию, а внутриклеточная – внеклеточным и цитоплазматическим доменами [31].

Внеклеточный домен участвует в трансляции сигналов, стимулирующих иммунные реакции, является лигандом для галектина-3 и EGFR, а цитоплазматический домен принимает участие в важнейших биохимических процессах клетки, оказывая влияние на транскрипцию ряда генов и активность кодируемых ими белков [18, 31]. Наиболее значимые гены, подверженные указанному влиянию, – *c-Myc*, *c-Src*, *APC*, *p53*, *Bcl-xL*, *ERBB2*, *cyc-D1*, *cad-e*, *v-cat* [31, 37].

По данным ряда исследователей, экспрессия MUC1 выявляется в 24,3–100% случаев РЖ, а показатели ИГХ экспрессии этого маркера не зависят от локализации, гистологического строения и гистологической стадии карциномы [8, 30, 40]. В опухолевых клетках чаще наблюдается апикальная и мембранная экспрессия MUC1, реже цитоплазматическая, очень редко – ядерная [8]. Установлено, что гиперэкспрессия опухолевыми клетками MUC1 коррелирует с более высоким метастатическим потенциалом опухоли, а также низкой послеоперационной выживаемостью [27, 35, 38].

Другим маркером, отражающим функциональные свойства и оказывающим влияние на биологические показатели карциномы желудка, является MUC2. Указанный муцин представляет собой макромолекулу, субъединицы которой объединены дисульфидными связями, формирующими олигомерную структуру. MUC2 – секреторный гликопротеин и в физиологических условиях продуцируется бокаловидными клетками кишечника, бронхов и слюнных желез, выполняя функции защиты эпителия и трансляции межклеточных сигналов, участвующих в механизмах регуляции пролиферации и дифференцировки эпителиальных клеток.

ИГХ экспрессия MUC2 обнаруживается в 34–95% наблюдений РЖ, и она не ассоциирована с кишечной метаплазией слизистой оболочки [8, 25, 26, 27, 32, 36, 39, 45]. В клетках опухоли чаще наблюдается цитоплазматическая экспрессия MUC2, реже – мембранно-цитоплазматическая, еще реже – ядерная [8]. Большинство исследователей расценивают гиперэкспрессию MUC2 опухолевыми клетками как неблагоприятный прогностический признак, ассоциированный с более высокой агрессивностью карциномы и худшим прогнозом [39, 45].

Исследования, посвященные изучению экспрессии MUC5AC, MUC6 в РЖ и определению влияния перечисленных маркеров на биологические свойства опухолевых клеток, малочисленны. Названные муцины относятся к группе секреторных гликопротеинов, формирующих на поверхности эпителия вязкий высокогидратированный гель, выполняющий функцию защиты эпителиальных клеток [29].

Экспрессию MUC5AC и MUC6 в РЖ выявляют, соответственно, в 19–70,5% и 10,6–57% наблюдений [8, 25, 26, 27, 32, 36, 39, 45]. Данные о показателях экспрессии этих маркеров, определяемых в зависимости от локализации карциномы, степени дифференцировки клеток опухоли, гистологического варианта и гистологической стадии РЖ, трудно сопоставимы ввиду различия в методических подходах к проведению исследования [8, 26, 32, 40, 45]. В опухолевых клетках РЖ независимо от гистологического варианта наблюдается цитоплазматическая экспрессия перечисленных маркеров [8]. Высказывается предположение, что карциномы желудка, экспрессирующие MUC5AC и MUC6, менее агрессивны, чем новообразования, экспрессирующие MUC1 и MUC2 [40].

Другим маркером функциональной активности эпителиальных клеток РЖ является поверхностный клеточный фермент CD10, обладающий металлоэндопептидазной активностью. Указанный маркер представляет собой цинкзависимый мембранно-связанный гликопротеин, который в желудочно-кишечном тракте экспрессируется покровным эпителием ворсинок тонкой кишки и обнаруживается на его щеточной каемке. В эпителиальных клетках слизистой оболочки желудка экспрессия CD10 наблюдается только в очагах полной кишечной метаплазии, а выявление этого гликопротеина в карциномах желудка можно использовать как дополнительный диагностический маркер [19].

В опухолевых клетках карцином желудка ИГХ экспрессия CD10 встречается в 17,8–53,3% случаев и, по данным ряда сообщений, оказывает влияние на злокачественный потенциал новообразования [1, 25, 26, 27, 36]. В карциномах желудка, экспрессирующих CD10, чаще обнаруживают инвазию сосудов и отдаленные гематогенные метастазы [26], а в клетках опухоли наблюдается апикальная, реже – мембранная и мембранно-цитоплазматическая, экспрессия этого маркера [1].

Экспрессия опухолевыми клетками карцином желудка перечисленных маркеров позволяет разделить новообразования на три иммунофенотипических (ИФТ) варианта рака: желудочный, кишечный и смешанный [42]. Для рака желудочного ИФТ характерна экспрессия опухолевыми клетками MUC1, MUC5AC и MUC6, кишечного ИФТ – MUC2 и CD10, смешанного (желудочно-кишечного) ИФТ – экспрессия названных маркеров в различных сочетаниях. Карциному желудка, не экспрессирующую перечисленные гликопротеины, относят к неклассифицируемому варианту.

В исследовании, проведенном на операционном материале 55 больных РЖ, карциномы желудочного ИФТ обнаружены в 56% наблюдений, кишечного ИФТ – в 4% случаев, а смешанного – в 40%. Карциномы неклассифицируемого варианта выявлены не были [1]. Полученные результаты согласуются с данными ряда публикаций, авторы которых диагностировали указанные ИФТ варианты РЖ, соответственно, в 2,3–51,6%, 4,7–83%, 4,6–66,7% и 0–50,0% наблюдений [1, 15, 25, 26, 27, 32, 36, 39, 44, 49].

В различных ИФТ вариантах РЖ установлены неоднородные хромосомные и молекулярно-генетические изменения. Карциномы желудочного ИФТ, по сравнению с кишечными, чаще сопровождаются повреждением хромосомных локусов 5p15.2 и 13q33-34 [25, 36], микросателлитной нестабильностью, мутацией *p73*, нарушениями транскрипционного фактора *Sox2* [48], инактивацией *hMLH1*, гиперэкспрессией определенных металлопротеиназ (ММП) [42] и подавлением *c-erbB-2* [46], а карциномы кишечного ИФТ – повреждением хромосомного локуса 7p21 [25], мутациями *p53*, *p27*, *CDX-1* и *-2*, потерей гетерозиготности по *APC* [10, 26], а также гиперэкспрессией *p53*, *CDX2* и *v-катенина* [27].

Смешанному ИФТ РЖ свойственны гиперэкспрессия сус-А [10], аномальная экспрессия кадгерина-е (*cad-e*) и повреждение хромосомного локуса 7p21 [25]. Вместе с тем в одном из исследований не выявлено существенных различий в показателях экспрессии *rb*, *p53*, *c-met*, *mif*, *TGF-в-RII*, *CD44*, *v-катенина* и *cad-e* между перечисленными ИФТ РЖ [49], что, по-видимому, обусловлено применением других методических подходов.

По данным ряда публикаций, выявлены неоднородные темпы опухолевой прогрессии различных ИФТ вариантов РЖ и возможность трансформации одного ИФТ варианта в другой. Для карцином смешанного ИФТ, по сравнению с кишечным, характерна более быстрая дедифференцировка опухолевых клеток [25, 26, 44], а для карцином желудочного ИФТ РЖ – трансформация в смешанный и кишечный ИФТ рака [17, 39].

Высказывается предположение, что существует зависимость злокачественного потенциала РЖ от ИФТ опухолевых клеток [6, 10, 15, 17, 36, 38, 40, 46, 49]. Однако результаты этих исследований немногочисленны и трудно сопоставимы ввиду различий в методических подходах к оценке полученных данных и анализу результатов, а сообщения об исследовании злокачественного потенциала неклассифицируемого варианта РЖ единичны.

Получены данные о более высоком злокачественном потенциале карцином смешанного ИФТ РЖ по сравнению с желудочным и кишечным вариантами, которые менее агрессивны [6, 43]. Клинико-морфологические сопоставления желудочного и кишечного ИФТ РЖ обнаружили более высокий злокачественный потенциал желудочного ИФТ варианта карциномы [38, 49]. Вместе с тем автор одного из сообщений получил обратные результаты [15].

Функциональный ИФТ карциномы предложено использовать в качестве независимого фактора прогноза РЖ [15, 28, 39, 47]. Установлено, что у пациентов с РЖ со смешанным ИФТ карциномы показатели выживаемости ниже, по сравнению с больными с желудочным ИФТ рака [39, 45]. Похожие результаты получены в нашем исследовании, в котором прослежены отдаленные результаты радикального хирургического лечения больных РЖ с различными ИФТ карцином [6]. Анализ 4-летней скорректированной безрецидивной выживаемости по методу Каплана–Мейера показал достоверные различия показателей выживаемости при желудочном и смешанном ИФТ вариантах рака, составивших, соответственно, 26% и 12% (рис.). Карциномы кишечного ИФТ из исследования были исключены из-за малого числа наблюдений.

В качестве одного из основных критериев при построении индивидуальной прогностической схемы новообразования, как правило, используют показатель пролиферативной активности опухолевых клеток. Для этой цели наряду с подсчетом митозов применяют ряд ИГХ маркеров, наиболее распространенным из которых является Ki-67 – белок ядер пролиферирующих клеток. Традиционно индекс пролиферации по Ki67 в качестве фактора прогноза предлагают использовать и для РЖ, расценивая высокие показатели экспрессии этого белка как неблагоприятный прогностический признак.

В новообразованиях других локализаций применение Ki-67 в прогностических целях обосновано рядом исследований. Вместе с тем в карциномах желудка прогностическая значимость этого маркера спорна [30]. Существует ряд сообщений, авторы которых не обнаружили в карциномах желудка корреляции между высокими показателями экспрессии Ki-67 и неблагоприятным прогнозом [20, 34], а в одном из исследований выявлена обратная взаимосвязь [33].

Мы провели сопоставление показателей пролиферативной активности опухолевых клеток карцином желудка 2–3-й гистологической стадии, определяемой по Ki-67, с данными о выживаемости оперированных больных, полученными ранее, и не обнаружили статистически значимых различий в величинах исследуемого индекса между группами живых и умерших на момент мониторингования пациентов [7].

Вместе с тем проведенное исследование выявило различия в показателях индекса Ki67 в двух ИФТ вариантах РЖ. В карциномах желудочного ИФТ, имеющих лучший прогноз, показатели экспрессии этого белка были достоверно выше, чем в опухолях смешанного ИФТ, прогностически менее благоприятных [7]. Результаты нашего исследования согласуются с данными нескольких сообщений [10, 17, 46].

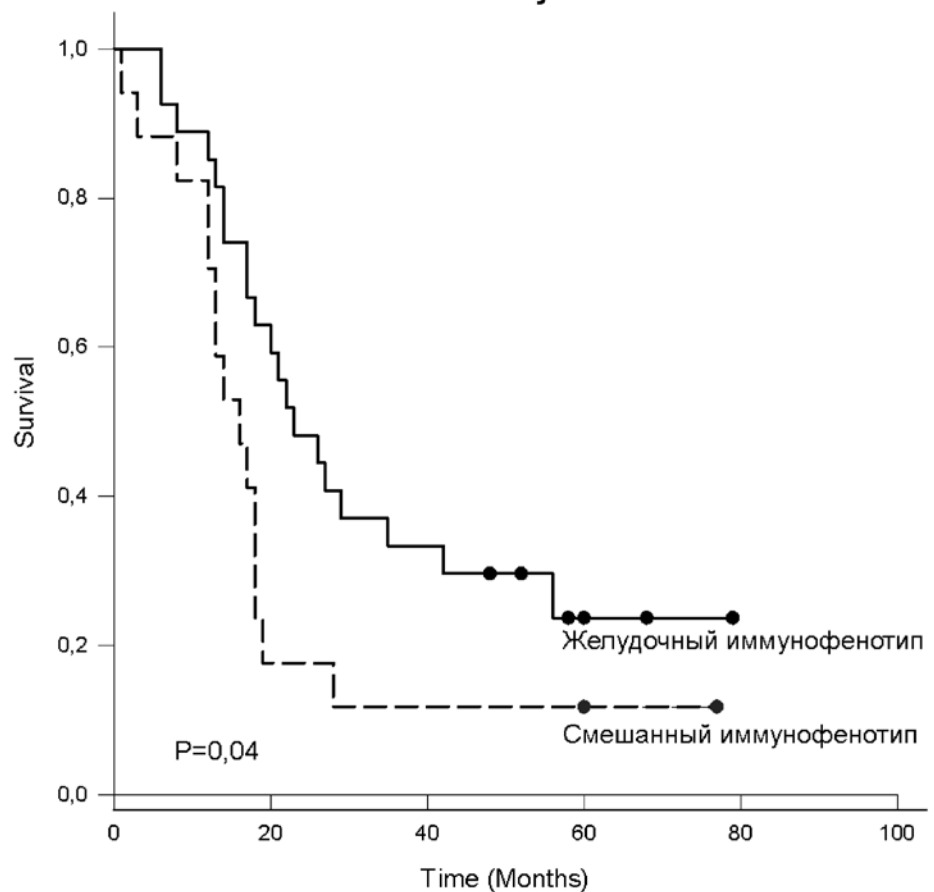
Другими критериями злокачественного потенциала опухоли, которые предлагают использовать, в том числе, для прогноза РЖ, являются показатели ИГХ экспрессии многофункционального регуляторного белка

Survival Analysis

Показатели скорректированной безрецидивной выживаемости больных раком желудка в зависимости от иммунофенотипического варианта карциномы (метод Каплана–Мейера, лог-ранговый критерий).

Кривая выживаемости пациентов с желудочным иммунофенотипом карциномы обозначена сплошной линией (n=27, умерли 20, живы 7, выживаемость – 26%, Me – 23, m – 4,3).

Кривая выживаемости пациентов со смешанным иммунофенотипом карциномы обозначена пунктирной линией (n=17, умерли 15, живы 2, выживаемость – 12%, Me – 16, m – 2,7)



галектина-3 (gal-3) и адгезивной молекулы эпителиальных тканей cad-e [14, 16, 23, 41, 44, 50].

Как известно, белок gal-3 участвует в процессах дифференцировки, пролиферации, апоптоза, адгезии и подвижности клеток, а также межклеточных, клеточно-матриксных взаимодействий и неоваскуляризации [11], а cad-e обеспечивает гомотипические межклеточные контакты, участвует в организации цитоскелета [12] и трансляции сигналов ряда мембранных рецепторов [13].

В эпителии шеек желез, фокусах кишечной метаплазии и очагах интраэпителиальной неоплазии внеопухолевой слизистой оболочки желудка обнаруживают цитоплазматическую экспрессию gal-3 и мембранную экспрессию cad-e [4].

В карциномах желудка экспрессию gal-3 и cad-e выявляют, соответственно, в 84–98% и 17–93% наблюдений. В опухолевых клетках встречается ядерный, цитоплазматический и ядерно-цитоплазматический тип экспрессии gal-3 и мембранный и аномальный (цитоплазматический, мембранно-цитоплазматический) тип экспрессии cad-e [4, 5, 16, 50].

Установлено, что в карциномах желудка утрата опухолевыми клетками экспрессии указанных белков может быть ассоциирована с более злокачественным гистологическим вариантом рака и иметь прогностическое значение [14, 16, 41]. Вместе с тем результаты

исследований экспрессии cad-e в различных ИФТ вариантах РЖ малочисленны, а аналогичные исследования с gal-3 не проводились.

Мы изучили экспрессию указанных маркеров в зависимости от ИФТ варианта РЖ и обнаружили, что опухолевые клетки карцином смешанного ИФТ имеют достоверно меньшую иммунореактивность к gal-3, чем раковые клетки желудочного ИФТ [2, 4]. По-видимому, это может свидетельствовать о более высоком злокачественном потенциале карцином смешанного ИФТ. Следует отметить, что проведенное исследование не выявило значимых различий в иммунореактивности к cad-e между исследуемыми вариантами карцином [4].

Во второй части исследования мы сопоставили полученные результаты с показателями выживаемости оперированных больных [7] и обнаружили достоверно большую иммунореактивность к gal-3 и cad-e опухолевых клеток карцином группы живых пациентов по сравнению с группой умерших. Таким образом, как показало исследование, уровень иммунореактивности карциномы к gal-3 и cad-e можно использовать в качестве дополнительных прогностических факторов при разработке критериев индивидуального прогноза у пациентов с РЖ [4].

Из-за отсутствия значимых различий в иммунореактивности к cad-e опухолевых клеток желудочного и смешанного ИФТ РЖ мы посчитали необходимым

уточнить типы ИГХ экспрессии этого маркера. Было установлено, что в опухолевых клетках карцином желудочного ИФТ достоверно чаще встречается аномальный тип экспрессии cad-e, а в опухолевых клетках карцином смешанного ИФТ – мембранный тип экспрессии [5]. Полученные результаты частично согласуются с данными двух имеющихся публикаций, в одной из которых обнаружено преобладание аномального типа экспрессии cad-e в карциномах смешанного ИФТ [25], а в другой – мембранного типа экспрессии этого маркера [44].

Как известно, мембранный тип экспрессии cad-e больше свойствен карциномам высокой степени дифференцировки и традиционно считается благоприятным прогностическим признаком. Вместе с тем ряд исследователей установили, что в карциномах желудка экспрессия cad-e всегда сопровождается точечными или парциальными мутациями этого белка с нарушением его адгезивных свойств [16, 22]. По-видимому, в карциномах желудка мембранный тип ИГХ экспрессии cad-e не может являться достоверным признаком лучшего прогноза.

Другим критерием злокачественного потенциала РЖ, предложенным для использования в прогностических целях, является экспрессия опухолевыми клетками металлопротеиназ, в том числе MMP-2 и MMP-3. Высказывается предположение, что указанные протеазы повышают пролиферативный и инвазивный потенциал карциномы, разрушая белки базальной мембраны и внеклеточного матрикса, а также принимая участие в механизмах подавления апоптоза, регуляции активности определенных внутриклеточных протеинов, неонатогенеза и местного иммунного ответа [24].

В эпителии шеек желез внеопухолевой слизистой оболочки желудка выявляют слабую цитоплазматическую ИГХ экспрессию MMP-2 и MMP-3, реже ее обнаруживают в фовеолярном эпителии, еще реже – в эпителии желез. Усиление экспрессии MMP наблюдают в очагах кишечной метаплазии и интраэпителиальной неоплазии [9, 23].

В карциномах желудка экспрессию MMP-2 и MMP-3 выявляют, соответственно, в 48–70% и 91% наблюдений. В опухолевых клетках встречается цитоплазматическая экспрессия MMP-2 и цитоплазматическая, мембранная и мембранно-цитоплазматическая экспрессия MMP-3 [9, 23].

По данным ряда исследователей, ИГХ гиперэкспрессия MMP-2 опухолевыми клетками карцином желудка ассоциирована с более злокачественным гистологическим вариантом рака и неблагоприятным прогнозом [14, 16, 21, 23, 41, 44, 50]. Вместе с тем результаты исследований, посвященных экспрессии MMP-2 в карциномах желудка, малочисленны и противоречивы, а изучение экспрессии MMP-3 при опухолях этой локализации не проводилось. Кроме того, не осуществлялось и сопоставление показателей экспрессии перечисленных маркеров с ИФТ характеристикой РЖ.

Мы провели исследование экспрессии MMP-2 и MMP-3 опухолевыми клетками различных ИФТ вариантов РЖ [9]. В карциномах смешанного ИФТ варианта количество опухолевых клеток, экспрессирующих исследуемые протеазы, было достоверно больше, чем в опухолях желудочного ИФТ варианта. Указанная зависимость может свидетельствовать о большем злокачественном потенциале смешанного ИФТ варианта РЖ.

Кроме того, исследование выявило достоверную взаимосвязь между показателями экспрессии MMP-2, MMP-3 опухолевыми клетками карцином и показателями выживаемости [9]. В карциномах желудка группы живых на момент мониторингования пациентов показатели экспрессии MMP-2 и MMP-3 были достоверно ниже аналогичных показателей в группе умерших, что позволяет использовать уровень иммунореактивности к исследуемым маркерам как дополнительный прогностический фактор при разработке критериев индивидуального прогноза у больных РЖ.

Таким образом, анализ публикаций и результаты собственных исследований свидетельствуют о том, что достоверными критериями злокачественного потенциала РЖ следует считать показатели иммунореактивности опухолевых клеток к gal-3, cad-e, MMP-2 и MMP-3, а уровень иммунореактивности к указанным маркерам можно использовать в качестве дополнительных прогностических факторов при разработке индивидуальной прогностической схемы. Низкая иммунореактивность опухолевых клеток карциномы к gal-3 и cad-e, а также высокая иммунореактивность к MMP-2 и MMP-3 являются неблагоприятными прогностическими признаками, достоверно ассоциированными с худшей выживаемостью пациентов с РЖ.

Подразделение карцином желудка на различные ИФТ варианты рака, основанное на иммунореактивности опухолевых клеток к маркерам функциональной активности MUC1, 2, 5AC, 6 типа и CD10, расширило возможности прогнозирования выживаемости больных РЖ. Экспрессия указанных маркеров оказывает определенное влияние на злокачественный потенциал карциномы и, как правило, не зависит от гистологического типа, гистологической стадии и локализации опухоли в желудке. Установлено, что карциномы смешанного ИФТ наиболее агрессивны. Это подтверждает ряд наших исследований, выявивших в карциномах смешанного ИФТ, по сравнению с желудочным ИФТ, большую иммунореактивность опухолевых клеток к MMP-2 и MMP-3 и меньшую к gal-3.

Принадлежность карциномы к одному из перечисленных ИФТ вариантов предложено рассматривать в качестве критерия прогноза. Смешанный ИФТ большинство исследователей относят к неблагоприятным прогностическим признакам, а желудочный и кишечный ИФТ расценивают как более благоприятные в прогностическом отношении карциномы. Это подтверждают и результаты нашего исследования о достоверно меньшей выживаемости в группе больных

РЖ с карциномами смешанного ИФТ по сравнению с группой пациентов, имеющих желудочный ИФТ рака.

Согласно данным ряда публикаций и результатам наших исследований, прогностическая значимость некоторых ИГХ маркеров, ассоциированных с опухолевым ростом, которые традиционно предлагают использовать для РЖ, спорна.

Вызывает сомнение диагностическая и прогностическая ценность такого общепринятого показателя злокачественного потенциала новообразования как пролиферативная активность опухолевых клеток, определяемая по индексу Ki-67. Как известно, ряд исследователей предлагают использовать индекс Ki-67 в качестве основного или единственного критерия при построении индивидуальной прогностической схемы у больных РЖ, традиционно расценивая высокие показатели этого маркера как неблагоприятный прогностический признак.

Пролиферативная активность – важная биологическая характеристика опухоли. Вместе с тем, как показывают результаты ряда исследований, в том числе наших, прогноз РЖ, основанный только на показателях индекса Ki-67, может быть ошибочным, поэтому, показатели темпа роста карциномы, определяемые по экспрессии этого белка, не могут считаться достоверными критериями прогноза РЖ.

Для более точного прогнозирования выживаемости при РЖ, по-видимому, необходим учет и других механизмов клеточного обновления: комплексная оценка митотического индекса, соотношения нормальных и патологических митозов, а также индекса клеточной гибели (апоптоза), которые могут дать намного более полное представление о темпах прогрессирования опухоли.

Кроме того, при построении прогностических схем РЖ, по-видимому, переоценена и прогностическая значимость мембранного и аномального типа ИГХ экспрессии cad-e. В новообразованиях некоторых других локализаций определение типа экспрессии этого белка в прогностических целях обосновано в ряде публикаций. Как известно, мембранная экспрессия cad-e свойственна опухолевым клеткам высокодифференцированных карцином с низким злокачественным потенциалом и традиционно считается благоприятным прогностическим признаком. Показано, что в опухолевых клетках РЖ мембранная экспрессия cad-e сопровождается точечными или парциальными мутациями этого белка с нарушением его адгезивных свойств, поэтому при прогнозировании течения РЖ высокие показатели мембранной экспрессии cad-e опухолевыми клетками карциномы не могут считаться достоверным признаком лучшего прогноза.

Таким образом, смешанный ИФТ вариант РЖ, а также низкая иммунореактивность опухолевых клеток карциномы к gal-3, cad-e и высокая иммунореактивность к MMP-2, MMP-3 являются неблагоприятными прогностическими признаками, достоверно ассоциированными с худшей выживаемостью, которые могут

быть использованы в качестве дополнительных прогностических факторов у больных РЖ.

Литература

1. Варианты карцином желудка по иммуногистохимической экспрессии муцинов и CD 10 / Л.Е. Гаганов и др. // Архив патологии. 2012. № 2. С. 3–6.
2. Выявление галектина-3 в карциномах желудка / Л.Е. Гаганов и др. // Земский врач. 2012. № 3. С. 37–38.
3. Злокачественные новообразования в России в 2011 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. В.И. Чиссова, В.В. Старинского, Г.В. Петровой М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2013. 289 с.
4. Иммуногистохимическая экспрессия галектина-3 и е-кадхерина в различных иммунофенотипических вариантах рака желудка / Л.Е. Гаганов и др. // Технологии живых систем. 2012. № 3. С. 28–31.
5. Особенности экспрессии Е-кадхерина в карциномах желудка / Л.Е. Гаганов и др. // Альманах клинической медицины. 2011. № 25. С. 3–8.
6. Отдаленные результаты хирургического лечения различных иммунофенотипических вариантов рака желудка / Л.Е. Гаганов и др. // Хирург. 2011. № 11. С. 20–24.
7. Сопоставление функциональных показателей и пролиферативной активности карцином желудка с отдаленными результатами радикального хирургического лечения / Л.Е. Гаганов и др. // Хирург. 2012. № 7. С. 4–8.
8. Сравнительное иммуногистохимическое исследование экспрессии муцинов в карциномах различных анатомических отделов желудка / Л.Е. Гаганов и др. // Альманах клинической медицины. 2010. № 22. С. 48–54.
9. Экспрессия металлопротеиназ-2 и -3 в карциномах желудка при различных иммунофенотипических вариантах / Л.Е. Гаганов и др. // Молекулярная медицина. 2013. № 1. С. 31–34.
10. Analysis of cell cycle-related proteins in gastric intramucosal differentiated-type cancers based on mucin phenotypes: a novel hypothesis of early gastric carcinogenesis based on mucin phenotype / T. Sugai et al. // BMC Gastroenterol. 2010. V. 10. P. 55.
11. Balan V. Galectins as cancer biomarkers / V. Balan, P. Nangia-Makker, A. Raz // Cancer. 2010. V. 2. N. 2. P. 592–610.
12. Bozzuto G. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion / G. Bozzuto, P. Ruggieri, A. Molinari // Ann. Ist. Super. Sanita. 2010. V. 46. N.1. P. 66–80.
13. Cadherin switching / M.J. Wheelock et al. // J. Cell. Sci. 2008. V. 121. N. 6. P. 727–35.
14. Cheong T. Silencing of galectin-3 changes the gene expression and augments the sensitivity of gastric cancer cells to chemotherapeutic agents / T. Cheong, J. Shin, K. Chun // Cancer Sci. 2010. V. 101. N. 1. P. 94–102.
15. Clinicopathological and prognostic significance of mucin phenotype in gastric cancer / K. Wakatsuki et al. // J. Surg. Oncol. 2008. V. 98. N. 2. P. 124–9.
16. Clinicopathological significance of E-cadherin, Я-catenin and p53 expression in gastric adenocarcinoma / M.R. Zali et al. // J. of Res. in Med. Sc. 2009. V. 14. N. 4. P. 239–47.
17. Correlation between cyclooxygenase-2, proliferative activity, and mucin phenotype in human advanced gastric cancer /

- M. Yamagishi et al. // *J. Gastroenterol.* 2004. V. 39. N. 12. P. 1143–9.
18. Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm / K.C. Haudek et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1800. N. 2. P. 181–89.
 19. Expression of CD10/neutral endopeptidase in normal and malignant tissue of human stomach and colon / Y. Sato et al. // *J. of Gastroenterol.* 1996. V. 31. N. 1. P. 12–7.
 20. Expression of cyclooxygenase-2, p53 and Ki-67 in gastric cancer / Y.E. Joo et al. // *J. Korean Med. Sci.* 2006. V. 21. N. 5. P. 871–6.
 21. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in gastric cancer and their relation to claudin-4 expression / L.Y. Lee et al. // *Histol. Histopathol.* 2008. V. 23. N. 5. P. 515–21.
 22. Expression of mucins and E-cadherin in gastric carcinoma and their clinical significance / H.K. Zhang et al. // *World J. Gastroenterol.* 2004. V. 10. N. 20. P. 3044–7.
 23. Expression of peroxisome proliferators activated receptor γ , E-cadherin and matrix metalloproteinases-2 in gastric carcinoma and lymph node metastases / Q. He et al. // *Chin. Med. J.* 2007. V. 120. N. 17. P. 1498–504.
 24. *Fingleton B.* Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis / B. Fingleton // *Front Biosci.* 2006. V. 11. P. 479–91.
 25. Gastric and intestinal phenotypic cell marker expressions in gastric differentiated-type carcinomas: association with E-cadherin expression and changes / K. Morohara et al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2006. V. 132. N. 6. P. 363–75.
 26. Gastric and intestinal phenotypic marker expression in early differentiated-type tumors of the stomach: clinicopathologic significances and genetic background / Y. Tajima et al. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. N. 2. P. 6469–79.
 27. Gastric mucin and beta-catenin are useful markers to predict submucosal invasion and lymph node metastasis in intestinal type early gastric cancer / W-G. Kim et al. // *Basic and Applied Pathology.* 2011. V. 4. N. 3. P. 86–92.
 28. Gastric phenotype signet-ring cell carcinoma of the stomach with multiple bone metastases effectively treated with sequential methotrexate and 5-fluorouracil / T. Mizoshita et al. // *Int. J. Clin. Oncol.* 2008. V. 13. N. 4. P. 373–6.
 29. *Gendler J.S.* Epithelial mucin genes / J.S. Gendler, A.P. Spicer // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. V. 57. P. 607–34.
 30. Ki-67 expression in gastric cancer. Results from a prospective study with long-term follow-up / D. Lazrr et al. // *Rom. J. Morphol. Embryol.* 2010. V. 51. N. 4. P. 655–61.
 31. *Kufe D.W.* Mucins in cancer: function, prognosis and therapy / D.W. Kufe // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. V. 9. N. 12. P. 874–85.
 32. *Lazrr D.* Immunohistochemical profile of mucins in gastric carcinoma / D. Lazrr, S. Trban, S. Ursoniu // *Gastric carcinoma – molecular aspect and current advances / Dr. Mahmoud Lotfy. InTech.* 2011. P. 201–36.
 33. Low Ki-67 proliferation index is an indicator of poor prognosis in gastric cancer / H.E. Lee et al. // *J. Surg. Oncol.* 2010. V. 102. N. 3. P. 201–6.
 34. Micropapillary Carcinoma of Stomach: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 11 Cases / J.H. Roh et al. // *Am. J. of Surg. Pathol.* 2010. V. 34. N. 8. P. 1139–46.
 35. Mixed-type gastric carcinomas exhibit more aggressive features and indicate the histogenesis of carcinomas / H. Zheng et al. // *Virchows Arch.* 2008. V. 452. N. 5. P. 525–34.
 36. Molecular biological characteristics of differentiated early cancer on the basis of mucin expression / N. Shin et al. // *Korean. J. Pathol.* 2011. V. 45. N. 1. P. 69–78.
 37. MUC1 inhibits cell proliferation by a beta-catenin-dependent mechanism / E.P. Lillehoj et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1773. N. 7. P. 1028–38.
 38. *Namikawa T.* Mucin phenotype of gastric cancer and clinicopathology of gastric-type differentiated adenocarcinoma / T. Namikawa, K. Hanazaki // *World J. Gastroenterol.* 2010. V. 16. N. 36. P. 4634–9.
 39. Phenotypic classification of gastric signet ring cell carcinoma and its relationship with Clinicopathologic parameters and prognosis / M.-M. Tian et al. // *World J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. N. 23. P. 3189–98.
 40. Prognostic significance of MUC1, MUC2 and MUC5AC expressions in gastric carcinoma / O. Ilhan et al. // *Turk. J. Gastroenterol.* 2010. V. 21. N. 4. P. 345–52.
 41. Reduced galectins-3 expression is an indicator of unfavorable prognosis in gastric cancer / K. Okada et al. // *Anticancer research.* 2006. V. 26. P. 1369–76.
 42. Relationship between biological behavior and phenotypic expression in undifferentiated-type gastric carcinomas / A. Kabashima et al. // *Gastric Cancer.* 2005. V. 8. N. 4. P. 220–7.
 43. Relationship between clinicopathological features and mucin phenotypes of advanced gastric adenocarcinoma / F. Toki et al. // *World J. Gastroenterol.* 2010. V. 16. N. 22. P. 2764–70.
 44. Relationship between lymph node metastasis and E-cadherin expression in submucosal invasive gastric carcinomas with gastric-phenotype / R. Aoki et al. // *The J. of Med. Invest.* 2007. V. 54. N. 1–2. P. 159–67.
 45. Relationships between mucinous gastric carcinoma, MUC2 expression and survival / E. Leteurtre et al. // *World J. Gastroenterol.* 2006. V. 12. N. 21. P. 3324–31.
 46. Significance of the mucin phenotype of early gastric cancer / M. Matsuoka et al. // *Jikeikai. Med. J.* 2003. V. 50. N. 1. P. 29–36.
 47. The MUC gene family: their role in the diagnosis and prognosis of gastric cancer / S. Senapati et al. // *Histol Histopathol.* 2008. V. 23. N. 12. P. 1541–52.
 48. Tumor differentiation phenotype in gastric differentiated-type tumors and its relation to tumor invasion and genetic alterations / K. Yamazaki et al. // *World J. Gastroenterol.* 2006. V. 12. N. 24. P. 3803–9.
 49. *Wu Y.* Phenotypic classification of well-differentiated gastric adenocarcinoma / Y. Wu, Z. Li, J. Li // *Chinese J. of Cancer Research.* 2009. V. 21. N. 4. P. 278–89.
 50. *Zhou Y.* Clinicopathological significance of E-cadherin, VEGF, and MMPs in gastric cancer / Y. Zhou, G. Li, J. Xu // *Tumour Biol.* 2010. V. 31. N. 6. P. 549–58

PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF STOMACH CANCER

L.E. Gaganov, I.A. Kazantseva

On a material of Publications and the results of own studies analyzed depends malignant potential of gastric carcinoma from functional immunophenotype of tumor cells, as well as the intensity of the expression of immunohistochemical markers associated with tumor growth. It is shown, that the mixed immunophenotypic variant gastric carcinoma, low immunoreactivity of tumor cells to gal-3 and cad-e, as well as high immunoreactivity to MMP-2 and MMP-3 are reliable prognostic features that are associated with a worse survival. However, the prognostic value of tumor cell proliferative activity determined by Ki-67 index, as well as the importance of membrane and abnormal type's expression of intercellular adhesion molecule cad-e for the prediction of cancer of the stomach, apparently overestimated.

Key words: gastric cancer, prognosis, immunophenotype, mucins, CD10, Ki-67, gal-3, cad-e, MMP-2, MMP-3

Информация об авторах

Казанцева Ирина Александровна – докт. мед. наук, профессор, руководитель патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Адрес: 110129, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2.

Гаганов Леонид Евгеньевич – канд. мед. наук, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Адрес: 110129, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2.

E mail: leo-gann@mail.ru

Материал поступил в редакцию 5 марта 2013 года.

© Коллектив авторов, 2013

УДК: 618.146-006.66-078.33

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *neuroD1* В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, А.Е. Прощина, С.В. Савельев

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

В настоящей работе с применением иммуногистохимических методов проведен анализ распределения транскрипционного фактора *neuroD1* и гормонов эндокринных клеток (инсулина, глюкагона) в поджелудочной железе (ПЖ) плодов человека с 8-й по 36–37-ю неделю развития. В результате исследования установлено, что при развитии ПЖ человека *neuroD1* выявляется в эпителиальных клетках формирующихся протоков начиная с 8-й недели и на всех последующих сроках гестации. Нарастание уровня экспрессии *neuroD1* наблюдается в начале II триместра беременности (14 недель) и совпадает по срокам с увеличением количества эндокринных клеток, в особенности А-клеток, и образованием в зачатке ПЖ биполярных панкреатических островков. Кроме того, было показано, что на всех исследованных сроках развития формирующиеся панкреатические островки контактируют с *neuroD1*-позитивными клетками, локализованными в протоках железы. Полученные результаты подтверждают данные литературы о необходимости транскрипционного фактора *neuroD1* для регуляции количества эндокринных клеток и морфогенеза панкреатических островков.

Ключевые слова: развитие человека, поджелудочная железа, панкреатические островки, *neuroD1*, инсулин

В исследованиях последних 20 лет был описан целый ряд транскрипционных факторов, участвующих в регуляции дифференцировки различных типов клеток поджелудочной железы. К транскрипционным факторам, регулирующим дифференцировку эндокринных клеток, относят *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*), *Ngn3* (*neurogenin 3*) *NeuroD1* (*neurogenic differentiation 1*), *Nkx2-2* (*NK2 transcription factor related, locus 2*), *Nkx6-1* (*NK6 transcription factor related, locus 1*), *Pax4* (*paired box gene 4*), *Pax6* (*paired box gene 6*), *Arx* (*aristaless related homeobox*) [1, 14, 22, 23].

Neurogenic differentiation factor 1 (*neuroD1*, *Beta2/NeuroD*, *NDF1*) является белком, относящимся к классу транскрипционных факторов с основным доменом типа спираль–петля–спираль (*basic Helix-Loop-Helix*, *bHLH*), который играет важную роль в развитии разнообразных структур в нервной системе [7, 12, 16, 17] и необходим для дифференцировки эндокринных клеток ПЖ [9, 18].

Экспрессия *neuroD1* наблюдается как в зрелых эндокринных клетках ПЖ, так и в клетках-предшественницах при ее развитии [6]. В зрелых эндокринных клетках *neuroD1* принимает участие в регуляции экспрессии некоторых генов, специфических

для В-клеток [13, 18, 20, 24]. Кроме того, эктопическая экспрессия *neuroD1* в линии D-клеток ПЖ человека приводит к репрессии соматостатина, которая сопровождается индукцией гормонов В-клеток – инсулина, амилина (*islet amyloid polypeptide*). По мнению авторов, *neuroD1* может действовать в одной клетке как репрессор и как активатор транскрипции различных генов [20].

При развитии ПЖ *neuroD1* вместе с другими транскрипционными факторами принимает участие в дифференцировке эндокринных клеток и морфогенезе панкреатических островков [6, 9, 14, 18]. На новорожденных мутантных мышях, лишенных функционально активного гена (*NEUROD1*^{-/-}), показаны редукция в количестве островковых клеток, в особенности В-клеток (25% от дикого типа), и плохая способность к формированию панкреатических островков [9]. В отсутствие функционально активного гена *NEUROD1* у мышей развивается тяжелый сахарный диабет, и они погибают в перинатальный срок [9]. Сверхэкспрессия *NEUROD1* в ПЖ трансгенных мышей приводит к увеличению количества эндокринных клеток, при этом подавляющее большинство клеток экспрессирует глюкагон [14].

В настоящее время идентифицированы некоторые мутации генов, кодирующих различные транскрипционные факторы, включая *NEUROD1*, которые приводят к развитию сахарного диабета зрелого типа у молодых (MODY, maturity-onset diabetes of the young) [2, 3, 15, 19].

Изложенные выше факты свидетельствуют о том, что *neuroD1* является одним из ключевых транскрипционных факторов, влияющих на морфогенез эндокринной части поджелудочной железы. Исследования, посвященные изучению экспрессии транскрипционных факторов в зачатке ПЖ человека, немногочисленны [4, 11, 25]. При этом очевидно, что данные о распределении клеток, экспрессирующих различные транскрипционные факторы, необходимы для детального понимания механизмов дифференцировки эндокринных клеток и морфогенеза панкреатических островков. Настоящая работа посвящена изучению распределения клеток, содержащих один из основных транскрипционных факторов – *neuroD1* в ПЖ плодов человека разных сроков развития (с 8-й по 36–37-ю неделю).

Материалы и методы

Работа выполнена на 22 аутопсийных образцах ПЖ плодов человека с 8-й по 36–37-ю неделю развития. Фиксация материала проводилась в 4% параформальдегиде или в 4% параформальдегиде на 0,1М фосфатном буфере, pH 7,5. ПЖ целиком (плоды с 8-й по 20-ю неделю развития) и кусочки ПЖ размером 1x1x0,5 мм (от плодов более поздних сроков развития) обезживали в спиртах восходящей концентрации и диоксане, заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 10 мкм.

В иммуногистохимических реакциях использовали по 6 срезов для каждого случая с максимальной площадью образца: 3 среза для проведения иммуногистохимической реакции с антителами к *neuroD1*, 3 среза для проведения тройного иммуногистохимического маркирования антителами к *neuroD1*, инсулину и глюкагону.

Для проведения иммуногистохимических реакций депарафинированные гидратированные срезы обрабатывали 3% раствором H_2O_2 для блокировки эндогенной пероксидазы. В качестве первых антител использовали мышинные моноклональные антитела к *neuroD1* (Abscam, рабочие разведения 1:400–1:800). Для образцов ПЖ плодов с 8-й по 12-ю неделю развития применяли рабочие разведения первых антител 1:100 (концентрация антител 3 мкг/мл). Для визуализации реакций использовали набор Ultra Vision ONE detection system (Thermo Scientific) с хромогеном DAB.

Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител раствором PBS (0,01М фосфатный буфер, pH 7,3–7,5).

При проведении тройного иммуногистохимического маркирования I этап проводили согласно описанной выше схеме. На II этапе срезы обрабатывали смесью мышинных моноклональных антител к инсулину (Sigma,

1:8000) и кроличьих поликлональных антител к глюкагону (Thermo Scientific, 1:200). Реакции на инсулин и глюкагон визуализировали с помощью набора Multi Vision Plymer Detection System Anti-rabbit HRP + Anti-mouse AP, LV blue & LV Red (Thermo Scientific).

Для негативного контроля первые антитела заменяли на раствор PBS. В описанной схеме для выявления *neuroD1* и глюкагона использовали вторые антитела, меченные пероксидазой. Указанные антигены имеют разную локализацию в клетке: глюкагон – цитоплазматическую, а *neuroD1* – ядерную, что позволяло различать метки на срезах.

Результаты и обсуждение

Иммунопозитивная реакция на *neuroD1* обнаружена в образцах ПЖ всех плодов с 8-й по 36–37-ю неделю развития. Иммунореактивность к этому маркеру была локализована в ядрах клеток. У ранних плодов (8–12 недель) позитивная реакция на *neuroD1* выявлялась только при использовании концентрации антител не менее 3 мкг/мл, при этом интенсивность реакции на *neuroD1* была заметно слабее, чем на более поздних сроках развития (с 14-й по 36–37-ю неделю). На 8-й неделе развития *neuroD1*-позитивные клетки были немногочисленны и локализованы в эпителии протоков ПЖ (рис. 1 А). По мере развития органа с 8-й по 12-ю неделю количество *neuroD1*-позитивных клеток в разветвляющихся протоках постепенно нарастает, однако интенсивность реакции на этот маркер остается слабой.

Во всех образцах ПЖ плодов человека с 14-й по 36–37-ю неделю развития была выявлена интенсивная и контрастная реакция на *neuroD1* (рис. 1 Б, В). При визуальной оценке установлено, что *neuroD1*-позитивные клетки наиболее многочисленны у 16–20-недельных плодов (рис. 1 Б). При дальнейшем развитии органа *neuroD1*-позитивные клетки присутствуют также в большом количестве, но локализуются все более разрежено (рис. 1 В).

Обнаруженные различия в интенсивности реакции на *neuroD1*, по-видимому, отражают изменения уровня экспрессии этого транскрипционного фактора при развитии ПЖ. Данные литературы об экспрессии *neuroD1* в поджелудочной железе плодов человека несколько противоречивы. С использованием иммунофлуоресцентных методов, РНК-микрочипов и методики количественной ПЦР (qRT-PCR) было показано, что экспрессия *neuroD1* наблюдается в клетках ПЖ 8-недельных плодов, по мере развития органа уровень экспрессии этого маркера постепенно нарастает [25]. В исследовании другой группы авторов, также методом количественной ПЦР, установлено, что на ранних сроках развития уровень экспрессии *neuroD1* в ПЖ плодов человека низкий [11], нарастание уровня экспрессии этого транскрипционного фактора начинается с 13–15-й недели развития, что согласуется с нашими результатами.

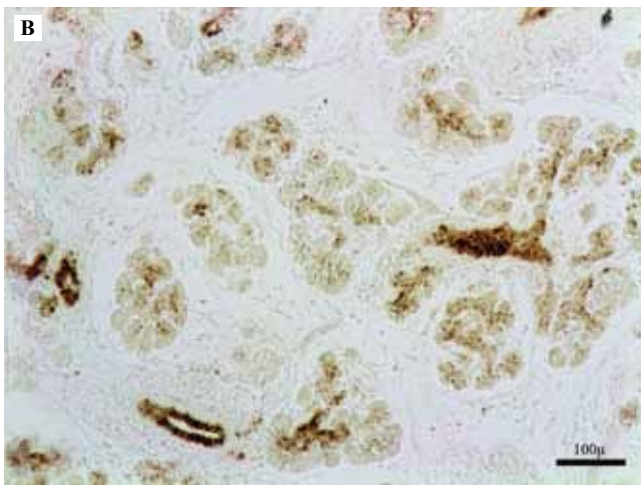
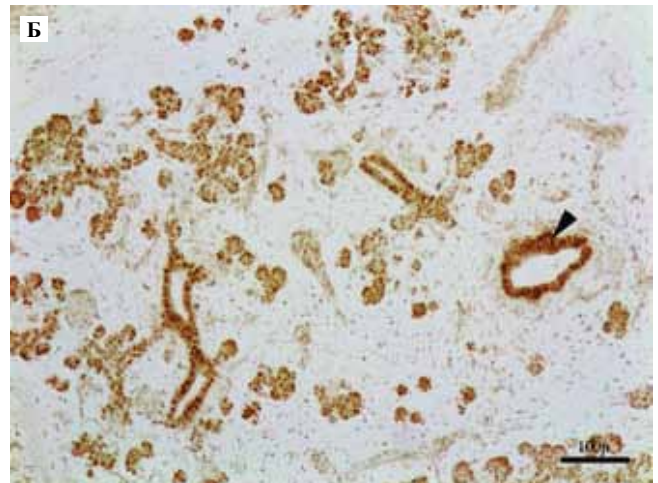
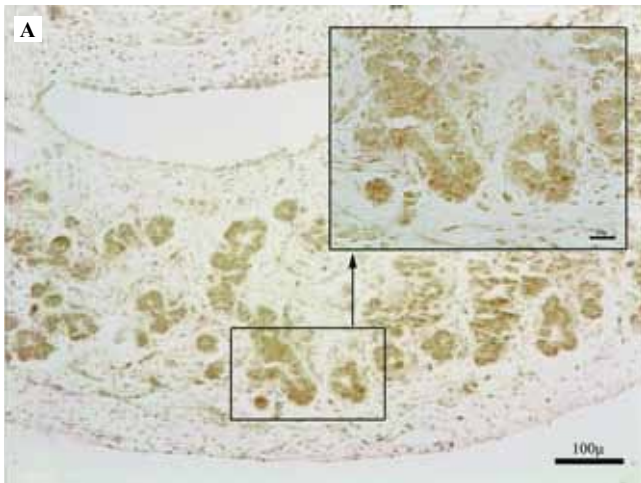


Рис. 1. Иммуногистохимические реакции с антителами к транскрипционному фактору *neuroD1* в поджелудочной железе плодов человека.
А – 8 недель;
Б – 16 недель, стрелкой указан междольковый панкреатический проток с многослойным утолщением стенки;
В – 25 недель

Таким образом, в ранний плодный период (8–12 недель) в зачатке ПЖ человека уровень экспрессии *neuroD1* низкий. При этом на указанных сроках наблюдаются дифференцировка первых эндокринных клеток, резкое нарастание их количества и образование первых кластеров эндокринных клеток [4, 8, 10, 11, 25]. Уровень экспрессии *neuroD1* повышается к началу II триместра беременности (14 недель). Согласно данным литературы и результатам наших предыдущих исследований, морфогенез эндокринной части ПЖ во II триместре беременности характеризуется изменением соотношения В- и А-клеток в пользу А-клеток [8, 25], а также образованием биполярных панкреатических островков, в которых В- и А-клетки локализованы на разных полюсах [8, 11].

В эксперименте на мышах с дефектом гена *NEUROD1* показано, что начальные стадии дифференцировки эндокринных клеток ПЖ (до 14,5 ЭД) не зависят от функциональной активности *neuroD1*, поскольку количество *neuroD1*-содержащих клеток, а также В- и А-клеток у мутантных животных не отличалось от такового у контрольных особей [9]. Дефект в экспрессии *neuroD1* проявлялся лишь после 17,5 ЭД и выражался

в снижении количества эндокринных клеток, в особенности В-клеток, и способности формировать панкреатические островки [9].

Исходя из полученных результатов и данных литературы, можно предположить, что при развитии ПЖ человека, как и у мышей, дифференцировка первых эндокринных клеток происходит независимо от экспрессии *neuroD1*. Повышение уровня экспрессии *neuroD1* во II триместре беременности свидетельствует о том, что данный транскрипционный фактор участвует в регуляции количества и соотношения различных типов эндокринных клеток и необходим для нормального морфогенеза панкреатических островков.

В большинстве современных работ оценивается преимущественно колокализация транскрипционных факторов с гормонами эндокринных клеток ПЖ. Наличие колокализации авторы рассматривают как доказательство участия транскрипционных факторов в дифференцировке различных типов эндокринных клеток [4, 11, 9, 25]. Лишь в немногих исследованиях имеются отдельные результаты локализации гормононегативных клеток, содержащих транскрипционные факторы [9]. Согласно данным Lyttle, в зачатке подже-

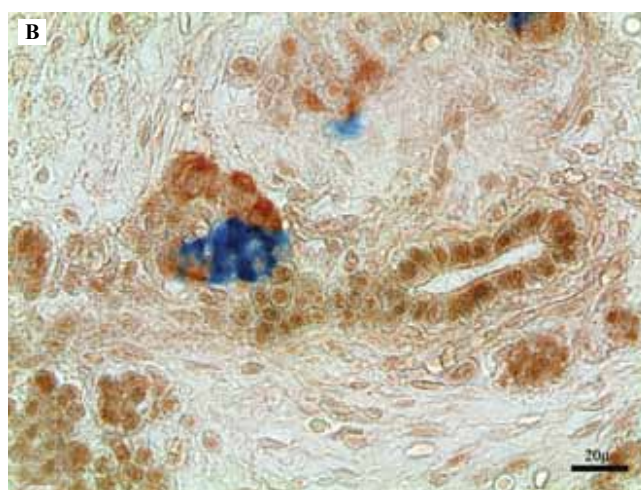
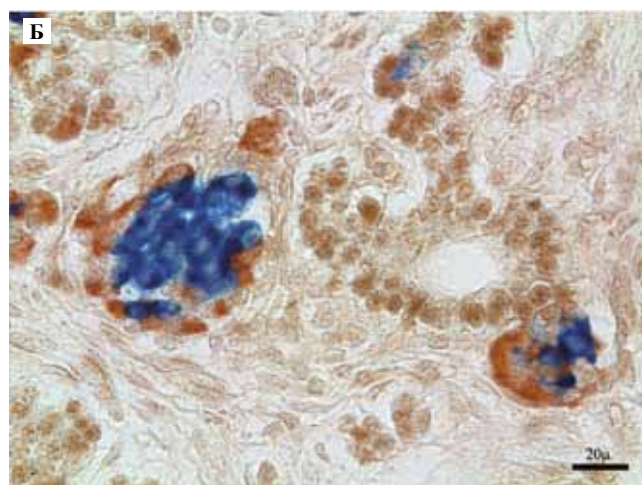
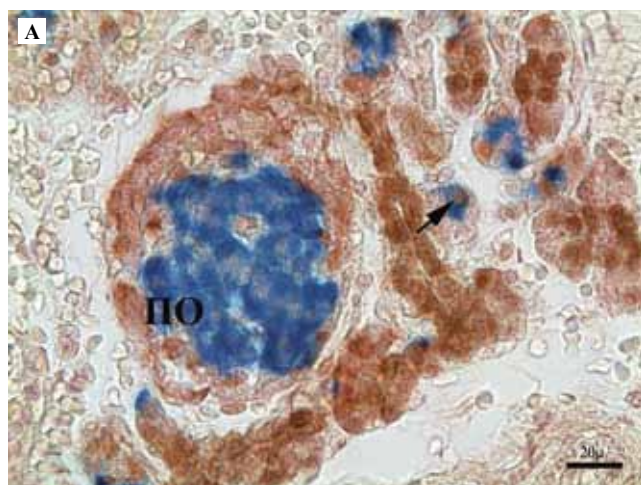


Рис. 2. Тройное иммуногистохимическое маркирование антителами к neuroD1 (коричневый), инсулину (голубой) и глюкагону (красный) в ПЖ плодов человека.

А – 23 недели; панкреатический островок (ПО), локализованный вблизи протока; стрелкой указана В-клетка с позитивной реакцией на neuroD1 в ядре;

Б – 14 недель, небольшие кластеры эндокринных клеток, локализованные вблизи протока;

В – 14 недель, тяж neuroD1-позитивных клеток, подходящий к кластеру эндокринных клеток

лудочной железы человека выявляется колокализация neuroD1 с инсулином, глюкагоном, соматостатином и панкреатическим полипептидом [25].

При маркировании антителами к neuroD1 нами обнаружено, что на всех сроках развития в большинстве клеток панкреатических островков реакция на neuroD1 иммунонегативна (рис. 2 А–В). Однако с использованием методики тройного иммуногистохимического маркирования во всех образцах выявлены редкие инсулин- (рис. 2 А) и глюкагонсодержащие клетки с neuroD1-позитивными ядрами, что согласуется с данными литературы [25].

Анализ распределения neuroD1-позитивных клеток показал, что на всех сроках развития эти клетки локализованы преимущественно в междольковых и внутридольковых панкреатических протоках различного диаметра, а также в формирующихся дольках (рис. 1, рис. 2) и не содержат гормоны.

Как указывалось выше, neuroD1 экспрессируется в дифференцирующихся эндокринных клетках ПЖ [9, 18]. Подтверждением данного факта служит отсутствие коэкспрессии neuroD1 с амилазой в зачатке поджелудочной железы [25]. Кроме того, в ПЖ мышей neuroD1-содержащие клетки имеют некоторые ультра-

структурные характеристики, свойственные эндокринным клеткам и клеткам протоков [21], поэтому можно предположить, что neuroD1-позитивные клетки, не содержащие гормоны, представляют собой популяцию предшественников эндокринных клеток. Отсутствие в большинстве инсулин- и глюкагонсодержащих клеток позитивной реакции на neuroD1, по-видимому, является результатом снижения экспрессии этого транскрипционного фактора по мере дифференцировки эндокринных клеток.

Локализация neuroD1-позитивных клеток преимущественно в протоках ПЖ плодов человека служит показателем того, что протоки поджелудочной железы являются эмбриональным источником эндокринных клеток, поэтому мы провели анализ взаимодействия между neuroD1-позитивными клетками в протоках и формирующимися кластерами эндокринных клеток.

В зрелой ПЖ млекопитающих протоки выстилает однослойный эпителий, состоящий из столбчатых, кубических или уплощенных клеток [21]. У 16–30-недельных плодов человека в некоторых междольковых протоках обнаружены участки с многослойными стенками, образованными neuroD1-позитивными клетками (рис. 1 Б). Подобные эпителиальные структуры, тесно

ассоциированные с протоками, отмечались и другими исследователями [5] и, вероятно, представляют собой начальные этапы образования панкреатических островков.

В I триместре беременности (8–12 недель) большинство образующихся кластеров эндокринных клеток тесно ассоциировано с протоками, что отмечают некоторые авторы [4, 10]. На всех последующих сроках развития в ПЖ плодов человека также присутствуют небольшие кластеры эндокринных клеток, локализованные вблизи протоков (рис. 2 А–В). Кроме того, начиная с 14-й недели развития в зачатке ПЖ выявляются протоки, образующие тяжи *neuroD1*-позитивных клеток, которые подходят к панкреатическим островкам (рис. 2 В). Такие тяжи были выявлены у всех плодов до 30-й недели развития. Таким образом, в развивающейся поджелудочной железе человека кластеры эндокринных клеток контактируют с *neuroD1*-позитивными клетками, локализованными в протоках. Этот факт служит косвенным подтверждением участия *neuroD1*-позитивных клеток в формировании панкреатических островков.

В проведенном исследовании установлено, что при развитии ПЖ человека *neuroD1* выявляется в эпителиальных клетках формирующихся протоков начиная с 8-й недели и на всех последующих сроках развития. Судя по интенсивности реакции, уровень экспрессии этого маркера у ранних плодов низкий. Нарастание уровня экспрессии *neuroD1* наблюдается в начале II триместра беременности (14 недель) и совпадает по срокам с нарастанием количества эндокринных клеток, в особенности А-клеток, и образованием в зачатке ПЖ биполярных панкреатических островков. Полученные результаты подтверждают данные литературы о необходимости этого транскрипционного фактора для регуляции количества эндокринных клеток и морфогенеза панкреатических островков. Выявленная связь между формирующимися панкреатическими островками и *neuroD1*-позитивными клетками также указывает на участие этих клеток в морфогенезе эндокринной части поджелудочной железы человека.

Литература

1. An illustrated review of early pancreas development in the mouse / M.C. Jorgensen et al. // *Endocr Rev.* 2007. V. 28. N 6. P. 685–705.
2. Analysis of candidate genes for susceptibility to type 1 diabetes: a case-control and family-association study of genes on chromosome 2q31-35 / D. Owerbach et al. // *Diabetes.* 1997. V. 46. N 6. P. 1069–74.
3. Association of polymorphism in the *NeuroD/BETA2* gene with type 1 diabetes in the Japanese / I. Iwata et al. // *Diabetes.* 1999. V. 48. N 2. P. 416–19.
4. Beta cell differentiation during early human pancreas development / K. Piper et al. // *J Endocrinol.* 2004. V. 181. N 1. P. 11–23.
5. CD-56 positive cells with or without synaptophysin expression are recognized in the pancreatic duct epithelium: a study with adult and fetal tissues and specimens from chronic pancreatitis / M. Fujisawa et al. // *Acta Med Okayama.* 2003. V. 57. N 6. P. 279–84.
6. Chu K. *BETA2* and pancreatic islet development / K. Chu, E. Nemoz-Gaillard, M.-J. Tsai // *Recent Prog Horm Res.* 2001. V. 56. P. 23–46.
7. Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by *NeuroD*, a basic helix-loop-helix protein / J.E. Lee et al. // *Science.* 1995. V. 268. N 5212. P. 836–44.
8. Development of the Islets of Langerhans in the Human Fetal Pancreas / Y.S. Krivova et al. // In: *Pancreas: Anatomy, Diseases and Health Implications*; eds.: Satou A., Nakamura H. N.Y.: Nova Science Publishers, 2012. P. 53–88.
9. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in *BETA2/neuroD*-deficient mice / F.J. Naya et al. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. N 18. P. 2323–34.
10. Early pattern of differentiation in the human pancreas / M. Polak et al. // *Diabetes.* 2000. V. 49. N 2. P. 225–32.
11. Endocrine cell clustering during human pancreas development / J. Jeon et al. // *J Histochem Cytochem.* 2009. V. 57. N 9. P. 811–24.
12. Essential role of *BETA2/NeuroD1* in development of the vestibular and auditory systems / M. Liu et al. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. N 22. P. 2839–54.
13. *Glick E.* Transcription factor *BETA2* acts cooperatively with *E2A* and *PDX1* to activate the insulin gene promoter / E. Glick, D. Leshkowitz, M.D. Walker // *J Biol Chem.* 2000. V. 275. N 3. P. 2199–204.
14. Expression of *neurogenin3* reveals an islet cell precursor population in the pancreas / V.M. Schwitzgebel et al. // *Development.* 2000. V. 127. N 16. P. 3533–42.
15. Homozygous Mutations in *NEUROD1* Are Responsible for a Novel Syndrome of Permanent Neonatal Diabetes and Neurological Abnormalities / O. Rubio-Cabezas et al. // *Diabetes.* 2010. V. 59. N 9. P. 2326–31.
16. Loss of *BETA2/NeuroD* leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy / M. Liu et al. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. V. 97. N 2. P. 865–70.
17. *Miyata T.* *NeuroD* is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus / T. Miyata, T. Maeda, J.E. Lee // *Genes Dev.* 1999. V. 13. N 13. P. 1647–52.
18. *Naya F.J.* Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor / F.J. Naya, C.M. Stellrecht, M.J. Tsai // *Genes Dev.* 1995. V. 9. N 8. P. 1009–19.
19. *NeuroD/BETA2* gene variability and diabetes: no associations to late-onset type 2 diabetes but an A45 allele may represent a susceptibility marker for type 1 diabetes among Danes. Danish Study Group of Diabetes in Childhood, and the Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group / L. Hansen et al. // *Diabetes.* 2000. V. 49. N 5. P. 876–8.
20. *NeuroD1* in the Endocrine Pancreas: Localization and Dual Function as an Activator and Repressor / P. Itkin-Ansari et al. // *Dev Dyn.* 2005. V. 233. N 3. P. 946–53.
21. Notch signaling differentially regulates the cell fate of early endocrine precursor cells and their maturing descendants in the mouse pancreas and intestine / H.J. Li et al. // *Dev Biol.* 2012. V. 371. N 2. P. 156–69.

22. *Stanger B.Z.* Organ size is limited by the number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver / *B.Z. Stanger, A.J. Tanaka, D.A. Melton* // *Nature*. 2007. V. 445. N 7130. P. 886–91.
23. Opposing actions of *Arx* and *Pax4* in endocrine pancreas development / *P. Collombat et al.* // *Genes Dev*. 2003. V. 17. N 20. P. 2591–603.
24. The homeodomain of *PDX-1* mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter / *K. Ohneda et al.* // *Mol Cell Biol*. 2000. V. 20. N 3. P. 900–11.
25. Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas / *B.M. Lyttle et al.* // *Diabetologia*. 2008. V. 51. N 7. 1169–80.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE DISTRIBUTION OF TRANSCRIPTIONAL FACTOR *NEUROD1* IN THE HUMAN FETAL PANCREAS

Y.S. Krivova, V.M. Barabanov, A.E. Proshchina, S.V. Saveliyev

Abstract. In the present study immunohistochemical analysis of the distribution of transcriptional factor *neuroD1* and hormones of the endocrine cell (insulin, glucagons) in the human fetal pancreas from 8th to 36–37th weeks of development was applied. Immunopositive reaction for *neuroD1* was revealed from 8th week of development and in all later stages in the nuclei of cells located predominantly in the pancreatic ducts. *NeuroD1* expression level increases at the beginning of the IInd trimester (14th week) accompanied by the increase of the endocrine cells mass (especially of A-cells) and the appearance of the bipolar pancreatic islets. Beside that we found out the interactions between the developing pancreatic islets and *neuroD1*-positive duct cells. The received data confirms the requirement of transcription factor *neuroD1* for the regulation of the amount of endocrine cells and pancreatic islet morphogenesis.

Key words: human development, pancreas, pancreatic islets, *neuroD1*, insulin

Информация об авторах

Кривова Юлия Сергеевна – старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека РАМН.
Савельев Сергей Вячеславович – профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Материал поступил в редакцию 13 марта 2013 года.

© Коллектив авторов, 2013

УДК: 616.316-006-076.5-076.4

ОПУХОЛЬ ИЗ ЮКСТАГЛОМЕРУЛЯРНЫХ КЛЕТОК (ОПИСАНИЕ НАБЛЮДЕНИЯ)

И.А. Казанцева¹, В.Б. Банина¹, Т.В. Безуголова², В.П. Черников²

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МОНКИ) им. М.Ф. Владимирского», Москва

² ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

В публикации приведено описание доброкачественной опухоли почки из юкстагломерулярных клеток. Особенность данной опухоли заключается в ее локализации в стенке лоханки и преобладании сосудистого компонента, что симулировало гемангиому. Иммуногистохимическое исследование с широкой панелью антител установило, что опухолевые клетки экспрессируют виментин, ГМА, слабо экспрессируют CD34 и не экспрессируют меланоцитарные и нейроэндокринные маркеры. Экспрессия CD31 выявлялась только в эндотелии сосудистых структур. Электронно-микроскопическое исследование позволило выявить протогранулы ренина характерной ромбовидной формы.

Ключевые слова: почка, опухоль, юкстагломерулярные клетки, гистология, иммуногистохимия, электронная микроскопия

Доброкачественная опухоль почки из юкстагломерулярных клеток (ЮГКО) была впервые описана Robertson et al. в 1967 году [16], а затем Kihara et al. в 1968-м [7]. К настоящему времени опубликованы сообщения более чем о 100 случаях ЮГКО. Эта опухоль обычно диагностируется во втором и третьем десятилетиях жизни, у женщин в 2 раза чаще, чем у мужчин, и является очень редкой причиной артериальной гипертензии. Naab et al. (1995) [5] обнаружили всего 8 случаев ЮГКО среди 30 тысяч пациентов с клиникой артериальной гипертензии.

Большинство ЮГКО клинически проявляется высокой концентрацией ренина, гипокалиемией и гипертензией [16, 22, 23], хотя бывают и редкие исключения [17].

Обычно это небольшая солитарная односторонняя опухоль, расположенная чаще в корковом веществе, с четкими контурами, полностью или частично отграниченная фиброзной капсулой, желтовато-серая на разрезе. Гистологически ЮГКО состоит из солидных скоплений тесно упакованных мономорфных округлых или полигональных клеток с овальными либо округлыми ядрами, незаметными ядрышками, светлой эозинофильной цитоплазмой и плохо различимыми клеточными границами. Могут встретиться микрокисты, атипия отдельных клеток. Митозы, как правило, не выявляются. Опухоль богата как тонкостенными, так и толстостенными кровеносными сосудами.

Диагноз подтверждается иммунореактивностью цитоплазмы опухолевых клеток к ренину [2, 4, 21], хотя изредка она выявляется в опухоли Вилмса, почечно-

клеточном раке и почечной онкоцитоме. Большинство опухолевых клеток диффузно иммунореактивно к виментину и CD34; в части случаев установлена также иммунореактивность к гладкомышечному актину и CD117 [8, 10, 14]. При электронно-микроскопическом исследовании в цитоплазме опухолевых клеток выявляются характерные ромбовидные протогранулы ренина, секреторные гранулы разного размера и формы, хорошо развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум, заметный аппарат Гольджи [1, 3, 6, 12, 13, 18, 19, 20]. В цитоплазме также могут содержаться микропиноцитозные пузырьки и субмембранные бляшки, указывающие на проявления гладкомышечной дифференцировки [9]. Ультраструктурные ИГХ исследования показали, что экспрессия ренина обнаруживается не только в протогранулах или гранулах округлой формы, окруженных мембраной, но и в их промежуточных формах [11].

Подавляющее большинство ЮГКО является доброкачественными, не рецидивирует и не дает метастазов при парциальной нефрэктомии.

Приводим описание собственного наблюдения ЮГКО.

Пациентка С., 60 лет, была госпитализирована в урологическое отделение МОНКИ с жалобами на периодические боли в поясничной области, отеки ног, подъем АД до 170/100 мм рт. ст. По данным КТ в лоханке левой почки определяется узловое образование размерами 34 × 24 × 26 мм неправильной формы. При внутривенной урографии слева на уровне лоханки определяется слабо накапливающее контраст

образование округлой формы с нечеткими контурами, размерами 37 × 26 мм, оттеняющее и деформирующее контур лоханки и чашечек. Чашечно-лоханочная система и мочеточник не расширены.

Выполнена левосторонняя нефрэктомия. Послеоперационное течение гладкое, пациентка выписана в удовлетворительном состоянии.

В биохимических анализах крови уровень калия нормальный (4,0–4,6 ммоль/л), определение уровня ренина не проводили.

На патологоанатомическое исследование доставлена почка размерами 10 × 5,5 × 5,5 см. В среднем сегменте на границе с лоханкой определяется неправильной формы узел размерами 2,0 × 1,5 см буроватого цвета на разрезе (рис. 1 А, Б).

Гистологически опухоль была частично окружена фиброзной капсулой, располагалась в подслизистом

слое лоханки, вдаваясь в окололоханочный жир и не распространяясь на мозговое вещество почки.

Опухоль имела дольчатое строение с широкими и более узкими соединительнотканными прослойками, содержащими толстостенные артериальные сосуды. Сами опухолевые структуры представлены густой сетью тонкостенных кровеносных сосудов с широкими просветами неправильной формы, между которыми определялись скопления округлых, полигональных и вытянутых клеток с эозинофильной цитоплазмой и плохо различимыми границами (рис. 1 В). Ядра клеток округло-овальные, узурированные, нормохромные, с мелкими ядрышками, окруженными ободком просветленной цитоплазмы (рис. 1 Г).

Дифференциальный диагноз проводили между ЮГКО и гемангиомой и перитонеальной эпителиоидноклеточной опухолью – ПЭКомой.

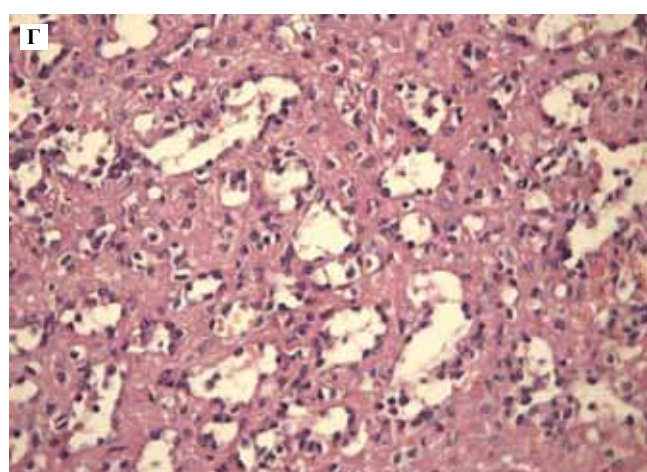
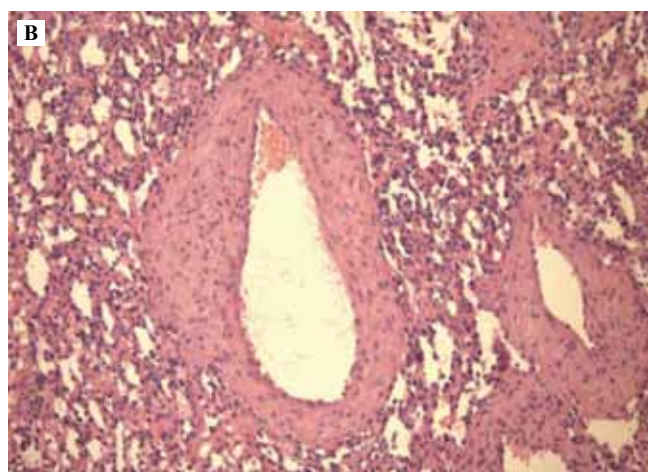
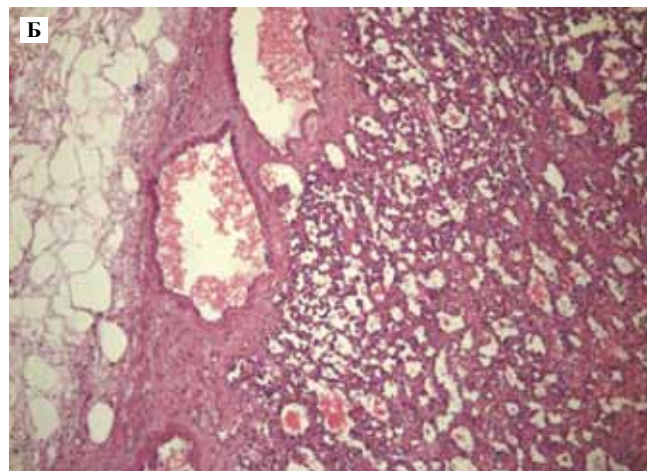


Рис. 1. Морфология ЮГКО. Окраска гематоксилином и эозином.

А – макроскопический вид опухоли на разрезе (указана стрелкой);

Б – общий вид опухоли. × 100;

В – обилие тонкостенных и толстостенных сосудов в опухолевой ткани. × 250;

Г – скопления опухолевых клеток в межсосудистых пространствах. × 400

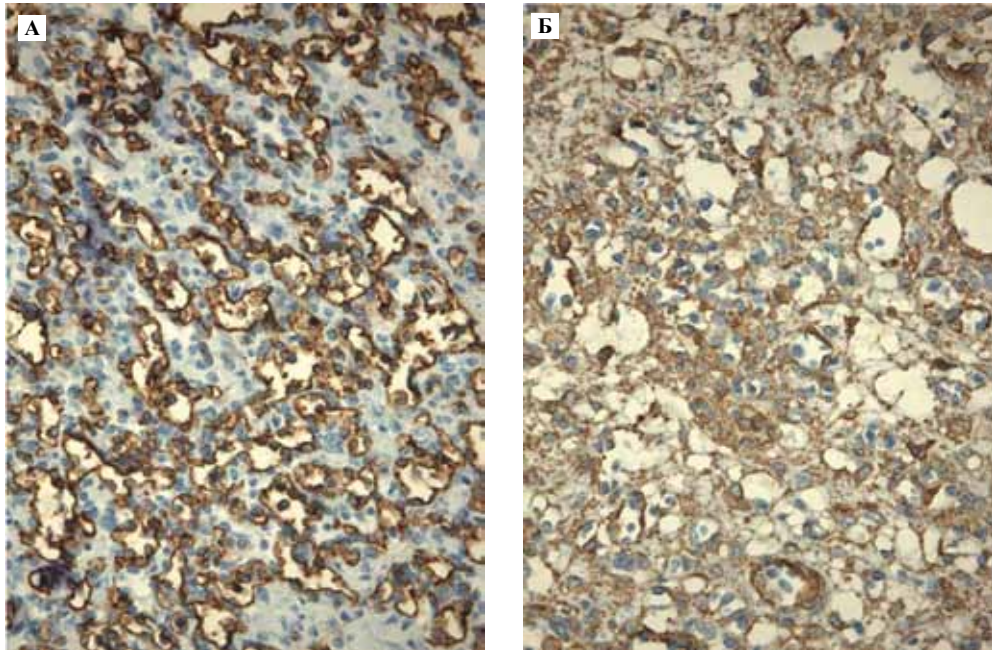


Рис. 2. Иммуногистохимическая характеристика ЮГКО.
 А – экспрессия CD34 эндотелием сосудов и отдельными клетками опухоли. × 400;
 Б – экспрессия ГМА опухолевыми клетками. × 400

Было выполнено ИГХ исследование с широкой панелью антител. Установлено, что опухолевые клетки экспрессируют виментин, ГМА, слабо экспрессируют CD34 и не экспрессируют меланоцитарные и нейроэндокринные маркеры. Экспрессия CD31 выявлялась только в эндотелии сосудистых структур (рис. 2 А, Б).

Электронно-микроскопическое исследование проведено на образцах ткани, предварительно фиксированных в 10% формалине, дальнейшая обработка проводилась по общепринятой схеме. На полутонких срезах в ткани опухоли хорошо видны многочисленные секреторные гранулы (рис. 3 А). При просмотре в элек-

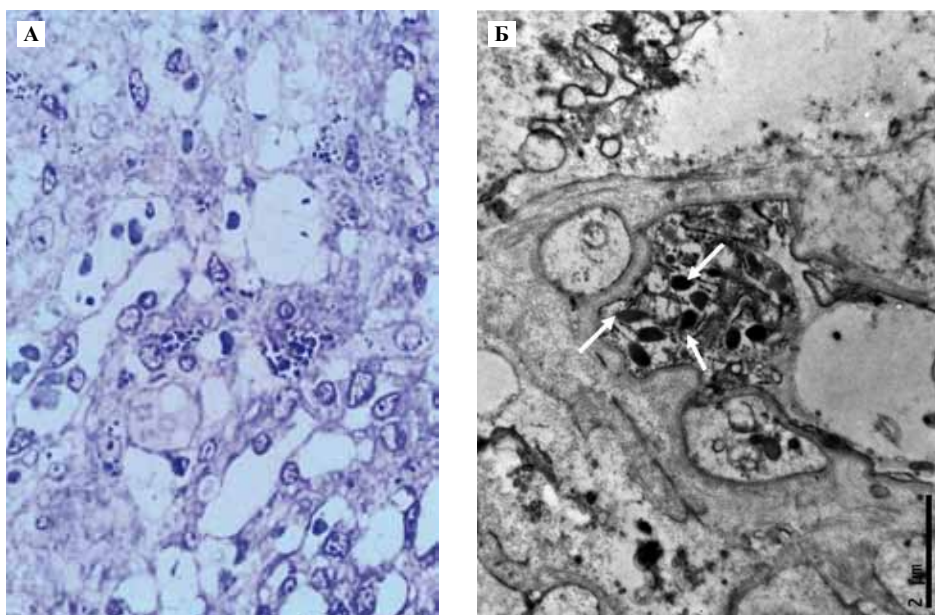


Рис. 3. Электронная микроскопия ЮГКО.
 А – многочисленные секреторные гранулы в ткани опухоли; полутонкий срез. × 200;
 Б – характерные протогранулы ромбовидной формы (указаны стрелкой) и зрелые электронноплотные гранулы.
 Электронная микрофотография

тронном микроскопе выявлены гранулы двух типов: протогранулы ренина характерной ромбовидной формы в относительно небольшом количестве и значительное количество электронно плотных секреторных гранул округлой или неправильной формы (зрелые ренинсодержащие гранулы) (рис. 3 Б).

Таким образом, установлено, что новообразование представляет собой ЮГКО. Особенностью данной опухоли являются ее локализация в стенке лоханки и преобладание сосудистого компонента, что симулировало гемангиому.

Судить о клинической манифестации данного наблюдения ЮГКО затруднительно, однако нельзя исключить роль гиперсекреции ренина в генезе развившейся у пациентки артериальной гипертензии.

Литература

- 1 Pathologic characterization of a renin-secreting juxtaglomerular cell tumor in a child and review of the pediatric literature / R.K. Abbi, M. McVicar, S. Teichberg et al. // *Pediatr Pathol*. 1993. V. 13. N 4. P. 443–51.
- 2 Juxtaglomerular cell tumor: MR findings / R. Agrawal, S. Zafar, H. Jafri et al. // *Comput Assist Tomogr*. 1995. V. 19. N 1. P. 140–2.
- 3 Hypertension due to a renin-secreting juxtaglomerular cell tumor / D.G. Beevers, M.B. Maheshwari, P.G. Ryan et al. // *Am J Hypertension*. 2008. V. 21. N 12. P. 1359–61.
- 4 Juxtaglomerular cell tumor of the kidney / L. Caregaro, F. Menon, A.P. Gatta et al. // *Clin Exper Hypertens*. 1994. V. 16. N 1. P. 41–53.
- 5 Renin-secreting tumors: diagnosis, conservative surgical approach and long-term results / F. Haab, J.M. Dulcos, T. Guyenne et al. // *J Urol*. 1995. V. 153. N 6. P. 1781–4.
- 6 Juxtaglomerular cell tumor (reninoma) with paroxysmal hypertension / W. Hanna, J. Tepperman, A.G. Logan et al. // *Can Med Assoc J*. 1979. V. 120. N 8. P. 957–9.
- 7 A hitherto unreported vascular tumor of the kidney: A proposal of «juxtaglomerular cell tumor» / I. Kihara, S. Kitamura, T. Hoshino et al. // *Acta Path Jap*. 1968. V. 18. N 2. P. 197–206.
- 8 Juxtaglomerular cell tumor of kidney with CD34 and CD117 immunoreactivity. Report of 5 cases / H-J. Kim, C.H. Kim, Y-J. Choi et al. // *Arch Pathol Lab Med* 2006. V. 130. N. 5. P. 707–11.
- 9 Review of juxtaglomerular cell tumor with focus on pathobiological aspect / N. Kuroda, H. Gotoda, C. Ohe et al. // *Diagn Pathol*. 2011. V. 6. N 80.
- 10 Juxtaglomerular cell tumor: A morphological, immunohistochemical and genetic study of six cases / N. Kuroda, S. Maris, F.A. Monson et al. // *Human Pathology*. 2013. V. 44. Issue 1. P. 47–54.
- 11 The immunocytochemical demonstration of renin in a juxtaglomerular cell tumour by light and electron microscopy / G.B.M. Lindrop, J.A. Stewart, T.T. Downie // *Histopathology*. 1983. V. 7. N 3. P. 421–31.
- 12 Juxtaglomerular cell tumor of the kidney: Morphological, immunohistochemical and ultrastructural studies of a new case / G. Lopez, J.A. Asenjo, J. Blanco Gonzalez, L. Ortega Medina, J. Sanz Esponera // *Path Res Pract*. 1991. V. 187. N 2–3. P. 354–9.
- 13 Juxtaglomerular cell tumor. A clinicopathologic study of four cases and review of the literature / S.A. Martin, L.A. Mynderse, D.J. Lager, J.C. Chevillat // *Am J Clin Pathol*. 2001. V. 116. N 6. P. 854–63.
- 14 Juxtaglomerular cell tumor of the kidney: A case report / K.O. Min, H.J. Kwon, S.J. Ahn et al. // *J Korean Med Sci*. 2001. V. 16. N 2. P. 233–6.
- 15 Renin-secreting tumor associated with hypertension / I.A. More, A.M. Jackson, R.N.M. MacSween // *Cancer*. 1974. V. 34. N 6. P. 2093–102.
- 16 Hypertension due to a renin-secreting renal tumor / P.W. Robertson, A. Klidijan, L.K. Harding et al. // *Am J Med*. 1967. V. 43. N 6. P. 963–76.
- 17 Nonfunctioning Juxtaglomerular Cell Tumor / R. Sakata, H. Shimoyamada, M. Yanagisawa et al. // *Case Reports in Pathology*. 2013. V. 2013. Article ID 973865, 3 p.
- 18 Immunohistochemical studies of cell differentiation in a juxtaglomerular cell tumor / F. Sanfilippo, S.V. Pizzo, B.P. Croker // *Arch Pathol Lab Med*. 1982. V. 106. N 12. P. 604–07.
- 19 Renin-secreting juxtaglomerular cell tumor causing severe hypertension: Diagnosis by computerized tomography-directed needle biopsy / A.D. Schonfeld, J.A. Jackson, S.P. Somerville et al. // *J Urol*. 1991. V. 146. N 6. P. 1607–09.
- 20 Juxtaglomerular cell tumor / T. Tanaka, A. Okumura, H. Mori // *Arch Pathol Lab Med*. 1993. V. 117. N 11. P. 1161–4.
- 21 Juxtaglomerular cell tumor of the kidney: report of two cases with a papillary pattern / B. Têtu, L. Vaillancourt, J-P. Camillier et al. // *Hum Pathol*. 1993. V. 24. N 11. P. 168–1174.
- 22 Juxtaglomerular cell tumor Têtu B. // In : *Tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon, 2004. P. 72–3.
- 23 Renin-secreting tumor. Case report / G. Valdes, J.M. Lopez, P.H. Martinez et al. // *Hypertension*. 1980. V. 2. N 5. P. 714–8.

TUMOR FROM THE JUXTAGLOMERULAR CELLS (DESCRIPTION OF OBSERVATION)

I.A. Kazantseva, V.B. Banina, T.W. Bezuglova, V.P. Tchernikov

In the publication the description of the benign tumor of kidney from the juxtaglomerular cells is given. The special feature of this tumor consists in its localization in the wall of renal pelvis and the predominance of vascular component, which simulated hemangioma. An immunohistochemical study with the wide panel of antibodies established that the tumor cells express vimentin, GMA, weakly express CD₃₄ and do not express

melanocytic and neuroendocrine markers. Expression CD₃₁ was revealed only in the endothelium of vascular structures. Electron-microscopic examination made it possible to reveal the characteristic rhomboid – shaped renin protogranules.

Key words: kidney, tumor, juxtaglomerular cells, histology, immunohistochemistry, the electron microscopy

Информация об авторах

Казанцева Ирина Александровна – докт. мед. наук, профессор, руководитель патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина д. 61/2. Телефон +7 (495) 684-4498. E-mail: leycom@mail.ru

Безуглова Татьяна Васильевна – старший научный сотрудник ЦПАЛ (консультативная группа) НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 128-8682. E-mail: bezuglovat@mail.ru

Черников Валерий Петрович – руководитель лаборатории экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120-0555. E-mail: 1200555@mail.ru

Материал поступил в редакцию 19 марта 2013 года.

РЕГЕНЕРАЦИЯ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ И СОСТОЯНИЕ ТИМУСА У СТАРЕЮЩИХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЛАЗЕРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И ПОСЛЕДУЮЩЕЙ АЛЛОПЛАСТИКИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ОТ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫСЯТ

Н.В. Булякова, В.С. Азарова

ФГБУ «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН», Москва

Исследован эффект имплантированной мышечной ткани новорожденных крысят на регенерацию мышц и состояние тимуса у стареющих крыс в возрасте 15–17 месяцев. В контроле в момент операции извлекали икроножные мышцы новорожденных крысят, измельчали и имплантировали в область травмы мышц реципиента. В опыте перед операцией задние конечности крыс облучали He-Ne лазером суммарно в дозе 7,5–9,0 Дж/см², в целом животное получило дозу 15–18 Дж/см². Показано, что в опыте лазерное облучение снижало реактивность тимуса перед операцией, способствовало большему сохранению очагов регенерирующей аллогенной мышечной ткани и повышало регенерацию мышечной ткани реципиента, однако в обеих сериях опытов процесс регенерации осложнялся. В области травмы кроме регенерирующих узких мышечных волокон формировались жировая ткань и узелки хрящевой ткани с признаками оссификации, причем в опыте очаги хрящевой ткани встречались чаще.

Ключевые слова: мышцы, тимус, аллопластика, стареющие и новорожденные крысы, He-Ne лазер

В настоящее время с целью улучшения восстановления мышечных тканей с различной патологией разрабатываются методы клеточной и тканевой терапии [28]. С помощью методов клеточной терапии в мышцы вводят экзогенные предшественники миогенеза, миобласты, выращенные в культуре. При этом наряду с положительным эффектом наблюдается гибель большого количества миобластов и отмечаются случаи онкологических заболеваний.

Эффективность метода тканевой терапии зависит от возраста как донора, так и реципиента. Положительные результаты описаны в условиях введения в область травмы миобластов в составе фрагмента аутологичной мышечной ткани, извлеченного в момент операции из другой мышцы и измельченного перед имплантацией. В мышечных фрагментах содержится меньше миобластов, но они способны к пролиферации и формированию мышечных волокон. Эффект получен на необлученных и локально облученных ионизирующей радиацией (20 Гр) скелетных мышцах у взрослых животных [13, 11], но аутотрансплантация предполагает нанесение организму дополнительной травмы, связанной с извлечением мышечной ткани для замещения дефекта. При имплантации генетически чужеродной ткани требуется длительное применение иммунодепрессантов.

Обращает на себя внимание тот факт, что лазерное излучение низкой интенсивности может оказывать как стимулирующее, так и депрессивное влияние на иммуногенность тканей и иммунитет в целом [1, 6, 10, 14, 15, 16]. Эффект зависит от дозы, режима и области облучения лазерным светом. При имплантации генетически чужеродной мышечной ткани в предварительно облученную лазером мышцу взрослой крысы реципиента [4, 5] в ее тимусе наблюдались такие же морфологические изменения, как и при подавлении трансплантационного иммунитета с помощью иммунодепрессантов [12].

Данных по аллопластике мышечной ткани в условиях предварительного лазерного облучения сравнительно мало. Представляет интерес вопрос влияния имплантатов аллогенной мышечной ткани новорожденных крысят на регенерацию поврежденных мышц стареющих животных. Процесс восстановления в травмированных мышцах с возрастом замедляется, что обусловлено снижением количества мышечных клеток-сателлитов, их способности к пролиферации, усилением апоптоза мышечных клеток и ухудшением функционального состояния интерстициального пространства, то есть микроокружения [24]. Иммунная система в процессе старения характеризуется возрастной

инволюцией тимуса, сопровождающейся снижением продукции тимусных гормонов, нарушением дифференцировки тимоцитов, усилением апоптоза и пикноза лимфоидных клеток, замещением паренхимы органов иммунной системы соединительной и жировой тканью, снижением иммунитета в целом [7]. В мышечной ткани новорожденных содержится в среднем 30% клеток-сателлитов, миобластов, находящихся в стадии активной пролиферации. Кроме того, ткани новорожденных крысят обладают низкой иммуногенностью.

Целью данного исследования было изучение регенерации скелетных мышц у стареющих крыс при имплантации мышечной ткани новорожденных крысят, извлеченной в момент операции и имплантированной в предварительно облученные лазером мышцы крыс-реципиентов, а также определение реакции тимуса как центрального органа иммунной системы.

Материалы и методы

Исследования проведены на 30 беспородных крысах-самцах в возрасте 15–17 месяцев, содержащихся в стандартных условиях вивария. В 1-й серии (контроль) у животных под нембуталовым наркозом в асептических условиях вскрывали кожу, кроющую мышцу, и полностью перерезали обе икроножные мышцы, сохраняя неповрежденными нервно-сосудистый пучок, лежащий на поверхности мышцы, и подлежащий малоберцовый нерв. Затем у новорожденных крысят извлекали икроножные мышцы, измельчали ножницами в стерильных чашках Петри и имплантировали в область поперечной перерезки мышцы реципиента. В каждую мышцу подсаживали измельченную мышечную ткань из 6–8 икроножных мышц новорожденных. Возраст новорожденных крысят составлял 1,5–3 суток. После аллопластики области мышечной травмы кроющую мышцу и кожу зашивали хирургическим шелком. Во 2-й серии (опыт) перед аллопластикой обе задние конечности крыс в области проекции икроножных мышц подвергались предварительному курсовому воздействию лазерных лучей. Эксперимент выполнен с соблюдением правил проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Условия воздействия He-Ne лазера (установка ОКГ-12, Россия): длина волны 632,8 нм, лазерный луч был расфокусирован с помощью линзы, диаметр поля облучения 2–2,5 см, плотность мощности составляла 2,5–3 мВт/см². Облучение проводили в режиме 10 экспозиций по 5 минут в течение 14 суток ежедневно, за исключением выходных, суммарно в дозе 7,5–9,0 Дж/см² на каждую конечность, а в целом животное получило дозу лазерного излучения 15–18 Дж/см².

Регенераты икроножных мышц и тимусы исследовали через 7, 14 и 30 суток после аллопластики. Мышцы и тимусы фиксировали в смеси Карнуа, срезы толщиной 7–8 мкм окрашивали железным гематоксилином по Рего с докраской по Маллори. Животных выводили из опыта инъекцией больших доз нембутала. О качествен-

ных показателях восстановительного процесса в икроножной мышце судили по изменению относительной массы регенератов (% к массе тела), гистологической структуре восстанавливающихся мышц и объему мышечной ткани, сохранившейся в 30-суточных регенератах. На 6 гистологических срезах, проходящих на разных уровнях, подсчитывали площадь, занимаемую мышечной и соединительной тканью, и выражали ее в процентах ко всей площади среза. О функциональном состоянии тимуса судили по данным гистологического, цитологического и морфометрического анализа органа. Измеряли также относительную массу тимуса (% к массе тела животного). Величину коркового и мозгового слоя в тимусе определяли в сохранившихся долях и измеряли методом полей с помощью тестовой окулярной сетки при увеличении $\times 50$. Количество точек, приходящихся на корковое и мозговое вещество, выражали в процентном отношении к общему количеству точек, подсчитанных на гистологическом срезе тимуса. Кроме того, в корковом веществе определяли митотический индекс клеток тимуса (в %) и число лимфоцитов с карриопикнозом (в %). На 6 гистологических срезах выбирали произвольно по 2–4 поля. Было просчитано до 4000–5000 клеток. Изучали также тимусы у интактных крыс и у крыс после 10 сеансов лазерного воздействия, то есть непосредственно перед операцией. На каждый срок исследовали по 3–5 животных. Количественные данные обрабатывали статистически, и различия средних величин оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты исследований

Мышцы. У крыс контрольной группы на 7-е сутки после операции в области травмы видны фрагменты аллогенной мышечной ткани (рис. 1 А). Отмечается лимфоидная инфильтрация. Мышечные культы укорачиваются примерно в 2 раза, расширяются септы, увеличивается интерстициальное пространство между отдельными группами мышечных волокон, многие мышечные волокна вовлекаются в деструктивный процесс, развивается сильный отек тканей. На концах перерезанных мышечных волокон образуются вакуоли (рис. 1 Б). Отсутствуют признаки регенерации мышечной ткани реципиента. В дистальной культе отмечается замещение значительных участков мышечной ткани реципиента соединительной тканью. В некоторых регенератах выявляются очаги эктопического образования узелков хрящевой ткани. Через 14 суток в области аллопластики отмечается повышенная лейкоцитарная инфильтрация. В аллопланте формируются узкие мышечные волокна (рис. 1 В). Между ними разрастается жировая ткань. Встречаются аллогенные мышечные волокна в ишемическом состоянии. Регенерационная активность мышечной ткани реципиента незначительная. В дистальной культе повышенный объем соединительной ткани сохраняется. Видны узелки хрящевой ткани. Через 30 суток в области аллопластики преобладает плотная соединительная и жировая ткань.

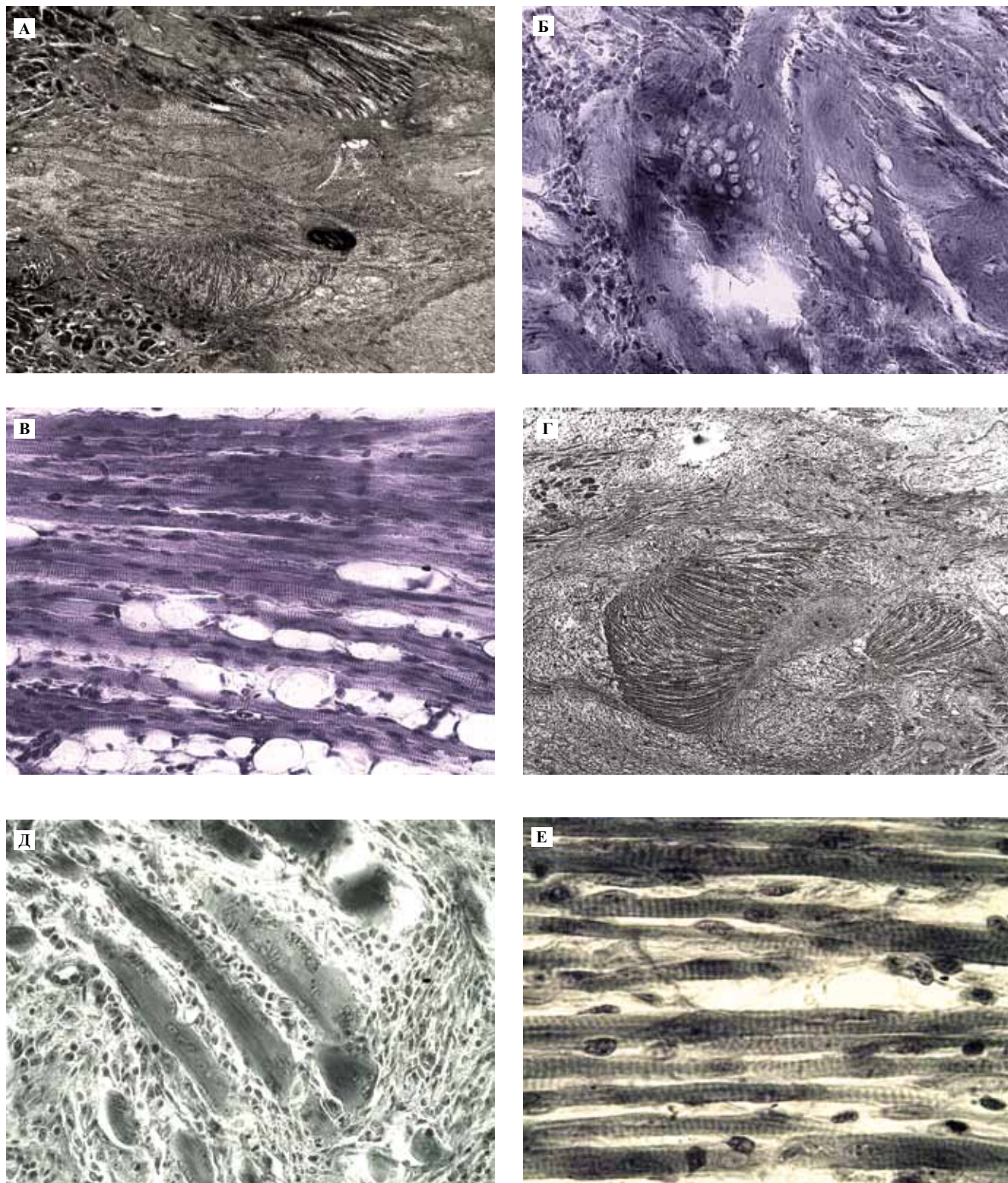


Рис. 1. Регенерация мышцы стареющих крыс после лазерного облучения и аллопластики области травмы мышечной тканью новорожденных крысят.

Контроль: А – фрагмент аллогенной мышечной ткани (тонкая стрелка), гематома (толстая стрелка) на 7-е сутки, $\times 40$;

Б – вакуоли в мышечных волокнах по краю проксимальной культы, отсутствие регенерации на 7-е сутки, $\times 100$;

В – область травмы, жировая ткань среди аллогенных мышечных волокон на 14-е сутки, $\times 400$.

Опыт: Г – большее количество фрагментов аллогенной мышечной ткани (тонкие стрелки) на 7-е сутки, $\times 40$;

Д – регенерирующая мышечная ткань по краю проксимальной культы на 7-е сутки, $\times 100$;

Е – область травмы, аллогенные мышечные волокна на 14-е сутки, $\times 400$. Окраска гематоксилином по Рего + Маллори

Отмечаются также узелки хрящевой ткани (от 1 до 3 в регенерате). В центре области травмы лежат узкие аллогенные мышечные волокна, ориентированные в разных направлениях.

В опыте через 7 суток в области травмы сохраняется большее количество участков жизнеспособной аллогенной мышечной ткани (рис. 1 Г). Проникают клетки лимфоидной ткани. Обе мышечные культы сравнительно большие. Количество темноокрашенных погибающих мышечных волокон в них меньше, чем в контроле. В проксимальной культе мышечные волокна располагаются плотно. На концах травмированных мышечных волокон скапливаются мышечные ядра, растут миотубы (рис. 1 Д). В дистальной культе небольшие участки соединительной ткани. В большинстве регенератов встречаются мелкие узелки хрящевой ткани, а также нити фибрина и очаги геморрагий. Через 14 суток много аллогенных фрагментов, особенно около обеих культей, в которых узкие мышечные волокна расположены параллельно друг другу (рис. 1 Е). Образующиеся по краю культей миотубы не врастают глубоко в дефект. Остальное пространство заполняется участками жировой ткани. Наблюдается лимфоидная инфильтрация. Образуются узелки хрящевой ткани (до 5–6 случаев в одном регенерате), иногда с перерождением в костную ткань. Через 30 суток в области травмы среди участков жировой ткани и тяжелой плотных гомогенных коллагеновых волокон отмечается небольшое количество мышечной ткани, состоящей из узких продольно ориентированных аллогенных мышечных волокон с повышенной лейкоцитарной инфильтрацией между ними, а также мышечные волокна, отрастающие от культей. Видны узелки хрящевой ткани.

Динамика формирования очагов хрящевой и жировой ткани в области мышечной травмы представлена на рисунке 2. Показано, что в контроле в большем проценте регенератов происходит формирование жировой ткани, в опыте – узелков хрящевой ткани. Изменение массы и морфологической структуры регенератов отражено на рисунке 3. После аллопластики масса регенератов у крыс контрольной и опытной группы постепенно снижалась ($p < 0,01$) по сравнению с массой мышц до операции. Достоверно более высокая масса 7-суточных регенератов в контроле ($0,48 \pm 0,02\%$) по сравнению с опытом ($0,41 \pm 0,01\%$) объясняется развивающимся сильным экссудативным отеком тканей, что подтверждается на гистологических препаратах. У подопытных крыс предварительное курсовое воздействие лазерного излучения улучшало состояние мышечной ткани в регенератах. В начальные сроки восстановления (в течение 14 суток после аллопластики) масса регенератов была сравнительно стабильной и к концу наблюдения объем мышечной ткани в опыте имел тенденцию к увеличению ($66 \pm 2\%$ и $57 \pm 3\%$, $p < 0,1$).

Тимус. Процесс восстановления травмированных мышц у стареющих крыс в условиях аллопластики дефекта влияет на реактивность тимуса, его гисто-

логическую структуру. В контроле у крыс до начала эксперимента тимус был крупный, состоял из двух долей, содержащих множество долек с узким или сравнительно широким корковым слоем (рис. 4 А). Изредка встречалась инволюция слоев. Лимфоидные клетки в корковом слое располагались довольно плотно.

Через 7 суток после аллопластики обе тимусные доли вовлекались в деструктивный процесс: разрастание септ, уменьшение и нарушение структуры долек, инволюция слоев, аплазия тимуса, появление жировой ткани целиком в одной из долей или частично в обеих долях (рис. 4 Б). При этом достоверно снижалась митотическая активность лимфоцитов ($6,65 \pm 0,34\%$ до операции и $3,87 \pm 0,53\%$ в контроле, $p < 0,01$) (табл.). Из-

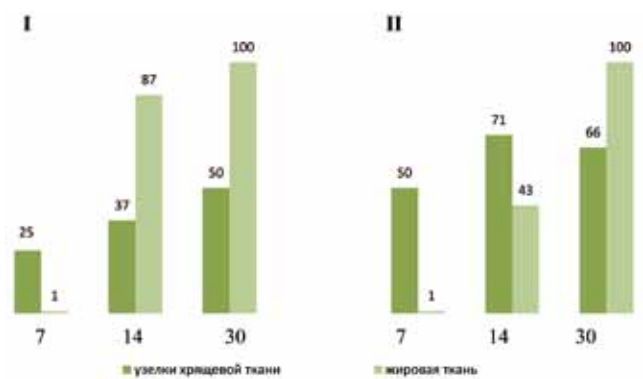


Рис. 2. Динамика формирования узелков хрящевой и жировой ткани через 7, 14 и 30 суток после аллопластики в контроле (I) и опыте (II), % от общего числа регенератов на данный срок восстановления

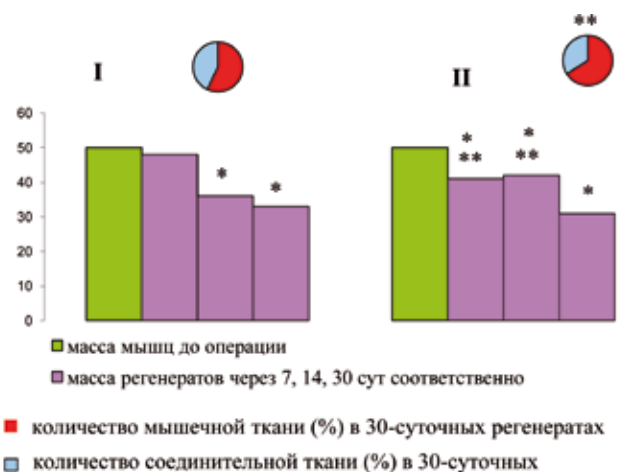


Рис. 3. Масса мышечных регенератов (столбики, % к массе тела, $\times 10^{-2}$) и объем мышечной и соединительной ткани в регенератах (кружочки, % к площади среза) в контроле (I) и опыте (II)

Примечания.

- * достоверные различия между массой регенератов и массой мышц до операции в соответствующих сериях ($p < 0,01$);
- ** достоверные различия между опытом и контролем ($p < 0,01$; $p < 0,05$)

менения остальных показателей функционального состояния тимуса не были значимы. Через 14 суток масса тимуса и митотический индекс тимоцитов в корковом слое повышаются на фоне достоверного снижения процента лимфоидных клеток с пикнотическими изменениями в ядрах. Гистологическая структура тимуса практически не изменялась по сравнению с предыдущим сроком. К концу наблюдения (30 суток) тимус еще окончательно не восстановлен. Встречаются дольки как с нормальной структурой и достоверным увеличением ширины коркового слоя, так и с инволюцией слоев. Высокий уровень пикноза в ядрах тимоцитов компенсируется повышенной пролиферативной активностью лимфоидных клеток.

В опыте после воздействия лазера на мышцы масса тимуса у крыс перед операцией снижалась на 40% (табл.). Наблюдались уменьшение и нарушение

коркового слоя в дольках, скопления лимфоидных клеток в виде глыбок, инволюция слоев, аплазия органа, увеличение соединительной ткани в структуре тимуса, замещение лимфоидной ткани жировой или по всему тимусу, или частично, только в одной из долей (рис. 4 В). Через 7 и 14 суток после аллопластики мышечного дефекта на фоне увеличения соединительнотканых элементов в структуре тимуса отмечались мелкие дольки с рыхлым расположением лимфоидных клеток в корковом слое, а также крупные кровеносные сосуды, находящиеся в состоянии дилатации или гиперемии (рис. 4 Г). Как показывают количественные данные, изменения массы тимуса, ширины коркового слоя в сохранившихся дольках, митотического индекса тимоцитов и числа лимфоцитов с пикнозом ядер в ответ на имплантацию генетически чужеродной ткани происходили плавно по сравнению с контролем.

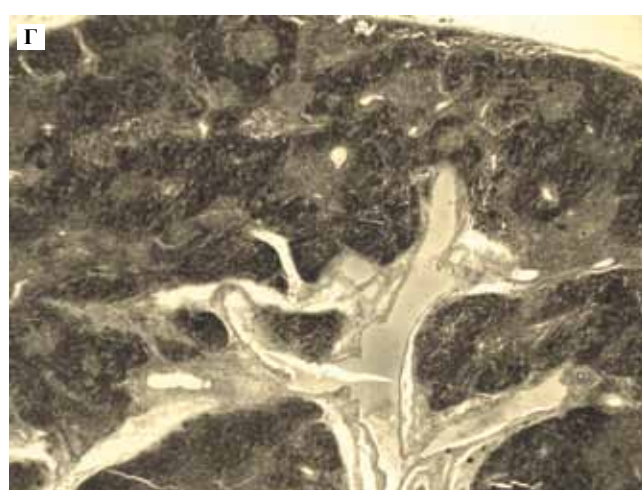
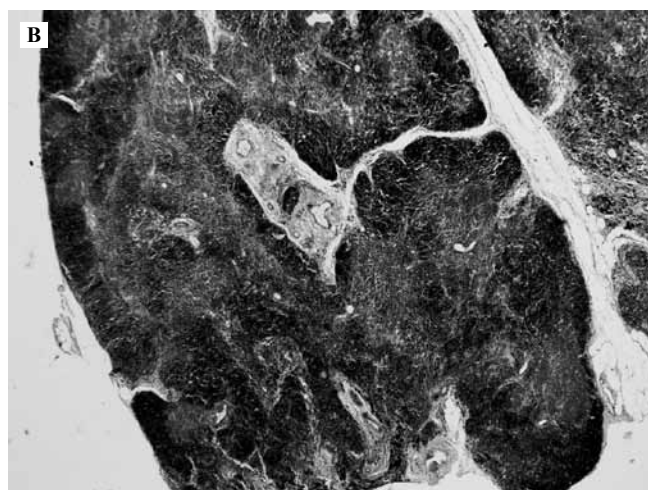
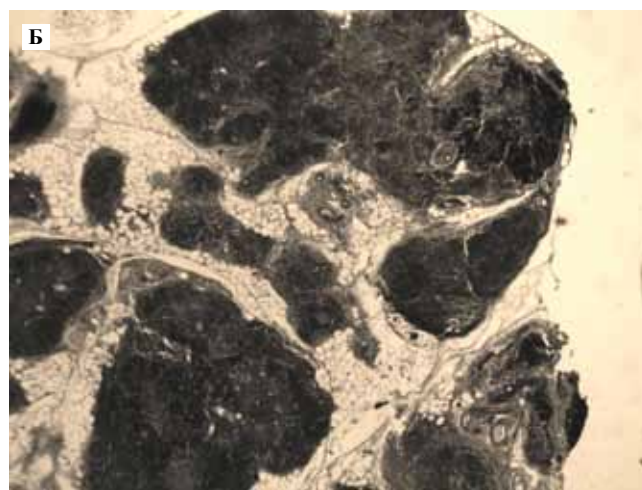
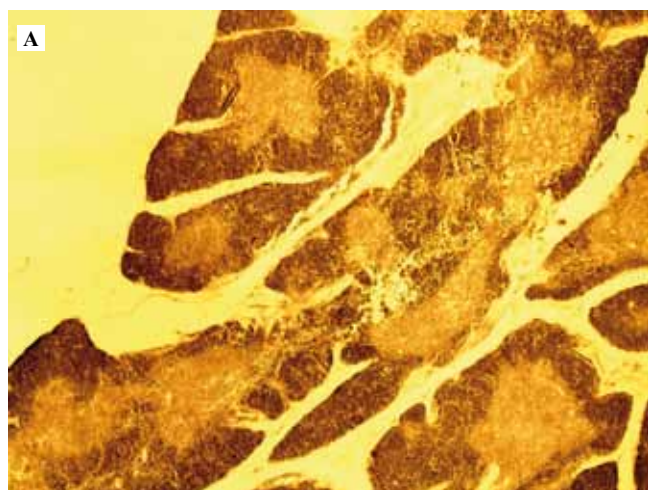


Рис. 4. Структурные изменения в тимусе.

Контроль: А – интактные крысы до операции, × 40;

В – уменьшение и нарушение структуры долек, появление жировой ткани в септах на 7-е сутки после аллопластики, × 100

Опыт: В – через 10 сеансов лазерного облучения перед операцией, уменьшение и разрушение коркового слоя, инволюция слоев, × 100;

Г – сравнительно мелкие дольки, гиперемия кровеносных сосудов, × 100

Таблица

Динамика изменения функционального состояния тимуса у стареющих крыс в условиях лазерного воздействия и регенерации мышц при аллопластике

Показатель	Интактные крысы до операции	Крысы, облученные лазером до операции	Срок регенерации, сут					
			контроль			опыт		
			7	14	30	7	14	30
Масса тимуса, % от массы тела	0,025±0,005	0,015±0,003 ***P<0,1	0,022±0,003	0,037±0,005 **P<0,01	0,027±0,006	0,020±0,006	0,025±0,009	0,027±0,003 *P<0,01
Величина коркового слоя по отношению к площади среза, S _{уд} (Усл. ед.)	60,0±0,8	56,0±3,8	57,0±2,1	56,0±5,0	66,0±1,8 **P<0,02	63,0±7,0	63,0±2,0	68,0±3,8
Величина мозгового слоя по отношению к площади среза, S _{уд} (Усл. ед.)	40,0±0,8	44,0±3,8	43,0±2,1	44,0±5,0	34,0±1,8 **P<0,02	37,0±7,0	37,0±2,0	32,0±3,8
Митотический индекс тимоцитов в корковом слое, %	6,65±0,34	6,93±0,50	3,87±0,53 *P<0,01	5,99±0,75 **P<0,02	10,31±2,00 **P<0,01	5,97±0,72	7,53±0,88	9,47±0,74 *P<0,01 **P<0,01
Пикноз тимоцитов в корковом слое, %	1,03±0,04	0,88±0,10	1,05±0,07	0,31±0,08 **P<0,01	1,23±0,19	0,84±0,07	1,08±0,11	1,13±0,12

Примечания. * достоверные различия по сравнению с соответствующими показателями до операции;

** достоверные различия по сравнению с 7-суточным сроком регенерации в пределах одной серии;

*** достоверные различия между интактными крысами и крысами, облученными лазером до операции

На 30-е сутки во многих дольках отмечалась инволюция коркового и мозгового вещества. Небольшое количество долек замещалось жировой тканью, однако восстановительные процессы, происходящие в тимусе у облученных крыс, способствовали тому, что к концу наблюдения (30 суток) масса тимуса и митотический индекс тимоцитов были достоверно выше, чем у облученных лазером животных перед аллопластикой.

Обсуждение

Полученные результаты показали, что аллопланты, приготовленные из икроножных мышц новорожденных крысят в момент операции, осложняли восстановительный процесс в икроножных мышцах стареющих крыс как в контроле, так и в опыте.

С одной стороны, восстановление травмированных мышц в условиях аллопластики происходило на фоне сниженной реактивности иммунной системы реципиента. В контроле это было обусловлено возрастными изменениями, а в опыте еще и предварительным воздействием лазерных лучей в сравнительно высокой дозе (в целом на животное 15–18 Дж/см²). Данные гистологического, цитологического и морфометрического анализа тимуса показали, что излучение He-Ne лазера снижало функцию тимуса перед операцией, а после операции его реакцию на имплантацию генетически чужеродной мышечной ткани, на что указывает более плавное изменение изученных показателей функционального состояния тимуса по сравнению с контролем. Кроме того, мышечные имплантаты не отторгались, а напротив, после операции в области травмы сохранялось больше аллогенных мышечных фрагментов, способных к регенерации. Формировались узкие аллогенные мышечные волокна с повышенной лимфоидной инфильтрацией в интерстициальном пространстве. Не исключено, что формирующиеся в аллогенном имплантате мышечные клетки новорожденных крысят включаются в регенерирующую мышечную ткань реципиента. В литературе имеются сообщения о том, что при имплантации мышечной ткани новорожденных и применении иммунодепрессантов могут формироваться гибридные мышечные волокна, увеличиваться пул функционирующих клеток-сателлитов, повышаться активность миосателлитов у стареющих животных [25, 27, 29]. Полученные нами данные о депрессивном влиянии лазерного излучения в изученной дозе на состояние тимуса согласуются с наблюдениями других авторов [6, 14, 15, 16].

Лазерное облучение улучшало состояние мышечной ткани реципиента. Уменьшались и замедлялись деструктивные процессы в травмированных мышечных волокнах, снижался экссудативный отек тканей (сравнение массы 7-суточных регенератов в контроле и опыте), активнее регенерировала мышечная ткань от концов перерезанных мышечных волокон. В предварительно облученных He-Ne лазером 30-суточных регенератах мышечной ткани было на 16% больше,

чем у животных контрольной группы, что согласуется с данными о стимулирующем эффекте лазерного излучения на регенерирующие ткани [22].

При этом, несмотря на указанные выше положительные моменты, результаты восстановления икроножных мышц у стареющих крыс в условиях лазерного облучения мышц и последующей аллопластики были неудовлетворительными. Область травмы, как и в контроле, частично замещалась жировой тканью. Более того, чаще встречались узелки хрящевой ткани с признаками оссификации. В условиях лазеротерапии уже поврежденных мышц без аллопластики мышечной ткани новорожденных крысят подобный эффект не наблюдался [3].

Известно, что икроножные мышцы новорожденных крысят к моменту рождения животных сформированы неокончательно. В этом периоде онтогенеза мышцы на 50% состоят из функционально незрелой соединительной ткани. Недавно в мышцах новорожденных животных была обнаружена субпопуляция сателлитных клеток, обладающая свойствами стволовых клеток и способная дифференцироваться в клетки мышечной, жировой, хрящевой и костной ткани [23]. Установлено, что на ранних этапах онтогенеза, а также в грануляционной ткани, формирующейся в ходе раневого процесса, плюрипотентные стволовые клетки характеризуются высоким дифференцировочным потенциалом [17, 18, 21]. Эктопическое образование узелков хрящевой ткани с элементами оссификации было отмечено нами ранее при регенерации икроножных мышц у новорожденных крысят после измельчения и аутотрансплантации *in situ* [2] и при имплантации в область мышечной травмы измельченной мышечной ткани от новорожденных крысят взрослым крысам [5]. При пересадке скелетных мышц от молодых крыс в ложе удаленной одноименной мышцы старых крыс [19], а также имплантации мышечной ткани от взрослого донора в область травмы мышцы взрослой крысы [4] подобный эффект не наблюдался.

Более частые случаи образования узелков хрящевой ткани с признаками оссификации при имплантации мышечной ткани новорожденных крысят в предварительно облученные лазером мышцы, возможно, обусловлены тем, что лазерное излучение стимулирует обмен кальция, увеличивает его аккумуляцию в цитозоле клетки и проницаемость клеточных и внутриклеточных мембран для ионов кальция [8, 20, 26]. После травмы облученной лазером мышечной ткани барьерная функция мембранных структур в клетках и распределение ионов кальция между клеткой и окружающей средой нарушаются. Концентрация ионов кальция является высокоэффективным сигналом для запуска процессов пролиферации и дифференцировки стволовых клеток [9]. Для выяснения роли кальция в оссификации мышечного регенерата требуется проведение специального исследования.

Выводы

При имплантации мышечной ткани новорожденных крысят, выделенной в момент операции, регенерация скелетных мышц у стареющих крыс в контроле и опыте осложнялась. В области травмы кроме регенерирующих мышечных волокон формировались жировая ткань и узелки хрящевой ткани с признаками оксификации. При этом воздействие лазера до операции снижало реактивность тимуса, стимулировало регенерацию мышечной ткани реципиента, способствовало большому сохранению аллогенной мышечной ткани, но учащались случаи эктопического образования узелков хрящевой ткани.

Литература

1. Бугаева И.О. Влияние низкоинтенсивного инфракрасного лазерного излучения на органы иммуногенеза: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук / И.О. Бугаева. Саратов, 2006. 85 с.
2. Булякова Н.В. Роль тканевых регуляций в процессе регенерации скелетной мышцы животных разного возраста / Н.В. Булякова // ДАН СССР. 1987. Т. 296. № 3. С. 763–765.
3. Булякова Н.В. Структурные особенности мышечных регенератов и состояние тимуса при лазеротерапии поврежденных мышц в различные периоды их восстановления / Н.В. Булякова, В.С. Азарова // Известия РАН. Серия биологическая. 2006. № 6. С. 667–679.
4. Булякова Н.В. Морфофункциональные особенности тимуса и мышечных регенератов при воздействии лазерного излучения и аллопластике мышечной ткани взрослого животного в область мышечной травмы / Н.В. Булякова, В.С. Азарова // Известия РАН. Серия биологическая. 2009. № 1. С. 18–26.
5. Булякова Н.В. Регенерация мышц и состояние тимуса взрослых крыс при воздействии лазера и имплантации икроножных мышц и диафрагмы новорожденных крысят / Н.В. Булякова, В.С. Азарова // Известия РАН. Серия биологическая. 2010. № 5. С. 535–546.
6. Зубкова С.М. Влияние лазерного излучения на физико-химические показатели тимуса и кожи крыс при развитии контактного дерматита / С.М. Зубкова, Е.Л. Харитонов // Физические факторы в профилактике, лечении и медицинской реабилитации. М.: Медицина, 1987. С. 25–27.
7. Иммунология и старение: пер. с англ. / Под ред. Т. Макинодан, Е. Юнис. М.: Мир, 1980. 280 с.
8. Кару Т.И. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии / Т.И. Кару // Лазерная медицина. 2001. Т. 5. Вып. 1. С. 7–15.
9. Осипенко М.А. Роль ионов Ca^{2+} в процессах пролиферации и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток и ранних зародышей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / М.А. Осипенко. Пущино, 2008. 109 с.
10. Патент 2209085 «Способ повышения антигенности и иммуногенности биоматериала» (заявка: 2001117399/14 от 20.06.2001) / Г.А. Баранов и др. 2003.
11. Попова М.Ф. Радиочувствительность и стимулирующие свойства регенерирующих тканей млекопитающих / Под ред. Б.М. Граевской / М.Ф. Попова. М.: Наука, 1984. 174 с.
12. Пучков В.Ф. Реакция тимуса крысы на ксенотрансплантацию и иммуносупрессию / В.Ф. Пучков, Е.Б. Смирнов, В.А. Отеллин // Морфология. 1998. Т. 114. № 4. С. 59–64.
13. Студитский А.Н. Восстановление мышц у выших млекопитающих / Под ред. М.С. Мицкевича / А.Н. Студитский, З.П. Игнатьева. М.: Изд-во АН СССР, 1961. 191 с.
14. Улащик В.С. Иммуномодулирующее действие лечебных физических факторов / В.С. Улащик // Медицинские новости. 2006. № 11. С. 8–13.
15. Харин Г.М. Изменения цитоархитектоники лимфоидных органов при воздействии на организм лазерного излучения / Г.М. Харин // Применение лазеров в хирургии и медицине. Ч. 1. М., 1989. С. 567–569.
16. Эффекты облучения разных участков кожи мышей-опухоленосителей низкоинтенсивным лазерным светом / О.В. Глушкова и др. // Биофизика. 2006. Т. 51. № 1. С. 123–135.
17. A population of cells resident within embryonic and newborn rat skeletal muscle is capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes / P.A. Lucas et al. // Wound Repair. Regenerat. 1995. V. 3. P. 449–59.
18. Bioactive factors affect proliferation and phenotypic expression in progenitor and pluripotent stem cells / H.E. Young et al. // Wound Repair. Regenerat. 1998. V. 6. P. 65–75.
19. Carlson B.M. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery / B.M. Carlson, J.A. Faulkner // Am. J. Physiol. 1989. V. 256. P. 1262–66.
20. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (He-Ne laser) / H. Breitbart et al. // J Photochem Photobiol B. 1996. V. 34. N 2–3. P. 117–21.
21. Differentiation factors induce expression of muscle, fat, cartilage, and bone in a clone of mouse pluripotent mesenchymal stem cells / J.J. Rogers et al. // Am. Surg. 1995. V. 61. P. 231–6.
22. Gao X. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation / X. Gao, D. Xing // J. Biomed Sci. 2009. V. 16. N 1. P. 4–20.
23. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration / Z. Qu-Petersen et al. // J. Cell Biol. 2002. V. 157. P. 851–64.
24. Impact of aging on muscle cell regeneration / S. Carosio et al. // Aging Research Reviews. 2011. V. 10. N 1. P. 35–42.
25. Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse / D.J. Watt et al. // J. Neurol. Sci. 1982. V. 57. P. 319–31.
26. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells / R. Lavi et al. // J Biol Chem. 2003. V. 278. P. 40917–22.
27. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment / I.M. Conboy et al. // Nature. 2005. V. 433(7027). P. 760–764.
28. Skuk D. Implantation of myogenic cells in skeletal muscles / D. Skuk, J.P. Tremblay // Stem cell anthology / ed. B.M. Carlson. Amsterdam: Elsevier, 2010. XXI. 402 p. Ch. 26. P. 307–15.
29. Transplanted primary neonatal myoblasts can give rise to functional satellite cells as identified using the Myf5^{nlacZ+} mouse / L. Heslop et al. // Gene therapy. 2001. V. 8. N 10. P. 778–83.

REGENERATION OF SKELETAL MUSCLES AND STATE OF THYMUS IN AGING RATS UNDER LASER IRRADIATION AND NEWBORN MUSCLE TISSUE ALLOPLASTY

N.V. Bulyakova, V.S. Azarova

The effect of newborn rat muscle alloplant on muscle regeneration and the state of thymus in rats aged 15–17 months were investigated. In the control group, the gastrocnemius muscles of newborn rats were removed during the operation, minced and implanted into the area of recipient muscle injury. In the experiment, hind legs of rats were irradiated with He-Ne laser before surgery in a total dose of 7.5–9.0 J/cm², the whole animal has received a dose of 15–18 J/cm². It was shown that the preliminary laser radiation reduced the reactivity of the thymus. In the field of trauma, the more quantity of fragments of allogeneic regenerating muscle tissue were preserved. The activity of recipient muscle tissue increased. However in both series, the regenerative process was complicated. In area of trauma, besides narrow muscle fibers a fatty tissue and nodules of cartilage with signs of ossification were formed. Moreover, in radiated muscles, the nodules of cartilage tissue were noted more often.

Key words: muscle, thymus, alloplastica, aging and newborn rats, He-Ne laser

Информация об авторах

Булякова Нелли Васильевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологических адаптаций позвоночных Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

E mail: bulyakova38@mail.ru

Азарова Валентина Сергеевна – научный сотрудник лаборатории морфологических адаптаций позвоночных Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

E mail: vazarova@mail.ru

Материал поступил в редакцию 18 марта 2013 года.

© Коллектив авторов, 2013

УДК: 616.31-006.6:612.014.4-092.4

ВОЗМОЖНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИСПЛАТИНА В КЛЕТКАХ ОПУХОЛИ ПО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ АНС И ДСМ

*О.В. Тарнопольская, И.А. Горошинская, А.И. Шихлярова,
П.С. Качесова, Ю.Н. Крохмаль*

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Исследовали интенсивность флуоресценции витального красителя ДСМ (4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний), связанного с клетками разных типов опухоли, лейкоцитами из опухоли и лейкоцитами периферической крови крыс-опухоленосителей, а также интенсивность флуоресценции зонда АНС. После инкубации клеточной взвеси с цисплатином в концентрации 0,1 мкг/мл в течение 20–60 минут яркость флуоресценции зонда-аниона АНС была снижена в среднем в 1,8 раза. Вместе с тем средняя яркость флуоресценции зонда-катиона ДСМ этих клеток вместо ожидаемого увеличения также снизилась в среднем почти в 4 раза. Представленные данные свидетельствуют о том, что снижение яркости флуоресценции ДСМ может быть критерием наличия в клетках цисплатина.

Ключевые слова: плоскоклеточный рак полости рта, лимфосаркома Плисса, флуоресцентный зонд ДСМ, цисплатин

Оценка наличия химиопрепаратов в клетках опухоли желательна не только в экспериментальной онкологии, но и в ряде клинических научных изысканий, поскольку дает возможность контролировать процесс химиотерапии на этапах лечения. Это особенно важно для биопсийного материала, где зачастую объем биоптата очень мал. Существование проблемы химиорезистентности опухолей и неэффективности химиотерапии обуславливает необходимость новых способов определения наличия химиопрепарата в клетках опухоли. Цисплатин является известным цитостатиком, широко применяющимся в терапии опухолей. Существуют различные способы определения концентрации цисплатина в тканях опухоли, описанные, например, в работе Н.А. Колпаковой [1].

Флуоресцентные зонды АНС и ДСМ известны давно и используются как потенциалозависимые для изучения, в частности, различных опухолевых клеток [2, 4, 5]. Яркость свечения катиона ДСМ в клетках прямо пропорциональна мембранному потенциалу клеток, а аниона АНС – обратно пропорциональна. В окраске ДСМ опухолевые клетки полихроматичны, имеют оранжевое или желто-бурое ядро, более яркие желто-оранжевые ядрышки, зеленую цитоплазму, а митохондрии – желтые зерна в цитоплазме [5]. Способность ДСМ прокрашивать ядрышки в ядрах клеток дает ему преимущество среди других витальных красителей, используемых для изучения опухолевых клеток, поскольку наличие нескольких ядрышек в ядрах клеток является одним из важных признаков

злокачественности клетки [3]. В книге А.Н. Мельника [3] представлены флуоресцентные изображения клеток плоскоклеточного рака, окрашенных акридиновым оранжевым – красителем, который хорошо прокрашивает ядрышки и ядра, а его флуоресценция имеет те же волновые характеристики, что и ДСМ. В отличие от акридинового оранжевого, интенсивность свечения ДСМ не зависит от pH, пропорциональна мембранному потенциалу клетки, краситель хорошо проникает в ядро и цитоплазму клетки, выделяя важные органеллы. Структурные формулы АНС и ДСМ даны в работах Г.К. Максимова [2] и О.В. Тарнопольской [5]. Клетки аденокарциномы предстательной железы очень интенсивно накапливают ДСМ в ядре, и оно обычно выглядит ярко-оранжевым, составляя до 70% от всей яркости клетки. В работе Г.К. Максимова [2] отмечена неоднородность по яркости клеток аденокарциномы предстательной железы, окрашенных АНС и ДСМ, которую желательно объяснить.

Цель исследования

Ставилась цель определить изменения интенсивности флуоресценции АНС (1-анилино-нафталин-8-сульфонат) и ДСМ (4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний), связанных с клетками плоскоклеточного рака полости рта человека (ПРПРЧ), с лейкоцитами этой опухоли, а также с клетками лимфосаркомы Плисса и саркомы 45 крыс, лимфоцитами периферической крови крыс, в отсутствие и присутствии в клеточной взвеси химиопрепарата цисплатина.

Материалы и методы

Работа выполнена в 10 опытах (по 4 пробы в каждом) на клетках различного типа, перечисленных ранее. Лейкоциты периферической крови крыс были выделены на градиенте плотности. Клеточную взвесь, витально окрашенную флуорохромами АНС и ДСМ, исследовали под люминесцентным микроскопом Axio Imager.M2, Zeiss. Флуоресцентный зонд-катион ДСМ использовали в конечной концентрации 20 мкМ, АНС – 40 мкМ, а конечная концентрация цисплатина в клеточной взвеси составила 0,1 мкг/мл. Время инкубации клеточной взвеси с цисплатином составляло от 20 до 60 минут при 25°C.

Из биоптата ПРПРЧ (гистологически подтвержденного, степень распространенности: T2N0M0), не более 30 минут после удаления, размером 3×4 мм, получали клеточную взвесь путем измельчения скальпелем на стекле в 200 мкл забуференного физраствора. Полученную взвесь клеток делили на две части, одну из которых инкубировали с цисплатином. Микросъемку проводили цветной цифровой камерой AxioCam HRC, а измерения – с помощью программного обеспечения AxioVision, rel.4.8. Использовали модуль захвата изображения MosaiX, выбирали 6 колонок и 6 рядов, получая 36 кадров цифровых изображений. Так повторяли 3–4 раза на разных участках одного препарата. Измерения проводили интерактивно, измеряя в среднем от 100 до 400 клеток опухоли в каждой пробе и все попавшие при этом в поля зрения лейкоциты, в том числе лимфоциты. Клетки опухоли измеряли одним инструментом – Outline, а лейкоциты другим – Circle Out-In. Флуорохром ДСМ был синтезирован в НИИ физической и органической химии при ЮФУ, а АНС поставлен фирмой Serva. Длина волны возбуждения ДСМ

составляла 480 нм, АНС – 375 нм, а волны эмиссии – 520 и 450 нм, соответственно. При микросъемке соблюдали одинаковое разрешение и экспозицию. Данные измерений сохраняли в приложении AxioVision, rel.4.8 в файле, совместимом с Excel (Microsoft Office-2003), которые затем сводили в общие электронные таблицы и обрабатывали в Excel, сортируя массив данных по инструменту измерения, что позволяло отдельно оценить клетки опухоли, лейкоциты и фон. Яркость клеток суммировали по трем цветовым каналам (RGB). Рассчитывали статистические параметрические показатели: среднее, стандартное отклонение, использовали t-test Стьюдента и непараметрический критерий Вилкоксона для оценки уровня значимости различий.

Результаты

Полученные данные представлены в таблице, в которой цифры, приведенные в двух крайних правых столбцах, показывают, во сколько раз снижена средняя яркость АНС и ДСМ в клетках по сравнению с клетками без цисплатина во всех 10 опытах. При сравнении средней яркости ДСМ, связанного с клетками, в суспензии без цисплатина и в суспензии с цисплатином было выявлено статистически значимое: $p=0,0058$ (t-test) и $p=0,0051$ (критерий Вилкоксона) снижение средней яркости флуоресценции ДСМ в клеточной взвеси с цисплатином в среднем в $3,8 \pm 3,0$ (среднее по 10 опытам, крайний правый столбец таблицы). Это снижение оказалось более выраженным в лимфоцитах периферической крови крыс опытной группы с лимфосаркомой Плисса – в среднем в 7 раз, в то время как в других клетках опухоли и лейкоцитах наблюдалось в среднем 2–4-кратное уменьшение яркости. На рисунке 1 (А, Б, В, Г) и рисунке 2 (А, Б,

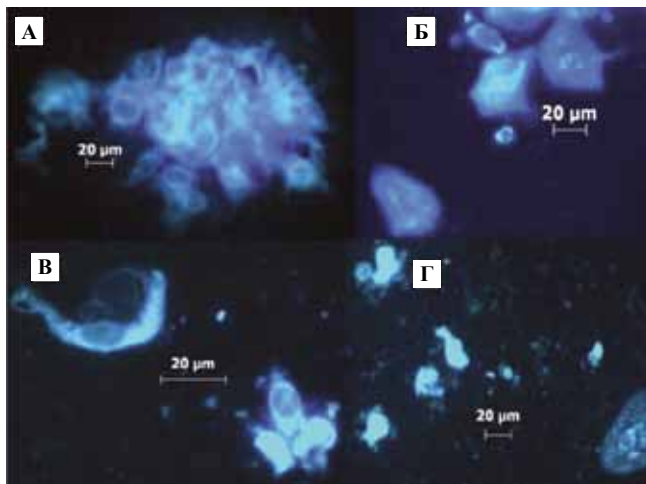


Рис. 1 (А, Б, В, Г). 4 поля зрения препарата клеточной взвеси плоскоклеточного рака полости рта человека, окраска АНС. Ядра клеток не прокрашиваются, выглядят более темными

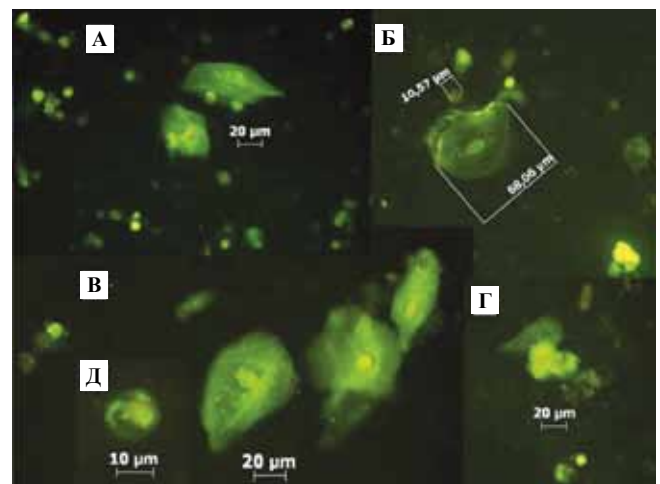


Рис. 2 (А, Б, В, Г, Д). Поля зрения препарата клеточной взвеси плоскоклеточного рака полости рта человека, флуорохром ДСМ. Видны клетки опухоли и малые лимфоциты размером от 5 до 10 мкр

Таблица

Яркость флуоресценции АНС и ДСМ, связанных с клетками различных типов в отсутствие и присутствие цисплатина в клеточной взвеси. Соотношение яркостей. Средние значения \pm стандартное отклонение (отн. ед.)

№ опыта	Без цисплатина				Инкубация с цисплатином						
	Типы клеток, условия выделения	N	S (мкр. кв.)	АНС-Br (отн. ед.)	Br-ДСМ (отн. ед.)	N	S (мкр. кв.)	АНС-Br (отн. ед.)	Br-ДСМ (отн. ед.)	АНС Br _{безPt} / Br _{Pt}	ДСМ Br _{безPt} / Br _{Pt}
1	Клетки плоскоклеточного рака полости рта человека (ПРПРЧ)	94	244 \pm 69	200\pm30	27 \pm 4	126	258 \pm 50	189\pm11	15 \pm 3**	1,1 \downarrow	1,8 \downarrow
2	Лейкоциты из клеточной взвеси плоскоклеточного рака полости рта человека	126	41 \pm 10	136\pm25	37 \pm 7	125	40 \pm 10	148\pm11	17 \pm 3**	0,92	2,2 \downarrow
3	Лейкоциты периферической крови от крысы № 1 с саркомой Плисса	325	42 \pm 9	63\pm9	46 \pm 12	124	64 \pm 18	45\pm12	7 \pm 1**	1,4 \downarrow	6,6 \downarrow
4	Лейкоциты периферической крови от крысы № 2 с саркомой Плисса	225	46 \pm 11	55\pm15	77 \pm 22	250	52 \pm 10	47\pm6	7 \pm 1**	1,2 \downarrow	11 \downarrow
5	Лейкоциты из опухоли, саркома Плисса, выделены на градиенте плотности, крыса № 3	282	70 \pm 14	346\pm64*	100 \pm 15	330	81 \pm 18	187\pm55	21 \pm 3**	1,9 \downarrow	4,8 \downarrow
6	Клетки саркомы Плисса, крыса № 4	405	107 \pm 25	300\pm58*	98 \pm 22	100	118 \pm 30	158\pm50	26 \pm 5**	1,9 \downarrow	3,8 \downarrow
7	Клетки саркомы 45, крыса № 5	179	294 \pm 98	327\pm53*	25 \pm 4	133	265 \pm 97	82\pm14	11 \pm 2**	4,0 \downarrow	2,3 \downarrow
8	Лейкоциты из саркомы 45, крыса № 5	79	35 \pm 7	263\pm49*	31 \pm 8	134	40 \pm 8	95\pm24	16 \pm 2**	2,8 \downarrow	1,9 \downarrow
9	Клетки саркомы Плисса, крыса № 6	232	83 \pm 16	176\pm25	16 \pm 2	235	78 \pm 16	190\pm39	7 \pm 1**	0,93	2,3 \downarrow
10	Лейкоциты периферической крови крыс, саркома Плисса, крыса № 6	174	61 \pm 17	170\pm60*	12 \pm 2	146	54 \pm 15	91\pm44	8 \pm 1**	1,9 \downarrow	1,5 \downarrow

Примечания. * – различия статистически достоверны для АНС; ** – для ДСМ, $p < 0,01$

Обозначения: N – число клеток, S – средняя площадь клеток, АНС-Br (ДСМ-Br) – средняя яркость флуоресцирующих клеток, связавших флуорохром АНС (ДСМ). АНС-Br_{безPt} – средняя яркость АНС в клеточной взвеси без цисплатина, АНС-Br_{Pt} – с цисплатином.

В, Г, Д) показаны фото клеток ПРПРЧ, а на рисунке 3 представлены клетки лимфосаркомы Плисса, окрашенные ДСМ, без цисплатина. На всех фотографиях видна неоднородность клеток по яркости свечения, в клетках ПРПРЧ ядрышки не видны, в полях зрения представлены клетки плоского эпителия и лимфоциты. На рисунке 3 в клетках лимфосаркомы Плисса видны прокрашенные ядра бурого цвета и оранжевые ядрышки, а также неоднородность этих клеток по яркости. По флуоресценции известного потенциалзависимого зонда-аниона АНС выявлена гиперполяризация клеток в результате присутствия в клеточной взвеси цисплатина в 8 из 10 опытов, в среднем по 10 опытам в $1,8 \pm 1,0$ раза. В клетках ПРПРЧ (2 опыта – первые две строки таблицы) яркость флуоресценции АНС не изменилась.

Обсуждение

Ранее в работах Г.К. Максимова, Е.М. Непомнящей и О.В. Тарнопольской [2, 4, 5] было показано, что при изменении мембранного потенциала клеток изменения флуоресценции АНС и ДСМ, связанных с клетками, противоположны по знаку, поскольку АНС и ДСМ – противоионы, то есть при гиперполяризации клеток в ответ на какое-либо воздействие яркость АНС снижается, а яркость ДСМ увеличивается. Между тем в представленных 10 опытах под действием цисплатина в клетках имеет место снижение яркости как АНС, так и ДСМ. По нашему мнению, в этом случае ДСМ уже не отражает изменения мембранного потенциала, а наблюдается конкуренция между ДСМ и цисплатином за места связывания в клетке, причем независимо от типа клеток, которые мы включили в исследование. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что особенно плохо прокрашивались флуорохромом ДСМ ядра в клеточной взвеси с цисплатином. Это согласуется с данными Н.А. Колпаковой и соавторов [1] о максимальном накоплении цисплатина в ядрах клеток.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение яркости флуоресценции ДСМ, связанного с клетками, может быть критерием наличия в клеточной взвеси цисплатина даже в столь малой концентрации, как 0,1 мкг/мл, относительно клеточной взвеси, где он отсутствует. При этом имеет место гиперполяризация мембран клеток, которую оценивали по снижению яркости АНС. Неоднородность клеток по яркости ДСМ можно объяснить не только различным мембранным

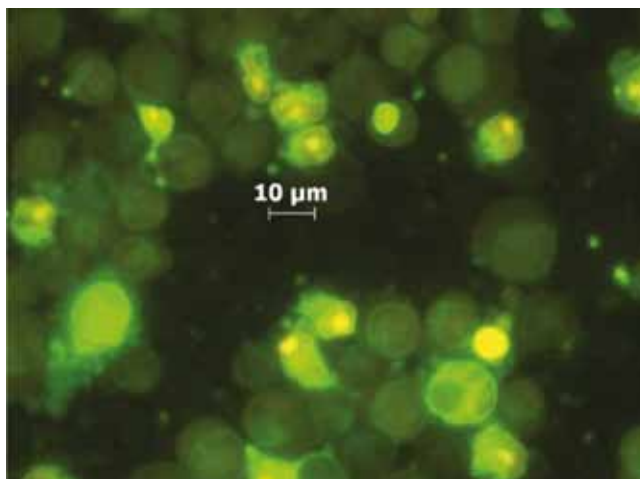


Рис. 3. Клеточная взвесь саркомы Плисса. Оранжевые ядрышки, бурое ядро. Окраска ДСМ. $\times 100$

потенциалом клеток в клеточной популяции, но и наличием в клеточной взвеси химических веществ, конкурирующих с ДСМ за места связывания в клетках опухоли, чем и является, по-видимому, цисплатин.

Литература

1. Колпакова Н.А. Оценка тканевого распределения платины методом инверсионной вольтамперометрии у онкологических больных / Н.А. Колпакова, Е.А. Смышляева, А.А. Завьялов, А.Ю. Добродеев, С.А. Тузиков, С.А. Антипов // Успехи современного естествознания. 2004. № 2. С. 13–16.
2. Максимов Г.К. Неоднородность клеток эпителия пунктата аденокарциномы предстательной железы по мембранному потенциалу / Г.К. Максимов, О.В. Тарнопольская, А.И. Шихлярова, Е.М. Непомнящая, В.А. Сергань // Вестник Южного научного центра РАН. 2012. Т. 8. № 3. С. 55–60.
3. Мельник А.Н. Цитоморфологическая диагностика опухолей. Киев: Здоров'я, 1983. 240 с.
4. Непомнящая Е.М. Прижизненная флуориметрия клеток перстневидноклеточного рака желудка с применением флуорохромов АНС и ДСМ / Е.М. Непомнящая, О.В. Тарнопольская, Х.Г. Мамулян // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 4. С. 18–22.
5. Тарнопольская О.В. Визуализация взаимодействия цефалоспоринов с клетками эпителия аденокарциномы предстательной железы с помощью окрашивания витальным флуоресцентным красителем ДСМ / О.В. Тарнопольская, Е.М. Непомнящая, В.А. Сергань // Новости клинической цитологии России. 2012. Т. 16. № 1–2. С. 10–11.

DETERMINATION POSSIBILITY OF CISPLATIN IN TUMOR CELLS BY ANS AND DSM FLUORESCENCE

O.V. Tarnopolskaya, I.G. Goroshinskaya, A.I. Shikhlyarova, P.S. Kachesova, J.N. Krochmal

The fluorescence intensity of the vital dye DSM (4 - (n-dimethylaminostyryl) -1 - methylpyridinium) associated with cells of various types of tumor, tumor's leukocytes and leukocytes of peripheral blood as well as fluorescence intensity of the dye ANS were investigated. By ANS fluorescence cells became hyperpolarized (as ANS fluorescence was decreased) by an average of 1.8 times after incubation of the cell suspension with cisplatin at 0.1 mg/ml for 20–60 minutes. At the same time the average DSM fluorescence intensity of the cell suspension also decreased by an average of almost 4 times, instead of the expected increase, as opposite changes in fluorescence intensity of ANS and DSM had been shown previously. The data presented indicate that the decline in fluorescence intensity of DSM can be criterion for the presence in the cells of cisplatin.

Key words: squamous cell carcinoma of the oral cavity, Pliss lymphosarcoma, fluorescent probes DSM and ANS, cisplatin

Информация об авторах

Тарнопольская Ольга Владимировна – канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник биохимической лаборатории Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Горошинская Ирина Александровна – докт. биол. наук, профессор, руководитель биохимической лаборатории Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Шихлярова Алла Ивановна – докт. биол. наук, профессор, руководитель лаборатории биофизики рака Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Качесова Полина Сергеевна – младший научный сотрудник биохимической лаборатории Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Крохмаль Юлия Николаевна – аспирант, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт.

Адрес ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России:

344037 Ростов-на-Дону, 14 линия, 63.

E-mail: mioi@list.ru

Переписку вести с Тарнопольской Ольгой Владимировной.

Телефон 8 919 891-6780. E-mail: mioi.biochem@gmail.com

Материал поступил в редакцию 22 марта 2013 года.

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПОТОМСТВА МЫШЕЙ, ПЕРЕНЕСШИХ АКТИВАЦИЮ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Изучены постнатальный онтогенез тимуса и селезенки потомства мышей, однократно перенесших активацию иммунной системы в ранние сроки беременности, и цитофизиология тучных клеток тимуса и селезенки. Выявленные особенности позволяют сделать вывод, что уменьшение количества тучных клеток в тимусе наблюдается при задержке инволютивных изменений органа у взрослых животных, а увеличение их в селезенке – при отставании формирования в ней лимфатических узелков.

Ключевые слова: тучные клетки, тимус, селезенка, морфогенез, пренатальное воздействие

Формирование органов иммунной системы в постнатальном периоде развития зависит от ряда факторов, среди которых клеточным взаимодействиям и юкстакринным и паракринным гуморальным механизмам регуляции отводится одна из главенствующих ролей. Особый интерес представляет исследование роли тучных клеток (ТК) как факторов регуляции морфогенеза иммунной системы. ТК – это полифункциональная популяция клеток, секретирующая десятки биологически активных веществ. С современных позиций ТК рассматриваются как полноправные участники реакции врожденного и регуляторы приобретенного иммунитета [2, 3, 7, 12, 14]. В пренатальном и раннем постнатальном периодах источниками ТК помимо красного костного мозга являются тимус и селезенка [10, 14], однако их влияние на развитие лимфоидных образований – мало изученный аспект биологии ТК. Ранее мы отмечали изменения гистофизиологии органов иммунной системы потомства после активации иммунной системы материнского организма [4, 5, 6]. Цель настоящего исследования – изучить цитофизиологию ТК тимуса и селезенки и морфогенез этих органов в разные сроки постнатального онтогенеза у потомства мышей, перенесших однократное иммуностимулирующее воздействие на ранних сроках беременности.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на 32 самцах мышей C57Bl/6. Самцы опытной группы (n=17) были полу-

чены от самок, которым на 7-е сутки после оплодотворения с целью активации иммунной системы был однократно введен КонА в орбитальный синус в дозе 5 мг/кг. В качестве контрольной группы использовали самцов мышей C57Bl/6 (n=15), родившихся от интактных самок. Мышей выводили из эксперимента в возрасте 17 суток (после перехода на самостоятельное вскармливание), 1,5 месяца (в период полового созревания) и 2,5 месяца (начало репродуктивного периода) передозировкой диэтилового эфира. Проводили удаление тимуса и селезенки. После стандартной гистологической проводки изготавливали парафиновые срезы органов, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином, толуидиновым синим. Исследование гистологических препаратов проводили методом световой микроскопии и компьютерной морфометрии с помощью программы ImageScope (Leica Microsystems GmbH, Австрия). Оценивали соотношение коркового и мозгового вещества, количество тимических телец на 1 мм² площади мозгового вещества, количество лимфоцитов в 1 мм² мозгового вещества. В гистологических препаратах селезенки изучали соотношение белой и красной пульпы, количество гемопоэтических мононуклеарных клеток в 1 мм² площади среза красной пульпы. Подсчитывали количество ТК в 1 мм² гистологического среза тимуса и красной пульпы селезенки. Определяли средний гистохимический коэффициент (СГК), отражающий насыщенность ТК секреторным материалом по ранее описанной методике [1] и индекс дегрануляции (ИД)

как отношение количества дегранулирующих ТК к общему количеству ТК.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 7.0 (Statsoft, США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением M и ошибкой среднего значения m . Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью t -критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты

В тимусе мышей контрольной группы на 17-е сутки постнатального развития корковое вещество преобладало и было представлено плотно лежащими лимфоцитами. Количество лимфоцитов в мозговом слое было высоким. В мозговом слое также встречалось небольшое количество тимических телец. ТК выявлялись в соединительнотканной капсуле органа. Эти клетки характеризовались высоким содержанием секреторного материала. В субкапсулярном слое и мозговом веществе встречались единичные ТК, также

насыщенные секреторным материалом (табл. 1). Дегрануляция ТК не наблюдалась. В возрасте 1,5 месяца отмечалось снижение количества лимфоцитов в мозговом веществе тимуса. Одновременно наблюдалось увеличение количества ТК (табл. 1). ТК выявлялись как в корковом, так и в мозговом веществе. Содержание секреторного материала в них было ниже, чем на предыдущем сроке исследования, дегрануляция не наблюдалась. В возрасте 2,5 месяца наблюдалось уменьшение коркового вещества, в корковом веществе появились небольшие очаги опустошения. Количество лимфоцитов в мозговом веществе уменьшилось, а тимических телец увеличилось (табл. 1). Количество ТК в корковом веществе увеличилось (табл. 1). Они характеризовались высокой насыщенностью секреторного материала. Треть ТК выделяла секреторные гранулы за пределы клетки.

В тимусе мышей опытной группы на 17-е сутки постнатального развития соотношение коркового и мозгового вещества не отличалось от значений контрольной группы, но отмечалось меньшее содержание лимфоцитов и большее количество тимических телец в мозговом веществе. ТК встречались в субкапсулярном слое. Их количество превышало значения контрольной группы (табл. 1). Также выявлены отличия

Таблица 1

Морфофункциональные показатели развития тимуса мышей контрольной и опытной групп и цитофизиологические характеристики тучных клеток тимуса ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа			Опытная группа		
	17 суток	1,5 месяца	2,5 месяца	17 суток	1,5 месяца	2,5 месяца
Относительная масса тимуса, %	0,67±0,11	0,39±0,02	0,20±0,02	0,63±0,03	0,4±0,02	0,39±0,02*
Доля коркового вещества, %	73,31±3,68	73,54±2,12	72,83±2,54	77,35±3,51	79,03±3,69	80,20±1,09*
Количество лимфоцитов в 1 мм ² мозгового вещества	22180,0±818,0	16572,7± 695,8	14084,5±990,6	17440,0±668,0*	18380,0±1388,3	21250,0±526,69*
Количество тимических телец в 1 мм ² мозгового вещества	10,27±0,53	9,70±1,12	16,84± 0,82	12,25±0,68*	8,45± 0,85	7,98± 0,67*
Количество ТК в 1 мм ² среза тимуса	0,069±0,0025	0,15±0,01	0,26±0,03*	0,13±0,01*	–	0,13±0,01*
СГК	2,0±0,0	1,50±0,15	2,0±0,0	1,5±0,15	–	2,0±0,0
ИД	0	0	33,33±4,45	50,0±6,06	–	50,0±10,0

в цитофизиологических характеристиках. Насыщенность ТК секреторным материалом была ниже, отмечалась слабая дегрануляция ТК (табл. 1). В возрасте 1,5 месяца объемная доля коркового вещества в тимусе незначительно превышала показатели контроля. Количество лимфоцитов в мозговом веществе увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования и превысило значения контрольной группы (табл. 1). Количество тимических телец уменьшилось и не отличалось от значений контрольной группы. ТК в тимусе не выявлялись. В 2,5 месяца у мышей опытной группы морфофункциональное состояние тимуса отличалось от контрольной группы (табл. 1). Доля коркового вещества увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования и статистически значимо превысила значения контрольной группы. Также продолжалось ранее наблюдавшееся увеличение количества лимфоцитов в мозговом веществе. Количество тимических телец не отличалось от значений контрольной группы. ТК встречались только в корковом слое. Их количество было статистически значимо меньше, чем в контрольной группе. По насыщенности секреторным материалом они не отличались от ТК крыс контрольной группы, а процессы дегрануляции происходили более активно.

В селезенке мышей контрольной группы в возрасте 17 суток белая пульпа была слабо развита, в красной пульпе встречались большое количество гемопоэтических клеток и единичные ТК. Тучные клетки характе-

ризовались низким содержанием секреторных гранул, дегрануляция не наблюдалась (табл. 2, рис. 1 А). В возрасте 1,5 месяца доля белой пульпы селезенки увеличилась и составила более половины объема органа (табл. 2). Популяция ТК селезенки характеризовалась стабильной численностью (табл. 2). Насыщенность ТК секреторным материалом значительно возросла. Многие ТК выделяли секреторный материал дегранулирующей. В основном встречались слабо дегранулирующие ТК. В возрасте 2,5 месяца у мышей контрольной группы отмечались возрастные изменения селезенки – снижение относительной массы органа и доли белой пульпы (табл. 2). В красной пульпе встречались единичные тучные клетки. Особенностью было появление ТК в маргинальной зоне лимфатических узелков. СГК оставался на прежнем уровне, ИД снизился (табл. 2, рис. 1 Б).

У мышей опытной группы на 17-е сутки постнатального развития наблюдались меньшее развитие лимфоидных образований, более активный гемопоэз и значительное увеличение количества ТК в селезенке по сравнению с контрольной группой (табл. 2, рис. 1 В). Наблюдались отличия в гистотопографии ТК. Они находились не только в красной пульпе, но и в маргинальной зоне на границе с красной пульпой. Насыщенность ТК секреторным материалом также отличалась – СГК почти в 2 раза превышал значения контрольной группы. Дегранулирующие клетки так же,

Таблица 2

Морфофункциональные показатели развития селезенки мышей контрольной и опытной групп и цитофизиологические характеристики тучных клеток селезенки (M±m)

Показатель	Контрольная группа			Кон А		
	17 суток	1,5 месяца	2,5 месяца	17 суток	1,5 месяца	2,5 месяца
Относительная масса селезенки, %	0,64±0,06	0,53±0,09	0,52±0,05	0,57±0,04	0,40±0,03	0,39±0,02*
Доля белой пульпы, %	26,59±4,66	59,40±0,85	34,80±3,41	19,62±2,75*	47,83±5,08*	48,15±4,78*
Количество гемопоэтических клеток в 1 мм ² среза красной пульпы	24175,0±803,3	20750,0±805,6	21811,1±552,1	27275,0±1076,2*	23450,0±737,5	18325,0±1053,9*
Количество ТК в 1 мм ² среза красной пульпы	0,92±0,31	1,31±0,07	1,17±0,29	5,49±0,25*	9,97±0,51*	6,15±0,29*
СГК	0,75±0,04	2,0±0,01	2,0±0,01	1,46±0,06*	1,58±0,04*	2,0±0,01
ИД	0	75,00±6,06	42,51±10,10	0	39,39±5,10*	58,80±7,18

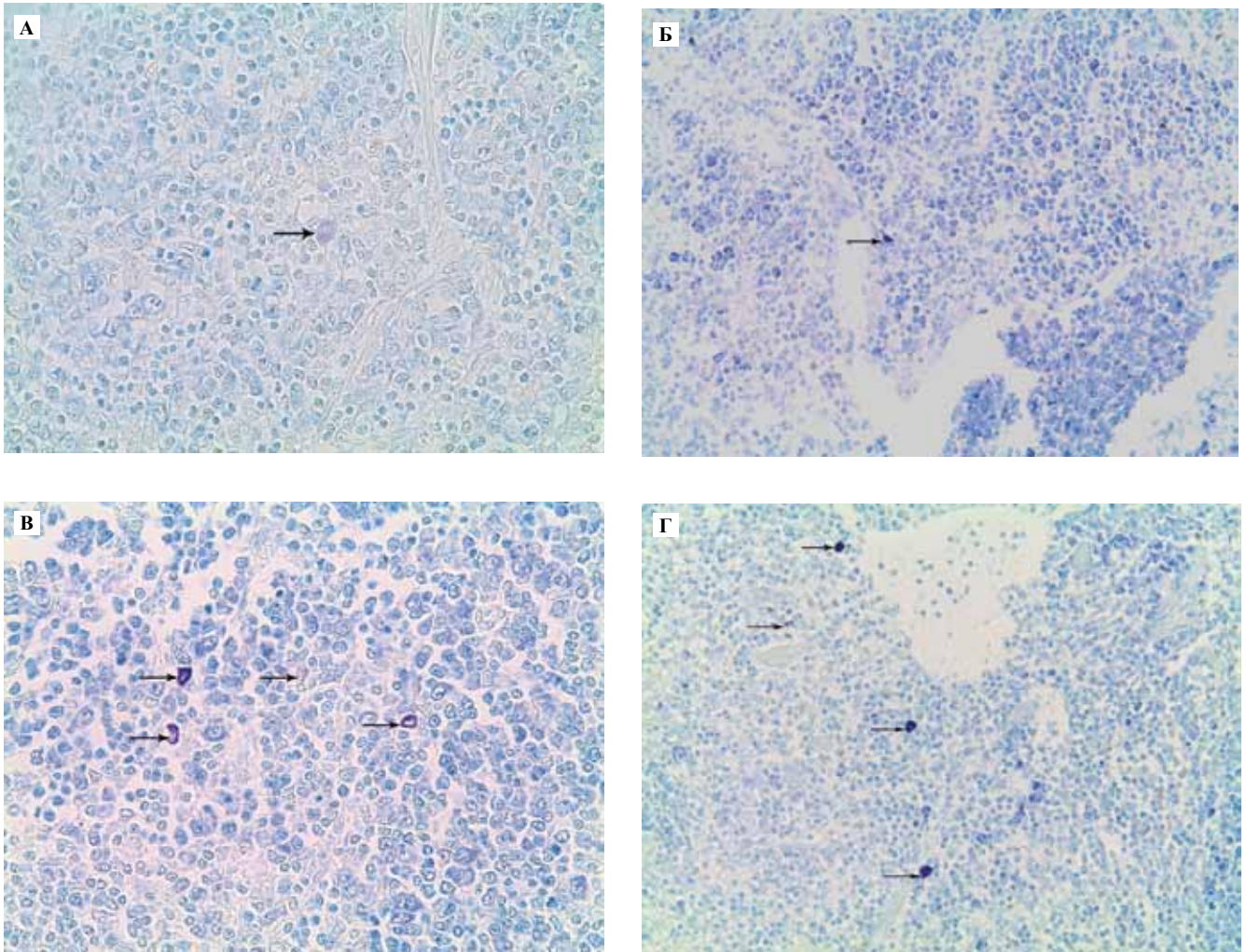


Рис. 1. Тучные клетки селезенки потомства интактных самок мышей C57Bl/6 (А, Б) и потомства самок, перенесших активацию иммунной системы в ранние сроки беременности (В, Г).

А – в селезенке мышей в возрасте 17 суток встречаются единичные тучные клетки, слабо насыщенные секреторными продуктами;

Б – в возрасте 2,5 месяца в селезенке наблюдается небольшое количество тучных клеток с высокой насыщенностью секреторными продуктами;

В – в селезенке мышей опытной группы в возрасте 17 суток количество выявляемых тучных клеток увеличено, встречаются тучные клетки как с низкой, так и с высокой насыщенностью секреторными продуктами;

Г – в селезенке мышей опытной группы в возрасте 2,5 месяца количество выявляемых тучных клеток увеличено, их насыщенность секреторными продуктами высокая.

Окраска толуидиновым синим. $\times 400$ (А, В) и 200 (Б, Г)

как в контрольной группе, не выявлялись. В возрасте 1,5 месяца объемная доля белой пульпы селезенки также была меньше, чем у контрольных животных. Количество ТК в красной пульпе селезенки увеличилось по сравнению как с предыдущим сроком исследования, так и со значениями контрольной группы (табл. 2). Некоторые ТК располагались в наружном слое маргинальной зоны лимфатических узелков. Две трети ТК было представлено клетками, богатыми секреторным материалом, треть – клетками с низкой насыщенностью секреторными продуктами. СГК тучных

клеток был ниже значений контрольной группы и не отличался от значений предыдущего срока исследования. Доля дегранулирующих ТК оказалась меньше, чем в контрольной группе. Дегранулирующие ТК характеризовались слабой степенью дегрануляционных процессов. Таким образом, ТК начали переходить в фазу выделения секреторного материала. У мышей опытной группы в возрасте 2,5 месяца селезенка имела меньшую относительную массу, чем в контрольной группе, но доля белой пульпы в ней была статистически значимо выше (табл. 2). В красной пульпе ТК

выявлялись в меньшем количестве, чем на предыдущем сроке исследования, но значительно больше, чем в контрольной группе (табл. 2, рис. 1 Г). По сравнению с предыдущим сроком исследования увеличилось содержание секреторных продуктов в ТК, а также усилилось выделение ими секреторного материала путем дегрануляции. По этим показателям они не отличались от значений контрольной группы (табл. 2).

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что в контрольной группе ТК в тимусе выявляются у мышей разного возраста и количество ТК с возрастом увеличивается. Насыщенность ТК секреторным материалом снижается в период полового созревания, а процессы дегрануляции активируются к 2,5 месяца. ТК встречаются в основном в корковом веществе, в том числе субкапсулярном слое, и только в периоде полового созревания они появляются в мозговом веществе. Таким образом, ТК встречаются в основном среди плотно лежащих дифференцирующихся лимфоцитов. Возможно, это связано с тимическим происхождением данного пула ТК. В литературе имеются данные, что в эмбриональном периоде в тимусе происходит мастоцитопоз, но его активность невысока [10]. Также связь ТК с Т-лимфоцитами заключается во взаимных паракринных влияниях на процессы пролиферации, дифференцировки и секреторной деятельности [15]. Общеизвестно, что количество ТК в тимусе увеличивается с возрастом и является характерным признаком как возрастной, так и акцидентальной инволюции [8, 11], что было показано и в настоящем исследовании, однако, по нашим данным, гистотопография ТК и в стадии развития тимуса, и в стадии его инволюции не изменялась. У мышей опытной группы в возрасте 17 суток отмечалось большее количество ТК и меньшее количество лимфоцитов в мозговом веществе, притом, что степень развития коркового вещества была одинаковой. Это свидетельствует о меньших темпах дифференцировки лимфоцитов. Отсутствие ТК в тимусе в период полового созревания сопровождалось увеличением количества лимфоцитов, а в более позднем возрасте меньшее количество ТК сочеталось с явным замедлением возрастной инволюции органа, включая продолжавшееся увеличение количества лимфоцитов в мозговом веществе и возрастание доли коркового вещества. Таким образом, полученные результаты указывают на роль ТК в снижении темпов процессов пролиферации и дифференцировки тимоцитов и подтверждают данные о связи возрастных инволютивных изменений с увеличением численности ТК.

По результатам исследования тучных клеток селезенки мышей контрольной группы можно сделать вывод, что численность ТК относительно стабильна на отрезке от 17 суток до 2,5 месяца постнатального развития. Секреторные процессы в ТК (накопление в ТК секреторных гранул и их выделение) активируются с

возрастом и достигают наиболее высокого уровня в период полового созревания, когда наблюдается максимальное развитие лимфоидных образований селезенки и количества лейкоцитов в красной пульпе.

В опытной группе численность ТК в селезенке значительно превышала значения контрольной группы на всех сроках исследования. Наибольшие значения наблюдались в возрасте 1,5 месяца. Насыщенность ТК секреторным материалом была выше в возрасте 17 суток. Она увеличивалась с возрастом, но не превышала значения контрольной группы. Дегрануляция ТК прогрессивно увеличивалась. Таким образом, наибольшая численность ТК наблюдалась в период полового созревания, когда паренхима органа достигла максимального развития, а наибольшая активность секреторных процессов – в возрасте 2,5 месяца, когда максимальное развитие белой пульпы сочеталось со снижением количества лейкоцитов в красной пульпе.

Увеличение количества ТК в селезенке могло быть связано либо с усилением мастоцитопоза в этом органе, либо с усилением миграции ТК в селезенку. Кроветворение в селезенке мышей начинается на 16-е сутки эмбрионального развития, и одновременно в селезеночных тяжах появляются ТК [13]. Кроветворение в селезенке, в том числе мастоцитопоз, продолжается и на ранних этапах постнатального онтогенеза [14]. Функции ТК в селезенке в эмбриональном и постнатальном периодах различны. На ранних этапах эмбрионального развития, когда селезенка представляет собой орган гемопоэза, ТК выполняют функции макрофагов – фагоцитируют гибнущие гемопоэтические клетки и экстрадированные ядра эритроцитов [13]. На более позднем этапе, когда в селезенке вокруг артерий инициируется формирование лимфатических узелков, ТК начинают оказывать регуляторное действие на процессы пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного происхождения [9, 12]. Проведенное исследование выявило активный гемопоэз в красной пульпе селезенки мышей в возрасте 17 суток, но в опытной группе среднее количество миелоидных и лимфоидных клеток в красной пульпе превышало значения контрольной группы на 13%, а количество ТК – более чем в 4 раза. Следовательно, увеличение количества ТК не было напрямую связано с гемопоэзом. Возможной причиной увеличения количества ТК было избирательное усиление пролиферации и дифференцировки селезеночных предшественников ТК – базофил-мастоциткоммитированных прогениторных клеток [14], однако в таком случае в красной пульпе должны были бы выявляться в больших количествах базофилы – гранулоциты с метахроматически окрашивающимися гранулами в цитоплазме. Избирательное усиление мастоцитопоза приводило бы к увеличению количества юных ТК с низким содержанием секреторных гранул. В опытной группе ТК селезенки можно было разделить на две подгруппы, первая из которых имела

низкую насыщенность секреторным материалом, как и в контрольной группе, а вторая половина – высокую. Это свидетельствует в пользу усиления миграции ТК из костного мозга в селезенку.

Сегодня день роль ТК в функционировании иммунной системы, регуляции реакций клеточного и гуморального иммунитета не вызывает сомнений [2, 3, 12, 14]. Увеличение количества ТК, их локализация не только в красной пульпе, но и в маргинальной зоне у мышей в возрасте 17 суток указывали на роль тучных клеток в формировании лимфатических узелков селезенки. У мышей на данном этапе лимфоидные узелки отличались меньшими размерами от узелков мышей контрольной группы. Полученные нами данные частично совпадают с данными R. Chacon-Salinas et al. [9], установившими, что иммуносупрессивное действие ультрафиолета, в частности нарушение формирования герминативных центров лимфатических узелков селезенки, не наблюдалось у мышей с дефицитом ТК и развивалось после восстановления популяции тучных клеток донорскими клетками. Биологический смысл усиленной миграции ТК в селезенку в данном случае не совсем понятен. У потомства мышей, получавших однократно Кона на 7-е сутки беременности, отмечалась задержка возрастных инволютивных изменений тимуса и развития белой пульпы селезенки, то есть закономерности постнатального морфогенеза тимуса и селезенки не изменялись, а временные сроки были смещены. Задержка инволютивных изменений тимуса в возрасте 2,5 месяца закономерно приводила к большому развитию белой пульпы селезенки по сравнению с контрольной группой. Динамика цитофизиологических характеристик ТК в этих органах была различной. Выявленные особенности позволяют сделать вывод, что если уменьшение количества ТК в тимусе связано с задержкой инволютивных изменений, то увеличение их в селезенке – с отставанием формирования лимфатических узелков. Тем самым ТК являются одним из факторов, обеспечивающих более медленное формирование белой пульпы. Соответствие гистотопографии ТК в селезенке крыс контрольной группы в возрасте 2,5 месяца, когда отмечались возрастное уменьшение размеров узелков и стирание границ между зонами узелков, и опытной группы в возрасте 17 суток подтверждает, что ТК являлись одним из факторов, задерживающих развитие селезенки как органа иммунной системы.

Литература

1. Яглова Н.В. Цитофизиологические особенности популяции тучных клеток щитовидной железы при воздействии липополисахарида / Н.В. Яглова // Морфологические ведомости. 2008. № 3–4. С. 94–98.
2. Яглова Н.В. Тучные клетки и врожденный иммунитет / Н.В. Яглова // Иммунология. 2009. Т. 30. № 2. С. 139–143.
3. Яглова Н.В. Биология секреции тучных клеток / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 4. С. 4–10.
4. Яглова Н.В. Снижение противоопухолевого иммунитета у потомства как следствие активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности / Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, И.М. Богданова // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6 (15). № 4. С. 357–362.
5. Яглова Н.В. Морфофункциональные изменения тимуса у потомства мышей в период полового созревания и у взрослых особей после однократного иммуностимулирующего воздействия на материнский организм в ранние сроки беременности / Н.В. Яглова, С.С. Обернихин // Иммунология. 2013. Т. 34. № 1. С. 15–19.
6. Яглова Н.В. Влияние активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности на постнатальный морфогенез органов иммунной системы потомства / Н.В. Яглова, С.С. Обернихин // Проблемы репродукции. 2013. Т. 19. № 1. С. 73–77.
7. Яглова Н.В. Ультраструктурные проявления молекулярного способа выделения секреторного материала тучными клетками щитовидной железы при воздействии липополисахарида / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155. № 2. С. 229–232.
8. A comparative study of the spatial distribution of mast cells and microvessels in the foetal, adult human thymus and thymoma / M. Raica et al. // Int. J. Exp. Path. 2010. V. 91. P. 17–23.
9. Chacon-Salinas R. Mast cell-derived IL-10 suppresses germinal center formation by affecting T follicular helper cell function / R. Chacon-Salinas, A. Limon-Flores, A. Chavez-Blanco, S. Ulrich // J. Immunol. 2011. V. 186. N 1. P. 25–31.
10. Kendall M. Hemopoiesis in the thymus / M. Kendall // Developmental immunology. 1995. V. 4. P. 157–68.
11. Kendall M. The thymus in the mouse changes its activity during pregnancy: a study of the microenvironment / M. Kendall, A. Clarke // J. Anat. 2000. V. 197. P. 393–411.
12. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes / D. Skokos et al. // J. Immunol. 2001. V. 166. P. 868–76.
13. Sasaki K. Cell death and phagocytosis of haematopoietic elements at the onset of haematopoiesis in the mouse spleen: an ultrastructural study / K. Sasaki, H. Iwatsuki, M. Suda, C. Itano // J. Anat. 1993. V. 183. P. 113–20.
14. Teoharides T. Mast cells: ontogeny, homing, and recruitment of a unique innate effector cell / T. Teoharides, M. Gurish, J. Boyce // J. Allergy Clin. Immunol. 2006. V. 117. N 6. P. 1285–91.
15. Wlodarski K. Lymphatic mast cells in response to in vitro stimulation by non-specific T-cell mitogenes / K. Wlodarski, G. Rychlik, S. Mazur // Immunology. 1985. V. 55. N 2. P. 311–5.

ROLE OF MAST CELLS IN DEVELOPMENT OF IMMUNE SYSTEM IN OFFSPRING OF EXPOSED TO ACTIVATION OF IMMUNITY IN EARLY PREGNANCY AND INTACT MURINE DAMS

N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin

Postnatal development of thymus and spleen and cytophysiology of thymic and splenic mast cells in offspring of exposed to activation of immunity in early pregnancy and intact murine dams were studied. The data obtained shows that later involution of thymus and retardation of spleen development in adult offspring of the exposed murine dams are associated with decrease of thymic mast cell and increase of splenic mast cells populations.

Key words: mast cells, thymus, spleen, morphogenesis, prenatal exposure

Информация об авторах

Яглова Наталья Валентиновна – докт. мед. наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон/факс (499) 120-8065. E-mail: yaglova@mail.ru

Обернихин Сергей Станиславович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: ober@mail.ru

Материал поступил в редакцию 3 марта 2013 года.

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ТРЕХМЕРНЫЙ АНАЛИЗ КАМЕР СЕРДЦА У РАННИХ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА

Т. Гудлетт, И.В. Твердохлеб

ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», Днепропетровск, Украина

Цель работы – создание трехмерных компьютерных моделей сердца ранних плодов человека с последующей сопоставительной оценкой параметров камер сердца. Проведены реконструкция и анализ сердца плодов человека при помощи компьютерного моделирования, выделены структуры для дальнейшего изучения. Показано, что компьютерная реконструкция является мощным и полезным инструментом для трехмерного анализа плодов. Созданы и изучены пространственные компьютерные модели различных отделов сердца человека с 9-й по 13-ю неделю внутриутробного развития.

Ключевые слова: сердце человека, ранний плодный период, трехмерное компьютерное моделирование

Успешное развитие методов ранней пренатальной диагностики пороков сердца и разработка новейших технологий микромагниторезонансного исследования, микрокомпьютерной томографии позволяют сегодня осуществлять надежную трехмерную визуализацию развивающегося сердца человека начиная с 14-й недели гестации [8, 9]. Применение указанных методов становится невозможным при изучении раннего плодного и эмбрионального сердца с размерами менее 8 мм. На протяжении последних лет в реконструкции эмбрионального сердца ведущее место заняли методы пространственного моделирования, основанные на ином принципе – компьютерной обработке серий гистологических срезов с последующим трехмерным восстановлением структур [4]. К настоящему времени созданы многочисленные компьютерные модели сердца, основанные на анализе широко известных эмбриональных коллекций Carnegie, Walmsley, Boyd и других [2, 6, 7]. В этих моделях проведено тщательное морфометрическое изучение эмбриональных преобразований органа с 11-й по 23-ю стадию развития по Карнеги (до конца 8-й недели гестации), однако существуют лишь единичные исследования подобного рода в раннем плодном периоде развития – с 9-й по 13-ю неделю [5, 9]. Следует отметить, что именно данный период внутриутробного развития является чрезвычайно важным с точки зрения окончательного формирования морфологического профиля многих сердечных пороков. Кроме того, для раннего плодного сердца характерен наибольший дефицит сведений о количественных параметрах многочисленных развивающихся структур разных отделов сердца.

В связи с этим цель работы заключалась в создании трехмерных компьютерных моделей сердца ранних плодов человека с последующей сопоставительной оценкой параметров камер сердца.

Материалы и методы

В работе исследовали абортивный материал 4 ранних плодов человека (гестационный возраст – начало 9-й недели, начало 10-й недели, 11 полных недель, середина 13-й недели) после согласования с комиссией по биоэтике Днепропетровской медицинской академии. Данные детального внешнего осмотра, взвешивания и измерения теменно-копчиковой длины плодов сопоставляли со стандартными величинами. После препарирования сердце целиком фиксировали в 4% формальдегиде, обезвоживали этанолом и заключали в парапласт. Срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Для создания пространственных моделей использовали 30–35 срезов с предварительным расчетом равномерного шага в зависимости от величины органа. После изготовления и обработки цифровых фотографий срезов в Photoshop CS2 изображения импортировались в программу AMIRA 5.0, подвергались трансляции и интерполированию кубическими сплайнами между каждой парой срезов. Пространственную реконструкцию проводили в соответствии с рекомендациями [1] с помощью Autodesk 3ds Max 8.0. В моделях анализировали внешнюю поверхность сердца, внутренний рельеф правого и левого желудочков, предсердий, определяли высоту и ширину органа в целом и изученных компонентов, объем желудочкового миокарда, объем полостей сердца.

Результаты и обсуждение

Моделирование сердца плода человека в начале 9-й недели гестации позволило визуализировать более развитый внутренний рельеф левого желудочка по сравнению с правым и значительное преобладание его по объему (рис. 1). Рельеф предсердий был намного более гладким, однако их объем лишь незна-

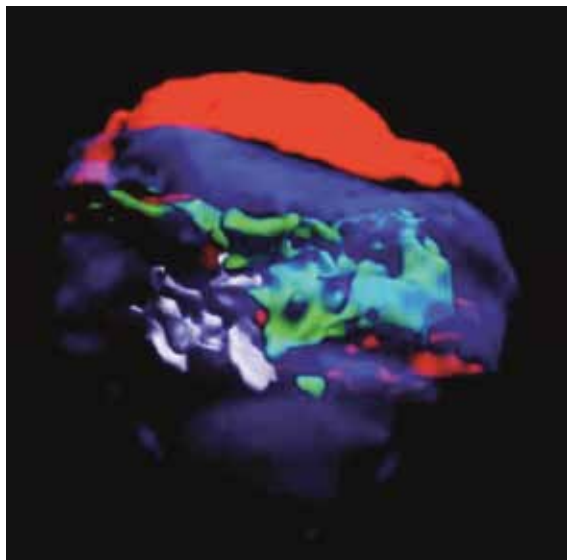


Рис. 1. Пространственная компьютерная модель сердца плода человека на 9-й неделе гестации. Проекция снизу. Зеленый цвет – полость левого желудочка; белый – полость правого желудочка; красный – полость предсердий; 50-проц. синий – желудочковый миокард

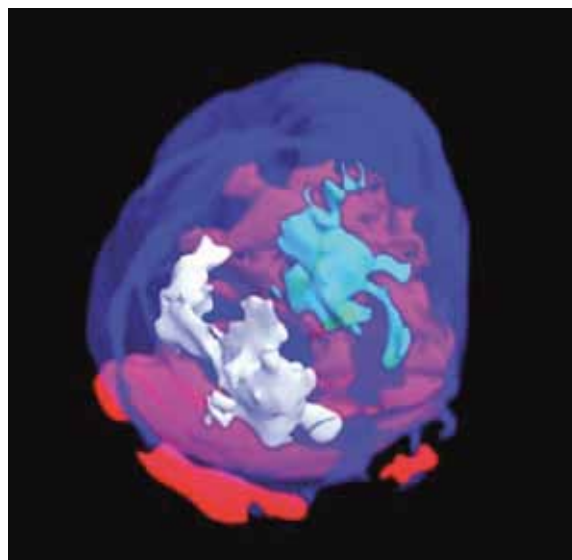


Рис. 2. Пространственная компьютерная модель сердца плода человека на 10-й неделе гестации. Проекция снизу. Зеленый цвет – полость левого желудочка; белый – полость правого желудочка; красный – полость предсердий; 50-проц. синий – желудочковый миокард

чительно уступал суммарному объему желудочков (табл. 1).

К началу 10-й недели развития в сердце плода человека наблюдалось существенное усложнение геометрии полости предсердий (рис. 2). Более чем 2-кратно нарастали их объем и площадь поверхно-

сти по сравнению с предыдущим сроком, а ширина преобладала над высотой (табл. 2). Так же активно нарастали объем и внутренняя поверхность правого желудочка, менее интенсивно – левого желудочка. Нарастание объема желудочкового миокарда составило 74,3%.

Таблица 1

Параметры модели сердца плода человека на 9-й неделе гестации

Показатель	Объем, мм ³	Площадь поверхности, мм ²	Высота, мм	Ширина, мм
Полость левого желудочка	7,35	89,3	2,07	1,42
Полость правого желудочка	2,63	44,5	1,79	1,86
Полость предсердий	7,67	20,8	1,54	1,15
Желудочковый миокард	18,13	73,7	2,83	3,04

Таблица 2

Параметры модели сердца плода человека на 10-й неделе гестации

Показатель	Объем, мм ³	Площадь поверхности, мм ²	Высота, мм	Ширина, мм
Полость левого желудочка	12,9	155,3	2,31	1,96
Полость правого желудочка	5,9	77,1	2,15	2,25
Полость предсердий	21,5	43,4	1,71	2,30
Желудочковый миокард	31,6	102,7	3,33	3,45

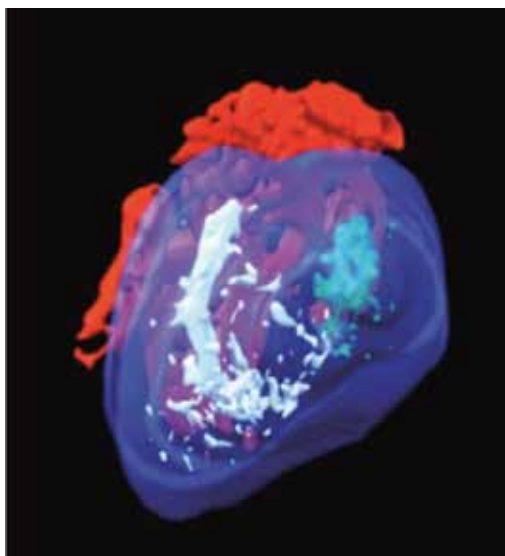


Рис. 3. Пространственная компьютерная модель сердца плода человека на 11-й неделе гестации. Проекция снизу. Зеленый цвет – полость левого желудочка; белый – полость правого желудочка; красный – полость предсердий; 50-проц. синий – желудочковый миокард

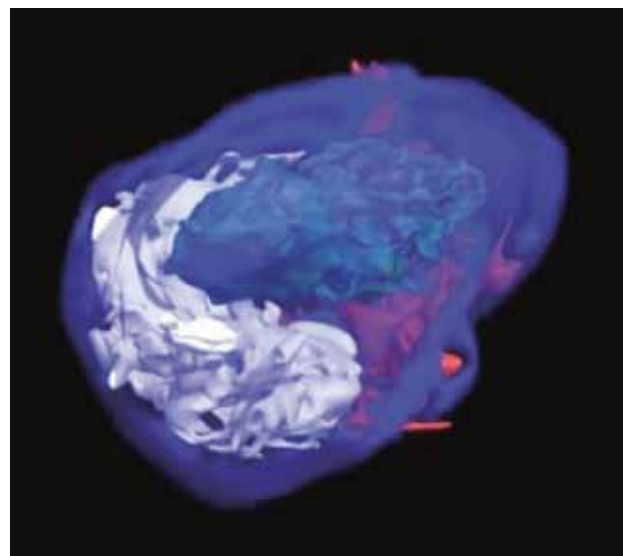


Рис. 4. Пространственная компьютерная модель сердца плода человека на 13-й неделе гестации. Проекция снизу. Зеленый цвет – полость левого желудочка; белый – полость правого желудочка; красный – полость предсердий; 50-проц. синий – желудочковый миокард

К концу 11-й недели внутриутробного развития происходило опережающее усложнение внутреннего рельефа предсердий и правого желудочка (рис. 3), а также умеренное нарастание объема левого и правого желудочков по сравнению с предыдущей моделью – на 34,9% и 54,2%, соответственно. Увеличение объема желудочкового миокарда составило всего 18,7%, тогда как объем полости предсердий в указанный период увеличивался почти 2-кратно, превосходя суммарный объем желудочков на 49,8%. Кроме того, на фоне стабильной высоты предсердий обнаруживалось их резкое расширение при неизменных пропорциях желудочкового миокарда (табл. 3).

В модели сердца 13-недельного плода человека отчетливо прослеживались существенные геометрические перестройки желудочков (рис. 4). Объем полости

левого желудочка возрастал в 3,6 раза по сравнению с предыдущим сроком, правого – в 3,2 раза, тогда как увеличение объема миокарда было 2,5-кратным, а объем полостей предсердий увеличивался всего на 33,8%. В отличие от сердца на 11-й неделе развития у 13-недельного плода объем предсердий уступал левому желудочку, однако продолжал активно расширяться (табл. 4).

Проведенные в данной работе компьютерная реконструкция и количественная оценка изученных параметров сердца ранних плодов человека (с 9-й по 13-ю неделю внутриутробного развития) показали перспективность использованного подхода для детального анализа архитектуры развивающихся структур и их сопоставления на тех этапах онтогенеза, которые в настоящее время остаются недоступными для

Таблица 3

Параметры модели сердца плода человека на 11-й неделе гестации

Показатель	Объем, мм ³	Площадь поверхности, мм ²	Высота, мм	Ширина, мм
Полость левого желудочка	17,4	181,5	3,89	3,16
Полость правого желудочка	9,1	91,4	2,23	2,54
Полость предсердий	39,7	60,7	1,83	4,68
Желудочковый миокард	37,5	124,1	4,46	4,31

Параметры модели сердца плода человека на 13-й неделе гестации

Показатель	Объем, мм ³	Площадь поверхности, мм ²	Высота, мм	Ширина, мм
Полость левого желудочка	62,0	206,3	6,05	5,32
Полость правого желудочка	29,1	131,9	5,12	4,25
Полость предсердий	53,1	80,7	2,66	6,37
Желудочковый миокард	95,6	159,6	8,03	7,15

применения иных диагностических методов. Особое значение в такой ситуации приобретает возможность параллельного использования и сопоставления данных трехмерной компьютерной реконструкции с результатами морфологического анализа гистологических срезов, включая возможности иммуногистохимии и других стандартных процедур в исследовании клеток и тканей.

Заключение

По результатам проведенного исследования, с 9-й по 11-ю неделю гестации в сердце плодов человека происходит опережающее усложнение внутреннего рельефа предсердий и правого желудочка с активным нарастанием и преобладанием объема полостей предсердий. С 11-й по 13-ю неделю развития происходит более чем 3-кратное возрастание объема полостей желудочков на фоне значительных преобразований их геометрии и рельефа при относительном замедлении перестроек предсердного миокарда.

Литература

1. Твердохліб І.В. Просторова реконструкція біологічних об'єктів за допомогою комп'ютерного моделювання / І.В. Твердохліб // Морфологія. 2007. Т. 1. № 1. С. 135–139.
2. Abdulla R. Cardiovascular embryology / R. Abdulla, G.A. Blew, M.J. Holterman // *Pediatr Cardiol*. 2004. V. 25. P. 191–200.
3. Blausen R.E. Computer-based reconstructions of the cardiac ventricles of human embryos / R.E. Blausen, R.S. Johannes, G.M. Hutchins // *Am. J. Cardiovasc. Pathol*. 1990. V. 3. P. 37–43.
4. Computer-aided interactive three-dimensional reconstruction of the embryonic human heart / Susan Whiten, Steven D. Smart, John C. McLachlan and James F. Aiton // *J. Anat*. 1998. V. 193. P. 337–45.
5. Computerized Three-Dimensional Analysis of the Heart and Great Vessels in Normal and Holoprosencephalic Human Embryos / Shigehito Yamada, Hitoshi Itoh, Chigako Uwabe et al. // *Anat. Rec*. 2007. V. 290. P. 259–67.
6. Flow in the early embryonic human heart: a numerical study / C.G. DeGroff, B.L. Thornburg, J.O. Pentecost et al. // *Pediatr. Cardiol*. 2003. V. 24. P. 375–80.
7. *Mandarim-de-Lacerda C.A.* Growth allometry of the myocardium in human embryos (from stages 15 to 23) / C.A. Mandarim-de-Lacerda // *Acta Anat*. 1991. V. 141. P. 251–6.
8. *Smith B.R.* Magnetic resonance microscopy in cardiac development / B.R. Smith // *Microsc. Res. Tech*. 2001. V. 52. N 3. P. 323–30.
9. Three-dimensional reconstruction and morphologic measurements of human embryonic hearts: a new diagnostic and quantitative method applicable to fetuses younger than 13 weeks of gestation / Jean-Marc Schleich, Jean-Louis Dillenseger, Laurence Loeuillet et al. // *Pediatr Dev Pathol*. 2005. V. 8 N 4. P. 463–73.

COMPUTERIZED THREE-DIMENTIONAL ANALYSIS OF CARDIAC CHAMBERS IN EARLY HUMAN FETUSES

T. Goodlett, I.V. Tverdokhle

Aim of this work was to create three-dimensional computer models of early human fetuses heart followed by a comparative assessment of cardiac chambers parameters. In the present study, we reconstructed and analyzed the heart staged human embryos with the aid of computer software and compared their structures for the further assay. We show that computer assisted reconstruction is a useful and powerful tool for analyzing detailed 3D in embryos. In our work, 3D models of different cardiac compartments have been created at 10-13 weeks old human embryo heart.

Key words: human heart, early fetal period, three-dimensional computer modeling.

Информация об авторах

Гудлетт Т. – очный аспирант кафедры гистологии Днепропетровской медицинской академии.

Твердохліб І.В. – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии Днепропетровской медицинской академии.

E-mail: ivt@dsm.a.dp.ua

Материал поступил в редакцию 3 марта 2013 года.

© Коллектив авторов, 2013

УДК: 616.592.7-002.3-089-003.9:616.155.32

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК ДЛЯ ОЦЕНКИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ НА МОДЕЛИ КРИТИЧЕСКИХ ДЕФЕКТОВ ТЕМЕННЫХ КОСТЕЙ КРЫС С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АДАПТИРОВАННОГО МЕТОДА ГИСТОМОРФОМЕТРИИ

А.В. Волков, А.В. Васильев, О.А. Рачинская, Г.Б. Большакова, Д.В. Гольдштейн

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Крысам линии Спрейг–Доули наносили критический дефект теменных костей цилиндрической формы диаметром 5 мм и применяли флуоресцентное мечение доксициклином и ализарином, а также окрашивание остеоида толуидиновым синим, обладающим собственной флуоресценцией. Из образцов свода черепа, содержащих дефект, изготавливали шлифы по стандартному протоколу, которые подвергались морфометрическому исследованию с помощью флуоресцентной микроскопии.

В отличие от традиционных способов оценки роста костного регенерата на материале, взятом на различных сроках наблюдения, способ мечения тетрациклиноподобными флуорохромами в сочетании с окраской общепринятыми гистологическим красителями дает возможность наблюдать на одном шлифе зоны минерализованной костной ткани, образованной на разных сроках эксперимента, и остеоида. Это позволяет сократить число используемых животных или, в некоторых случаях, оценить динамику костной регенерации на одном объекте исследования. На данной модели нами разработан метод определения такого морфометрического параметра как скорость минеральной аппозиции для оценки костной ткани регенерата. Предложен способ вычисления 3D параметров, характеризующих весь регенерат в пределах любого дефекта цилиндрической формы из 2D характеристик с помощью выведенного нами коэффициента, индивидуального для каждого шлифа.

Ключевые слова: гистоморфометрия, критический дефект кости, цилиндрический дефект, флуорохромы, тетрациклины, мечение, флуоресценция красителя, регенерация

Модели критических дефектов кости используют для изучения эффективности и безопасности различных остеопластических материалов, клеточных продуктов и новых технологий для костной пластики [1, 4, 9, 10]. Для оценки регенерации кости применяются рентгенологические [12] и гистологические методы исследования, которые позволяют определить объем и площадь, занимаемую костной тканью в регенерате. Динамику роста костного регенерата традиционно изучают на материале, взятом на разных сроках наблюдения, что требует использования большого количества животных.

Предлагаемый нами метод изучения скорости роста костной ткани основан на использовании флуоресцентных тетрациклиноподобных меток и флуоресценции красителей.

Флуоресценция тетрациклинов в костной ткани описана R. A. Milch et al. в 1958 году, после чего методика была модифицирована для мечения фронта минерализации [2, 5, 7]. Суть данного метода заключается в том, что тетрациклины, попадая в организм, образуют хелатные соединения с ионами кальция, что обеспечивает их накопление в местах минерализации костной ткани [8].

В процессе дальнейшей минерализации кости связанные с кальцием тетрациклины «замуровываются», и таким образом происходит отложение тетрациклиновых меток. Под воздействием ультрафиолетового излучения тетрациклины флуоресцируют – излучают фотоны видимого светового спектра. Каждый тетрациклиноподобный флуорохром излучает видимый свет определенной длины волны, то есть определенного цвета, что позволяет дифференцировать метки. Ме-

чение разными метками на различных сроках остеогенеза характеризует образование в конкретный момент времени. Для морфологической оценки костного регенерата такой способ выглядит крайне привлекательным, давая возможность получить качественную и количественную информацию о динамике роста костной ткани на разных сроках ее образования у одного и того же объекта исследования. В данной работе мы основывались на общепринятой системе гистоморфометрии костной ткани [3]. Целью нашей работы было 1) определить возможности использования тетрациклиноподобных флуорохромов и гистологических красителей в изучении динамики развития костного регенерата и 2) адаптировать существующие рекомендации гистоморфометрии для оценки регенерации костной ткани на модели критического дефекта теменных костей.

Методическая часть

Экспериментальная модель. Исследование выполняли на модели критического дефекта теменных костей крыс. Шести крысам-самцам линии Спрейг-Дуули массой 350 г под комбинированным внутримышечным наркозом (Золетил/Рометар) производили поперечный разрез кожи головы, последовательно тупым и острым путем обнажали теменные кости. Посередине саггитального шва на теменных костях круглым трепаном диаметром 5 мм формировали отверстие до твердой мозговой оболочки, после чего рану послойно ушивали. Животные были разделены на 3 группы в соответствии с тремя вариантами флуоресцентного мечения. В 1-й группе для двух крыс в качестве первого флуорохрома был выбран доксициклин – наиболее яркий флуорохром, который может быть также использован в клинике, в качестве второго – ализариновый красный С, один из наиболее популярных и ярких флуорохромов, используемых в доклинических исследованиях. Во 2-й группе для двух крыс первым флуорохромом был выбран ализарин, вторым – доксициклин. При выборе флуорохромных меток учитывалась их совместимость [11]. В послеоперационном периоде на 8-й, 9-й и 10-й день крысам делали внутримышечные инъекции раствора первого флуорохрома в дозировке 25 мг/кг массы тела. Через 4 дня, на 15-й, 16-й и 17-й день эксперимента, крысам вводили раствор второго флуорохрома в той же дозировке. В 3-й группе двум крысам флуорохромы не вводили, но для визуализации новообразованной костной ткани использовали окраску срезов толуидиновым синим. На 28-й день эксперимента крыс выводили из эксперимента пятитикратной передозировкой наркотика Золетил/Рометар. Далее забирали костный фрагмент свода черепа, который фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24 часов. После фиксации образцы промывали в проточной воде, обезживали в восходящих спиртах (этанол), пропитывали метилметакрилатом, который затем полимеризовали в блок.

Рентгенологическое исследование. С полученных блоков делали прицельные рентгеновские снимки (радиовизиограф Owandy Elios AC, датчик Krystal-X Easy).

Приготовление шлифов. С учетом рентгенологической картины определялась плоскость, параллельно которой выполняли гистологические срезы (рис. 1 А). Она располагалась перпендикулярно поверхности теменных костей как диаметр окружности дефекта, проходящего через наибольшее по ширине место новообразованной костной ткани (рис. 1 Б). Срезы толщиной 200 мкм изготавливали с помощью ленточной пилы (Jet, Швейцария) и шлифовали до толщины 50–60 мкм под контролем микрометра. Срезы, полученные в 3-й группе, освобождали от метилметакрилата в специальном сольвенте (Sigma-Aldrich Osteo-Bed) и окрашивали толуидиновым синим.

Морфологическое исследование. С помощью люминесцентной микроскопии (микроскоп Carl Zeiss Axioplan 2 (Германия) и Биомед 6 (Корея) с использованием возбуждающего источника света с длиной волны 410 нм и запирающего светофильтра 510–650 нм в 1-й и 2-й группе визуализировали флуорохромное свечение новообразованной костной ткани желто-зеленого (доксициклин) и красного (ализарин) цвета. В 3-й группе толуидиновый синий, которым был окрашен срез, флуоресцировал оранжевым цветом. Толуидиновый синий окрашивает остеоид и мягкие ткани, но не окрашивает минерализованную костную ткань, поэтому, смешиваясь с естественной зеленой автофлуоресценцией костной ткани, остеоид при флуоресцентной микроскопии светился желто-зеленым цветом (рис. 2). Полученные изображения с каждого среза соединяли в одно изобра-

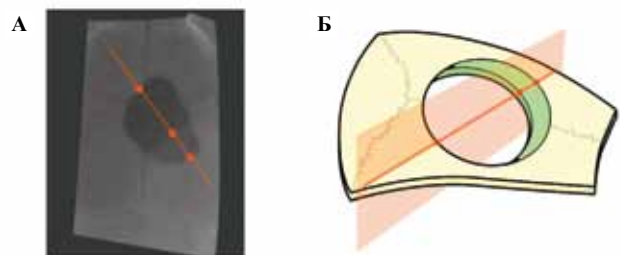


Рис. 1. Определение положения плоскости, относительно которой выполнялись гистологические срезы. Зеленым цветом обозначена новообразованная костная ткань

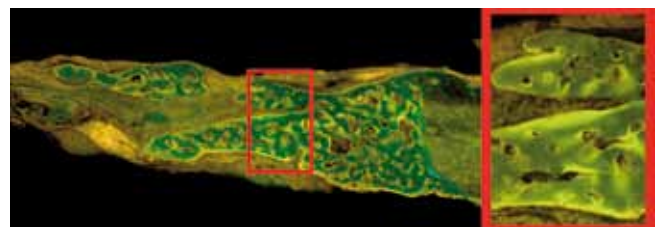


Рис. 2. Шлиф недеминерализованного препарата (3-я группа), окрашенного толуидиновым синим. Люминесцентная микроскопия (Axioplan 2)

жение целого среза с помощью программы Adobe Photoshop CS4 (США) (рис. 3). Благодаря использованной схеме введения флуорохромов в 1-й и 2-й группах стало возможным полностью окрасить всю образовавшуюся в первые 14 дней минерализованную костную ткань первым флуорохромом, а с 15-го по 28-й день – вторым флуорохромом (рис. 4). Это позволило более эффективно выделить и измерить интересующие нас площади новообразованной минерализованной костной ткани, соответствующие каждому временному интервалу. Далее с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США) на полученных изображениях измеряли периметр, длину и площадь каждой флуоресцентной метки отдельно. Дополнительно измеряли площадь дефекта черепа. Данные вводили в программу по работе с таблицами пакета OpenOffice. С помощью автоматизированной таблицы Excel значения площади и периметра пересчитывали в метрические размеры.

Для оценки регенерата мы использовали общепринятые гистоморфометрические параметры [3], для 1-й и 2-й группы.

- T.Ar – площадь дефекта кости. Все площади и периметры, для определения других параметров, измеряли только в области T.Ar (рис. 5), поскольку нашей целью было оценить характеристики регенерата, заполняющего непосредственно дефект. Такой подход облегчает стандартизацию метода.
- Md.Pm.1 – периметр минерализации внешней поверхности первой метки.
- Md.Pm.2 – периметр минерализации внешней поверхности второй метки.
- Md.Ar.1 – площадь минерализованной костной ткани, содержащей первую метку.

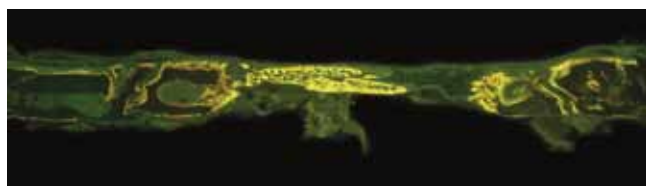


Рис. 3. Шлиф недеминерализованного препарата (2-я группа). Первый флуорохром – ализарин (красное свечение), второй – доксициклин (желтое свечение). Люминесцентная микроскопия (Биомед 6)



Рис. 4. Шлиф недеминерализованного препарата (1-я группа). Первый флуорохром – доксициклин (желтое свечение), второй – ализарин (красное свечение). Люминесцентная микроскопия (Биомед 6)

- Md.Ar.2 – площадь минерализованной костной ткани, содержащей вторую метку.
- Md.Pm.1 – периметр минерализованной костной ткани, образованной в первые 14 дней, соответствует первой метке.
- Md.Pm.2 – периметр минерализованной костной ткани, образованной в последние 14 дней, соответствует второй метке.
- $d_{(MAR)}$ – длина отрезка, для определения уровня минеральной аппозиции (MAR, характеризующего линейную скорость образования минерализованной костной ткани) (рис. 5). Этот параметр рассчитывали по методике, отличающейся от существующей общепринятой [6]. Скорость минеральной аппозиции по Фросту определяется как среднее арифметическое длин (d) четырех кратчайших отрезков, проведенных между центрами флуоресцентных меток, деленное на время, соответствующее каждой метке (рис. 6). При нанесении критического дефекта теменных костей крыс на гистологических срезах наблюдается треугольный фронт регенерата в отличие от трапециевидного, описываемого Фростом. Кроме того, окраска флуорохромами костной ткани в нашем случае была сплошной: первый флуорохром полностью окрашивал всю минерализованную костную ткань, образованную до 14-го дня эксперимента, второй окрашивал всю минерализованную костную ткань, образованную с 15-го по 28-й день эксперимента. Вследствие этого измерение уровня минеральной аппозиции в нашем случае заключалось в следующем: от основания треугольника до его вершины откла-



Рис. 5. Определение 2D параметров на полученном срезе критического дефекта теменной кости. Первая метка показана желтым цветом, вторая – оранжевым



Рис. 6. Отличие способа определения минеральной аппозиции по Фросту (слева) от используемого нами (справа)

дывался кратчайший отрезок с каждой из сторон дефекта, их величина суммировалась, в результате получалось значение, соответствующее $d_{(MAR)}$. Измерения проводили на каждом срезе, после чего вычисляли среднее арифметическое (μ) всех $d_{(MAR)}$ в дефекте, которое делили на число дней, в течение которых флуорохром накапливался в новообразованной костной ткани, что давало значение MAR. Поскольку в этом случае вычисление MAR требовало измерений на всех срезах дефекта, мы умышленно отнесли его к 3D параметрам.

Фактор коррекции [6] не применяли в связи с тем, что серийные срезы свода черепа выполняли по стандартизированному протоколу.

Все полученные исходные параметры использовали для расчета следующих величин.

- $Md.Ar.nb$ – площадь всей минерализованной новообразованной костной ткани ($Md.Ar.nb = Md.Ar.1 + Md.Ar.2$).
- $MFR.1$ – уровень минерального образования, соответствует объему минерализованной костной ткани, образованной за один день в период с 1-го по 14-й день ($MFR.1 = Md.Ar.1 / 14$).
- $MFR.2$ – уровень минерального образования, соответствует объему минерализованной костной ткани, образованной за один день в период с 15-го по 28-й день ($MFR.2 = Md.Ar.2 / 14$).
- $MFR.nb$ – уровень минерального образования, соответствует объему минерализованной костной ткани, образованной за один день на период всего эксперимента, то есть с 1-го по 28-й день ($MFR = Md.Ar.1 + Md.Ar.2 / 28$) – соответствует арифметическому среднему значению параметров $MFR.1$ и $MFR.2$.

Для характеристики регенерата в 3-й группе мы использовали следующие параметры.

- $Md.Ar$ – площадь минерализованной новообразованной костной ткани.
- $O.Ar$ – площадь неминерализованной костной ткани, остеоида, окрашенного толуидиновым синим.
- $Md.Pm$ – периметр минерализации.
- $O.Pm$ – периметр остеоида.
- $T.Ar$ – площадь дефекта кости.
- $d_{(MAR)}$ – длина для определения минеральной аппозиции, измеряется так же, как в двух других группах.
- $d_{(OAR)}$ – длина для определения аппозиции остеоида, измеряется аналогично $d_{(MAR)}$.

Вычисление множителя, необходимого для перевода плоскостных параметров в объемные. Все перечисленные выше параметры, использованные для описания каждого среза в отдельности, являются плоскостными (2D). Чтобы получить сведения о характере всего регенерата в области дефекта, необходимо перевести полученные 2D параметры в объемные (3D). Принимая во внимание развитие компьютерных технологий, исследователю не составит особого труда опе-

рировать сложными формулами для расчета объемных параметров – усложнение вычислений необходимо для повышения точности получаемых результатов. С повышением точности, в свою очередь, станет возможным выявлять даже незначительные отличия характера регенерата в разных исследовательских группах.

Для перевода плоскостных данных с каждого среза в объемные мы предлагаем использовать особый индивидуальный для каждого среза коэффициент (k_n), вычисление которого дано ниже.

Пространство дефекта представляет собой цилиндр. Его высота не изменяется на протяжении всего дефекта, что связано с практически одинаковой высотой теменной кости в этой области. Основание цилиндра представляет собой круг, математическое описание которого поможет нам вывести необходимый коэффициент (рис. 7 А).

Формула окружности $(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2 = R^2$ – в декартовой системе координат не является графиком функции, поэтому может быть описана как объединение графиков функций:

$$y = y_0 \pm \sqrt{R^2 - (x - x_0)^2},$$

где точка (x_0, y_0) – центр окружности (рис. 7 Б).

Поскольку количество срезов и их толщина будут представлены положительным числом и удобнее высчитываются через значение по оси X, перенесем окружность в новую систему координат. Формула окружности примет вид:

$$y = \pm \sqrt{R^2 - (x - R)^2},$$

или упрощенный (рис. 7 В)

$$y = \pm \sqrt{2Rx - x^2}.$$

Хорды (L) на рисунке 7 В соответствуют параллельным разрезам, выполняемым с помощью микро-тома либо специальных пил. Круг – фигура радиально симметричная. Площадь и периметр верхней и нижней его половин равны друг другу. Поскольку все разрезы должны выполняться параллельно, соответствующие хорды тоже будут параллельны – расположим все хорды перпендикулярно оси X (рис. 7 в). Тогда ось X будет делить каждую хорду пополам и длина каждой хорды будет равна значению координаты y точки, принадлежащей верхней половине окружности и хорде, длину которой необходимо вычислить. Отсюда следует, что длину хорды, площадь и периметр удобнее вычислить через функцию «двойной полуокружности»:

$$y = 2\sqrt{2Rx - x^2},$$

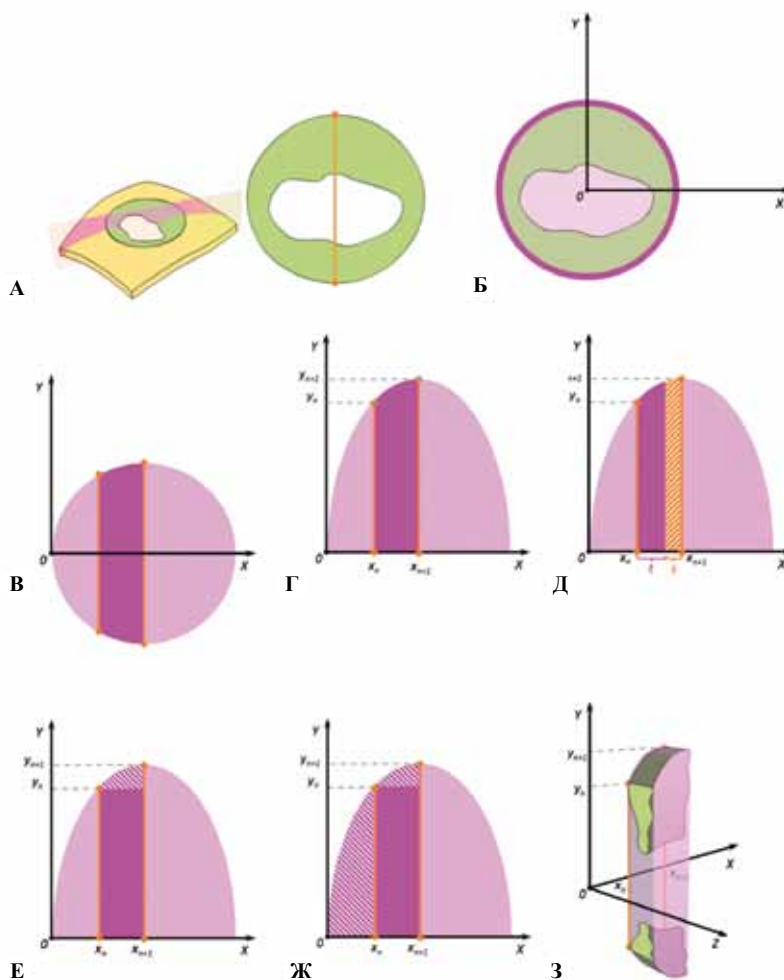


Рис. 7. Вычисление множителя, необходимого для пересчета 2D параметров в 3D.

где значение y равно длине соответствующей хорды L :

$$y_n = L_n = 2\sqrt{2Rx_n - x_n^2} \text{ (рис. 7 Г).}$$

$$x_n = \frac{2Rn}{N},$$

$$x_{n+1} = \frac{2R(n+1)}{N},$$

Теперь в получившейся формуле любые значения x и y будут положительными.

Для расчетов нужно знать, где именно в пространстве нашей системы координат проходят разрезы. Другими словами, необходимо вычислить значения x для разреза в начале полученного среза – x_n и для его конца, то есть начала следующего за ним среза – x_{n+1} .

Значения x_n и x_{n+1} будут высчитываться двумя разными способами, в зависимости от техники получения среза.

1. Если используется микротом или пила со строго определенным фиксированным шагом реза и толщина каждого среза равна друг другу, рациональнее применить следующий способ вычисления x_n и x_{n+1}

где R – радиус окружности, n – номер среза по порядку, N – общее количество срезов.

2. Если применяется микротом или пила с нестандартизированным шагом реза, следует применять следующие формулы:

$$x_n = R + \sqrt{R^2 - \left(\frac{Yn}{2}\right)^2} -$$

выведено из формулы «двойной полуокружности»;

$$x_{n+1} = x_n + t + s,$$

где t – толщина среза, s – толщина пропила (рис. 7 Д).

Теперь, зная способы вычисления всех переменных, стало возможным перейти к вычислению индивидуального коэффициента. Находят коэффициент следующим способом. Площадь участка круга, ограниченная x_n и x_{n+1} , нужно разделить на площадь прямоугольника, ограниченного x_n , x_{n+1} и y_n . (рис. 7 Е).

Площадь участка круга:

$$S_o = \int_{x_n}^{x_{n+1}} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx.$$

Площадь прямоугольника:

$$S_n = (x_n - x_{n+1}) \times y_n.$$

Напомним, что

$$y_n = \sqrt{2Rx_n - x_n^2}.$$

Таким образом, чтобы перевести плоскостной параметр, измеренный на срезе, в объемный, следует умножить его на следующий коэффициент (k_n):

$$k_n = (x_n - x_{n+1}) \times \frac{\int_{x_n}^{x_{n+1}} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx}{(x_n - x_{n+1})\sqrt{2Rx_n - x_n^2}}$$

или, упростив выражение:

$$k_n = \frac{\int_{x_n}^{x_{n+1}} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx}{\sqrt{2Rx_n - x_n^2}}$$

Итак, нами выведен необходимый множитель. Однако ясно, что первый срез окажется неинформативным, так как будет содержать лишь самую «горбушку дефекта» (рис. 7 Ж, рис. 8), поэтому его необходимо отбросить, представить как нулевой по порядку, а первым считать следующий по счету (число n в представленной выше формуле). Первый срез будет определять распределение регенерата в области от нулевого до второго

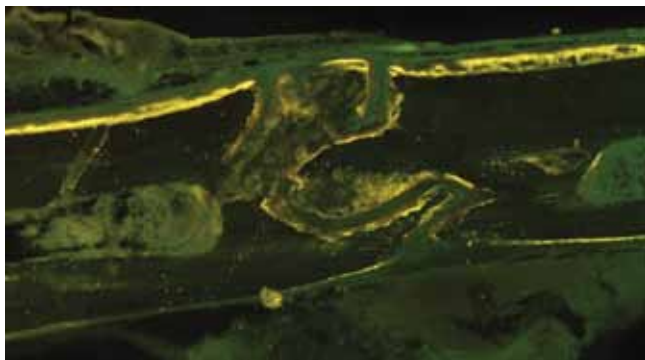


Рис. 8. Шлиф недеминерализованного препарата, полученного в 1-й группе. Самый первый срез, захватывающий край дефекта. В процессе приготовления шлифа пространство, содержащее регенерат, практически полностью сошлифовано. Люминесцентная микроскопия (Биомед 6)

среза ($x_0 - x_1$). (рис. 7 Ж). Множитель для первого среза (k_1) позволит описать пространство для нулевого и первого срезов и примет вид:

$$k_1 = \frac{\int_0^{x_1} 2\sqrt{2Rx - x^2} dx}{\sqrt{2Rx_1 - x_1^2}}$$

Требования для выполнения шлифов. Предоставленная модель вычисления может быть выполнена только с применением определенных требований к получаемым шлифам.

1. Срезы для приготовления шлифов должны выполняться последовательно, в параллельных плоскостях.

2. При изготовлении тонкого шлифа сошлифовывание выполняется в одном направлении, в сторону переднего края каждого среза.

3. Полученные препараты во время обработки не должны деформироваться, чтобы не исказить истинные показатели объема дефекта и объема регенерата. По этой причине шлифы не нужно освобождать от пластика (в нашем случае ПММА) (рис. 9).

Пересчет плоскостных параметров в объемные. Используя выведенный коэффициент для 1-й и 2-й групп, объемные параметры вычисляли следующим образом.

- MAR.1 – уровень минеральной аппозиции в первые 14 дней: вычислялся описанным ранее способом, как арифметическое среднее $d_{(MAR,1)}$ со всех срезов дефекта, деленное на число дней мечения первым флуорохромом (в нашем случае 14 дней) ($\mu(d_{(MAR,1)}) / 14$). (Знаком μ обозначается арифметическое среднее.)
- MAR.2 – уровень минеральной аппозиции в первые 14 дней: вычислялся описанным ранее способом, как арифметическое среднее $d_{(MAR,1)}$ со всех срезов дефекта, деленное на число дней мечения вторым флуорохромом (в нашем случае 14) ($\mu(d_{(MAR,1)}) / 14$).
- MAR.nb – уровень минеральной аппозиции в течение всего времени эксперимента: вычислялся как арифметическое среднее суммы $d_{(MAR,1)}$ и $d_{(MAR,2)}$ со всех срезов дефекта, деленное на число дней эксперимента (в нашем случае 14) ($\mu(d_{(MAR,1)}) / 14$).
- MV.1 – объем минерализованной новообразованной костной ткани в первые 14 дней во всем дефекте. Является параметром пересчета 2D ин-

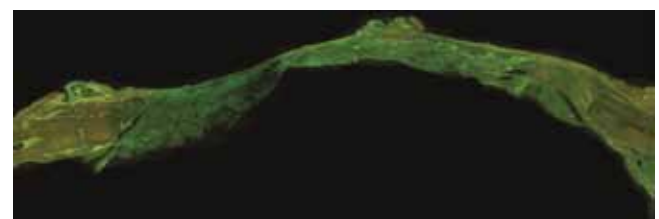


Рис. 9. Деформация препарата, освобожденного от пластика после заключения под покровное стекло. Препарат окрашен толуидиновым синим, получен от 1-й группы (Аxioplant 2)

формации в 3D. Вычисляется через определенный ранее множитель, индивидуальный для каждого среза, $-k_n$. Чтобы найти MV.1, необходимо умножить параметр Md.Ag.1 на k_n , полученные с каждого среза, после чего сложить полученные со всех срезов значения. Напомним, что для первого среза множитель k определяется иначе, чем в остальных случаях (см. k_1). (рис. 4 3).

- MV.2 – объем минерализованной новообразованной костной ткани в последние 14 дней. Вычисляется через Md.Ag.2, аналогично MV.1.
- MV.nb – объем минерализованной новообразованной костной ткани в последние 14 дней. Вычисляется через Md.Ag.nb, аналогично MV.1, или как сумма MV.1 и MV.2 ($MV.nb = MV.1 + MV.2$).
- MFR.1 – уровень минерального образования, соответствует объему костной ткани, образованной за один день в период с 1-го по 14-й день ($MFR.1 = MV.1 / 14$).
- MFR.2 – уровень минерального образования, соответствует объему костной ткани, образованной за один день в период с 14-го по 28-й день ($MFR.1 = MV.2 / 14$).
- MFR.nb – уровень минерального образования, соответствует объему костной ткани, образованной за один день в период с 1-го по 28-й день ($MFR.nb = MV.nb / 28$).
- Md.S.1 – минерализованная поверхность. Определяет площадь поверхности минерализованной костной ткани на момент 14-го дня эксперимента. Является параметром пересчета 2D информации в 3D. Вычисляется через определенный ранее множитель, индивидуальный для каждого среза, $-k_n$. Чтобы найти Md.S, необходимо умножить параметр Md.Pm.1 на k_n , полученные с каждого среза, после чего сложить полученные со всех срезов значения. Напомним, для первого среза множитель k определяется иначе, чем в остальных случаях (см. k_1).
- Md.S.2 – минерализованная поверхность. Определяет площадь поверхности минерализованной костной ткани на момент 28-го дня эксперимента. Вычисляется через Md.Pm.2, аналогично Md.S.1.
- TV – объем дефекта кости. Вычисляется через T.Ag, аналогично MV.1.

Для 3-й группы вычисление объемных параметров проводили следующим образом.

- MAR – уровень минеральной аппозиции за все 28 дней эксперимента: вычислялся описанным ранее способом, как арифметическое среднее $d_{(MAR)}$ со всех срезов дефекта, деленное на число дней эксперимента (в нашем случае 28 дней) ($\mu(d_{(MAR)}) / 28$).
- OAR – уровень аппозиции остеоида, вычисляется аналогично MAR ($\mu(d_{(OAR)}) / 28$).
- MFR – уровень минерального образования, соответствует объему костной ткани, образованной за один день в период с 1-го по 28-й день ($MFR = MV / 28$).

- OFR – уровень образования остеоида, соответствует объему неминерализованной костной ткани, образованной за один день в период с 1-го по 28-й день к 28-му дню ($MFR = MV / 28$).
- Md.V – объем минерализованной новообразованной костной ткани в последние 14 дней. Вычисляется через Md.Ag, аналогично MV.1 для первых двух групп.
- OV – объем остеоида в последние 14 дней. Вычисляется через O.Ag, аналогично MV.1 для первых двух групп.
- Md.S – минерализованная поверхность. Определяет площадь поверхности минерализованной костной ткани на момент 28-го дня эксперимента. Вычисляется через Md.Pm, аналогично Md.S.1 в первых двух группах.
- OS – поверхность остеоида. Определяет площадь поверхности минерализованной костной ткани на момент 28-го дня эксперимента. Вычисляется через O.Pm, аналогично Md.S.1 в первых двух группах.

Используя в итоге полученные 3D параметры, становится возможным оценить полученную информацию с помощью определенных индексов [3], которые определяют качественную характеристику регенерата.

Проведенное нами исследование показало успех использования метода мечения тетрациклиноподобными флуорохромами при определении скорости образования костной ткани в разные сроки на одном объекте исследования. Этот метод позволяет сократить число используемых животных или, в некоторых случаях, оценить динамику костной регенерации на одном объекте исследования. В свою очередь, флуоресцентные красители позволяют дифференцировать остеоид и заполнить подсчет соответствующих гистоморфометрических параметров. Очевидно, что при соответствующем подборе цветов флуоресценции меток и красителя возможно их комбинированное применение, что позволит получить больший объем информации с одного препарата. Несмотря на то, что тетрациклины обладают сравнительно низкой флуоресценцией (дозировки для человека значительно ниже) [11], они незаменимы при сопоставлении результатов между доклиническими и клиническими исследованиями, поскольку могут быть введены человеку, в то время как такие популярные вещества как кальцеин, ализарин, гематопорфирин и другие пригодны исключительно для экспериментов на животных.

Выведенный нами коэффициент может применяться при гистоморфометрии любого участка цилиндрической формы. При современном уровне развития персональных компьютеров и их интеграции в повседневную практику вычисления с помощью такого коэффициента не составляют большого труда. В нашем случае при использовании подготовленной таблицы Excel пересчет 2D параметров в 3D выполнялся в течение не более одной минуты с учетом внесения необходимых данных.

Выводы

1. Нами показана возможность оценки регенерата в области критического дефекта теменных костей с помощью тетрациклиноподобных меток и флуоресценции после окрашивания препарата.

2. Пересмотрены способы и даны методические указания для получения такого морфометрического параметра как скорость минеральной аппозиции (MAR) для оценки регенерата на модели критического дефекта теменных костей.

3. Предложен способ вычисления 3D параметров, характеризующих весь регенерат в пределах дефекта цилиндрической формы, из 2D с помощью выведенного нами коэффициента.

Литература

1. Устранение критических костных дефектов с помощью биоинженерной конструкции на нерезорбируемой полимерной основе с использованием аутогенных мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани / А.А. Кулаков и др. // *Стоматология*. 2010. № 3. С. 9–12.
2. Baud C.A., Dupont D.H. Histologie intrastructurale sur la bi-fluorescence du tissu, osseux tonitée par les tétracyclines / C.A. Baud, D.H. Dupont // *C R Séances Acad Sci*. 1962. N 254. P. 3129–30.
3. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee / A.M. Parfitt et. al. // *J Bone Miner Res*. 1987. V. 2. N 6. P. 595–610.
4. Effects of fibrin-binding oligopeptide on osteopromotion in rabbit calvarial defects / J.A. Lee et al. // *J Periodontal Implant Sci*. 2010. V. 40. N. 5. P. 211–9.
5. Frost H.M. Tetracycline labeling of bone and the zone of demarcation / H.M. Frost // *Can J Biochem*. 1962. N 40. P. 485–9.
6. Frost H.M. Histomorphometry of trabecular bone. I. Theoretical correction of appositional rate measurements. In: P.J. Meunier, ed. *Bone histomorphometry. 2nd International Workshop* / H.M. Frost // Toulouse, France: Société de la Nouvelle Imprimerie Fournié, 1976. P. 361–70.
7. Harris W.H. The in vivo distribution of tetracycline in canine bone / W.H. Harris, R.H. Jackson, J. Jowsey // *J Bone Jt Surg [Am]*. 1962. N 44. P. 1308–20.
8. Ibsen K.H. Complexes of calcium and magnesium with oxytetracycline / K.H. Ibsen, M.R. Urist // *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962. N 109. P. 797–801.
9. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies / G. Pellegrini et al. // *J Dent Res*. 2009. V. 88. N 12. P. 1065–76.
10. Ray R.D. Bone implants / R.D. Ray, J.A. Holloway // *J Bone Joint Surg*. V. 39A. N 5. P. 1119, 1957.
11. Sun T.C. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information? / T.C. Sun et al. // *Bone*. 1992. V. 13. N 6. P. 443–6.
12. Takagi K. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects / K. Takagi, M.R. Urist // *Ann Surg*. 1982. V. 196. N 1. P. 100–9.

OF FLUORESCENT MARKERS FOR BONE REGENERATION ASSESSMENT ON THE MODEL OF CRITICAL PARIETAL BONE DEFECT RATS USING ADAPTED METHODS HYSTOMORPHOMETRY

A.V. Volkov, A.V. Vasiliev, O.A. Rachinskaya, G.B. Bolshakova, D.V. Goldstein

Rats of the Sprague-Dawley rats was applied to a critical defect parietal bones cylindrical shape with a diameter of 5 mm, and used fluorescent labeling doxycycline and alizarin, and toluidine blue staining of osteoid having intrinsic fluorescence. Of the samples of the skull containing the defect, thin sections were prepared by the standard protocol, which were subjected to morphometric study using fluorescence microscopy.

In contrast to the traditional way of evaluating the growth of bone regeneration on material taken at different periods of observation, the method of marking tetra-cyclinopodobnymi fluorochromes in combination with the color of conventional histological dyes makes it possible to observe a single thin section of mineralized zones bone formed at different stages of the experiment, and osteoid. This reduces the number of animals used, or in some cases, to assess the dynamics of bone regeneration at a research facility. In this model, we have developed a method for the determination of the morphometric parameters as mineral apposition rate to estimate the bone regenerate. We propose a method of calculating the 3D parameters that characterize the entire regenerate any defect within a cylindrical shape of the 2D features we have derived using the coefficient for each individual micro-section.

Keywords: hystomorphometry, a critical bone defect cylindrical defect, fluorochromes, tetracyclines, labeling, fluorescence dye regeneration

Информация об авторах

Волков Алексей Вадимович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник НИИ морфологии человека РАМН.
Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: morfolum@mail.ru

Материал поступил в редакцию 13 марта 2013 года.