

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

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

ISSN 2226-5988

№ 4 (8) / 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.б.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. Узбеки (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. Шварц (Тель-Авив, Израиль)

А.Н. Яцковский (Москва)

ПЕРЕДОВЫЕ СТАТЬИ EDITORIALS

О.В. Зайратьянц, И.Б. Манухин, А.Л. Тихомиров,
В.В. Казенасhev, К.В. Опаленов, Т.Г. Барсанова,
Т.Д. Алиева
Новый вид обратимых морфологических
изменений эндометрия (РАЕС – Progesterone
receptor modulator Associated Endometrial Changes)
при терапии лейомиом матки

4

O.V. Zayratyants, I.B. Manukhin,
A.L. Tikhomirov, V.V. Kazenashev,
K.V. Opalenov, T.G. Barsanova, T.D. Aliyeva
New kind of reversible morphological changes
of endometrium (PAEC – Progesterone Receptor
Modulator Associated Endometrial Changes)
in the therapy of uterine leiomyomata

КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ CLINICAL MORPHOLOGY

Н.С. Мельникова, Л.В. Адамян, О.В. Зайратьянц,
О.В. Козлова, Т.Г. Барсанова
Эпидемиология болезней эндометрия у женщин
пожилого и старческого возраста

13

N.S. Melnikova, L.V. Adamyan, O.V. Zayratyants, O.V.
Kozlova, T.G. Barsanova
Epidemiology of endometrial disease in elderly and
senile women

И.В. Василенко, Р.Б. Кондратюк, Б.Б. Брук
Морфологические особенности зоны
паренхиматозно-стромальных контактов
в раке легкого с эпителиально-мезенхимальной
трансформацией

18

I.V. Vasilenko, R.B. Kondratyuk, B.B. Bruk
Morphological features of the parenchymal-stromal
interaction zone in lung cancer
with epithelial-mesenchymal transition

О.В. Паклина, Г.Р. Сетдикова,
Е.Н. Гордиенко, А.И. Артемьев
Вариант внутрипротоковой опухоли
поджелудочной железы с тубулопапиллярным
ростом и скудной выработкой муцина

22

O.V. Paklina, G.R. Setdikova,
E.N. Gordienko, A.A. Artem'ev
Variant of intraductal neoplasms of the pancreas with
tbulopapillary pattern growth and scant production of
mucin

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

С.О. Абдулаева, Т.И. Хомякова, Е.Ю. Симонова,
И.С. Цветков, М.Т. Добрынина, О.В. Макарова,
А.Н. Яцковский
Сравнительная морфологическая,
бактериологическая и иммунологическая
характеристика индуцированного
декстрансульфатом натрия острого язвенного
колита у мышей Balb/c и C57BL/6

27

S.O. Abdulayeva, T.I. Khomyakova, E.Yu. Simonova,
I.S. Tsvetkov, M.T. Dobrynina, O.V. Makarova,
A.N. Yatskovskiy
Comparative morphological, bacteriological and
immunological characteristics of severe ulcerative
colitis induced by sodium dextran sulfate in Balb/c
and C57BL/6 mice

К.А. Артемьева, О.В. Калюжин, И.И. Степанова,
С.В. Назимова, М.Н. Болтовская
Морфофункциональная характеристика органов
иммунной системы и плаценты при аллогенной
беременности у мышей с высокой фертильностью
и мурамилдипептид-индуцированными абортами

34

K.A. Artemyeva, O.V. Kalyuzhin, I.I. Stepanova,
S.V. Nazimova, M.N. Boltovskaya
Morphofunctional characteristics of the immune
system and placenta in allogeneic pregnancy in mice
high fertility And muramyldipeptides - induced
abortion

П.Л. Гореликов
Нейроглияльные взаимодействия в механизмах
энергообеспечения симпатического ганглия

41

PL. Gorelikov
Cooperative interaction between neurons
and satellite glial cells in mechanisms of power supply
sympathetic ganglion

А.В. Макаров, И.В. Арутюнян, Т.Х. Фатхудинов,
А.В. Ельчанинов, Е.Ю. Кананыхина, П.А. Володина,
О.А. Васюкова, А.А. Ким, Е.Е. Кириенко,
Г.Б. Большакова
Влияние трансплантации мультипотентных
стромальных клеток пупочного канатика
на состояние ишемизированной мышечной ткани
конечностей крыс

45

A. V. Makarov, I. V. Arutyunyan, T.Kh. Fatkhudinov,
A. V. Elchaninov, E. Yu. Kananykhina, P.A. Volodina,
O.A. Vasyukova, A.A. Kim, E.E. Kiriienko,
G.B. Bolshakova
Effect of multipotent stromal cells of the umbilical
cord on the ischemic muscle tissue in rat limb

Н.В. Яглова
Индивидуальные особенности патогенеза
синдрома нетиреоидных заболеваний
при остром эндотоксикозе

53

N. V. Yaglova
Individual features of pathogenesis of nonthyroidal
illness syndrome in acute endotoxycosis

МЕТОДИКИ METHODS

И.И. Марков, В.И. Маркова,
Е.С. Петров, Е.В. Любаева
Импрегнационные методы выявления
инициального лимфатического русла

61

I.I. Markov, V.I. Markova, E.S. Petrov, E. V. Lyubayeva
Impregnation methods to reveal
initial lymphatic vessels

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

А.С. Халанский, Л.И. Кондакова
Перевиваемый штамм глиомы крысы 101.8 I.
Биологическая характеристика

63

A.S. Khalansky, L.I. Kondakova
Transplanted rat glioma 101.8.I.
Biological characteristics

И.С. Цветков, О.В. Макарова, В.А. Мхитаров
Структурно-функциональная характеристика
предстательной железы крыс

69

I.S. Tsvetkov, O. V. Makarova, V.A. Mkhitarov
Structural and functional characteristics
of prostate in rats

ОТЧЕТЫ

V Чтения памяти О.К. Хмельницкого
(Санкт-Петербург, 4-5 октября 2013 года)

75

25-й Европейский конгресс патологов

77

НОВЫЙ ВИД ОБРАТИМЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЭНДОМЕТРИЯ (РАЕС – PROGESTERONE RECEPTOR MODULATOR ASSOCIATED ENDOMETRIAL CHANGES) ПРИ ТЕРАПИИ ЛЕЙОМИОМ МАТКИ

*О.В. Зайратьянц, И.Б. Манухин, А.Л. Тихомиров, В.В. Казенашев,
К.В. Опаленов, Т.Г. Барсанова, Т.Д. Алиева*

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова»
Минздрава России, Москва

При терапии лейомиом матки улипристала ацетатом – препаратом из группы селективных модуляторов рецепторов прогестерона – в эндометрии развиваются специфические и обратимые изменения, получившие название РАЕС (Progesterone receptor modulator Associated Endometrial Changes, изменения эндометрия, ассоциированные с модулятором рецепторов прогестерона). Они самостоятельно регрессируют в течение нескольких недель после завершения курса терапии. Недостаточная информированность специалистов о морфологических проявлениях РАЕС может привести к ошибочной диагностике гиперплазии или эстрогениндуцированных изменений эндометрия при исследовании его биопсий либо операционного материала после гистерэктомии у пациенток с лейомиомами матки, пролеченных селективными модуляторами рецепторов прогестерона.

Ключевые слова: эндометрий, селективные модуляторы рецепторов прогестерона, улипристала ацетат

Селективные модуляторы рецепторов прогестерона (СМРП) – это новая перспективная группа лекарственных препаратов, предназначенных для терапии патологических процессов, развивающихся в прогестерончувствительных тканях, в частности лейомиом матки [3–10].

Рецепторы прогестерона имеют одинаковое строение в разных клетках и тканях и активируются лигандами, одними из которых являются СМРП [3, 4, 6–10, 12–15]. Различают две изоформы рецепторов прогестерона – RP-A и RP-B. С помощью моделей генного нокаута доказано, что изоформы рецепторов прогестерона могут играть различную роль в разных тканях и действие их лигандов, включая СМРП, зависит от соотношения в ядрах клеток экспрессии RP-A и RP-B, причем активация RP-B дает значительно более выраженный эффект. В определенных условиях, в ответ на связывание с агонистами или антагонистами прогестерона, RP-A действует как лигандозависимый трансдоминантный репрессор других стероидных рецепторов, включая RP-B, рецепторы эстрогенов, андрогенов, глюко- и минералокортикоидов. Активация

RP-B увеличивает, а RP-A, напротив, уменьшает восприимчивость тканей к эстрадиолу. Селективное блокирование RP-A приводит к повышению пролиферативной активности клеток эндометрия, опосредованной активацией RP-B [2, 7, 8].

Примером прогестеронзависимого патологического процесса является лейомиома матки. Около 90% клеток лейомиом экспрессирует рецепторы прогестерона (RP-A и RP-B), и он играет роль индуктора ее роста. В лютеальную фазу цикла экспрессия маркеров пролиферации и продукция факторов роста (EGF и т.д.) в клетках лейомиомы матки повышается, а активность апоптоза снижается [2]. Различные модуляторы рецепторов прогестерона (МРП) подавляют рост лейомиомы матки и могут приводить к ее регрессии [2, 13].

Семейство МРП представлено разными лигандами этих рецепторов и включает в себя агонисты прогестерона (сам прогестерон и прогестины), вещества со смешанным действием агонистов и антагонистов прогестерона (СМРП) и антагонисты прогестерона (антипрогестины или антигестагены, например мифепристон) [2–10]. В некоторых классификациях все три

группы веществ объединены в одно семейство СМРП. С этим трудно согласиться, так как принципиально важно различать СМРП и антагонисты прогестерона. Последние, даже в очень низких дозах, способны прерывать беременность. СМРП не вызывают прерывания беременности вследствие их тканеспецифического смешанного эффекта как антагонистов и агонистов прогестерона [3–10].

В 2012 году в Европе и России зарегистрирован новый препарат из группы СМРП – Эсмия® (торговое название улипристала ацетата, компания «Гедон Рихтер», Венгрия), характеризующийся тканеспецифическим смешанным эффектом антагониста и агониста прогестерона [3–10, 13, 21]. Он оказывает прямое антипролиферативное и проапоптотическое действие на клетки лейомиомы матки. Иммуногистохимические исследования уровня апоптоза в лейомиомах матки, удаленных после 3-месячной терапии улипристала ацетатом, в сравнении с тремя предоперационными инъекциями лейпрорелина (агониста гонадолиберина, 3,75 мг 1 раз в месяц) и с безадыювантными операциями, показали, что индекс апоптоза в группе улипристала ацетата составил 158,9, в группе агониста гонадолиберина – 27,5 и в безадыювантной контрольной группе – 2,0. В исследованиях *in vitro* обнаружена способность улипристала ацетата подавлять ангиогенез, снижая в лейомиоме экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), аденомедуллина и их рецепторов, а также снижать синтез коллагена, повышать деградацию экстрацеллюлярного матрикса вследствие повышения продукции матриксных металлопротеиназ и снижения их тканевых ингибиторов [3, 4, 9, 10, 13, 15].

Улипристала ацетат рекомендован для предоперационной терапии умеренных и тяжелых симптомов лейомиомы матки (прежде всего маточных кровотечений) у женщин репродуктивного возраста старше 18 лет (перорально 5 мг 1 раз в сутки в течение 3 месяцев). Проводимые в настоящее время исследования свидетельствуют, что в будущем этот препарат может занять самостоятельную терапевтическую нишу и лечь в основу органосохраняющего лечения лейомиом матки и, возможно, других гормонально зависимых заболеваний органов женской репродуктивной системы [9, 10].

Эффективность и безопасность лечения улипристала ацетатом продемонстрированы в многоцентровых рандомизированных двойных слепых плацебо контролируемых исследованиях пациенток пременопаузального возраста (от 18 до 50 лет) с крупными лейомиомами матки и обильными маточными кровотечениями (исследования PEARL I и II, где PEARL – это PGL 4001's [UPA's] Efficacy Assessment in Reduction of symptoms due to uterine Leiomyomata – PGL4001 [Улипристала ацетат] Оценка эффективности в уменьшении симптомов, вызванных лейомиомой матки) [9, 10].

У пациенток с лейомиомами матки доказана эффективность улипристала ацетата как в плане уменьшения

размеров миоматозных узлов, так и в прекращении маточных кровотечений. Лечение этим препаратом приводит к уменьшению менометроррагий и, нередко, аменорею уже в течение первых 7–10 дней терапии. Возобновление нормального менструального цикла происходит, как правило, в течение 4 недель после завершения курса лечения. Прекращение маточных кровотечений отмечено более чем у 90% пациенток с лейомиомой матки, при этом аменорея (до 82% больных) развивалась быстрее, чем при лечении лейпрорелином – агонистом гонадолиберина (соответственно, на 7-е и 21-е сутки). Это способствовало скорейшему восстановлению показателей уровней гемоглобина и железа в крови, что особенно важно в предоперационной подготовке такого контингента больных. Полагают, что при лечении улипристала ацетатом прекращение менометроррагий и развитие аменореи связано со специфическими и обратимыми изменениями эндометрия, хотя патогенез аменореи остается дискуссионным [9, 10].

Кроме того, улипристала ацетат после 3-месячного курса терапии оказывал более пролонгированный эффект в плане уменьшения размеров лейомиомы матки, по сравнению с достаточно быстрым возобновлением роста миоматозных узлов после окончания применения антигестагенов [9, 10, 17]. Он также уменьшает болевой синдром, способствует улучшению качества жизни и вызывает существенно меньшее число побочных реакций (горячие приливы, признаки резорбции костной ткани, депрессия и т.д.), в сравнении с агонистами гонадолиберина, что обусловлено, как полагают, главным образом сохранением продукции эстрогенов на уровне средней стадии фолликулярной фазы менструального цикла [3–10].

Улипристала ацетат действует непосредственно на рецепторы прогестерона в лейомиоме, эндометрии, гипофизе, подавляет овуляцию без значимого влияния на уровень продукции эстрогенов и глюкокортикоидов. Угнетая процессы пролиферации и усиливая апоптоз клеток лейомиомы матки, он не оказывает заметного эффекта на окружающий миометрий. Взаимодействуя с рецепторами прогестерона в аденогипофизе, он не влияет на продукцию пролактина и адренокортикотропного гормонов, но подавляет продукцию фолликулостимулирующего и лютеинизирующего гормонов, причем, в отличие, например, от лейпрорелина (агонист гонадолиберина), не снижает концентрацию эстрадиола в плазме крови ниже уровня, соответствующего средней стадии фолликулярной фазы менструального цикла (60–150 пг/мл) [3, 4, 9, 10, 13, 15].

Известно, что прогестерон оказывает протективное действие на эстрогениндуцированную пролиферацию эндометрия, а эндометрий является одной из основных тканей – мишеней для МРП, поэтому более или менее продолжительная терапия препаратами одной из групп МРП – антигестагенами – может быть причиной развития гиперплазии эндометрия. В рекомендациях по использованию антигестагенов их назначение обычно

ограничено молодыми больными с лейомиомами матки, но не в перименопаузе, когда риск развития гиперпластических процессов в эндометрии возрастает на фоне ановуляции [2, 7, 8].

В отличие от классических МРП, препараты из группы СМРП, в частности улипристала ацетат, модулируют активность рецепторов прогестерона (RP-A и RP-B) эпителия желез и клеток стромы эндометрия, а не блокируют их, как, например, антигестагены. В результате, в условиях сохраняющегося влияния эстрогенов на клетки эндометрия, не развивается его гиперплазия, а формируются специфические и обратимые морфологические изменения эндометрия с признаками смешанного эстрогенного (слабо выраженная пролиферация) и прогестагенного (секреторные изменения) влияния [3–13, 19–21].

Патогенез этих изменений эндометрия требует дальнейшего изучения, но, вероятно, механизмы действия улипристала ацетата и ряда других СМРП на эндометрий близки к описанным выше для лейомиомы матки. В их основе могут лежать антипролиферативный и проапоптотический эффекты, влияние на продукцию факторов роста на фоне сохраненного уровня продукции эстрогенов и других гормонов [5, 7, 8].

Изменения эндометрия, развивающиеся под влиянием улипристала ацетата и нередко при терапии другими СМРП, получили название РАЕС (Progesterone receptor modulators Associated Endometrial Changes, изменения эндометрия, ассоциированные с модулятором рецепторов прогестерона). Термин РАЕС был впервые предложен в 2006 году рабочей группой «СМРП и эндометрий» Национального института детского здоровья и развития человека в США [12, 17, 19–21].

Схожие изменения отмечены в части наблюдений при лечении и другими лекарственными препаратами этого класса [11, 16, 20]. В силу своей уникальности и класс-специфичности в 2012 году РАЕС авторизован Европейским медицинским агентством как новый самостоятельный вид обратимых изменений эндометрия, подробно описанный у пациенток с симптомными лейомиомами матки после 3-месячного курса терапии улипристала ацетатом (препаратом Эсмия®) и лежащий в основе преходящей аменореи [9, 10, 21].

Возникающие под действием улипристала ацетата изменения эндометрия (РАЕС) характеризуются следующими особенностями [12, 17, 19–21]: не развиваются под влиянием каких-либо лекарственных препаратов других классов и иных факторов; каждый из признаков РАЕС неспецифичен, но вместе они образуют новый уникальный вид морфологических изменений эндометрия; при морфологическом исследовании требуют проведения дифференциальной диагностики с эстрогениндуцированными изменениями и гиперплазией эндометрия; лежат в основе прекращения менометроррагии и обратимой аменореи; не представляют угрозу как в клиническом плане, так и в плане дальнейшего развития каких-либо патологических процессов

эндометрия; обратимы и быстро регрессируют после завершения курса терапии.

В основу современных представлений о РАЕС положены результаты исследований PEARL I и II [9, 10]. Морфологические проявления РАЕС обобщены в специальном руководстве для патологоанатомов, подготовленном в 2012 году А. Williams и М. Glant [21].

При анализе результатов терапии улипристала ацетатом пациенток с лейомиомами матки у 10–15% было выявлено развитие утолщения эндометрия (по данным МРТ и ультрасонографии) даже при сохранении нормального менструального цикла, которое регрессирует в пределах 6 месяцев после окончания лечения. Обнаружение утолщения эндометрия нередко служит причиной направления аспиратов или соскобов из полости матки на патогистологическое исследование, в ходе которого принципиально важно проводить дифференциальный диагноз между РАЕС, гиперплазией и эстрогениндуцированными изменениями эндометрия [9, 10, 16, 17].

Анализ результатов исследования изменений эндометрия при 3-месячном курсе терапии улипристала ацетатом больных с лейомиомами матки с маточными кровотечениями позволил выявить РАЕС примерно у 60% пациенток. Терапия прогестогеном (норэтистерона ацетат, 10 суток) после завершения курса лечения улипристала ацетатом мало влияла на развитие и регрессию РАЕС. Достоверного повышения частоты других изменений эндометрия (его гиперплазии и т.д.) не обнаружено. Не выявлен риск развития предопухолевых процессов или опухолей эндометрия [9, 10, 14, 17, 19–21].

Морфология РАЕС в ряде наблюдений сходна с гиперплазией или эстрогениндуцированными изменениями эндометрия, однако особенности архитектоники желез, изменений их эпителия, стромы и сосудов эндометрия образуют при РАЕС уникальную морфологическую картину [14, 19–21]. В определенной мере схожие изменения эндометрия как один из вариантов неполноценной стадии секреции и при применении некоторых МПР описаны ранее в России Н.И. Кондриковым [1]. Показано, что РАЕС является характерным и класс-специфическим изменением эндометрия, развивающимся под влиянием различных СМРП [11, 16, 20].

При РАЕС характерно нарушение расположения и строения желез. В большинстве наблюдений строение и взаимное расположение желез варьирует в пределах одного биоптата, причем многие из желез кистозно расширены. Могут преобладать извитые железы, иногда фестончатой, звездообразной формы, более соответствующие секреторной фазе, но встречаются также и единичные прямые с узким просветом. Кистозное расширение желез носит обычно диффузный характер, другие нарушения их формы – фокальный. В части наблюдений встречаются микроскопические фокусы скученного расположения желез, как правило, различного строения. Кистозно расширенные железы могут быть окружены «воротником» из плотно расположен-

ных стромальных клеток вытянутой формы, которые формируют перигландулярные фигуры типа водоворота. В просвете многих желез, в том числе кистозно расширенных, накапливается водянистый секрет [14, 17, 19–21].

При РАЕС эпителий желез выглядит неактивным, с редкими митозами; формируется картина нефизиологической стадии секреции. Хотя структура желез больше соответствует секреторной фазе, железистый эпителий обычно уплощенный кубический или призматический, без признаков или со слабо выраженной стратификацией ядер, с единичными митозами. Часть эпителиоцитов содержит в цитоплазме базальные вакуоли. Встречаются мерцательно-клеточная метаплазия эпителия и секреторный эпителий с признаками апокриновой секреции, особенно в кистозно расширенных железах. Апоптоз выражен слабо или умеренно, носит очаговый характер. Такие изменения эпителия позволяют отличать РАЕС от эстрогениндуцированных и гиперплазии эндометрия [14, 17, 19–21].

Для РАЕС типична строма с плотным расположением клеток, низкой пролиферативной активностью, без признаков периваскулярной децидуоподобной реакции. Могут встретиться очаги отека стромы. Липидсодержащие «пенистые» клетки не выявляются. Не характерны участки распада стромы [14, 17, 19–21].

РАЕС свойственна аномальная васкуляризация. Часто встречаются скопления артерий с утолщенными

ми стенками с гиперплазией гладкомышечных клеток, напоминающие клубки спиральных артерий, мелкая-чеистая сеть капилляров, тонкостенные эктатически расширенные сосуды. Фибриновые тромбы в сосудах не выявляются [14, 17, 19–21].

Важно также отметить, что артефициальные изменения при РАЕС включают главным образом инвагинацию желез, а также наличие фрагментов эндометрия, в которых участки стромы выстланы с обеих сторон эпителием, – признак наличия кистозно расширенных желез [14, 17, 19–21].

Таким образом, основные морфологические признаки РАЕС – это сочетание нарушения расположения и формы желез, более соответствующих по своему строению секреторной фазе, но с кистозным расширением многих из них, железистым эпителием, имеющим вид функционально малоактивного, стромой без предцидуальных изменений, аномальной васкуляризацией, отсутствием очагов распада. В результате формируется нефизиологическая секреторная картина, специфическая для эндометрия у пациенток, леченных улипристала ацетатом и нередко другими препаратами из группы СМРП [14, 17, 19–21] (рис. 1).

Патологоанатом, незнакомый с морфологией РАЕС, может ошибочно диагностировать эстрогениндуцированные изменения эндометрия или его гиперплазию, для которых также характерны нарушения структуры и расположения желез с кистозным расширением их

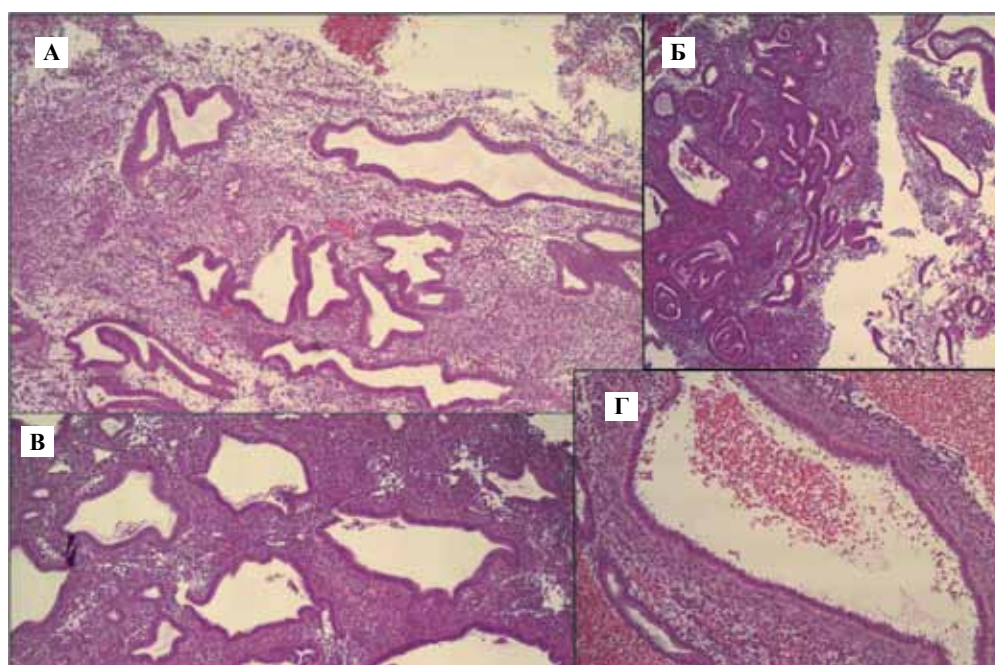


Рис. 1. А–Р. Морфологические изменения при РАЕС. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 60 - 400$.

Фотографии гистологических препаратов публикуются с разрешения A. Williams, M. Glant и Medical Information Service Preglem S.A., Geneva, Switzerland [21].

А–В – различная степень кистозного расширения желез, их фокальная скученность, строма без предцидуальной трансформации, с мелкочаеистой сетью капилляров, скопления артерий с утолщенными стенками.

Г – расширенная железа, выстланная секреторным эпителием, окруженная «воротником» из плотно расположенных стромальных клеток вытянутой формы (перигландулярные фигуры типа водоворота).

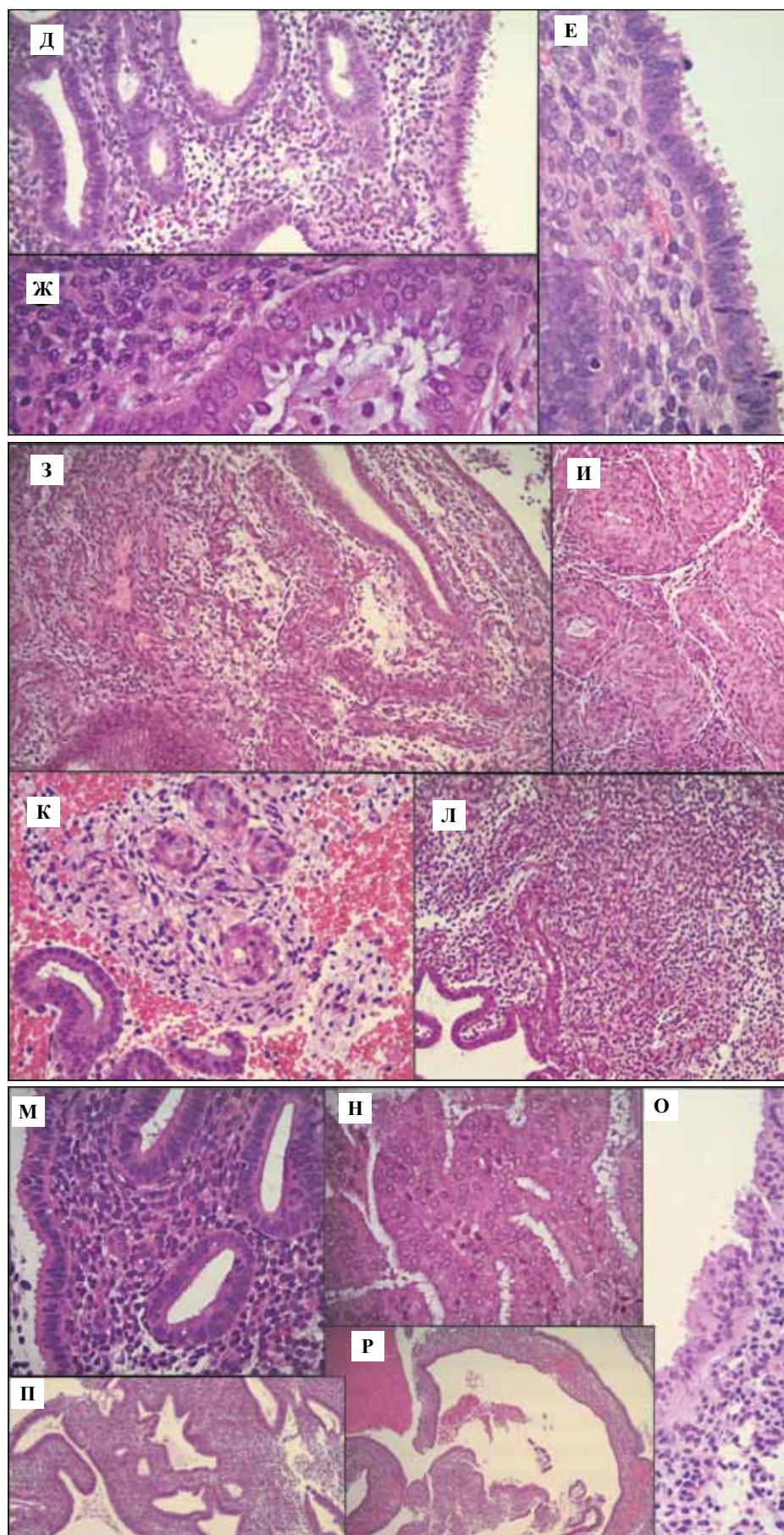


Рис. 1. (окончание)

Д–Ж – железы выстланы уплощенным кубическим и цилиндрическим неактивным или слабо секретирующим эпителием без стратификации ядер и фигур митозов.

З–Л – строма без предецидуальной трансформации, с мелкоячеистой сетью капилляров и артериол, скопления артерий с утолщенными стенками.

М – железистый эпителий неактивный или слабопролиферирующий (единичные фигуры митозов и апоптоза).

Н – мерцательно-клеточная метаплазия эпителия.

О – необычные секреторные изменения эпителия.

П–Р – в препаратах с артефициальными изменениями видны участки стромы, выстланные с обеих сторон эпителием, – признак наличия кистозно расширенных желез

Таблица

**Дифференциально-диагностические гистологические признаки РАЕС,
эстрогениндуцированных изменений эндометрия и его гиперплазии [20, 21]**

Гистологический признак	РАЕС	Эстрогениндуцированные изменения эндометрия	Гиперплазия эндометрия (сложная [комплексная])
Структура желез			
Кистозная дилатация	Обычно присутствует	Присутствует	Может отсутствовать, быть фокальной или диффузной
Нарушение формы (как при НПФ*)	Фокальное	Фокальное	Диффузное
Комплексное (компактное) расположение	Отсутствует	Фокальное	Диффузное
«Ветвящиеся» железы	Отсутствуют	Могут присутствовать	Присутствуют
Папиллярные структуры в просвете	Отсутствуют	Могут присутствовать	Присутствуют
Сближение (скупенность) желез	Отсутствует	Присутствует фокально (как при НПФ*)	Присутствует
Железисто-стромальное соотношение	Не нарушено	Не нарушено или фокально повышено (как при НПФ*)	Повышено
Эпителий			
Тип клеток	Уплотненные кубические	Высокие призматические	Высокие призматические
Стратификация ядер	Отсутствует	Присутствует	Присутствует
Митозы	Единичные	Обычно множественные	Множественные
Вакуолизация цитоплазмы (субнуклеарные вакуоли)	Обычно присутствует	Обычно отсутствует	Обычно отсутствует
Секреторная активность	Обычно отсутствует	Обычно отсутствует	Может присутствовать
Размеры ядер	Небольшие	Небольшие или среднего размера	Крупные
Форма ядер	Овоидная	Овоидная или округлая	Округлая
Ядрышки	Обычно не видны	Обычно видны	Видны
Ядерная атипия	Отсутствует	Отсутствует	Может присутствовать
Плоскоклеточная метаплазия («морулы»)	Отсутствует	Редко присутствует	Часто присутствует
Строма			
«Плотность»	Компактная	Может быть компактной или речной	Обычно компактная, может быть разреженной
Липидсодержащие («пенистые») клетки	Отсутствуют	Редко присутствуют	Присутствуют
Очаги распада	Отсутствуют	Присутствуют	Присутствуют
Фибриновые тромбы в сосудах	Отсутствуют	Присутствуют	Присутствуют

НПФ – нарушенная пролиферативная фаза, неупорядоченная пролиферация при эстрогенной стимуляции, характеризуется формированием фокусов скупенных желез с аномальной складчатостью, выстланных пролиферирующим высоким призматическим эпителием.

просвета [14, 17, 19–21]. Однако при эстрогениндуцированных изменениях эндометрия или его гиперплазии даже расширенные железы выстланы преимущественно пролиферирующим неуплощенным эпителием с признаками псевдостратификации и фигурами митозов. Эпителий большинства желез имеет вид, типичный для средней или поздней стадий фазы пролиферации. Главный признак РАЕС, помимо нарушения формы и размеров желез, – преобладание слабопролиферирующего уплощенного и малоактивного секреторного или индифферентного эпителия [14, 17, 19–21].

В части наблюдений нарушенной фазы пролиферации при эстрогенной стимуляции с преобладанием кистозно расширенных желез с низкой пролиферативной активностью эпителия при малом увеличении морфологическая картина близка к РАЕС, но слабо выраженные секреторные изменения эпителия и необычные изменения сосудов помогают верифицировать диагноз [14, 17, 19–21].

Дифференциально-диагностические гистологические признаки РАЕС, эстрогениндуцированных изменений эндометрия и его гиперплазии представлены в таблице и на рисунке 2.

В результате прямого действия на эндометрий улипристала ацетата и нередко других препаратов из группы СМРП в нем развиваются специфические и обратимые морфологические изменения, получившие название РАЕС (Progesterone receptor modulator Associated Endometrial Changes, изменения эндометрия, ассоциированные с модулятором рецепторов проге-

стерона). По-видимому, РАЕС являются характерным и класс-специфическим изменением эндометрия, развивающимся под влиянием различных СМРП. Они характеризуются нефизиологической секреторной картиной – сочетанием нарушения расположения и формы желез, более соответствующих по своему строению секреторной фазе, но с кистозным расширением многих из них, с железистым эпителием, имеющим вид функционально малоактивного, стромой без прецедуальных изменений, аномальной васкуляризацией, отсутствием очагов распада. РАЕС наблюдаются примерно у 60% пациенток с симптомными лейомиомами матки, леченных в течение 3 месяцев улипристала ацетатом (препарат Эсмия®, компания «Геден Рихтер», Венгрия). Изменения эндометрия обратимы и самостоятельно регрессируют в течение нескольких недель после завершения курса терапии. Недостаточная информированность специалистов о морфологических проявлениях РАЕС может привести к ошибочной диагностике эстрогениндуцированных изменений эндометрия или его гиперплазии при исследовании операционного материала после гистерэктомии или биопсий эндометрия у пациенток с лейомиомами матки, леченных СМРП. Причиной направления на патогистологическое исследование аспиратов или соскобов из полости матки может быть обнаружение преходящего утолщения эндометрия, которое диагностируется ультразвукографически или с помощью МРТ у 10–15% больных, получающих или прошедших курс терапии СМРП. Особую важность

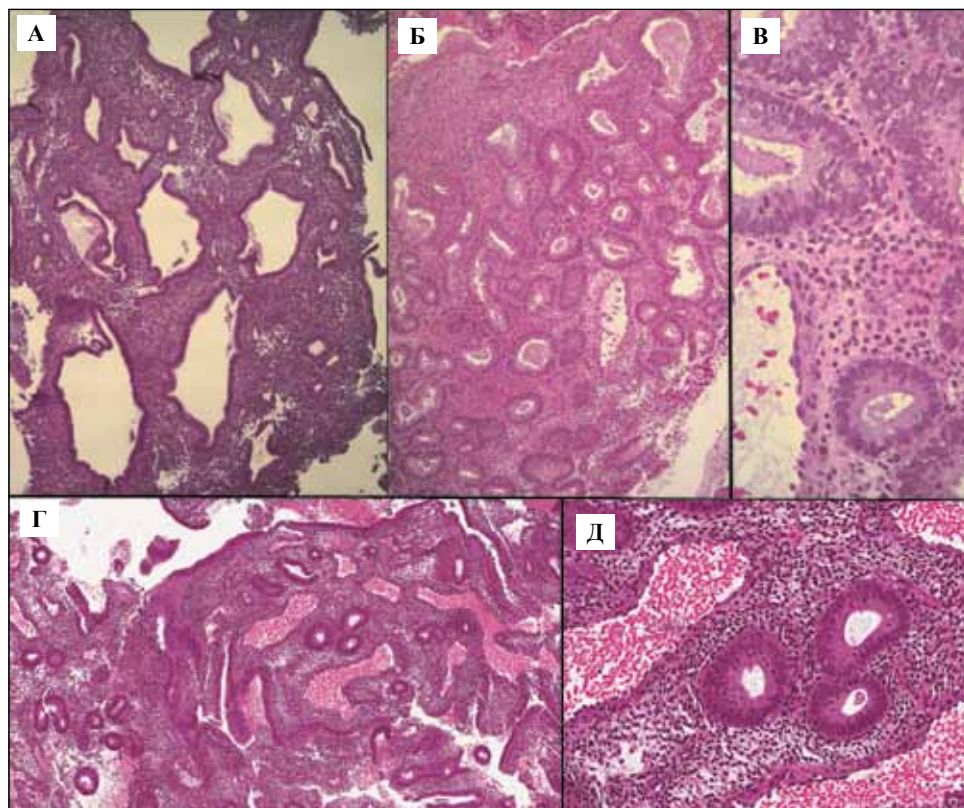


Рис. 2. А–Д. РАЕС (А), сложная (комплексная) гиперплазия эндометрия без атипии (Б, В) и эстрогениндуцированные изменения эндометрия (Г, Д). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 60 - 250$. Фотографии гистологических препаратов публикуются с разрешения A. Williams, M. Glant и Medical Information Service Preglem S.A., Geneva, Switzerland [21]

приобретает обязательное указание на терапию препаратами из группы СМРП, в частности Эсмия®, в бланках направлений биопсий эндометрия и операционного материала после гистерэктомии на патогистологическое исследование.

Литература

1. Кондриков Н.И. Патология матки (иллюстрированное руководство). М.: Практическая медицина, 2008. 344 с.
2. Тихомиров А.Л. Миома, патогенетическое обоснование органосохраняющего лечения. М., 2013. 319 с.
3. Attardi B.J., Burgenson J., Hild S.A. et al. CDB-4124 and its putative monodemethylated metabolite, CDB-4453, are potent antiprogesterones with reduced antiglucocorticoid activity: in vitro comparison to mifepristone and CDB-2914. *Mol. Cell Endocrinol.* 2002;188:111–23.
4. Attardi B.J., Burgenson J., Hild S.A., Reel J.R. In vitro antiprogesterone/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2004;88:277–88.
5. Bzenner A.M., Slayden O.O., Nath A. et al. Intrauterine administration of CDB-2914 (ulipristal) suppresses the endometrium of rhesus macaques. *Contraception.* 2010;81:336–42.
6. Chabbert-Buffet N., Mesuri G., Bouchard P., Spitz M. Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum. Reprod. Update.* 2005;11:293–307.
7. Chwalisz K., Brenner A.M., Fuhrmann U.U. et al. Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids.* 2000;65:741–51.
8. Chwalisz K., Perez M.C., DeManno D. et al. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr. Rev.* 2005;26: 423–38.
9. Donnez J., Tatarchuk T.F., Bouchard P. et al. Ulipristal acetate versus placebo for fibroid treatment before surgery. *N. Engl. J. Med.* 2012;366:409–20 (PEARL I).
10. Donnez J., Tomaszewski J., Vazquez F. et al. Ulipristal acetate versus leuprolide acetate for uterine fibroids. *N. Engl. J. Med.* 2012;366:421–32 (PEARL II).
11. Fiscella J., Bonfiglio T., Winters P. et al. Distinguishing features of endometrial pathology after exposure to the progesterone receptor modulator mifepristone. *Hum. Pathol.* 2011;42:947–53.
12. Horne F.M., Blithe D.L. Progesterone receptor modulators and the endometrium: changes and consequences. *Hum. Reprod. Update.* 2007;13:567–80.
13. Geiner E.E., Ulmann A. Pharmacologic properties of CDV (VA)-2914. *Steroids.* 2003;68:1005–11.
14. Ioffe O.B., Zaino R.J., Mutter G.L. Endometrial changes from short-term therapy with CDB-4124, a selective progesterone receptor modulator. *Mod. Pathol.* 2009;22:450–9.
15. Joshida S., Ohara N., Xu Q. et al. Celltype specific actions of progesterone receptor modulators in the regulation of uterine leiomyoma growth. *Semin. Reprod. Med.* 2010;28:260–73.
16. Mutter G.L., Ioffe O.B. et al. Proellex effects on the endometrium. *Gynecol. Endocrinol.* 2008;24(Suppl. 1):75 p.
17. Mutter G.L., Bergeron C., Deligdisch L. et al. The spectrum of endometrial pathology induced by progesterone receptor modulators. *Mod. Pathol.* 2008;1:591–8.
18. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (COEA). Guidance for Industry: Estrogen and Estrogen/Progestin Drug: Products to Treat Vasomotor Symptoms and Vulvar and Vaginal Atrophy Symptoms - Recommendations for Clinical Evaluation. Rockville, MO: Center for Drug Evaluation and Research (COEA); 2013. Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
19. Williams A.R.W., Bergeron C., Chabbert-Buffet N. et al. Progesterone receptor modulator associated endometrial changes: a pilot histological dose escalation study of ulipristal acetate. Facts, Views and Vision in ObGyn; *Sci. J. Flemish. Soc. Obstet. Gynecol.* 2010, abstract 163. EBCOG, Antwerp. P. 99.
20. Williams A.R.W., Bergeron C., Barlow D.H., Ferenczy A. Endometrial morphology after treatment of uterine fibroids with the selective progesterone receptor modulator, Ulipristal Acetate. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2012;31,6:556–69.
21. Williams A., Glant M. PRM-Associated Endometrial Changes (PAEC). ESMYA® (ulipristal acetate). Pathologist's guide. Medical Information Service Pregel S.A. Geneva, Switzerland, 2012.

NEW KIND OF REVERSIBLE MORPHOLOGICAL CHANGES OF ENDOMETRIUM (PAEC – PROGESTERONE RECEPTOR MODULATOR ASSOCIATED ENDOMETRIAL CHANGES) IN THE THERAPY OF UTERINE LEIOMYOMATA

O.V. Zayratyants, I.B. Manukhin, A.L. Tikhomirov, V.V. Kazenashev, K.V. Opalenov, T.G. Barsanova, T.D. Aliyeva

In the therapy of uterine leiomyomata with ulipristal acetate, a selective progesterone receptor modulator, specific and reversible endometrial changes occur named PAEC (Progesterone receptor modulator Associated Endometrial Changes). The changes independently regress within a few weeks after completion of therapy. Insufficient awareness of specialists on PAEC morphological manifestations may result in erroneous diagnosis of hyperplasia or an estrogen-induced endometrial changes in the study of biopsies or surgical specimens after hysterectomy in patients with uterine leiomyomas treated with selective progesterone receptor modulators.

Key words: endometrium, selective modulators of progesterone receptors, ulipristal acetate

Информация об авторах

Зайратьянц Олег Вадимович – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

Тел. 8 903 184-92-17. E-mail: ovzair@mail.ru

Манухин Игорь Борисович – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

Тихомиров Александр Леонидович – докт. мед. наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

Казенашев Виктор Викторович – канд. мед. наук, ассистент кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

Опаленов Константин Викторович – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

Барсанова Татьяна Георгиевна – врач-лаборант кафедры патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

Алиева Тейюба Джалаловна – аспирант Московского государственного медико-стоматологического университета имени А.И. Евдокимова.

Материал поступил в редакцию 24 сентября 2013 года.

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ БОЛЕЗНЕЙ ЭНДОМЕТРИЯ У ЖЕНЩИН ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

Н.С. Мельникова¹, Л.В. Адамян², О.В. Зайратьяниц², О.В. Козлова¹, Т.Г. Барсанова²

¹ ФГБУ «Клиническая больница» Управления делами Президента РФ, Москва

² ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва

Проведен анализ частоты и структуры патологии эндометрия у 3998 женщин в возрасте 60–87 лет, находящихся на диспансерном учете в системе поликлиника–стационар. Частота различной патологии эндометрия составила 2,5%, или 24,8 на 1000 женщин. Преобладали железисто-фиброзные полипы эндометрия (2,2%; 22,0‰), в 15–18 раз реже встретились аденокарциномы эндометрия (0,1%; 1,5‰) и хронический эндометрит (0,1%; 1,2‰). При этом патологические изменения эндометрия в 4 раза чаще выявлялись у женщин в возрасте 60–74 лет (полипы эндометрия – в 4,5 раза, хронический эндометрит – в 1,5 раза, эндометриальные аденокарциномы – в 2 раза). Исследование демонстрирует высокую эффективность диспансерного обследования женщин в постменопаузальном периоде с целью раннего выявления и лечения патологии эндометрия, в частности онкологических процессов. Важна преемственность в работе амбулаторных и стационарных медицинских учреждений, лежащая в основе оказания медицинской помощи населению.

Ключевые слова: частота и структура патологии эндометрия, постменопаузальный период

Старение населения является общемировой демографической и медико-социальной проблемой. По прогнозам, к 2030 году каждый пятый человек в мире будет старше 65 лет. Уровень заболеваемости населения в пожилом возрасте (60–74 лет) в 2 раза, а в старческом (старше 75 лет) – в 6 раз выше, чем у людей более молодого возраста. Улучшение качества жизни населения старших возрастных групп – приоритетная задача органов здравоохранения и социальной защиты. В связи с этим большое значение приобрело изучение особенностей возникновения, течения, лечения и профилактики заболеваний у лиц пожилого возраста [7, 9, 10, 12].

В структуре гинекологической заболеваемости женщин пожилого и старческого возраста наиболее часто встречается патология эндометрия [11, 12, 13], однако данные разных авторов об эпидемиологии внутриматочной патологии в постменопаузальном периоде достаточно противоречивы. Так, частота железисто-фиброзных полипов эндометрия (ЖФПЭ) составляет от 39,2 до 69,3%, гиперплазии без атипии – от 3,3 до 4,9%, с атипией – от 0,5 до 5,2%, аденокарцином – от 0,5 до 14%. Вариабельность этих показателей объясняется использованием разных методов исследования, различной длительностью постменопаузы и наличием маточного кровотечения (наиболее частый симптом в постменопаузе, заставляющий пациентку обратиться к врачу) [2, 3, 6, 9, 14, 16, 17, 21, 22].

Целью исследования явилось выяснение частоты и структуры патологии эндометрия у женщин пожилого и старческого возраста из контингента, прикрепленного для ежегодной диспансеризации к системе поликлиника–стационар.

Обследованные женщины в 2008–2011 годы проходили ежегодную диспансеризацию в поликлинике № 5 (главный врач – кандидат медицинских наук Е.Б. Александрова) Управления делами Президента РФ (УДП РФ) и при выявлении гинекологической патологии госпитализировались для дальнейшего обследования и лечения в клиническую больницу УДП РФ (главный врач – доктор медицинских наук Е.Р. Яшина). За 3 года наблюдений из 3998 женщин пожилого и старческого возраста было направлено в гинекологическое отделение клинической больницы с подозрением на внутриматочную патологию, выявленную при УЗИ, 140 пациенток (3,5%). Ведущим методом диагностики патологии органов репродуктивной системы, в том числе эндометрия, признано ультразвуковое исследование [1, 4, 5]. Многие зарубежные и отечественные авторы указывают на высокую эффективность, простоту выполнения, неинвазивность, низкую стоимость данного метода исследования, позволяющего в ряде случаев избежать использования агрессивных инвазивных процедур. Он считается скрининговым методом диагностики внутриматочной патологии

[2, 9, 15, 18]. Значимыми критериями являются симметричность и толщина эндометрия (показатель М-эха). Нормой, в зависимости от длительности постменопаузы, принято считать показатель М-эха, равный 3–5 мм [15, 17]. По мнению большинства авторов, толщина эндометрия в постменопаузе, превышающая 5 мм, рассматривается как ведущий эхографический признак его патологии [18, 20, 25].

Возраст женщин, направленных в стационар, составил 60–87 лет (в среднем $67,6 \pm 5,6$ года) и соответствовал пожилому и старческому возрастным периодам по классификации ВОЗ. Возраст наступления менопаузы варьировал от 38 до 56 лет (в среднем $44,9 \pm 6,8$ года). С учетом возрастной классификации ВОЗ изучена эпидемиология внутриматочной патологии у женщин двух возрастных групп: I – 60–74 года; II – 75 лет и старше (табл. 1, 2).

Среди женщин, находящихся на диспансерном учете, преобладали пациентки в возрасте до 74 лет (I группа, 69,4%). Обращает на себя внимание, что большинство женщин, у которых при ультрасонографическом исследовании была заподозрена патология эндометрия (127; 90,7%), также были из I группы наблюдения, и только 13 (9,3%) оказались из II группы, в возрасте 75–87 лет. Представляет интерес рост в обеих группах за 4 года в 1,8 раза числа наблюдений с выявленными при УЗИ изменениями эндометрия.

У 67 пациенток (47,9%) было выявлено неоднородное утолщенное М-эхо (более 4 мм), у 51 (36,4%) визуализированы полипы эндометрия, у 14 (10%) диагностирована серозометра. У 8 пациенток (5,7%) при УЗИ органов малого таза патология эндометрия не выявлена, госпитализация для раздельного диагностического выскабливания матки произведена по другим показаниям (например, полип цервикального канала).

Всем 140 пациенткам в стационаре было выполнено раздельное диагностическое выскабливание с предварительной диагностической гистероскопией. При выскабливании полости матки вслепую часто пропускаются или удаляются неполностью полипы эндометрия, узлы миомы, участки гиперплазированного эндометрия и т.д., поэтому сегодня золотым стандартом в диагностике внутриматочной патологии признана гистероскопия с последующим патогистологическим исследованием биопсии эндометрия [2, 6, 9, 10, 14, 19, 23–25]. Гистероскопически в полости матки были выявлены разной величины и локализации полипы эндометрия (рис. 1), неоднородные локальные утолщения эндометрия, субмукозные или интерстициально-субмукозные узлы миом, синехии, атрезия цервикального канала, признаки атрофии эндометрия и хронического эндометрита. При необходимости производили оперативную

гистероскопию с использованием эндоскопических щипцов, гистерорезектоскопию, а также абляцию эндометрия. Дополнительную деструкцию эндометрия проводили пациенткам, у которых в анамнезе были указания на внутриматочные вмешательства в период постменопаузы.

Патологоанатомическое исследование соскобов эндометрия выявило его патологические изменения у 99 из 140 женщин (70,7%), направленных после УЗИ в стационар с подозрением на внутриматочную патологию (табл. 3). У остальных пациенток (41 наблюдение, 29,3%) были диагностированы атрофия эндометрия

Таблица 1

Число амбулаторно обследованных женщин разных возрастных групп

Возрастные группы	Абс. число	%
I группа (60–74 года)	2774	69,4 %
II группа (75 лет и старше)	1224	30,6 %
<i>Итого</i>	3998	100%



Рис. 1. Гистероскопия. Полип эндометрия размерами около 10 мм в области левого угла матки.

Слизистая полости матки атрофична

Таблица 2

Распределение женщин с подозрением на внутриматочную патологию, выявленную при УЗИ, по возрастным группам и годам поступления в стационар

Группы	Год				
	2008	2009	2010	2011	Всего
I группа (60–74 года)	21 (15%)	33 (23,6%)	39 (27,8%)	34 (24,3%)	127 (90,7%)
II группа (75 лет и старше)	2 (1,4%)	2 (1,4%)	1 (0,7%)	8 (5,7%)	13 (9,3%)
<i>Итого</i> (60–87 лет)	23 (16,4%)	35 (25%)	40 (28,6%)	42 (30%)	140 (100%)

(34 наблюдения; 24,3%) и субмукозные и интрамурально-субмукозные миомы матки (8 наблюдений; 5,7%). Обращает на себя внимание, что гиперплазия эндометрия выявлена не была, в том числе в наблюдениях с его утолщением по показателям М-эха при УЗИ. В таких случаях гистологически были обнаружены или кистозная трансформация атрофического эндометрия (рис. 2), или хронический эндометрит (рис. 3, А, Б), или эндометриальные аденокарциномы (рис. 4).

В обеих группах женщин преобладали ЖФПЭ (соответственно, 63,0 и 61,5% наблюдений). Значительно реже, примерно с равной частотой, встретились аденокарциномы эндометрия (3,9 и 7,7%) и хронический эндометрит (3,2 и 7,7%). Обращает на себя внимание то, что аденокарциномы и хронический эндометрит были обнаружены в 2 раза чаще у женщин из II группы (в возрасте старше 75 лет).

Показатели внутриматочной патологии обследованных женщин пожилого и старческого возраста представлены в таблице 4.

Таким образом, частота различной патологии эндометрия у женщин пожилого и старческого возраста (60–87 лет), находящихся на диспансерном учете, составляет 2,5%, или 24,8 на 1000 человек. Преобладают ЖФПЭ (2,2%; 22,0‰), в 15–18 раз реже обнаруживаются аденокарциномы эндометрия (0,1%; 1,5‰) и хронический эндометрит (0,1%; 1,2‰). При этом патологические изменения эндометрия в 4 раза чаще встречаются у женщин в возрасте 60–74 лет. ЖФПЭ выявляются чаще в 4,5 раза, хронический эндометрит – в 1,5 раза, эндометриальные аденокарциномы – в 2 раза. Хотя в старческом возрасте (после 75 лет) патология эндометрия встречается реже, риск возникновения злокачественных новообразований, как видно, остается достаточно высоким (около 1 больной на 1000 человек), что диктует важность адекватного обследования и своевременного лечения женщин этой возрастной группы.

Ретроспективный анализ клинических данных показал, что у большинства пациенток (123; 87,8%) с выявленной патологией эндометрия, включая его аденокарциномы, какие-либо жалобы отсутствовали. Только 12 женщин (8,6%) предъявляли жалобы на кровянистые выделения из половых путей, 5 (3,6%) отмечали боли в низу живота (у них были диагностированы ЖФПЭ и хронический эндометрит). Беременность не наступала у 12 пациенток (8,6%), живущих половой жизнью, 54 женщины имели однократные роды (38,6%), у остальных было от 2 до 4 родов. Наиболее часто в анамнезе встречались миома матки (31,4%), патология эндометрия (16,4%), псевдоэрозии шейки матки (15,7%), а также воспалительные заболевания гениталий

Таблица 3

Структура и частота патологии эндометрия у женщин пожилого и старческого возраста, выявленной при патологоанатомическом исследовании соскобов из полости матки

Патология эндометрия	I группа (60–74 года, n=127)	II группа (75 лет и старше, n=13)	Всего (60–87 лет, n=140)
Железисто-фиброзный полип эндометрия	80 (63,0%)	8 (61,5%)	88 (62,9%)
Хронический эндометрит	4 (3,2%)	1 (7,7%)	5 (3,5%)
Аденокарцинома	5 (3,9%)	1 (7,7%)	6 (4,3%)
<i>Итого</i>	89 (70,1%)	10 (76,9%)	99 (70,7%)

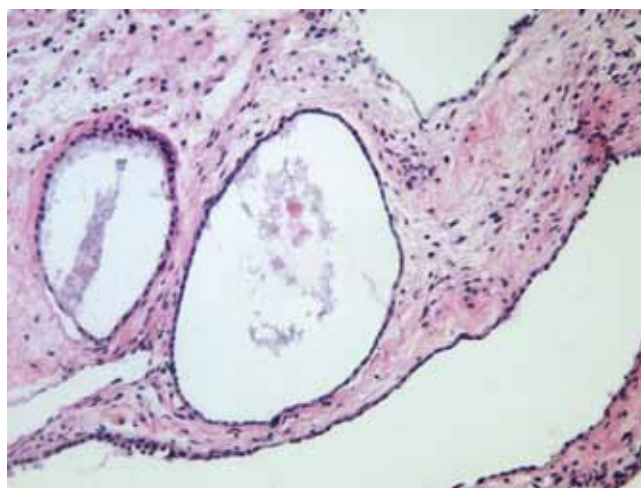


Рис. 2. Кистозный вариант атрофии эндометрия. Окраска гематоксилином и эозином, × 200

Таблица 4

Показатели заболеваемости (абс. число, % и интенсивный показатель на 1000 женщин – ‰) внутриматочной патологии у женщин пожилого и старческого возраста

Показатель	Железисто-фиброзный полип эндометрия	Хронический эндометрит	Аденокарцинома	Всего
I группа (60–74 года, n=2774)	80 (2,9%; 28,8‰)	4 (0,1%; 1,4‰)	5 (0,2%; 1,8‰)	89 (3,2%; 32,1‰)
II группа (75 лет и старше, n=1224)	8 (0,6%; 6,5‰)	1 (0,1%; 0,8‰)	1 (0,1%; 0,8‰)	10 (0,8%; 8,2‰)
<i>Итого</i> (60–87 лет, n=3998)	88 (2,2%; 22,0‰)	5 (0,1%; 1,2‰)	6 (0,1%; 1,5‰)	99 (2,5%; 24,8‰)

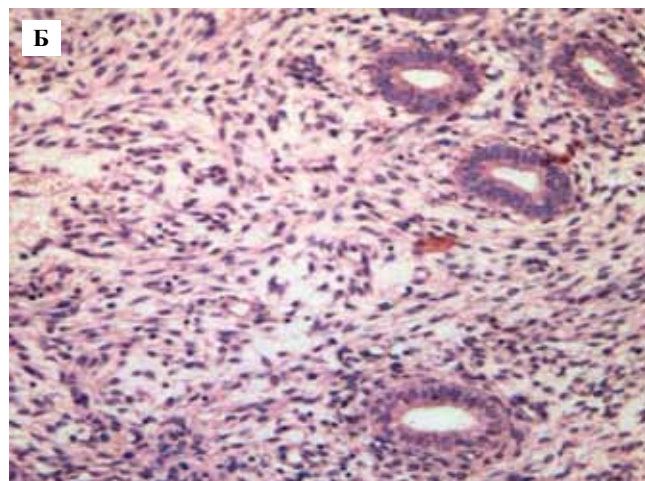
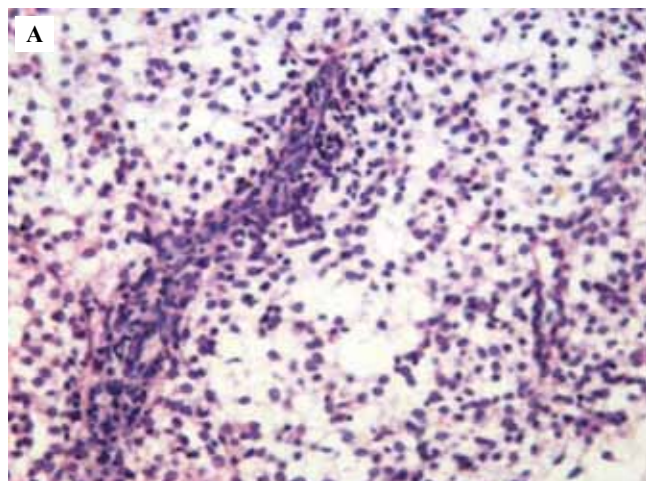


Рис. 3. А, Б. Хронический эндометрит. А – преимущественно периваскулярная лимфоплазмноклеточная инфильтрация и отек стромы эндометрия, Б – фибробластоподобная трансформация стромальных клетки с формированием фигур водоворота вокруг желез и сосудов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 160$

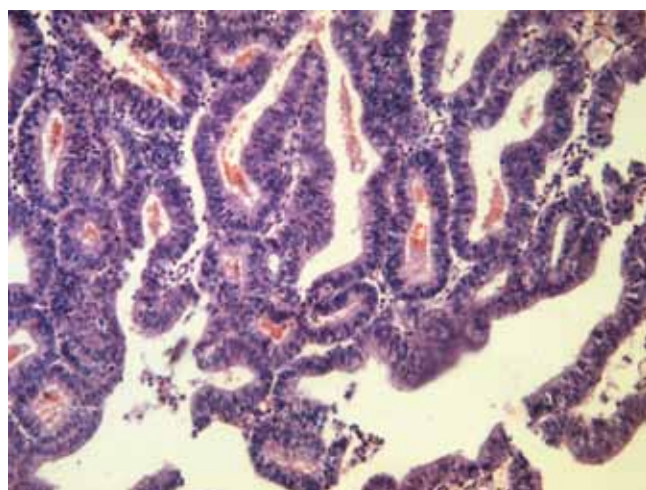


Рис. 4. Высокодифференцированная эндометриальная аденокарцинома. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

(15,7%). Реже диагностировались кисты яичников (5%), полипы цервикального канала (5,7%), неполное выпадение матки (6,4%) и эктопическая беременность (3,6%). У многих пациенток в анамнезе было сочетание различных гинекологических заболеваний. Среди экстрагенитальных заболеваний чаще встречались болезни органов кровообращения (62,9%), у многих пациенток отмечены эндокринно-обменные нарушения: ожирение 2–4-й степени (19,3%), сахарный диабет 2-го типа (13,6%).

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует высокую эффективность диспансерного обследования женщин в постменопаузальном периоде с целью раннего выявления и лечения патологии эндометрия, в частности его онкологических заболеваний.

Важна преемственность в работе амбулаторных и стационарных медицинских учреждений, лежащая в основе оказания медицинской помощи населению. Высокий процент внутриматочной патологии у пациенток

пожилого и старческого возраста (24,8 на 1000 женщин) диктует необходимость своевременного высококвалифицированного лечения данного контингента больных. Сопутствующая экстрагенитальная патология влечет за собой повышенный риск оперативного вмешательства и анестезиологического пособия, поэтому выявление патологических процессов на ранних стадиях при обязательной ежегодной диспансеризации и поиск наименее инвазивных методов лечения с целью улучшения качества жизни населения пожилых возрастных групп являются важными звеньями в системе современного здравоохранения.

Литература

1. Ашрафян Л.А., Киселев В.И. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез). М.: Компания «Димитрейд График Групп», 2008. 216 с.
2. Бреусенко В.Г., Голова Ю.А., Капушева Л.М., Шилина Е.А., Климова И.В. Внутриматочная патология в постменопаузе: диагностика и лечение // Акушерство и гинекология. 2003. № 2. С. 36–40.
3. Горных О.А., Самойленко В.В., Биштави А.Х., Каниболоцкий А.А., Манухин И.Б., Табакман Ю.Ю. Гиперплазия и предрак эндометрия // Опухоли женской репродуктивной системы. 2011. № 4. С. 59–63.
4. Девятковская А.Г. Применение трехмерной эхографии в мониторинге лечения гиперпластических процессов эндометрия: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. 117 с.
5. Демидов В.Н., Гус А.И. Патология полости матки и эндометрия. ВМК // Эхография органов малого таза у женщин: Практическое пособие. М., 2001. 138 с.
6. Доброхотова Ю.Э., Венедиктова М.Г., Сапрыкина Л.В. Эндоскопические методы лечения предраковых состояний эндометрия // Лечебное дело: Периодическое учебное издание РГМУ. 2010. № 2. С. 66–69.
7. Журавлева Т.П. Основы гериатрии: Учебное пособие. 2-е изд., испр. и доп. М.: ФОРУМ: ИНФРА-М, 2007. 288 с.

8. Интенсивная терапия. Реанимация. Первая помощь: Учебное пособие / Под ред. В.Д. Малышева. М.: Медицина. 2000. 464 с.
9. *Мартыросян К.А.* Проллиферативные процессы эндометрия у пациенток старше 60 лет. Современные технологии в диагностике и хирургическом лечении: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2012. 26 с.
10. *Савельева Г.М., Бреусенко В.Г., Голова Ю.А., Мишинева О.И., Ивановская Т.Н.* Гиперпластические процессы эндометрия в пре- и постменопаузе. Методы терапии // Онкогинекология. 2012. № 1. С. 43–46.
11. *Стрижова Н.В., Сухих Г.Т., Соболева Г.М., Холодова Ж.Л., Рейснер Е.А.* Сравнение сывороточной активности матриксной металлопротеиназы-2 у больных с железистой и железисто-кистозной гиперплазиями эндометрия в перименопаузе // Проблемы репродукции. Спецвыпуск. 2008. С. 312–313.
12. *Сухих Г.Т., Адамян Л.В.* Репродуктивное здоровье семьи / Проблемы репродукции. Спецвыпуск. 2008. С. 5–10.
13. *Торчинов А.М., Умаханова М.М., Фидарова Т.В., Габараева М.Р.* Проллиферативная активность железистого эпителия полипов эндометрия в период пери- и постменопаузы / Материалы IX Всероссийского научного форума «Мать и дитя». 2007. С. 540–541.
14. *Хитрых О.В.* Отдаленные результаты и оптимизация тактики лечения полипов эндометрия в постменопаузе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. 18 с.
15. *Щеглова Е.А.* Ультразвуковая диагностика гиперпластических процессов эндометрия у женщин различных возрастных периодов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. 26 с.
16. *Brand A.H.* The woman with postmenopausal bleeding // Aust. Fam. Physician. 2007;36(3):116–20.
17. *Dreisler E., Sorensen S.S., Ibsen P.H.* Prevalence of endometrial polyps and abnormal uterine bleeding in a Danish population aged 20–74 years // ultrasound Obstet Gynecol. 2009;33(1): 102–8.
18. *Goldstein S.R.* Significance of incidentally thick endometrial echo on transvaginal ultrasound in postmenopausal women // Menopause. 2011;18(4):434–6.
19. *Hefler L., Lemach A., Seebacher V., Polterauer S., Tempfer C., Reinthaller A.* The intraoperative complication rate of nonobstetrics dilation and curettage // Obstetrics & Gynecology 2009; 113(6): 1268–71.
20. *Kasraeian M., Asadi N., Ghaffarpasand F., Karimi A.A.* Value of transvaginal ultrasonography in endometrial evaluation of non-bleeding postmenopausal women // Climacteric. 2011;14(1):126–31.
21. *Mossa B., Torcia F., Avenoso F.* Occurrence of malignancy in endometrial polyps during postmenopause // Eur J Gynaecol Oncol. 2010;31(2):165–8.
22. *Raouf S.A., Gupta P., Papaioannou S., Pradhan P.* Endometrial thickness for invasive investigations in women with postmenopausal bleeding // Climacteric. 2011;14(1):117–20.
23. *Svirsky R., Smorgick N., Rozovski U.* Can we rely on blind endometrial biopsy for detection of focal intrauterine pathology? // Am J Obstet Gynecol. 2008; 199(2):115.e1–3.
24. *Wethington S.L., Herzog T.J., Burke W.M.* Risk and predictors of malignancy in women with endometrial polyps // Ann Surg Oncol. 2011;18(13):3819–23.
25. *Wolfman W., Leyland N., Heywood M.* Asymptomatic endometrial thickening // J Obstet Gynaecol Can. 2010;32(10): 990–9.

EPIDEMIOLOGY OF ENDOMETRIAL DISEASE IN ELDERLY AND SENILE WOMEN

N.S. Melnikova, L.V. Adamyan, O.V. Zayratyants, O.V. Kozlova, T.G. Barsanova

The analysis was performed of frequency and structure of endometrial pathology in 3998 women aged 60–87 years receiving follow-up clinic-hospital monitoring care. The frequency of different endometrial pathology was 2,5%, or 24,8 per 1,000 women. Glandular fibrous endometrial polyps predominated (2,2%; 22,0‰). Endometrial adenocarcinoma (0,1%; 1,5 ‰) and chronic endometritis (0,1%; 1,2 ‰) was detected 15 to 18 times less frequently. In this case, pathological changes in the endometrium were found 4 times more frequently in women aged 60–74 years (endometrial polyps, 4.5 times; chronic endometritis, 1.5 times; endometrial adenocarcinoma, 2 times). The study demonstrates the high efficiency of follow-up monitoring of postmenopausal women for early detection and treatment of endometrial pathology, in particular, oncological processes. The continuity in the work of the outpatient and inpatient medical institutions underlying the provision of medical care is important.

Key words: frequency and structure of endometrial pathology, postmenopause

Информация об авторах

Мельникова Н.С. — акушер-гинеколог гинекологического отделения клинической больницы Управления делами Президента РФ.

Адамян Л.В. — академик РАМН, докт. мед. наук, профессор, заведующая кафедрой репродуктивной медицины и хирургии МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Зайратьянц О.В. — докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Адрес: Москва, ул. Делегатская, д. 20. Тел. 8 903 184-92-17. E-mail: ovzair@mail.ru

Козлова О.В. — заведующая гинекологическим отделением клинической больницы Управления делами Президента РФ.

Барсанова Т.Г. — врач-лаборант патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России.

Адрес: Москва, ул. Делегатская, д. 20.

Материал поступил в редакцию 18 сентября 2013 года.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЗОНЫ ПАРЕНХИМАТОЗНО-СТРОМАЛЬНЫХ КОНТАКТОВ В РАКЕ ЛЕГКОГО С ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИЕЙ

И.В. Василенко, Р.Б. Кондратюк, Б.Б. Брук

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Донецк

Изучена зона паренхиматозно-стромальных контактов в 35 случаях немелкоклеточного рака легкого с эпителиально-мезенхимальной трансформацией с использованием гистологических, гистохимических и иммуногистохимических методов (в частности, выявление эпителиальных, соединительнотканного и гладкомышечных маркеров). Установлено, что в зоне паренхиматозно-стромальных контактов часто (48,6% случаев) обнаруживались признаки усиления активности стромы в виде накопления гликозаминогликанов, увеличения экспрессии α -гладкомышечного актина. В 14 случаях (40%) это сочеталось со снижением экспрессии маркеров эпителия в паренхиме опухоли в данной зоне, а в 5 наблюдениях – с появлением экспрессии соединительнотканного маркера виментина. Обнаруженные изменения подчеркивают важность взаимного влияния паренхимы опухоли и ее микроокружения в развитии эпителиально-мезенхимальной трансформации.

Ключевые слова: рак легкого, эпителиально-мезенхимальная трансформация

В развитии эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) в опухолях играют роль как генетические программы клеток паренхимы, так и особенности их микроокружения [8]. Взаимодействие между ними во многом определяет прогрессию опухоли, ее инвазивность [3]. С учетом этого особый интерес представляет зона контакта паренхимы и стромы опухоли.

Материалы и методы

Изучено 35 случаев немелкоклеточного рака легкого с ЭМТ разной распространенности и полноты, в том числе 29 случаев аденокарцином, 6 плоскоклеточного рака. Кроме гистологических и гистохимических методов исследования (окраска гематоксилином и эозином, по ван Гизону, выявления сульфатированных и несulfатированных гликозаминогликанов альциановым синим при pH 1,0 и 2,5) использовали иммуногистохимические методы с выявлением маркеров эпителия (панцитокератин AE1/AE3, цитокератины 18, высокомолекулярный цитокератин HMW, Е-кадгерин), мезенхимы (виментин, α -гладкомышечный актин, десмин), пролиферативной активности (Ki-67, MIB), а также нейроэндокринного маркера (глиальный фибриллярный кислый протеин, GFAP).

Результаты и обсуждение

Признаками ЭМТ, описанными во многих исследованиях и обзорах [2, 6, 7], были обособление опухолевых клеток от пласта в виде тяжей, мелких групп или единичных клеток, изменение их формы – приобретение вытянутой, веретенообразной или отростчатой формы

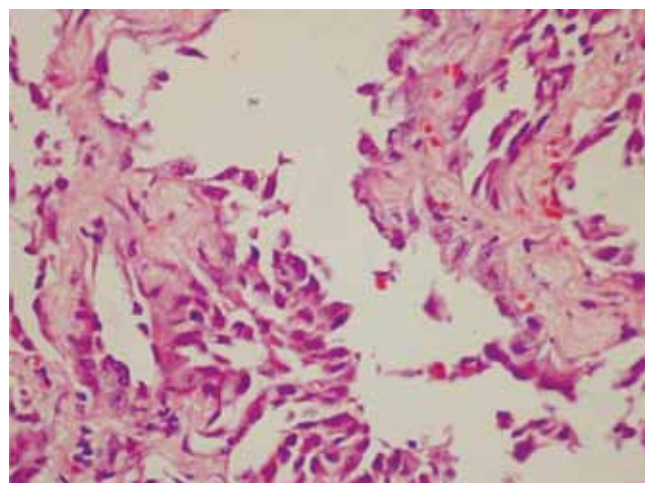


Рис. 1. Изменение формы опухолевых клеток – приобретение вытянутой, веретенообразной и отростчатой формы, отсутствие иммуноклеточной и воспалительной инфильтрации стромы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

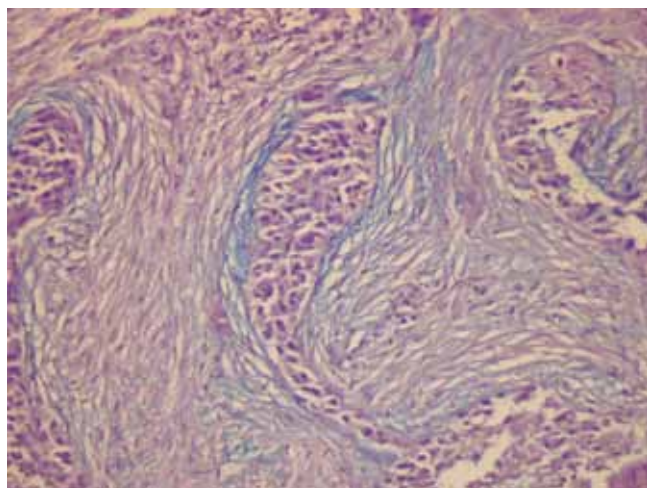


Рис. 2. Усиление альцианофилии стромы на границе с паренхимой опухоли. Окраска альциановым синим при pH 2,5, $\times 200$

(рис. 1), снижение или потеря экспрессии цитокератинов, потеря мембранозной или приобретение цитоплазматической экспрессии Е-кадгерина. При полной ЭМТ в цитоплазме опухолевых клеток появлялась экспрессия виментина, α -гладкомышечного актина, очень редко десмина, чаще очаговая. Объем и характер стромы были различны в очагах ЭМТ и вне их. В очагах ЭМТ строма приобретала характер активированной с появлением в ней гликозаминогликанов, миофибробластов с экспрессией виментина и α -гладкомышечного актина, редко (в 5 случаях) десмина, резким снижением или исчезновением иммуноклеточной и воспалительной инфильтрации стромы (рис. 1).

В 8 случаях аденокарцином и плоскоклеточного рака в очагах ЭМТ в зоне паренхиматозно-стромальных контактов отмечалось усиление альцианофилии (рис. 2), все эти случаи отличались умеренной и высокой пролиферативной активностью опухолевых клеток: от 20% до 70–90% обнаруживали ядерную экспрессию Ki-67. Можно думать, что активация стромы в них с накоплением гликозаминогликанов связана с сигналами из паренхимы. Установлено, что накопление гиалуроновой кислоты стимулируется цитокинами и факторами роста (эпидермальным фактором роста, интерлейкином-1 бета) и индуцирует эпителиально-мезенхимальноподобный фенотип в немелкоклеточном раке легкого [1]. В 1 случае плоскоклеточного рака альцианофилия стромы была интенсивно выражена на всем протяжении, но кроме того очагово обнаруживалась в строме экспрессия глиального фибриллярного кислого протеина, возможно, как проявление не только снижения степени зрелости соединительной ткани, но и ее метаплазии. В этом же случае на границе со стромой в тяжах эпителия отмечались снижение и потеря экспрессии панцитокератина AE1/AE3 (рис. 3).

В 12 случаях на границе паренхимы и стромы обнаруживалось увеличение количества и густоты рас-

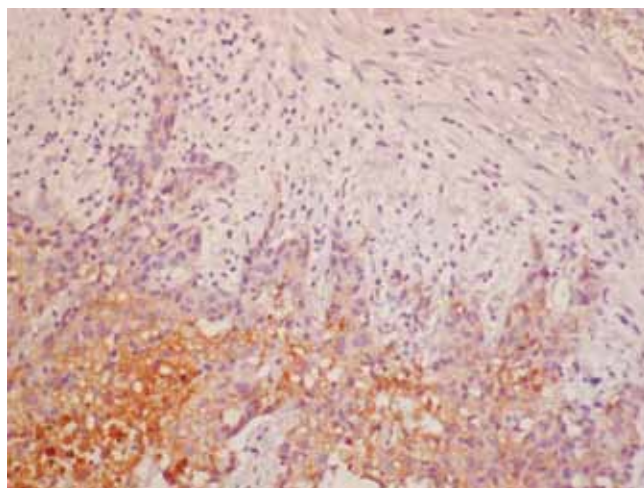


Рис. 3. Снижение и потеря экспрессии панцитокератина AE1/AE3 в тяжах опухолевых клеток на границе со стромой. $\times 200$

положения миофибробластов (рис. 4). Нередко рядом с миофибробластами в строме располагались крупные, веретенообразной формы опухолевые клетки (рис. 5), то есть признак ЭМТ. Нельзя исключить возможность приобретения ими со временем экспрессии α -гладкомышечного актина и смещение в строму, где они мало отличимы от других миофибробластов стромы. В 3 случаях вблизи эпителия наблюдалось одновременное усиление альцианофилии и увеличение числа миофибробластов.

Активированная строма в аденокарциномах и плоскоклеточном раке на границе с эпителием сочетается со снижением или потерей экспрессии эпителиальных маркеров – цитокератинов (рис. 3, рис. 6), Е-кадгерина, изредка появлением в опухолевых клетках мезенхимального маркера виментина (рис. 7).

В остальных 19 случаях усиление интенсивности активизации стромы вблизи контакта с эпителием не

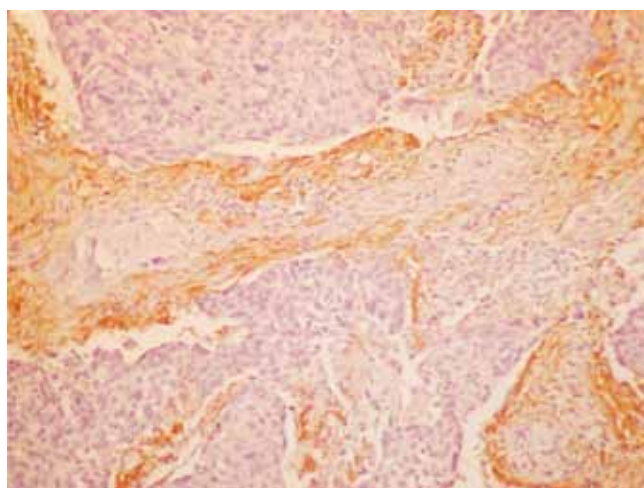


Рис. 4. Увеличение количества и плотности расположения миофибробластов в строме на границе с паренхимой. Экспрессия α -гладкомышечного актина, $\times 200$

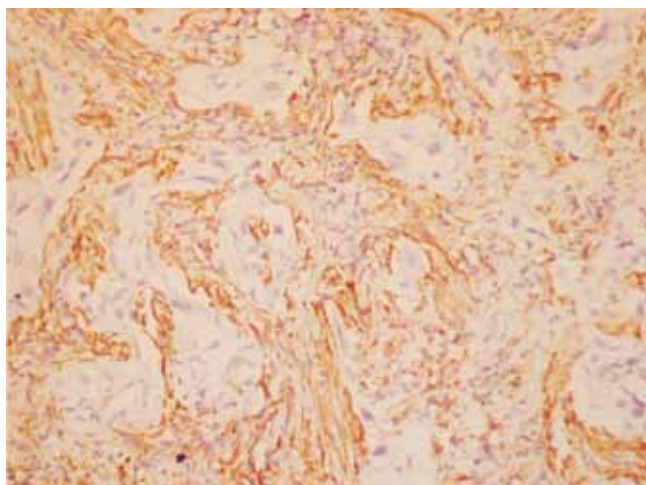


Рис. 5. Крупные, веретенообразной формы опухолевые клетки в строме рядом с миофибробластами. Экспрессия α -гладкомышечного актина, $\times 200$

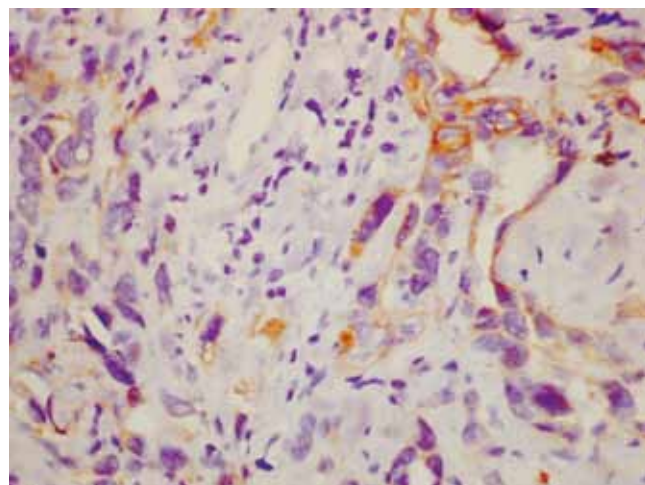


Рис. 6. Потеря экспрессии панцитокератина AE1/AE3 в опухолевых клетках вытянутой фибробластоподобной формы. $\times 400$

обнаружено. В части из них (9 наблюдений) вытянутые фибробластоподобные опухолевые клетки со снижением эпителиальных маркеров (рис. 8) присутствовали в толще пласта опухолевых клеток без контакта с окружающей стромой. Можно предполагать, что в этих случаях побудительный сигнал к ЭМТ возникает в самой паренхиме опухоли, возможно без связи с изменениями в строме или до их развития.

Множество индукторов ЭМТ, которые включают этиологические факторы развития опухолей, предопухолевые процессы в органах, в частности хроническое воспаление, гипоксия, их качественные и количественные характеристики, создают очень сложную картину регуляции этого процесса, что находит отражение и в его отдельных морфологических проявлениях [2, 5, 9].

Нами была предпринята попытка оценить отдельные особенности паренхиматозно-стромальных взаи-

модействий, абстрагируясь от многих других важных факторов, таких, например, как воспалительные и иммунноклеточные реакции в строме, многие секреторные процессы в паренхиме опухоли и т.д., сосредоточившись на морфологических изменениях в зоне контакта опухолевого эпителия и стромы.

В зоне контакта опухолевых и стромальных клеток аденокарцином и плоскоклеточного рака часто (17 из 35 случаев, 48,6%) обнаруживались признаки активации стромы, и в 14 случаях из них (40%) это сочеталось со снижением экспрессии эпителиальных маркеров (цитокератинов, Е-кадгерина или обоих), а в 5 (14,5%) – с появлением экспрессии мезенхимального маркера виментина.

Обнаруженное нами разнообразие морфологических изменений в зоне паренхиматозно-стромального контакта в раке легкого подтверждает мысль, что взаи-

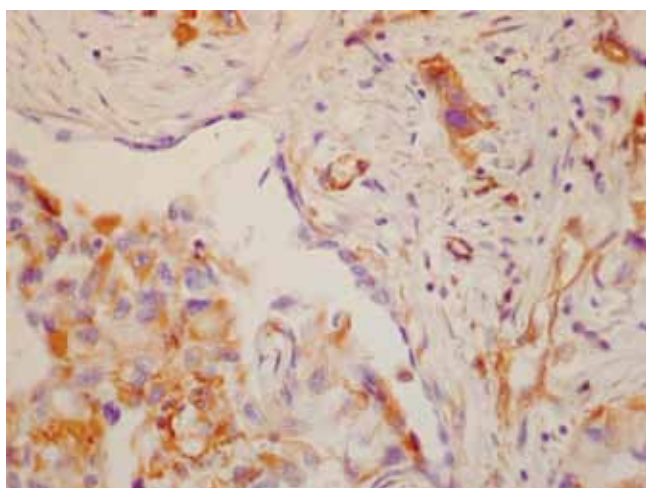


Рис. 7. Появление в опухолевых клетках мезенхимального маркера виментина. $\times 400$

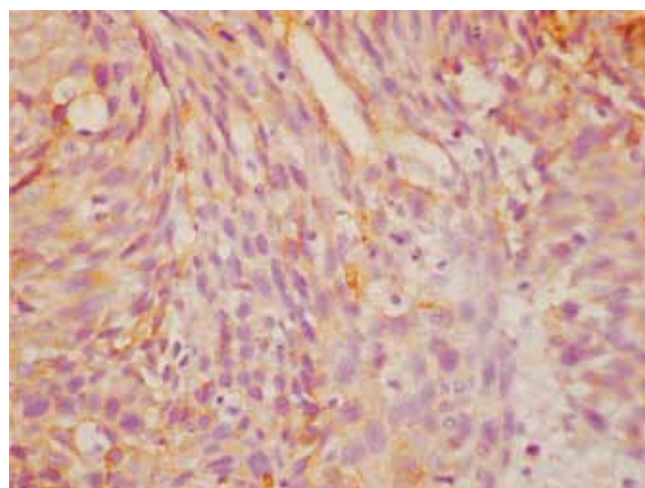


Рис. 8. Снижение экспрессии панцитокератина AE1/AE3 в фибробластоподобных опухолевых клетках в толще пласта. $\times 400$

имодействие опухолевых клеток и их микроокружения является порочным циклом, когда микроокружение может усиливать прогрессию рака, ведущую к метастазированию [4]. Так, в выявленных нами случаях более высокой активации стромы вблизи эпителия несколько чаще наблюдалась инвазия сосудов опухолевыми клетками (16 из 17 случаев, 94,1%), чем без такой активации (14 из 18 случаев, 77,7%).

Заключение

Применение гистохимических и иммуногистохимических методов исследования позволило выявить в немелкоклеточном раке легкого изменения в зоне эпителиально-стромального контакта, в частности увеличение накопления гликозаминогликанов и α -гладкомышечного актина в строме и снижение экспрессии цитокератинов, Е-кадгерина, изменение формы опухолевых клеток в направлении фибробластоподобных, то есть фенотипа эпителиально-мезенхиальной трансформации в паренхиме. В таких случаях наблюдается некоторое увеличение частоты инвазии сосудов опухолевыми клетками.

Литература

1. Chow G., Tauler J., Mulshine J.L. Cytokines and growth factors stimulate hyaluronan production: role of hyaluronan in epithelial to mesenchymal-like transition in non-small cell lung cancer // J. Biomed. Biotechnol. 2010. V. 2010. P. 1–11.
2. Christiansen J.J., Rajasekaran A.K. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis // Cancer Res. 2006. V. 66. N 17. P. 8319–26.
3. De Wever O., Pauwels P., de Craene B. Molecular and pathological signatures of epithelial–mesenchymal transitions at the cancer invasion front // Histochem Cell Biol. 2008. V. 130. P. 481–94.
4. Kuo P.L., Huang M.S., Chong D.E., Hung J.Y., Yang C.J., Chow S.H. Lung cancer-derived galectin-1 enhances tumorigenic potentiation of tumor-associated dendritic cells by expressing heparin-binding EGF-like growth factor // J. Biol. Chem. 2012. V. 287 (13). P. 9753–64.
5. Lopez-Novoa J.M., Nieto A.M. Inflammation and EMT an alliance towards organ fibrosis and cancer progression // EMBO Molecular Medicine. 2009. V. 1. P. 303–14.
6. Nieto M.A. The SNAIL superfamily of zinc-finger transcription factors // Molecular cell biology. 2002. V. 22. P. 155–66.
7. Nieto M.A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives // Int J Dev Biol. 2009. V. 53. P. 1541–7.
8. Sato M., Shames D.S., Hagegawa Y. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis // Respirology. 2012, Mar 27 (in print).
9. Thierry J.P., Acloque H., Huang R.Y., Nieto M.A. Epithelial-mesenchymal transition in development and disease // Cell. 2009. V. 139. N 5. P. 871–90.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE PARENCHYMAL-STROMAL INTERACTION ZONE IN LUNG CANCER WITH EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION

I.V. Vasilenko, R.B. Kondratyuk, B.B. Bruk

Summary. The parenchymal-stromal interaction zone was studied in 35 cases of non-small cell lung cancer with epithelial-mesenchymal transition using histological, histochemical and immunohistochemical techniques, in particular, using epithelial, smooth muscle and connective tissue markers. Signs of increased activity in the stroma, characterized by accumulation of glycosaminoglycans and increasing α -smooth muscle actin expression, were often (48.6%) detected in the parenchymal-stromal interaction zone. It was accompanied by the reduction of epithelial markers in the parenchyma of tumor in that area in 14 cases (40%), and by the appearance of connective tissue marker vimentin in 5 cases. Detected changes emphasise the importance of mutual influence of tumor parenchyma and its microenvironment in the development of epithelial-mesenchymal transition.

Key words: lung cancer, epithelial-mesenchymal transition

Информация об авторах

Василенко Инна Васильевна – докт. мед. наук, профессор, заведующая кафедрой патологической морфологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького.

Телефон +38 062 295-6333. E-mail: roman.kondrat@dsmu.edu.ua

Кондратюк Роман Борисович – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической морфологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького.

Телефон +38 062 295-7062. E-mail: roman.kondrat@dsmu.edu.ua

Брук Белла Борисовна – канд. мед. наук, доцент кафедры патоморфологии Донецкого национального медицинского университета им. М. Горького.

Телефон +38 062 295-6745. E-mail: roman.kondrat@dsmu.edu.ua

Материал поступил в редакцию 18 сентября 2013 года.

ВАРИАНТ ВНУТРИПРОТОКОВОЙ ОПУХОЛИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТУБУЛОПАПИЛЛЯРНЫМ РОСТОМ И СКУДНОЙ ВЫРАБОТКОЙ МУЦИНА

О.В. Паклина, Г.Р. Сетдикова, Е.Н. Гордиенко, А.И. Артемьев

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Внутрипротоковые тубулопапиллярные опухоли – редкие опухоли, которые составляют меньше 1% всех экзокринных опухолей поджелудочной железы и меньше 3% всех внутрипротоковых новообразований поджелудочной железы. Впервые выделены только в последней редакции гистологической классификации опухолей желудочно-кишечного тракта (ВОЗ, 2010) и отнесены к группе предзлокачественных опухолей поджелудочной железы. В данной статье представлен случай внутрипротоковой тубулопапиллярной опухоли поджелудочной железы у женщины 67 лет. Решить вопрос о выборе правильной тактики лечения пациентов с такими нозологиями из-за их чрезвычайной редкости трудно. Прогноз не ясен. Несомненно, у пациентов с внутрипротоковой тубулопапиллярной опухолью без инвазивного компонента прогноз более благоприятный по сравнению с внутрипротоковой тубулопапиллярной опухолью в сочетании с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы.

Ключевые слова: внутрипротоковая тубулопапиллярная опухоль, внутрипротоковая опухоль, поджелудочная железа

В группе первичных внутрипротоковых новообразований поджелудочной железы (ПЖ) выделены панкреатическая интраэпителиальная неоплазия, внутрипротоковая папиллярная муцинозная опухоль (ВПМО) и внутрипротоковая тубулопапиллярная опухоль (ВТПО). Вторичное вовлечение протоков ПЖ обнаружено при протоковой аденокарциноме и протоковым варианте ацинарноклеточной карциномы.

В литературе описаны необычные случаи внутрипротоковых опухолей ПЖ с преимущественным тубулопапиллярным ростом без признаков ацинарной дифференцировки опухолевых клеток и без заметной выработки муцина. Данные новообразования получили название «внутрипротоковые тубулопапиллярные опухоли», выделенные только в последней редакции гистологической классификации опухолей желудочно-кишечного тракта (ВОЗ, 2010) и отнесены к группе предзлокачественных опухолей поджелудочной железы [1]. Для ВТПО характерны основные признаки: 1) тесно прилегающие тубулярные железы с тяжелой дисплазией эпителия; 2) сосочковые разрастания внутри, но без обструкции главного панкреатического протока; 3) отсутствие видимого муцина; 4) отсутствие ацинарной дифференцировки опухолевых клеток; 5) очаги некроза [12].

ВТПО – редкие опухоли, составляющие меньше 1% всех экзокринных опухолей ПЖ и меньше 3% всех

внутрипротоковых новообразований ПЖ [1]. В литературе описано около 35 случаев ВТПО. Возраст пациентов варьирует от 26 до 84 лет (средний возраст – 56 лет), распределение по половой принадлежности примерно равно [3]. Специфические клинические симптомы не выявлены. Как правило, больные жалуются на абдоминальную боль, тошноту, рвоту. В 6 описанных случаях симптомы полностью отсутствовали и опухоль была диагностирована случайно [14]. Онкомаркеры в пределах нормы. Опухоль чаще локализуется в головке ПЖ, в 30% описанных случаев отмечено диффузное поражение железы. При макроскопическом исследовании опухоль размером от 1 до 15 см (средний размер – 4,7 см), округлая, плотноэластичной консистенции, располагающаяся в расширенных панкреатических протоках, без слизи, с угревидными некрозами, иногда с обструкцией протоков [1, 11]. При микроскопическом исследовании опухоль построена из тесно прилегающих друг к другу тубулярных желез с сосочковыми разрастаниями и со скудным цитоплазматическим муцином. Некоторые протоки полностью облитерированы опухолевыми массами и выглядят как четко ограниченные солидные опухолевые гнезда, замурованные фиброзной стромой. Опухолевые клетки кубической или цилиндрической формы, с выраженными округло-овальными ядрами и заметными ядрышками и эозинофильно-амфифильной цитоплазмой, как правило с тяжелой дисплазией эпи-

теля. Митотическая активность в описанных случаях различна: от 1 до 9 митозов в 10 полях зрения [9]. В 30% описанных случаев в данных опухолях обнаружены KRAS мутации [3, 11], в одном случае – BRAF соматическая мутация [10]. В 50% случаев ВТПО сочетается с инвазивной протоковой аденокарциномой. В 4 описанных случаях ВТПО сочеталась с микрокистозной серозной цистаденомой ПЖ [14]. Во всех описанных случаях отсутствовали метастазы в регионарных лимфатических узлах. В 3 описанных случаях отмечена инвазия в стенку вены, желчного протока и стенку двенадцатиперстной кишки [12]. При иммуногистохимическом исследовании в опухолевых клетках отмечается экспрессия с антителами к цитокератинам 7 и 19, муцином типа 1. Негативны с антителами к цитокератину 20, муцинам 2 и 5АС типов и маркерам ацинарной (трипсин, химотрипсин) и эндокринной дифференцировки (хромогранин, синаптофизин). Индекс мечения с Ki-67 варьировал от 6 до 43%.

В связи с редкостью ВТПО ПЖ приводим клиническое наблюдение.

Больная А., 67 лет, госпитализирована в отделение хирургии в ФМБЦ ГНЦ им. А.И. Бурназяна с диагнозом «образование головки поджелудочной железы» для обследования и лечения. Болеет с сентября 2013 года, когда впервые отметила появление болевого абдоминального синдрома, тяжесть в правом подреберье, двукратную рвоту, общую слабость.

При компьютерной томографии органов брюшной полости в головке поджелудочной железы определяется дилатированный проток, открывающийся на малом дуоденальном соске. Он заполнен внутриспросветными васкуляризованными массами. Рядом отмечен блокированный проток, расширенный до 8 мм, без патологического содержимого. Еще один дилатированный до 11 мм и заполненный васкуляризованными массами проток определяется в крючковидном отростке, вдающийся в вирсунгов проток, который с этого уровня и до фатерова соска также заполнен патологическими массами. Проксимальнее вирсунгов проток расширен до 7 мм. В целом поджелудочная железа небольших размеров, дольчатого строения. Нельзя исключить локальное распространение васкуляризованных масс из протока крючковидного отростка в заднюю паранкреатическую клетчатку. В печеночно-двенадцатиперстной связке определяются лимфатические узлы размером до 11 мм. Печень обычной формы, размеров и структуры. Внутри- и внепеченочные желчные протоки не расширены. Дистальный отдел холедоха не визуализируется, сдавлен расширенной ампулой, заполненной васкуляризованными массами. Желчный пузырь не увеличен, без рентгенконтрастных включений. Селезенка не увеличена, структура однородная.

Заключение. Признаки интрадуктальной папиллярной муцинозной опухоли с поражением протоков головки железы и частично вирсунгова протока. Лимфаденопатия печеночно-двенадцатиперстной связки.

УЗИ органов брюшной полости. Печень не увеличена. Желчный пузырь обычного размера, содержит анэхогенную желчь. Поджелудочная железа: в проекции головки в крючковидном отростке лоцируется гипозоногенное неоднородное образование 25×20×15 мм с нечеткими контурами, неоднородное, блокирующее главный панкреатический проток. Вирсунгов проток расширен до 5 мм. Свободной жидкости в брюшной полости нет.

Онкомаркеры в пределах нормы.

На основании клинической картины заболевания и результатов комплексного лучевого исследования поставлен диагноз «опухоль головки поджелудочной железы $T_2N_xM_0$ ». Пациентка прооперирована 23 октября 2013 года. Во время операции при ревизии поджелудочная железа нормальных размеров, уплотнена, дольчатость сглажена. Пальпаторно в области головки ПЖ опухолевидное образование до 5 см в диаметре. В гепатодуоденальной связке умеренная лимфаденопатия. Отдаленные метастазы не выявлены. Выполнена пилоросохраняющая панкреатодуоденальная резекция.

Послеоперационный период протекал без осложнений.

Макропрепарат представлен органокомплексом: резецированной головкой поджелудочной железы 7×4,5×4 см, частью желудка и отрезком тонкой кишки. На разрезе ткань железы желтовато-сероватая, дольчатого вида. В области крючка головки ПЖ определяется мультицентричное образования размерами 1,5×1,5 см и 1,0×1,0 см беловато-сероватого цвета с четкими контурами. При гистологическом исследовании внутри протоков определяются тубулопапиллярные разрастания атипичных клеток с выраженным полиморфизмом, окруженные фиброзной стромой (рис. 1, 2). Опухоль в пределах поджелудочной железы. В краях резекции общего желчного и главного панкреатического протоков, а также на поверхностях железы элементов опухоали

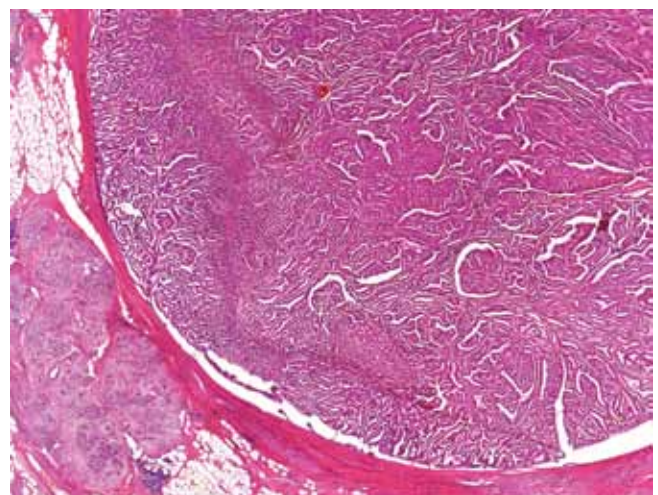


Рис. 1. ВТПО, внутри протока обнаружены тесно прилегающие друг к другу тубулярные железы с сосочковыми разрастаниями. Окраска гемтоксилином и эозином. × 200

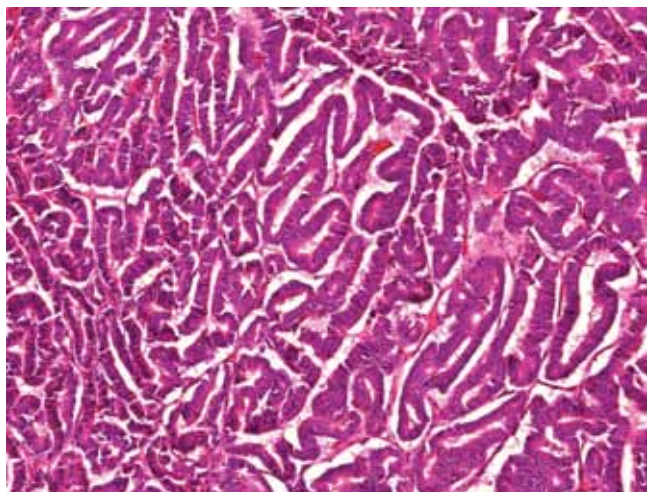


Рис. 2. ВТПО, тяжелая дисплазия эпителия.
Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

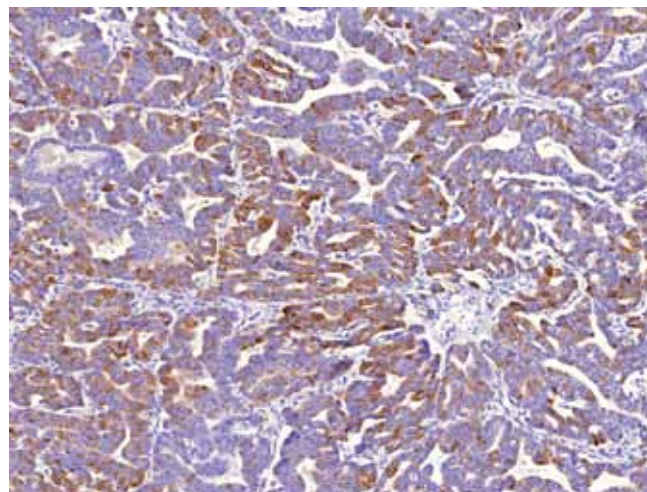


Рис. 3. ВТПО, ИГХ реакция
с муцином типа 6. $\times 400$

нет (R0). В 19 исследованных парапанкреатических лимфатических узлах метастазов нет (N0).

При иммуногистохимическом исследовании отмечена выраженная положительная реакция с вилином, фокально с муцином типа 6 (рис. 3), в отдельных неопластических клетках с CDX2 и муцином типа 2 (рис. 4). Отрицательная реакция с цитокератином 20, муцинами типов 1 и 5 АС. Индекс мечения с Ki-67 – 40% (рис. 5.)

Заключение. Внутрипротоковая тубулопапиллярная опухоль поджелудочной железы с выраженной дисплазией эпителия (ICD-O 8503/2). Опухоль в пределах железы (pT1). В краях резекции опухолевого роста нет (R0). В 19 исследованных лимфоузлах (парапанкреатические) метастазов рака нет (pN0). Стадия IA.

Пациентка выписана с рекомендацией наблюдения у онколога и проведения химиотерапии.

Согласно 2-му изданию Japanese General Rules for the Study of Pancreatic Cancer, ВТПО классифицируют на внутрипротоковые тубулопапиллярные адено-

мы с низкой или умеренной степенью дисплазии и внутрипротоковые тубулопапиллярные карциномы с тяжелой дисплазией эпителия [4, 13]. Esposito et al. и Königsrainer et al. описали случаи ВТПО с наличием микрокист – микрокистозная тубулопапиллярная карцинома как возможный вариант ВТПО [3,15].

Многие авторы сообщают, что данная опухоль довольно трудна для диагностики на предоперационном этапе [2, 5, 6, 7, 8]. В большинстве описанных случаев на основе данных КТ и МРТ внутрипротоковая тубулопапиллярная опухоль диагностирована как внутрипротоковая папиллярная муцинозная опухоль, как и в описанном нами случае. Некоторые авторы описывают возможность установления точного диагноза ВТПО после проведения ЭРХПГ [5, 6, 7].

Кроме того, ВТПО трудна для микроскопической диагностики. Дифференциальную диагностику необходимо проводить с внутрипротоковой папиллярной муцинозной опухолью, протоковой аденокарциномой поджелудочной железы, внутрипротоковым вариантом

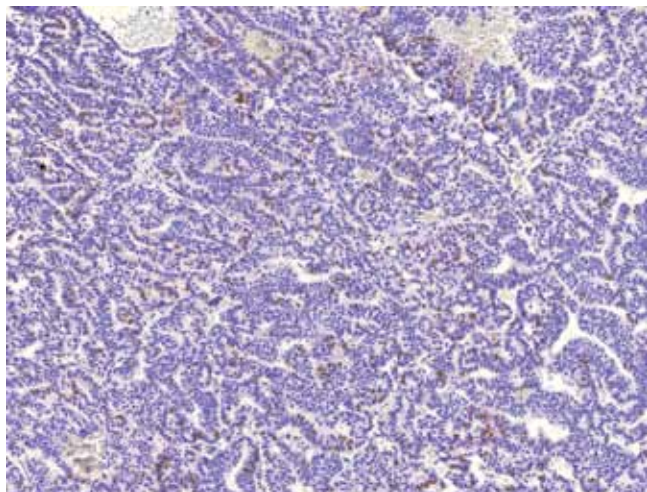


Рис. 4. ВТПО, ИГХ реакция с муцином типа 2. $\times 200$

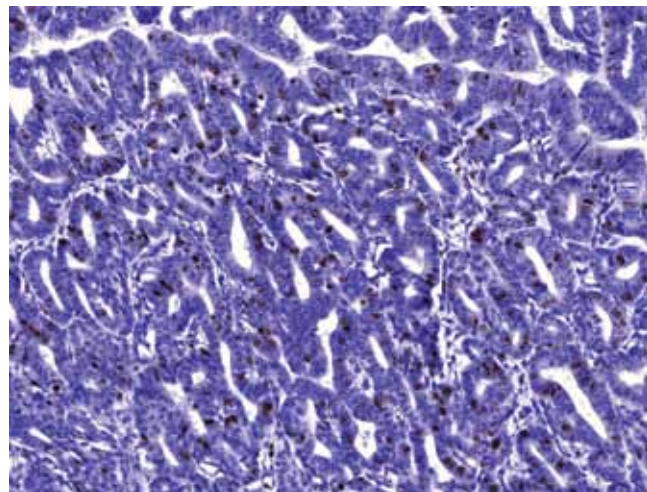


Рис. 5. ВТПО, ИГХ реакция с Ki-67. $\times 400$

Таблица

Дифференциально-диагностическая панель

	Макро-	Микро-	ИГХ	Дополнение
ВТПО	Солидная опухоль с участками некроза, без видимого муцина	Тубулопапиллярные структуры, некрозы	<i>Положительно</i> ЦК 7 и 19, муцин типа 1 и 6 <i>отрицательно</i> ЦК20, муцин типа 2 и 5AC	
ВПМО	Кистозно-расширенные протоки с видимым муцином	Папиллярная структуры, выраженный муцин, связь с протоками	<i>Положительно</i> муцин типа 1, 2, 5AC, 6	
ПАК	Солидная опухоль, плотная, белесоватого цвета	Железистые структуры, выраженная десмопластическая реакция стромы	<i>Положительно</i> ЦК7, муцин типа 1, 2, 5AC	Отсутствие внутрипротокового роста
АКК	Солидная опухоль, плотная, белесоватого цвета	Ацинарная дифференцировка	<i>Положительно</i> трипсин, химотрипсин	
Карцинома толстой кишки	Солидная опухоль, плотная, белесоватого цвета, участки некроза	Железистые структуры из клеток с базофильной цитоплазмой и гиперхромными ядрами, некрозы	<i>Положительно</i> ЦК 19, 20, виллин, CDX2, фокально муцин типа 2 <i>отрицательно</i> муцин типа 1, 5AC и 6	В анамнезе колоректальный рак

ВТПО – внутрипротоковая тубулопапиллярная опухоль; ВПМО – внутрипротоковая папиллярно-муцинозная опухоль; ПАК – протоковая аденокарцинома; АКК – ацинарноклеточная карцинома; ИГХ – иммуногистохимия; ЦК – цитокератин.

ацинарноклеточной карциномы и метастазом колоректального рака (табл.).

Решить вопрос о выборе правильной тактики лечения пациентов с такими нозологиями из-за того, что они чрезвычайно редки, трудно. Прогноз не ясен. Несомненно, у пациентов с ВТПО без инвазивного компонента прогноз более благоприятный по сравнению с ВТПО в сочетании с протоковой аденокарциномой поджелудочной железы. 5-летняя выживаемость при ВТПО прослежена только в трети описанных случаев. Рецидив и отдаленные метастазы описаны у 20% больных, но даже в этих случаях выживаемость составила более 2 лет. Только в одном случае пациент умер через 7 месяцев после проведенного лечения от множественных метастазов в печень [12].

Литература

1. Bosman F.T. WHO Classification of tumors of the digestive system // Lyon, 2010.
2. Imaging of intraductal tubular tumors of the pancreas / K. Ishigami et al // Am J Roentgenol 2008;191:1836–40.
3. Intraductal and cystic tubulopapillary adenocarcinoma of the pancreas--a possible variant of intraductal tubular carcinoma / I. Königsrainer et al. // Pancreas. 2008;36(1):92–5.
4. Intraductal carcinoma with complex fusion of tubular glands without Hise macroscopic mucus in main pancreatic duct: Dilemma in classification / T. Nisa et al. // Pathol Int 2007;57:741–5.
5. Intraductal tubular adenocarcinoma of the pancreas diagnosed before surgery by transpapillary biopsy: case report and review / K. Ito et al. // Gastrointest Endosc 2005;61:325–9.
6. Intraductal tubular carcinoma in an adenoma of the main pancreatic duct of the pancreas head / K. Itatsu et al. // J Gastroenterol 2006;4:702–5.
7. Intraductal tubular carcinoma of the pancreas: a case report with the imaging findings / D.K. Oh et al. // Korean J Radiol 2008;9:473–6.
8. Intraductal tubular carcinoma of the pancreas: case report with review of literature / M. Hioki et al. // Anticancer Research 2010;30:4435–42.
9. Intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas on fine needle aspiration: Case Report with Differential Diagnosis / H. Guan et al. // Diagn Cytopathol. 2012 doi:10.1002/dc.22890.
10. Intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas with somatic BRAF mutation / T. Urata et al. // Clinical Journal of Gastroenterology, 2012;5(6): 413–20.
11. Intraductal tubulopapillary neoplasm of the pancreas: A clinicopathologic study of 6 case / X.-Y. Chang et al. // Chinese Journal of Pathology, 2013; 42(4):248–51.
12. Intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas distinct from pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms / H. Yamaguchi et al. // Am J Surg Pathol, 2009;33:1164–72.
13. Japan Pancreas Society: General rules for the study of pancreatic cancer, 2nd ed. 2002; Kanehara, Tokyo.

14. Kasugai H., Tajiri T., Takehara I. Y. Intraductal Tubulopapillary Neoplasms of the Pancreas: Case Report and Review of the Literature // J Nippon Med Sch 2013;80:224–9.
15. Microcystic tubulopapillary carcinoma of the pancreas: a new tumor entity? / I. Esposito et al. // Virchows Arch, 2004;444:447–53.

VARIANT OF INTRADUCTAL NEOPLASMS OF THE PANCREAS WITH TUBULOPAPILLARY PATTERN GROWTH AND SCANT PRODUCTION OF MUCIN

O.V. Paklina, G.R. Setdikova, E.N. Gordienko, A.A. Artem'ev

Intraductal tubulo-papillary tumors (IDTP) are rare tumors that are <1% of all exocrine pancreatic tumors and <3% of intraductal pancreatic neoplasms. First identified only in the latest edition histological classification of tumors of the gastrointestinal tract (WHO, 2010) and assigned to a group of premalignant tumors of the pancreas. This article presents a case intraductal tubulopapillary tumors with anaplastic carcinoma of the pancreas in women 67 years of age. It is difficult to decide on the choice of the right treatment strategy of patients with these entities that due to their extreme rarity. The prognosis is not clear. Undoubtedly, patients with IDTP without invasive component prognosis is more favorable compared with IDTP with ductal adenocarcinoma of the pancreas.

Key word: Intraductal tubulo-papillary tumors, intraductal neoplasms of the pancreas, pancreas

Информация об авторах

Паклина Оксана Владимировна – докт. мед. наук, заведующая патологоанатомическим отделением ГНЦ им. А.И. Бурназяна.
Адрес: 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23.

Сетдикова Галия Равиловна – канд. мед. наук, врач патологоанатомического отделения ГНЦ им. А.И. Бурназяна.
Адрес: 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23.

Гордиенко Елена Николаевна – врач патологоанатомического отделения ГНЦ им. А.И. Бурназяна.
Адрес: 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23.

Артемьев Алексей Игоревич – хирург Центра хирургии и трансплантологии ГНЦ им. А.И. Бурназяна.
Адрес: 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23.

Материал поступил в редакцию 18 сентября 2013 года.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ, БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕКСТРАНСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ ОСТРОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА У МЫШЕЙ BALB/C И C57BL/6

**С.О. Абдулаева², Т.И. Хомякова², Е.Ю. Симонова², И.С. Цветков²,
М.Т. Добрынина¹, О.В. Макарова^{1,2}, А.Н. Яцковский³**

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

² ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

В работе проведено сравнительное исследование морфологических, иммунологических и бактериологических проявлений острого язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия у мышей линий Balb/c и C57Bl/6. Мыши вместо питьевой воды потребляли в течение 4 суток 5% и 3 суток – 7% водный раствор декстрансульфата натрия (молекулярная масса 100 кДа). По данным макроскопической оценки распространенности язв и кровоизлияний в слизистой оболочке ободочной кишки показано, что у мышей линии C57Bl/6, по сравнению с Balb/c, патологические изменения более выражены. Морфометрическое исследование патоморфологических изменений стенки ободочной кишки позволило установить, что показатели распространенности язв, глубины некрозов, воспалительной инфильтрации и выраженности отека подслизистого слоя статистически значимо выше у мышей C57Bl/6. У мышей обеих линий с острым язвенным колитом снижался уровень практически всех изученных представителей: лактозонегативных энтеробактерий, энтерококков *E. faecalis* и лактобактерий, за исключением энтерококков *E. fecium*, количество которых повышалось у мышей C57Bl/6. На системном уровне у мышей Balb/c с острым язвенным колитом снижался уровень ИФН-γ и ИЛ-4, а у C57Bl/6 достоверных изменений уровня цитокинов не выявлено.

Ключевые слова: кишечник, микрофлора, острый язвенный колит, Balb/c, C57Bl/6

В последние годы среди населения отмечается рост частоты встречаемости синдрома раздраженной кишки, воспалительных заболеваний тонкой и толстой кишки, таких как болезнь Крона и язвенный колит [13, 14]. Выраженность морфофункциональных изменений тонкой и толстой кишки при стрессорных воздействиях и воспалительных заболеваниях определяется состоянием эпителиальной выстилки, мукозальной иммунной системы и составом просветной микрофлоры. По данным литературы, ключевую роль в патогенезе язвенного колита играет иммунная система слизистой оболочки кишечника, которая находится в процессе постоянного взаимодействия с пищевыми антигенами и просветной микрофлорой [9, 10].

В развитии и тяжести течения воспалительных заболеваний кишечника наряду с перечисленными факторами имеет важное значение преобладание реакций

врожденного (Tx1) или адаптивного (Tx2) иммунного ответа. Для понимания генотипически обусловленных внутривидовых различий адаптивных и дизадаптивных реакций, воспалительных процессов, развивающихся в тонкой и толстой кишке, необходимо их изучение на линейных животных. Классической моделью для изучения особенностей клеточных и гуморальных реакций иммунной системы при воспалительных процессах являются мыши линий Balb/c и C57Bl/6, в связи с преобладанием у них, соответственно, Tx2 или Tx1 типа иммунного ответа [3, 8].

Для изучения механизмов развития воспалительного процесса в толстой кишке широко используется модель индуцированного декстрансульфатом натрия острого язвенного колита, разработанная Okayasu et al. [11]. Melgar S. с соавторами [9] изучали морфологические изменения ободочной кишки при индуциро-

ванном декстрансульфатом натрия язвенном колите и показали, что у мышей C57Bl/6 с преобладанием Th1 типа иммунного ответа их выраженность выше, чем у мышей Balb/c с преобладанием Th2 типа иммунного ответа [9]. В литературе сведения о морфологических проявлениях острого язвенного колита у мышей этих линий во взаимосвязи с иммунологическими и бактериологическими нарушениями отсутствуют.

В связи с этим целью работы было сравнительное исследование морфологических, иммунологических и бактериологических проявлений острого язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, у мышей линий Balb/c и C57Bl/6.

Материалы и методы

В работе использовали половозрелых самцов мышей Balb/c (n=20) и C57Bl-6 (n=20), полученных из питомника «Столбовая». Возраст мышей составил 9–10 недель, масса тела 23–25 граммов. Модель острого язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия (молекулярная масса 100000; Fluka), воспроизводили по I. Okayasu et al. [11]. Мыши контрольной группы получали питьевую воду, мыши опытной группы вместо питьевой воды получали 5% раствор декстрансульфата натрия в течение 4 суток и 7% раствор в течение следующих 3 суток.

Для гистологического исследования проводили забор фрагментов среднего отдела ободочной кишки у животных опытных и контрольной групп. Фрагменты органов фиксировали в растворе Буэна. Образцы тканей проводили по спиртовым растворам возрастающих концентраций, заливали в парафин, изготавливали срезы и окрашивали их гематоксилином и эозином. С целью выявления гранул декстрансульфата в просвете кишки и печени материал фиксировали в жидкости Карнуа и гистологические срезы окрашивали толуидиновым синим (pH 2,0).

Для морфометрической оценки площади кровоизлияний и язв в макропрепаратах продольно рассеченной ободочной кишки мышей с колитом проводили фотографирование препаратов и подсчет с помощью морфометрической программы Image-Pro.

Для оценки патоморфологических изменений в продольно ориентированных гистологических препаратах слизистой оболочки толстой кишки при язвенном колите, индуцированном приемом декстрансульфата натрия, была использована модифицированная нами шкала полуколичественной оценки, разработанная S. Kitajima [7]. Оценку проводили в баллах по ряду критериев. Распространенность язв: 0 – отсутствует; 1 – площадь язвы занимает 10–20% поля зрения; 2 – площадь язвы занимает 21–50% поля зрения; 3 – площадь язвы занимает 51–80% поля зрения; 4 – площадь язвы занимает все поле зрения. Глубина некроза: 0 – отсутствует; 1 – некроз $\frac{1}{3}$ высоты крипты; 2 – некроз $\frac{2}{3}$ высоты крипты; 3 – тотальный некроз слизистой оболочки. Выраженность отека подслизистого слоя:

0 – отсутствует; 1 – подслизистый слой шириной не более чем в 2 раза больше по сравнению с нормой; 2 – подслизистый слой шириной не более чем в 3 раза больше по сравнению с нормой; 3 – подслизистый слой шириной более чем в 3 раза по сравнению с нормой и наличие в нем воспалительной инфильтрации нейтрофилами; 4 – сочетание указанных выше изменений с резко выраженным отеком и выраженной диффузно-очаговой инфильтрацией нейтрофилами.

С целью изучения цитокинового профиля в культуральной жидкости спленоцитов, активированных конканавалином А, определяли уровень ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-4, ИЛ-17, ИФН- γ , ФНО- α , ГМ-КСФ методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора mouse Th1/Th2 10plex BMS820FF BenderMedSystems на приборе CytomicsFC500 BeckmanCoulter (США).

Оценку состояния микрофлоры толстой кишки проводили путем высевания на соответствующие питательные среды (HiMedia, Индия) десятичных разведений гомогената фекалий, взятых из прямой кишки, по следующим параметрам: уровень лактозоположительных и лактозоотрицательных энтеробактерий, уровень энтерококков (*E. faecalis et fecium*), уровень лактобактерий. Результаты посевов пересчитывали и представляли в виде количества колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 грамм фекалий.

Статистическую обработку показателей проводили с учетом характера распределения параметрическими (t-критерий Стьюдента) и непараметрическими методами (U-критерий Манна-Уитни). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

При гистологическом исследовании микропрепаратов, окрашенных толуидиновым синим, в просвете тонкой кишки, строме ее ворсинок, звездчатых макрофагах печени (клетках Купфера) выявлялись метакроматически окрашенные массы и гранулы декстрана (рис. 1).

На 3-и и 5-е сутки у мышей Balb/c и C57Bl/6, получавших вместо питьевой воды раствор декстрансульфата натрия, был жидкий кашицеобразный стул черно-коричневого цвета, в котором выявлялась примесь крови. При вскрытии брюшной полости толстая кишка была с участками сужения и расширения, нечетко очерченными зонами темно-красного цвета.

При макроскопическом исследовании ободочной кишки у всех 10 мышей Balb/c с острым язвенным колитом определялись мелкие эрозии и очаги гиперемии (рис. 2). На поверхности слизистой оболочки ободочной кишки большинства мышей C57Bl/6 выявлялись обширные очаги гиперемии и язвы. У части мышей C57Bl/6 практически вся внутренняя поверхность ободочной кишки была изъязвлена и дно язв заполнено сгустками крови (рис. 2).

При количественной оценке макроскопических изменений в слизистой оболочке ободочной кишки у

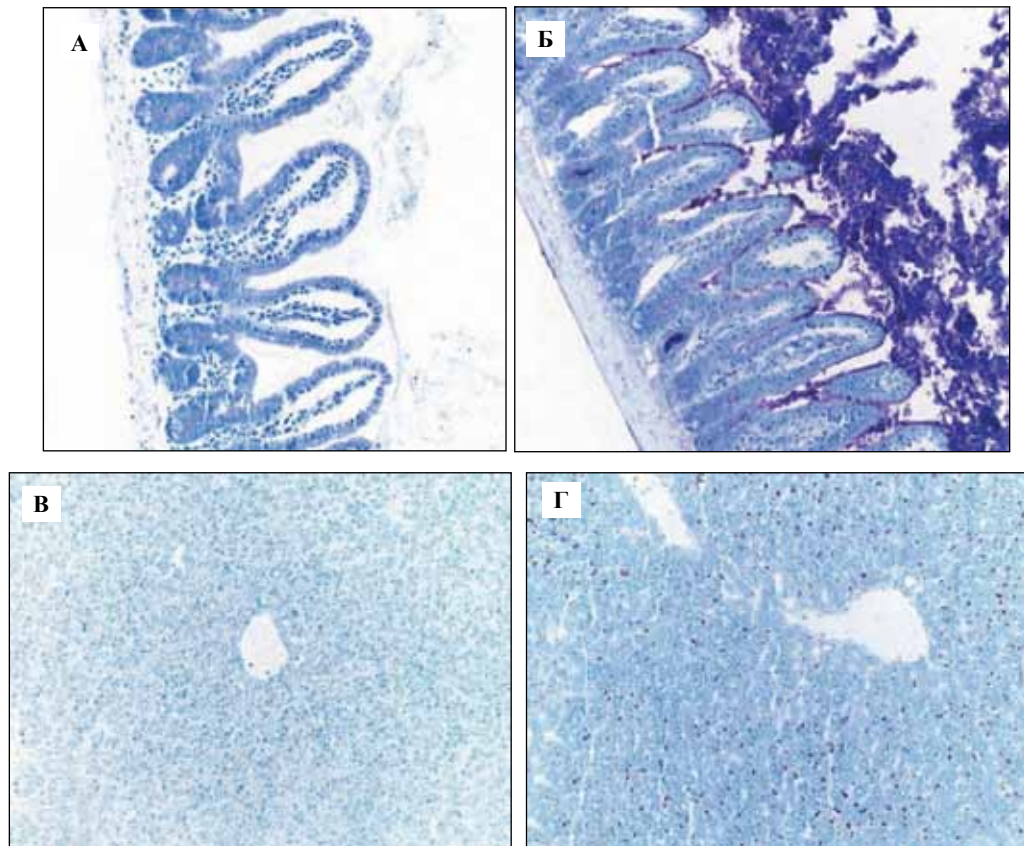


Рис. 1. Подвздошная кишка мыши контрольной группы (А, В) и при остром язвенном колите (Б, Г). Метакрохроматическое окрашивание отсутствует (А, В). В просвете кишки, на поверхности эпителия и в строме ворсинок видны метакрохроматически окрашенные массы и гранулы декстрана (Б); накопление гранул декстрансульфата натрия в клетках Купфера (Г). Окраска толуидиновым синим. $\times 200$

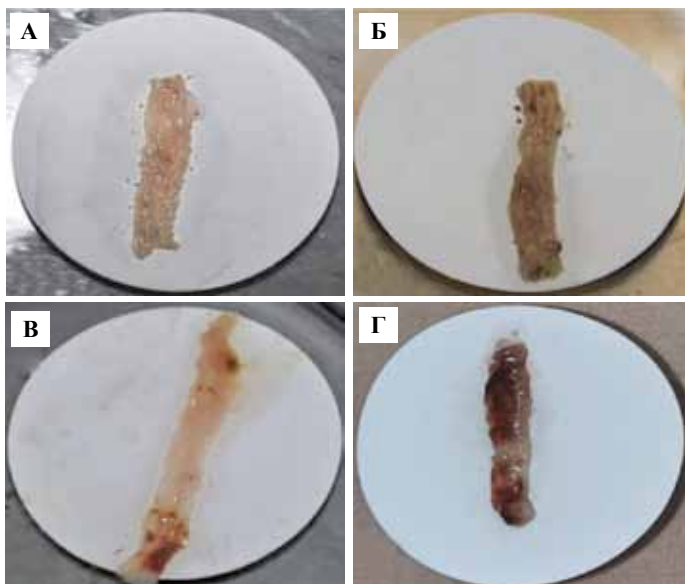


Рис. 2. Ободочная кишка мышей линии Balb/c (А, В) и линии C57Bl/6 (Б, Г) контрольных групп (А, Б) и при остром язвенном колите (В, Г). В слизистой оболочке ободочной кишки у мышей Balb/c видны мелкие эрозии и очаги гиперемии (В), у мышей C57Bl/6 изменения обширные субтотальные (Г)

мышей сравнимых линий оказалось, что процесс более выражен у мышей C57Bl/6 (рис. 3).

При микроскопическом исследовании в ободочной кишке у мышей обеих линий наблюдали изменения различной тяжести: очаговые некрозы и эрозии слизистой оболочки, дистрофические и десквамативные изменения колоноцитов, на участках с сохраненной слизистой оболочкой – увеличение размеров бокаловидных клеток и слизи на поверхности эпителиальной выстилки. В подслизистом слое выявлены явления отека и диффузной воспалительной инфильтрации лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами, расширение просветов лимфатических сосудов (рис. 4).

По данным полуколичественной оценки выраженности некротических, экссудативных и воспалительных изменений тяжесть процесса и его распространенность были выше у мышей C57Bl/6 (табл. 1).

По данным микробиологического исследования по сравнению с мышами Balb/c у мышей C57Bl/6 были более выражены нарушения микробиоценоза, у них достоверно снижалось количество лактобактерий, энтеробактерий *Lac-/E.coli*, уменьшался уровень *E. faecalis* и повышалось количество *E. fecium*.

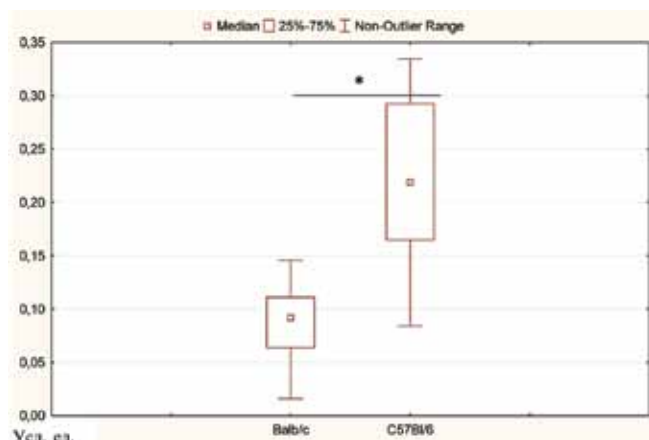


Рис. 3. Относительная площадь (на 1 мм²) макроскопически визуализируемых изменений слизистой оболочки ободочной кишки при индуцированном декстрансульфатом натрия острым язвенном колите у мышей Balb/c и C57Bl/6.

* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой

В составе просветной микрофлоры у мышей Balb/c также снижалось количество энтеробактерий *Lac*+/*E. coli* и лактобактерий (табл. 2).

В цитокиновом профиле у мышей Balb/c с острым язвенным колитом наблюдалось снижение уровня IFN- γ (показатели в пг/мл контрольной группы составили 11508,7 (954,7; 14442,4), а опытной – 123,5 (0; 2232,1)) и ИЛ-4 (показатели в пг/мл контрольной группы составили 183,7 (132,7; 437,3) , а опытной – 0 (0; 0)) у мышей C57Bl/6 показатели варьировали, но статистически значимых изменений уровня цитокинов не наблюдалось.

Таким образом, по данным макроскопического исследования ободочной кишки оказалось, что у мышей C57Bl/6 с острым язвенным колитом, вызванным приемом декстрансульфата натрия, по сравнению с Balb/c более выражены патологические изменения слизистой оболочки. При морфометрической оценке выраженности патоморфологических изменений показатели распространенности язв, глубины некрозов,

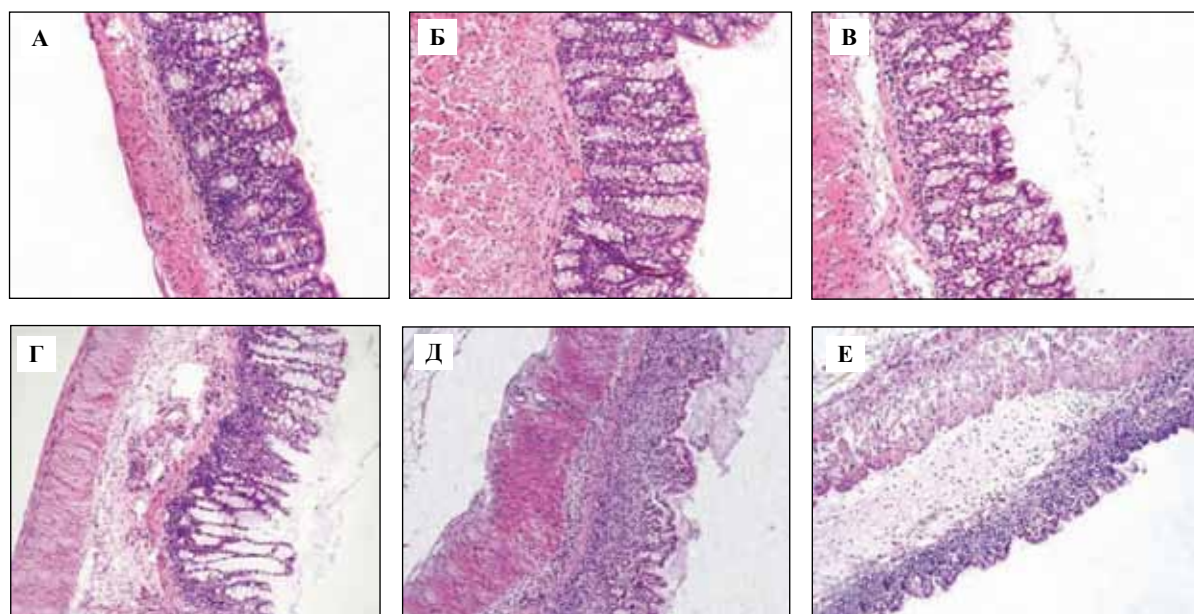


Рис. 4. Морфологические изменения в стенке ободочной кишки при индуцированном декстрансульфатом натрия острым язвенном колите, в соответствии со шкалой полуколичественной оценки.

А – 0 баллов. Эпителиальная выстилка сохранена на всем протяжении, просветы крипт узкие. Патологических изменений нет.

Б – 1 балл. Слабо выраженная воспалительная инфильтрация, полнокровие сосудов, небольшой отек подслизистого слоя.

В – 2 балла. Очаговые дистрофические и десквамативные изменения эпителия, умеренный отек подслизистого слоя, расширение и полнокровие сосудов.

Г – 3 балла. Выраженные дистрофические и десквамативные изменения эпителия с образованием эрозий.

Выраженная воспалительная инфильтрация в собственной пластинке слизистой оболочки и умеренная в подслизистом слое.

Резко расширенные лимфатические сосуды.

Д, Е – 4 балла. Обширные очаговые некрозы, эрозии и язвы в слизистой оболочке; локально с реэпителизацией.

Резко выраженная воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистого слоя.

Отек подслизистого и мышечного слоев.

Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Таблица 1

Полуколичественная оценка выраженности патологических изменений
при индуцированном декстрансульфатом натрия острым язвенным колите у мышей Balb/c и C57Bl/6 (M±SE)

Линии мышей		Относительная площадь макроскопически визуализируемых изменений (на 1 мм²)	Показатели микроскопической полуколичественной оценки изменений (баллы)		
			распространенность эрозий язв	глубина некрозов	отек и инфильтрация нейтрофилами подслизистого слоя
Balb/c	1	0,087±0,01	0,8±0,1	1,1±0,1	1,6±0,1
C57Bl/6	2	0,218±0,03	1,8±0,2	1,8±0,1	3,5±0,1
Порог доверительной вероятности		p1-2=0,00	p1-2=0,00	p1-2=0,00	p1-2=0,00

Таблица 2

Изменения состава просветной микрофлоры (КОЕ/г) толстой кишки при индуцированном декстрансульфатом натрия острым язвенным колите у мышей Balb/c и C57Bl/6 (Me (25L;75U))

Группы наблюдения			Энтеробактерии <i>Lac-</i> (*10 ⁵)	Энтерококки (*10 ⁵)		Лактобактерии (*10 ⁵)
				<i>E. faecalis</i>	<i>E. fecium</i>	
Balb/c	Контроль	1	Газон	857,5 (115;1600)	300 (110;6500)	22000 (2300; 32000)
	Острый язвенный колит	2	0	0,1 (0,1;500)	3600 (3100; 9000)	1600 (375; 1700)
C57Bl/6	Контроль	3	Газон	325 (150;500)	3600 (2400;4400)	35500 (17000;40000)
	Острый язвенный колит	4	0 (0;0)	0 (0;0)	215000 (80000;440000)	5250 (330;19000)
Порог доверительной вероятности			p1-2=0,01 p3-4=0,00	p1-2=0,14 p3-4=0,04	p1-2=0,21 p3-4=0,00	p1-2=0,03 p3-4=0,02

воспалительной инфильтрации и выраженности отека подслизистого слоя также были достоверно выше у мышей линии C57Bl/6.

Механизмы развития декстран-индуцированного колита, по данным M. Friswell et al. [6], связаны с активацией реакций врожденного иммунитета, так как в развитии воспаления при его воздействии, очевидно, ключевую роль играют повреждение эпителия и активация макрофагов, которые, как показано нами в гистологических препаратах тонкой кишки и печени, фагоцитируют частицы декстрансульфата. По сравнению с мышами Balb/c, большая выраженность морфологических проявлений колита у мышей C57Bl/6 генотипически обусловлена преобладанием Th1 типа иммунного ответа. Наши данные о большей выраженности воспалительных изменений в толстой кишке у мышей C57Bl/6, по сравнению с мышами Balb/c, согласуются с литературными [9]. По данным С.О. Абдулаевой и соавт. [1], в норме у мышей Balb/c, по сравнению

с мышами C57Bl/6, отмечается высокое содержание кортикостерона, который блокирует активацию транскрипционного фактора NF-kB и тем самым ингибирует гены воспалительного и иммунного ответа [15]. Кроме того, показано, что у мышей Balb/c в толстой кишке более выражен слизистый барьер, который оказывает протективный эффект, препятствуя цитотоксическому действию декстрансульфата, вызывающего повреждение эпителия [5].

При исследовании просветной микрофлоры у мышей обеих линий наблюдали снижение практически всех изученных представителей: лактозонегативных энтеробактерий, энтерококков *E. faecalis* и лактобактерий. Исключение составили энтерококки *E. fecium*, их уровень повышался у мышей C57Bl/6. На системном уровне у мышей Balb/c с острым язвенным колитом снижался уровень ИФН-γ и ИЛ-4, а у мышей C57Bl/6 достоверные изменения уровня цитокинов не отмечались.

Выявленное снижение уровня лактобактерий и лактозоферментирующих энтеробактерий свидетельствует о формировании патогенного профиля микробиома [2]. Полученные по результатам микробиологического анализа данные согласуются с данными литературы. Так, M. Friswell et al. [6] отмечают, что при развитии хронического колита происходит снижение биологического разнообразия бактерий, населяющих кишечник, и значительное уменьшение некоторых бактерий-симбионтов, сочетающееся с увеличением количества токсигенных *E. coli* инвазивного фенотипа. Подобное снижение общего количества представителей просветной и пристеночной микрофлоры обусловлено, по-видимому, описанными в литературе абсорбционными свойствами декстрансульфата [4, 12].

Выводы

Таким образом, по сравнению с мышами Balb/c, у мышей C57Bl/6 морфологические проявления острого язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, более выражены. При остром язвенном колите количественные показатели просветной микрофлоры у мышей обеих линий снижаются. Уровень продукции и секреции цитокинов у мышей C57Bl/6 не изменяется, у мышей Balb/c снижается уровень ИФН-γ и ИЛ-4.

Литература

1. Абдулаева С.О., Кирюхин С.О., Белоусова Т.А., Хомякова Т.И., Черников В.П., Макарова О.В. Морфологическая характеристика острого язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, у мышей линии Balb/c // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 3 С. 38–46.
2. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. М: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 304 с.
3. Трунова Г.В., Макарова О.В., Диатроптов М.Е., Богданова И.М., Михайлова Л.П., Абдулаева С.О. Морфофункциональная характеристика иммунной системы мышей линий Balb/c и C57Bl/6 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 151. № 1. С. 99–102.
4. Araki Y., Bamba T., Mukaisho K., Kanauchi O., Ban H., Bamba S., Andoh A., Fujiyama Y., Hattori T., Sugihara H. Dextran sulfate sodium administered orally is depolymerized in the stomach and induces cell cycle arrest plus apoptosis in the colon in early mouse colitis // Oncol Rep. 2012. V. 28. N 5. P. 1597–605.
5. Bauer M.E., Perks P., Lightman S.L., Shanks N. Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution? // Life Sci. 2001. V. 69. N 10. P. 1167–79.
6. Friswell M., Campbell B., Rhodes J. The role of bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease // Gut Liver. 2010. V. 4. N 3. P. 295–306.
7. Kitajima S., Takuma S., Morimoto M. Histological analysis of murine colitis induced by dextran sulfate sodium of different molecular weights // Exp Anim. 2000. V. 49. N 1. P. 9–15.
8. Mahler M., Bristol I.J., Leiter E.H., Workman A.E., Birkenmeier E.H., Elson C.O., Sundberg J.P. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis // Am J Physiol. 1998. V. 274. N 3. Pt 1. P. G544–51.
9. Melgar S., Karlsson A., Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005. V. 288. N 6. P. G1328–38.
10. Nakanishi M., Tazawa H., Tsuchiya N., Sugimura T., Tanaka T., Nakagama H. Mouse strain differences in inflammatory responses of colonic mucosa induced by dextran sulfate sodium cause differential susceptibility to PhIP-induced large bowel carcinogenesis // Cancer Sci. 2007. V. 98. N 8. P. 1157–63.
11. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice // Gastroenterology. 1990. V. 98. N 3. P. 694–702.
12. Saunders D.R., Sillery J., Rachmilewitz D. Effect of dioctyl sodium sulfosuccinate on structure and function of rodent and human intestine // Gastroenterology. 1975. V. 69. N 2. P. 380–6.
13. Shi X.Z., Winston J.H., Sarna S. K. Differential immune and genetic responses in rat models of Crohn's colitis and ulcerative colitis // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011. V. 300. N 1. P. G41–51.
14. Shokrani M. Inflammatory bowel disease: diagnosis and research trends: the clinical lab is playing an increasingly important role // MLO Med Lab Obs. 2012. V. 44. N 8. P. 8, 10, 12; quiz 14.
15. Zhao J., Karalis K.P. Regulation of nuclear factor-kappaB by corticotropin-releasing hormone in mouse thymocytes // Mol Endocrinol. 2002. V. 16. N 11. P. 2561–70.

COMPARATIVE MORPHOLOGICAL, BACTERIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SEVERE ULCERATIVE COLITIS INDUCED BY SODIUM DEXTRAN SULFATE IN BALB/C AND C57BL/6 MICE

S.O. Abdulayeva, T.I. Khomyakova, E.Yu. Simonova, I.S. Tsvetkov, M.T. Dobrynina, O.V. Makarova, A.N. Yatskovskiy

A comparative study was performed on morphological, immunological and bacteriological manifestations of acute ulcerative colitis induced by sodium dextran sulfate in Balb/c and C57Bl/6 mice. Mice consumed 5% aqueous solution of sodium dextran sulfate (molecular weight of 100kDa) for 3 days and 7% sodium dextran sulfate for 4 days instead of drinking water. Macroscopic evaluation of the prevalence of ulcers and bleeding in the colonic lining showed that pathological changes were more pronounced in C57Bl/6 mice compared with Balb/c mice. Morphometry of pathological changes of the colonic wall revealed significantly higher prevalence of ulcers, depth of necrosis, inflammatory infiltration, and severity of submucosal edema

in C57Bl/6 mice. The levels of almost all studied types of microflora: lactose negative Enterobacteriaceae, enterococci *E. faecalis* and lactobacilli were reduced in mice of both strains with acute ulcerative colitis, except for *E. fecium*, which number increased in C57Bl/6 mice. IFN- γ and IL-4 decreased at the system level in Balb/c mice. with acute ulcerative colitis. Significant changes in cytokine levels were not found in C57Bl/6 mice.

Key words: gut, microflora, severe ulcerative colitis, Balb/c, C57Bl/6.

Информация об авторах

Абдулаева Сабина Олеговна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120-80-65. E-mail: sabina347@mail.ru

Хомякова Татьяна Ивановна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120-80-65. E-mail: tatkhom@yandex.ru

Симонова Евгения Юрьевна – научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120-80-65. E-mail: evgenisimonova@mail.ru

Цветков Иван Сергеевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120-80-65. E-mail: davedm66@gmail.com

Добрынина Мариэтта Тиграновна – старший преподаватель кафедры клеточной биологии, цитологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Макарова Ольга Васильевна – докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе НИИ морфологии человека РАМН, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120-8065. E-mail: morfolhum@mail.ru

Яцковский Александр Никодимович – профессор кафедры гистологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.

Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Телефон 8 (499) 939-45-67.

Материал поступил в редакцию 15 сентября 2013 года.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ПЛАЦЕНТЫ ПРИ АЛЛОГЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ У МЫШЕЙ С ВЫСОКОЙ ФЕРТИЛЬНОСТЬЮ И МУРАМИЛДИПЕПТИД-ИНДУЦИРОВАННЫМИ АБОРТАМИ

К.А. Артемьева¹, О.В. Калюжин², И.И. Степанова¹, С.В. Назимова¹, М.Н. Болтовская¹

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Впервые проведено сравнительное морфологическое и морфометрическое исследование тимуса, селезенки и плаценты мыши в условиях аллогенной беременности при фертильном сочетании линий (самки CBA × самцы BALB/c) и иммунозависимом невынашивании, индуцированном β-гептилгликозидом мурамилдипептида (С7МДП). Установлено, что при мурамилдипептид-индуцированных абортах в тимусе усиливаются проявления акцидентальной инволюции, в селезенке резко увеличиваются объемные доли белой пульпы и Т-зависимой зоны ПАЛМ, в плаценте сохранившихся плодов проявляются признаки фетоплацентарной недостаточности.

Ключевые слова: тимус, селезенка, плацента, аллогенная беременность, мурамилдипептид, фетоплацентарная недостаточность, мурамилдипептид-индуцированные аборт, морфологическое исследование

Формирование материнской иммунотолерантности к полуаллогенному плоду обеспечивается множественными системными и локальными механизмами, реализующимися на разных сроках гестации, однако исследование морфофункциональной адаптации иммунной системы к состоянию беременности у человека по этическим причинам практически невозможно. Другим ограничением является отсутствие адекватных систем *in vitro*, позволяющих оценить сложные взаимодействия между трофобластом плаценты и основными типами материнских иммунных клеток, поэтому для изучения клеточных и молекулярных механизмов физиологии и патологии беременности, разработки новых диагностических, профилактических и терапевтических мер, направленных на ее сохранение, широко используют экспериментальные модели *in vivo*. Общепринятыми объектами для исследования иммунологических аспектов беременности служат мыши, у которых молекулярные механизмы развития плаценты, тип строения плаценты, характер материнского и плодного кровообращения наиболее близки к таковым у человека [8, 12, 14]. Известен ряд сингенных и аллогенных мышиных моделей для изучения

механизмов невынашивания беременности [11]. Нами была разработана новая модель иммунозависимого невынашивания аллогенной беременности у мышей CBA/JxBALB/c, позволяющая достичь высокого уровня резорбции эмбрионов (45–50%) с использованием иммуномодулятора N-ацетил-β-1-О-гептилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина (β-гептилгликозид мурамилдипептида, С7МДП) [1].

Цель работы – сравнительная оценка морфофункционального состояния тимуса, селезенки и плаценты у самок CBA/J при фертильной беременности и мурамилдипептид-индуцированных абортах.

Материалы и методы

В работе использовали 8–10-недельных мышей инбредных линий, самок CBA и самцов BALB/c, массой тела 23–25 граммов, полученных из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария НИИ морфологии человека РАМН. Эксперименты проводили в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава

СССР № 577 от 12 августа 1977 года. Самок и самцов ссаживали в соотношении 3:1, день появления копулятивной пробки обозначали как 1-й день гестации (ДГ). С7МДП вводили внутривентально на 5-й ДГ (завершение имплантации) и 7-й (до начала плацентации) ДГ в дозе 20 мкг в 0,1 мл 0,9% раствора NaCl на 1 животное (≈ 1 мг/кг). Выбранная доза С7МДП соответствует ED_{50} , определенной в предварительной серии экспериментов на септических моделях *in vivo* [5]. Кратность и сроки введения препарата были выбраны для обеспечения длительного повышения уровня цитокинов и исключения возможности прямого действия С7МДП на процессы имплантации и/или развития плаценты. Наступление беременности верифицировали по нарастанию уровня прогестерона в сыворотке крови, полученной из хвостовой вены на 5-й день предполагаемой беременности, методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов для иммуноферментного определения прогестерона в сыворотке крови «Прогестерон-ИФА» (фирма Хема-Медика, Россия). Были сформированы четыре экспериментальные группы по 7 животных в каждой: СВА×BALB/c на 8-й день ДГ, интактные и после введения С7МДП; СВА×BALB/c на 14-й ДГ, интактные и после введения С7МДП. Животных выводили из эксперимента цервикальной дислокацией под эфирным наркозом на 8-й и 14-й ДГ. Селезенку, тимус и плаценту фиксировали в 10% нейтральном формалине и подвергали стандартной гистологической обработке. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование препаратов проводили методом световой микроскопии (Leica DM 2500) и компьютерной морфометрии с помощью программы ImageScopeM (Leica Microsystems GmbH, Германия). В тимусе оценивали соотношение объемных долей коркового слоя (КС) и мозгового слоя (МС) в условных единицах, ширину субкапсулярного слоя (СС), степень развития тимических телец; в селезенке определяли индекс соотношения белой пульпы (БП) и красной пульпы (КП) в условных единицах, объемные доли лимфоидных фолликулов (ЛФ) и периартериоларных муфт (ПАЛМ) в процентах от площади белой пульпы; в плаценте определяли объемную долю структур лабиринта плаценты в процентах и ширину слоев плаценты.

Результаты и обсуждение

В тимусе самок с фертильной беременностью (СВА×BALB/c) наблюдалось выраженное преобладание КС (индекс отношения объемных долей КС и МС $2,20 \pm 0,75$) с компактно расположенными лимфоцитами, границы между КС и МС были четкими, в МС присутствовали многочисленные ТГ 1–2-й стадий развития. Морфологические изменения соответствовали акцидентальной инволюции I–II стадии (рис. 1А). На 14-й ДГ соотношение КС и МС достоверно уменьшалось ($0,93 \pm 0,28$, $p=0,002$) по сравнению с предыдущим сроком беременности. Границы КС и МС становились

нечеткими, наблюдались инверсия слоев, очаговое опустошение и истончение КС, появление ТГ с началом отложения кератогиалина (рис. 1Б) – признаки акцидентальной инволюции III стадии. В КС присутствовали единичные макрофаги.

Тимус самок с мурамилпептид-индуцированными абортми по сравнению с показателями самок СВА×BALB/c на 8-й ДГ характеризовался меньшим индексом отношения КС и МС ($1,15 \pm 0,04$, $p=0,016$) и сужением СС ($23,85 \pm 2,93$ мкм и $28,18 \pm 1,47$ мкм, соответственно, $p=0,017$). Инволютивные изменения были более выраженными по сравнению с фертильной беременностью. Нечеткие границы между очагово разреженным КС и МС, инверсия слоев, присутствие ТГ с отложениями кератогиалина в МС и многочисленных кистоподобных ТГ на границе КС и МС соответствовали картине акцидентальной инволюции II–III стадии (рис. 1В). Акцидентальная инволюция тимуса на 14-й ДГ соответствовала III–IV стадии, но в отличие от фертильной беременности в тимусе преобладал КС ($1,30 \pm 0,29$, $p=0,014$), расширился СС ($27,85 \pm 2,58$ и $22,66 \pm 1,75$, соответственно, $p<0,001$), на границе КС и МС присутствовало большое количество ТГ в виде полостей (рис. 1Г). На 8-й и 14-й ДГ наблюдались многочисленные макрофаги в КС. Морфофункциональные характеристики тимуса в динамике фертильной беременности у самок СВА×BALB/c в целом согласуются с данными о прогрессирующем уменьшении клеточности тимуса при сингенной и аллогенной беременности у мышей за счет потери кортикальных тимоцитов [15]. Структура тимуса самок с мурамилпептид-индуцированными абортми на 14-й ДГ была сходна с изменениями тимуса при сингенной беременности у мышей С57Bl/6, вызванными Т-клеточным митогеном конканавалином А (очаговое опустошение КС, инверсия слоев, увеличение числа ТГ в МВ) [7]. Особенности структурных изменений тимуса при действии иммуномодулятора С7МДП (увеличение популяции макрофагов в КС, увеличение СС (зона пролиферации тимоцитов) и КС (зона положительной и отрицательной селекции тимусных лимфоцитов, разделения их на субпопуляции) могут быть обусловлены активирующим действием С7МДП на Т-клеточное и моноцитарно-макрофагальное звенья иммунного ответа [5, 6]. Таким образом, β -гептилгликозид мурамилдипептида (С7МДП), индуцирующий иммунозависимые аборты, усиливал проявления акцидентальной инволюции тимуса, вызывал появление большого количества макрофагов в КС, множественных крупных кистоподобных телец Гассала на границе КС и МС.

Селезенка самок с фертильной беременностью на 8-й ДГ характеризовалась одинаковым соотношением БП и КП ($1,19 \pm 0,13$) и равной выраженностью ЛФ и ПАЛМ (рис. 2А). На 14-й ДГ доля БП возрастала ($1,5 \pm 0,12$, $p=0,001$) по сравнению с предыдущим сроком, равное соотношение долей ЛФ и ПАЛМ сохранялось (рис. 2Б). При мурамилдипептид-индуцированных им-

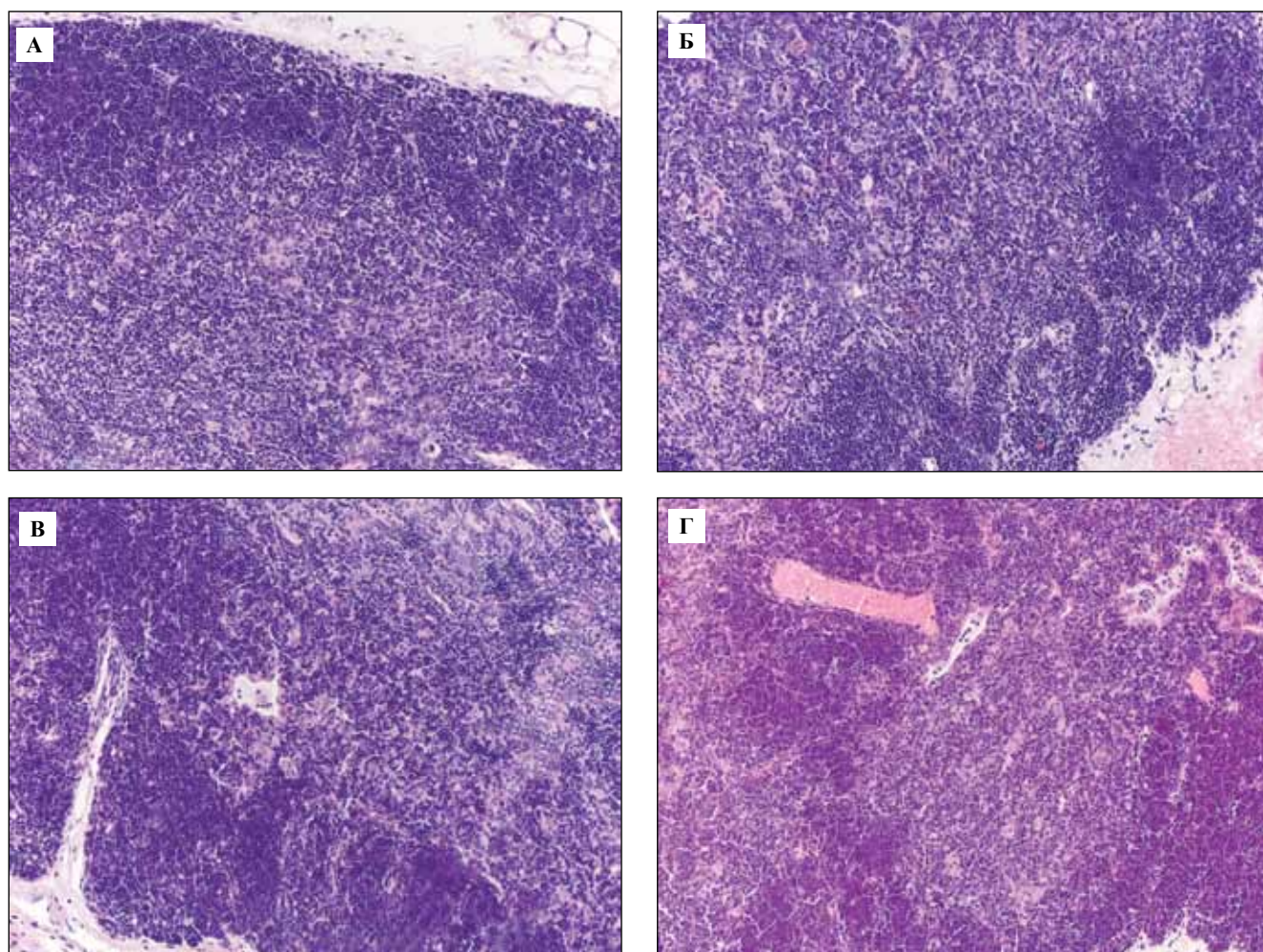


Рис. 1. Тимус при фертильной беременности (А – 8-й день, Б – 14-й день) и мурамилдипептид-индуцированных абортрах (В – 8-й день, Г – 14-й день). Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

- 1А – Преобладание коркового слоя с компактно расположенными лимфоцитами, четкие границы между корковым и мозговым слоями, в мозговом слое многочисленные тельца Гассалья 1–2-й фаз развития.
- 1Б – Преобладание мозгового слоя, очаговое разрежение коркового слоя, нечеткие границы коркового и мозгового слоев, инверсия слоев. Тельца Гассалья с отложениями кератогиалина в мозговом слое.
- 1В – Преобладание коркового слоя. Нечеткие границы коркового и мозгового слоев, инверсия слоев, кистоподобные тельца Гассалья на границе коркового и мозгового слоев.
- 1Г – Преобладание очагово разреженного коркового слоя, нечеткие границы между корковым и мозговым слоями, инверсия слоев, многочисленные кистоподобные тельца Гассалья

мунозависимых абортрах на 8-й ДГ в селезенке резко увеличивалась объемная доля БП ($1,80 \pm 0,36$), в которой значительно преобладала ПАЛМ-зона ($82,1 \pm 3,02\%$, $p=0,036$), занимающая при фертильной беременности лишь $46,46 \pm 5,62\%$ БП (рис. 2В). На 14-й ДГ в селезенке сохранялось преобладание БП над КП ($1,81 \pm 0,14$), объемная доля ПАЛМ уменьшалась по сравнению с 8-м ДГ в данной группе ($69,60 \pm 5,47$, $p=0,036$), но превышала показатель фертильной беременности на том же сроке ($49,74 \pm 8,28$, $p=0,008$), маргинальная зона ЛФ была хорошо выражена (рис. 2Г). Изменения селезенки при мурамилдипептид-индуцированных абортрах в условиях аллогенной беременности отличались от реакции селезенки на Т-клеточный митоген конканавалин А при

сингенной беременности, при которой соотношение БП и КП по сравнению с интактной беременностью не изменялось [7]. Таким образом, иммуномодулятор С7МДП, индуцирующий аборт у самок СВА, оплодотворенных самцами Balb/c, вызывал резкое увеличение объемных долей БП и Т-зависимой ПАЛМ-зоны, что является морфологическим проявлением усиления клеточных иммунных реакций, обусловленного свойством гликозидов МДП, в частности С7МДП, направлять дифференцировку Т-хелперов в сторону Th1-клеток [3, 4, 5].

Плацента самок с фертильной беременностью на 14-й ДГ состояла из децидуальной оболочки, представляющей материнскую часть плаценты, слоя гигантских кле-

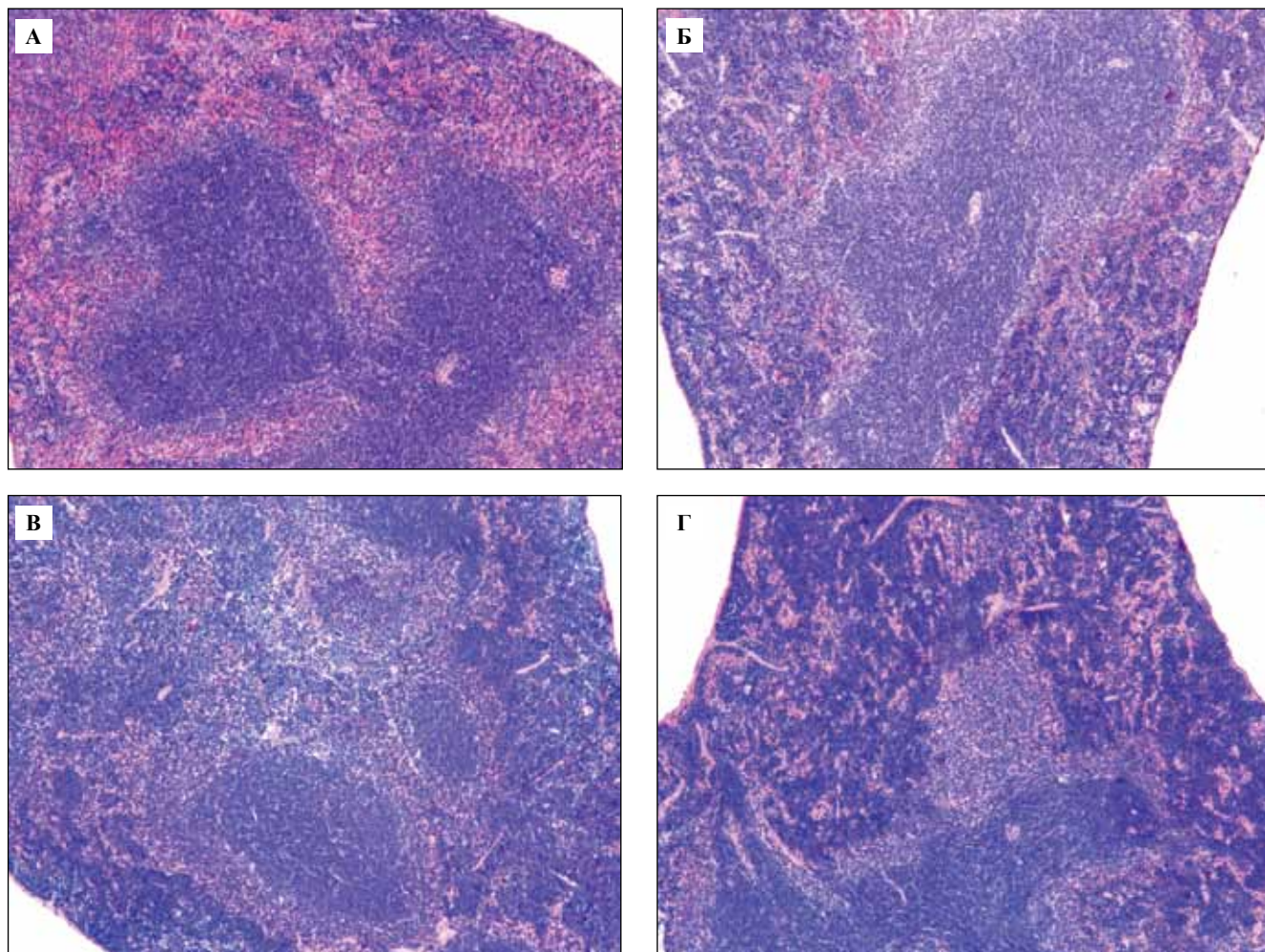


Рис. 2. Селезенка при фертильной беременности (А – 8-й день, Б – 14-й день) и мурамилдипептид-индуцированных абортах (В – 8-й день, Г – 14-й день). Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 50$

2А – Равное соотношение красной и белой пульпы, в белой пульпе одинаково выражены лимфоидные фолликулы и зона ПАЛМ.

2Б – Преобладание белой пульпы, лимфоидные фолликулы и зона ПАЛМ выражены в равной степени.

2В – Значительное увеличение белой пульпы и зоны ПАЛМ.

2Г – Выраженное преобладание белой пульпы и зоны ПАЛМ

ток трофобласта (ГКТ), спонгиотрофобласта (контактный слой) и лабиринта. Слой ГКТ был непрерывным на большом протяжении, состоял из 4–6 рядов клеток (рис. 3А). Лабиринт представлял собой разветвленную сеть плодных сосудов, содержащих ядерные эритробласты, и материнских лакун (рис. 3Б).

У самок с мурамилдипептид-индуцированными абортами в плаценте жизнеспособных плодов по сравнению с фертильным контролем слой ГКТ был прерывистым, представлен 1–2 рядами клеток (рис. 3В), ширина слоя резко уменьшалась ($64,95 \pm 9,3$ мкм и $124,8 \pm 11,19$ мкм, соответственно, $p=0,004$). Ширина зон спонгиотрофобласта и лабиринта не изменялась. В лабиринте объемная доля материнских лакун соответствовала показателям контроля, но объемная доля плодовых сосудов уменьшалась вдвое ($15,95 \pm 3,51$ и $35,69 \pm 13,46$, $p<0,001$), объемная доля трофобласта увеличивалась ($62,73 \pm 11,10$ и $45,05 \pm 12,34$, $p=0,004$).

Наблюдались расширение и полнокровие материнских лакун (рис. 3Г). Изменения плаценты при мурамилдипептид-индуцированных абортах соответствовали морфологическим признакам, наблюдаемым при моделировании фетоплацентарной недостаточности у крыс [2]. К проявлениям фетоплацентарной недостаточности при мурамилдипептид-индуцированных абортах можно отнести также уменьшение количества ГКТ, жизненно важных для развития эмбриона и материнской адаптации к беременности. Эти клетки секретируют широкий спектр гормонов и паракринных факторов, включая стероидные гормоны и пролактин-связанные цитокины, обладают инвазивным потенциалом и рассматриваются как аналог вневорсинчатого трофобласта плаценты человека [9, 10]. При исследовании маточно-плодовых единиц в зонах резорбции в некоторых случаях наблюдали картину водянки матки с полным разрушением плаценты и эмбриона,

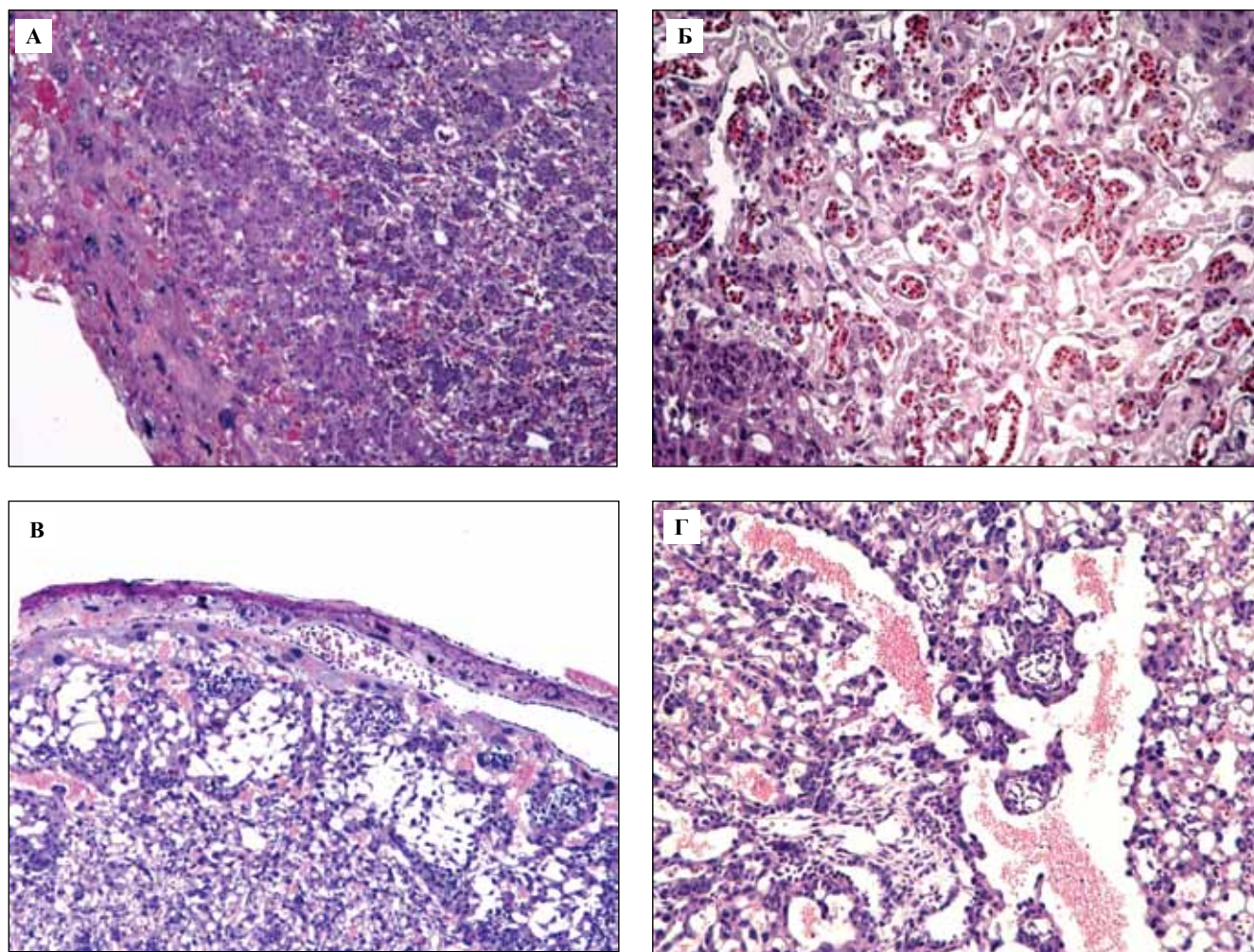


Рис. 3. Плацента жизнеспособных плодов на 14-й день гестации при фертильной беременности (А, Б) и мурамилдипептид-индуцированных абортах (В, Г). Окрашивание гематоксилином и эозином. А, В – $\times 50$, Б, Г – $\times 100$

- 3А – Непрерывный слой гигантских клеток трофобласта, состоящий из нескольких рядов, на границе материнской части плаценты и спонгиотрофобласта.
 3Б – Лабиринт, представленный разветвленной сетью плодных сосудов с ядерными эритроблантами и материнскими лакунами.
 3В – Слой гигантских клеток трофобласта прерывистый, представлен 1–2 рядами.
 3Г – Расширенные полнокровные материнские сосуды в зоне спонгиотрофобласта.
 3Г – Сужение и запустевание плодных сосудов, увеличение слоя трофобласта, расширение и полнокровие материнских лакун в зоне лабиринта

расширенная полость была заполнена клеточным детритом (рис. 4А). Такую же структуру матки отмечали при 100% потере беременности у мышей Balb/c после действия высокой дозы блокатора рецепторов прогестерона RU 486 (Мифепристон), используемого для медикаментозных аборт [13]. В сохранившейся плаценте резорбированных плодов нарушалось послеродовое расположение ГКТ, спонгиотрофобласта и лабиринта, наблюдались лейкоцитарная инфильтрация, запустевание плодных сосудов, выраженное полнокровие в сохранившихся материнских лакунах, массивные отложения фибрина на границе материнской ткани и трофобласта (рис. 4Б). ГКТ смещались к центру пла-

центы, в них проявлялись дистрофические изменения – вакуолизация и эозинофилия цитоплазмы, пикноз и фрагментация ядер (рис. 4В). Стаз и сладжирование эритроцитов, отложение фибрина в зоне лабиринта свидетельствовали об усиленном тромбообразовании (рис. 4Б, В). Очевидно, выраженные нарушения маточно-плацентарного и фетоплацентарного кровообращения, препятствующие трансплацентарному обмену, приводят к ишемии плода и его последующей гибели. Таким образом, β -гептилгликозид мурамилдипептида в плаценте жизнеспособных плодов вызывал уменьшение количества ГКТ, снижение объемной доли плодных сосудов, нарушение гемодинамики в материнских

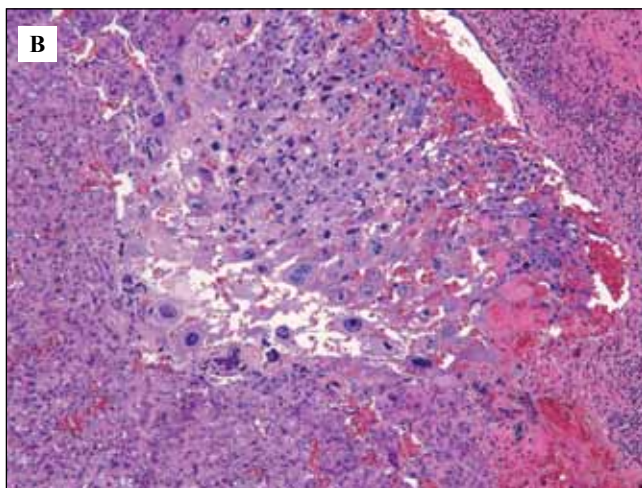
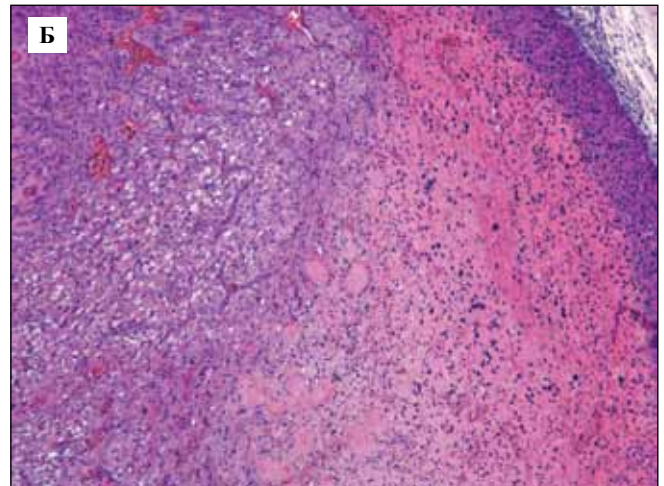
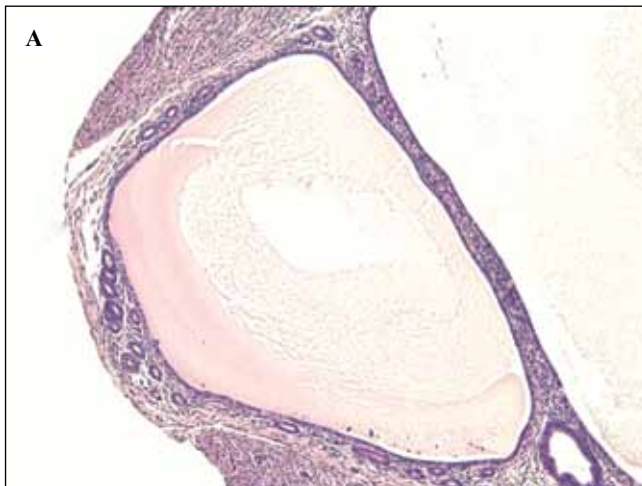


Рис. 4. Плацента резорбированных плодов при мурамилдипептид-индуцированных абортах. Окрашивание гематоксилином и эозином.

А – $\times 50$, Б, В – $\times 100$

4А – Полость матки расширена, заполнена эозинофильными массами – полная резорбция плаценты и эмбриона.

4Б – Нарушение архитектоники плаценты, лейкоцитарная инфильтрация, запустевание плодных сосудов, уменьшение количества и выраженное полнокровие материнских лакун, отложения фибрина.

4В – Смещение гигантских клеток трофобласта к центру плаценты, дистрофические изменения и гибель гигантских клеток, стаз и сладжирование эритроцитов, отложения фибрина

лакунах, что свидетельствует о развитии фетоплацентарной недостаточности. В сохранившейся плаценте резорбированных плодов нарушалось расположение слоев, проявлялись дистрофические изменения ГКТ, признаки тромбообразования.

Выводы

На мышиной модели иммунозависимых аборт, индуцированных β -гептилгликозидом мурамилдипептида С7МДП, показано, что увеличение уровня эмбриональных потерь происходит на фоне усиления проявлений акцидентальной инволюции тимуса и резкого увеличения объемной доли белой пульпы и Т-зависимой зоны периапериартериоларных муфт в селезенке на 8-й и 14-й дни беременности. В плаценте сохранившихся жизнеспособных плодов наблюдаются признаки фетоплацентарной недостаточности.

Литература

1. Артемьева К.А. Моделирование иммунозависимого невынашивания беременности на мышах с использованием гликозида мурамилдипептида / К.А. Артемьева, М.Н. Болтовская, О.В. Калюжин // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2012. № 2. С. 34–40.
2. Беленичев И.Ф. Исследование ноотропной и нейропротективной активности Тиоцетама в условиях моделирования фетоплацентарной недостаточности / И.Ф. Беленичев и др. // Международный неврологический журнал. 2008. Т. 6. № 22. С. 34–46.
3. Калюжин О.В. Иммуномодулирующая активность новых производных мурамилдипептида in vitro / О.В. Калюжин и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1994. Т. 117. № 5. С. 510–513.
4. Калюжин О.В. Иммуномодулирующая активность гликозидных производных N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина // Вестник новых медицинских технологий. 2003. Т. 10. № 1–2. С. 28–32.
5. Калюжин О.В. Стимуляция резистентности мышей к бактериальной инфекции гликозидами мурамилдипептида / О.В. Калюжин и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 135. № 5. С. 531–535.
6. Караулов А.В. Биологическая активность гликозидных производных N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина / А.В. Караулов, О.В. Калюжин, А.Е. Земляков // Российский биотерапевтический журнал. 2002. Т. 1. № 1. С. 14–24.
7. Яглова Н.В. Влияние активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности на постнатальный онтогенез органов иммунной системы потомства

- / Н.В. Яглова, С.С. Обернихин // Проблемы репродукции. 2013. Т. 19. № 1. С. 73–77.
8. *Giakoumopoulos M.* Embryonic stem cell-derived trophoblast differentiation: a comparative review of the biology, function, and signaling mechanisms / M. Giakoumopoulos, T.G. Golos // *J. Endocrinol.* 2013. N 216. R33–R45.
 9. *Hu D.* Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta / D. Hu, J.C. Cross // *Int. J. Dev. Biol.* 2010. V. 54. N 2–3. P. 341–54.
 10. *Krishnan L.* From mice to women: the conundrum of immunity to infection during pregnancy / L. Krishnan, T. Nguen, S.J. McComb // *Reprod. Immunol.* 2013. V. 97. P. 62–73.
 11. *Kwak-Kim J.* Immunological modes of pregnancy loss / J. Kwak-Kim et al. // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2010. V. 63 (6). P. 611–23.
 12. *Lim H.J.* Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models / H.J. Lim, H. Wang // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. N 4. P. 1004–15.
 13. *Lv F.* Repeated Abortion Affects Subsequent Pregnancy Outcomes in BALB/c Mice/ F. Lv et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7. N 10. e48384.
 14. *Watson E.D.* Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta / E.D. Watson, J.C. Cross // *Physiology.* 2005. V. 20. N. 3. P. 180–93.
 15. *Zoller A.L.* Murine pregnancy leads to reduced proliferation of maternal thymocytes and decreased thymic emigration / A.L. Zoller, F.J. Schnell, G.J. Kersh // *Immunology.* 2007. V. 121(2). P. 207–15.

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE IMMUNE SYSTEM AND PLACENTA IN ALLOGENEIC PREGNANCY IN MICE HIGH FERTILITY AND MURAMYLDIPEPTIDES - INDUCED ABORTION

K.A. Artemyeva, O.V. Kalyuzhin, I.I. Stepanova, S.V. Nazimova, M.N. Boltovskaya

First, a comparative morphological and morphometric study of the thymus, spleen and placenta of the mouse in terms of allogeneic pregnancy in fertile combination lines (female x male CBA BALB /c) and immune-miscarriage, induced β -geptilglikozidom muramyl dipeptide (S7MDP). Found that when muramyl dipeptide-induced abortion in the thymus intensified manifestations accidental involution, in the spleen increase dramatically the volume fractions of the white pulp and T-dependent zone PALM, placenta preserved fruit, signs of placental insufficiency.

Keywords: thymus, spleen, placenta, allogeneic pregnancy muramyl dipeptide, fetoplacental insufficiency, muramyl dipeptide - induced abortions, morphological study.

Информация об авторах

Артемьева Ксения Александровна – младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Калюжин Олег Витальевич – докт. мед. наук, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Первого МГМСУ им. И.М. Сеченова.

Степанова Ирина Ильдаровна – научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Назимова Светлана Владимировна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Болтовская Марина Николаевна – докт. биол. наук, профессор, заведующая лабораторией клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН. E-mail maribolt@mail.ru

Материал поступил в редакцию 13 октября 2013 года.

© Гореликов П.Л., 2013

УДК: 004.032.26(06)

НЕЙРОГЛИАЛЬНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В МЕХАНИЗМАХ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ СИМПАТИЧЕСКОГО ГАНГЛИЯ

П.Л. Гореликов

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Методом интегральной цитофотометрии на криостатных срезах после гистохимического окрашивания нитросиним тетразолием определяли активность Н- и М-изоформ ЛДГ в нейронах и сателлитных глиоцитах краниального шейного симпатического ганглия кроликов в норме и при частичной и полной фармакологической блокаде никотиновых холинорецепторов (н-ХР).

В норме изоферментный профиль ЛДГ нейронов и сателлитных глиоцитов различается: в нейронах более высокая активность Н-изоформ, а в сателлитных глиоцитах – М-изоформ.

Блокада н-ХР приводит к полной инверсии изоферментного профиля ЛДГ сателлитных глиоцитов, который в условиях полной депривации н-ХР становится таким же, как у интактных нейронов.

Высказано предположение, что нейроны направляют через н-ХР энергетический метаболизм соседних с ними сателлитных глиоцитов в сторону выработки лактата.

Ключевые слова: симпатический ганглий, холинорецепторы, нейроны, глиоциты, изоферменты ЛДГ

В последнее время формируются новые представления об энергетических механизмах, обеспечивающих жизнедеятельность мозга. Одной из основных интенсивно разрабатываемых является гипотеза ANLSH (astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis), предполагающая существование нейрон-глиальной кооперации в механизмах энергообеспечения головного мозга и участие синапсов в этом взаимодействии [7, 11]. Лактат, вырабатываемый в астроцитах, согласно ANLSH, поступает в качестве дополнительного энергетического субстрата в интенсивно функционирующие нейроны головного мозга через глутаматергические синапсы, причем этот процесс контролируется синаптической активностью самих нейронов. ANLSH механизм отражает современную концепцию универсальной роли лактата как дополнительного энергетического источника для различных тканей в организме [8]. Внимание исследователей при этом фокусируется исключительно на разных отделах ЦНС, и обсуждается роль глутаматергических синапсов в нейроглиальном энергетическом взаимодействии [3, 7, 9, 11].

Вместе с тем в свете представлений об универсальном характере обсуждаемого механизма актуален вопрос о принципиальной возможности существования аналогичного энергетического взаимодействия между нейронами и глиальными клетками в симпатических ганглиях и возможной роли в поддержании энергетического гомеостаза никотинчувствительной холинергической (Н-холинергической) нейротрансмиттерной системы, которая, подобно глутаматергической в ЦНС,

передает возбуждающие синаптические сигналы в периферических отделах нервной системы [13].

Адекватным подходом к решению проблемы является применение экспериментальной модели дозированной фармакологической блокады синапсов холинолитиками направленного действия, позволяющей блокировать разное число никотиновых холинорецепторов (нХР) с одновременным определением в этих условиях активности ЛДГ и ее изоферментов, регулирующих, как известно, превращения лактата в энергетическом метаболизме клетки [2, 8].

Цель исследования – в условиях частичной и полной блокады холинергической передачи через никотиновые рецепторы определить активность ЛДГ, ее Н- и М-изоформ в симпатических нейронах и сателлитных глиоцитах, окружающих эти нейроны.

Материалы и методы

Объектом исследования служил краниальный шейный симпатический ганглий (КШСГ) кроликов половозрелых самцов породы шиншилла (8 месяцев).

Для создания фармакологической блокады использовали специально подобранный холинолитик димеколин, который блокирует никотиновые холинорецепторы [5] и в отношении которого у кроликов известна фармакодинамика [6].

Создавали частичную (I серия) и полную (II серия) блокаду синаптической передачи путем подкожного введения препарата в дозах 10 и 50 мг/кг, соответственно. Ганглии брали через 1 час после введения препарата

в указанных выше дозах, что соответствовало сроку максимального проявления блокирующего воздействия димеколина [6].

Всего в контроле и в эксперименте использовано 9 животных (по 3 особи в каждой серии и контроле). При работе с экспериментальными животными и выведении их из эксперимента руководствовались приказами Минздрава СССР № 577 от 12 августа 1977 года и Минздравсоцразвития России № 708н от 23 августа 2010 года «Об утверждении Правил лабораторной практики».

В нейронах и сателлитных глиоцитах определяли активность ЛДГ, ее изоформ Н и М в относительных единицах оптической плотности методом интегральной цитофотометрии [1] на цитофотометре МИФ-1 на криостатных срезах после гистохимического окрашивания нитросиним тетразолием по методу Брумберга и Певзнера [2], позволяющему проводить количественную оценку активности фермента. Анализировали глиальные клетки, удаленные от перикариона нейрона на расстоянии, не превышающем средний диаметр ядер глиальных клеток. В каждой серии опыта и в контроле объем выборки составлял по 150 нейронов и 210–300 сателлитных глиоцитов. В изучаемых клетках определяли изоферментный профиль ЛДГ и оценивали отноше-

ние активности Н-изоформы к активности М-изоформы (Н/М). Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерных программ STATISTICA. Для статистической оценки достоверности различий в полученных результатах и необходимого объема выборки применяли t-критерий Стьюдента. Аппроксимацию данных проводили по методу наименьших квадратов.

Результаты и обсуждение

В нейронах и сателлитных глиоцитах интактного ганглия выявляется высокая активность ($p < 0,05$) как Н-, так и М-изоформ ЛДГ (рис.). Изоферментный профиль ЛДГ в нейронах и окружающих сателлитных глиоцитах различается (табл.). В нейронах более высокая активность Н-изоформ ($H/M > 1$), в сателлитных глиоцитах, напротив, высокую активность проявляют М-изоформы ($H/M < 1$).

Блокада нХР вызывает разные эффекты в исследуемых клетках (рис.). В нейронах активность ЛДГ, Н- и М-изоформ значительно уменьшается ($p < 0,05$). Следует отметить, что падение активности всех трех исследуемых показателей происходит пропорционально степени блокирующего воздействия и аппроксимируется линейными зависимостями с довольно высоким коэффициентом детерминированности ($R^2 = 0,99$).

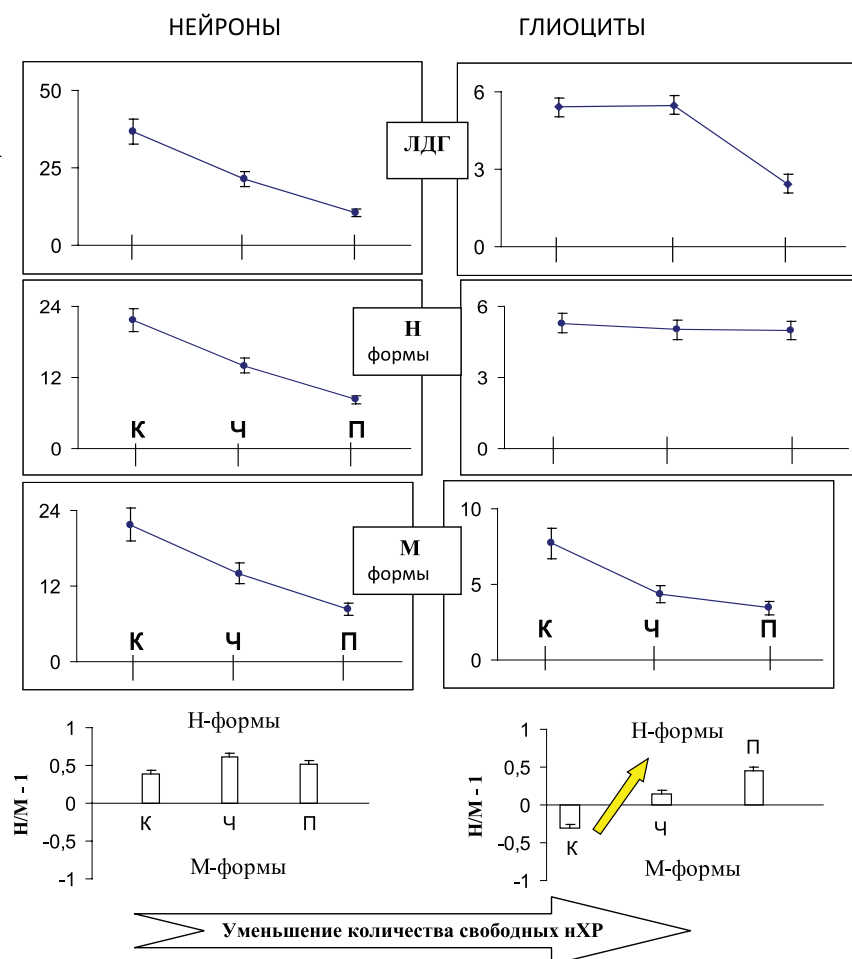


Рис. Ферментативная система ЛДГ в клетках симпатического ганглия при частичной и полной блокаде никотиновых холинорецепторов: А – общий ЛДГ, Б – Н-изоформ, В – М-изоформ.

На графиках: сплошная линия – симпатические нейроны, пунктирная – сателлитные глиоциты

По горизонтали: 1 – контроль, 2 – частичная, 3 – полная блокада.

По вертикали: оптическая плотность (отн. ед.)

Таблица
Отношение активности Н-формы ЛДГ к М-форме (Н/М) в симпатических нейронах и сателлитных глиоцитах в норме и разных условиях синаптической блокады ($M \pm m$)

Клетки	Контроль	Блокада	
		частичная	полная
Нейроны	1,38*±0,04	1,61±0,06	1,51*±0,09
Глиоциты	0,69±0,02	1,15±0,05	1,45*±0,04

Различия между показателями в таблице статистически значимы ($p < 0,05$), кроме показателей с обозначением (*).

Совершенно иная картина наблюдается в сателлитных глиоцитах при блокаде н-ХР (рис.). В указанных клетках изменяется активность только М-формы, которая значительно, так же, как и в нейронах, уменьшается относительно контрольных показателей ($p < 0,05$), при блокаде н-ХР. Активность Н-формы остается при этом неизменной ($p > 0,05$). Достоверное снижение показателей активности общей ЛДГ регистрируется только при полной блокаде ($p < 0,05$), что, очевидно, связано с отмеченными выше изменениями активности М-формы.

Важно подчеркнуть, что описанная в эксперименте динамика изменений активности изоформ приводит к постепенному сдвигу изоферментного профиля ЛДГ глиоцитов в сторону изоферментного профиля ЛДГ, характерного для нейронов (табл.). Так, при частичной блокаде отношение Н/М в указанных клетках уже больше единицы (1,15), а при полной блокаде изоферментный профиль ЛДГ глиоцитов статистически значимо не отличается от изоферментного профиля ЛДГ в нейронах интактного ганглия (табл.).

Сопоставление результатов цитохимического анализа ЛДГ настоящего исследования с результатами биохимического анализа (диск-электрофорез в полиакриламидном геле) изоферментного спектра ЛДГ в целом КШСГ [4] обнаруживает совпадение изоферментных спектров ЛДГ ганглия и симпатических нейронов, входящих в его состав. Это представляется вполне закономерным, если принять во внимание, что изучаемые нейроны обеспечивают специфическую функцию КШСГ, а высокий уровень активности Н-изоформ, как известно [2, 8], необходим для реализации высокоэффективной аэробной фазы энергопродукции в клетке.

Напротив, в изоферментном спектре ЛДГ сателлитных глиоцитов наиболее активны М-изоформы, обеспечивающие накопление лактата. Такая особенность изоферментного профиля указанных клеток позволяет полагать, что лактат в сателлитных глиоцитах образуется в значительно большем количестве, чем в нейронах, что указывает на существование в КШСГ градиента в распределении лактата между симпатическими нейронами и окружающими их сателлитными глиоцитами. Наличие такого градиента – необходимое условие для возможного осуществления транспорта лактата меж-

ду клетками [8], и это служит одним из доказательств ANLSH гипотезы [7, 9, 11].

Аналогичные различия в изоферментном распределении ЛДГ между нейронами и астроцитами найдены в головном мозге [10, 12], хотя в целом высшие отделы головного мозга, так же, как и в исследованном в настоящей работе ганглии, характеризуются преобладанием активности Н-изоформ ЛДГ [2].

Таким образом, между КШСГ и структурами головного мозга не обнаруживается принципиальных различий в распределении изоферментов ЛДГ как на уровне органа в целом, так и на клеточном уровне.

Суммируя все изложенное выше, логично предположить, что сателлитные глиоциты КШСГ, возможно, выполняют ту же роль в энергообеспечении симпатических нейронов, что и астроциты для нейронов головного мозга [3, 7, 9, 11].

Это предположение подтверждает анализ результатов последствий блокады никотиновых холинорецепторов. В самом деле, в глиоцитах с усилением блокирующего воздействия последовательно и значительно снижается активность только М-изоформ, тогда как активность Н-изоформ не меняется (рис.). Полученные цитохимические сдвиги означают, что аэробная составляющая энергетических процессов в сателлитных глиоцитах не изменяется, тогда как уровень выработки внутриклеточного лактата в них заметно снижается.

Характер происходящих изменений таков, что соотношение в активности изоферментов претерпевает в глиоцитах полную инверсию – оно последовательно сдвигается в сторону нейронального и при полной блокаде синапсов совпадает с изоферментным профилем ЛДГ нейронов и ганглия в целом. Все это означает, что в сателлитных глиоцитах выработка избыточного лактата в условиях полной блокады синаптической передачи прекращается и ферментативная система ЛДГ начинает функционировать так же, как в симпатических нейронах интактных животных.

В связи со всем изложенным выше справедливо предположить, что синаптические процессы в холинэргических синапсах никотинового типа играют закономерную роль в изменениях активности М-изоформ ЛДГ в глиоцитах. Скорее всего, подобно глутаматергическим синапсам в ЦНС, в соответствии с гипотезой ANLSH [7, 11], активность никотиновых холинэргических синапсов КШСГ является необходимым фактором, прямо влияющим на процессы выработки лактата в окружающих симпатических нейроны сателлитных глиоцитах.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокий уровень выработки лактата в сателлитных глиоцитах никак не связан с потребностями этих клеток, а обусловлен исключительно синаптической активностью симпатических нейронов. Последние направляют энергетический метаболизм соседних с

ними сателлитных глиоцитов через холинергические синапсы никотинового типа в сторону выработки лактата.

Литература

1. Агроскин Л.С. Цитофотометрия / Л.С. Агроскин, Г.В. Папаян. Л.: Наука, 1977. 295 с.
2. Брумберг В.А. Нейрохимия изоферментов / В.А. Брумберг, Л.З. Певзнер. Л.: Наука, 1975. 124 с.
3. Глиальные сателлиты как источник дополнительного энергоснабжения нейронов при повышении частоты импульсной активности / Н.В. Пасикова и др. // Морфология. 2012. Т. 141. № 1. С. 33–38.
4. Гореликов П.Л. Изоферментный спектр лактатдегидрогеназы в краниальном шейном симпатическом ганглии в норме и при синаптической блокаде / П.Л. Гореликов, С.В. Савельев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005. Т. 140. № 12. С. 642–644.
5. Особенности строения ионного канала нейронального никотинового холинорецептора, установленные на основании изучения связи структуры и активности в ряду ганглиоблокаторов / Н.Б. Бровцына и др. // Биол. мембраны. 1996. Т. 13. № 1. С. 57–70.
6. Першин Г.И. Димеколин / Г.И. Першин. В кн.: Новые лекарственные средства / Под ред. Г.И. Першина. М.: Медицина, 1966. Вып. 10. С. 72–100.
7. Close coupling between astrocytic and neuronal metabolisms to fulfill anaplerotic and energy needs in the rat brain / S. Serres et al. // Journal of Cerebral blood flow and metabolism. 2008. V. 28. N 4. P. 712–24.
8. Gladden L. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium / L. Gladden // J. Physiol. 2004. V. 558. N 1. P. 5–30.
9. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective / L. Hertz // Neuropharmacology. 2008. V. 55. N 3. P. 289–309.
10. Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons / J. O'Brien et al. // Neurochem Res. 2007. V. 32. N 4–5. P. 597–607.
11. Magistretti P. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity / P. Magistretti // J Exp Biol. 2006. V. 209. N 12. P. 2304–11.
12. Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase / J. Laughon et al. // BMC Neuroscience. 2007. V. 8. N 35. P. 1–6.
13. Miwa J.M. Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses / J.M. Miwa, R. Freedman, H.A. Lester // Neuron. 2011. V. 70. N 1. P. 20–33.

COOPERATIVE INTERACTION BETWEEN NEURONS AND SATELLITE GLIAL CELLS IN MECHANISMS OF POWER SUPPLY SYMPATHETIC GANGLION

P.L. Gorelikov

The H and M isoforms activity of LDH in rabbits superior cervical sympathetic ganglion (SCG) neurons and satellite glial cells was determined by the method of a integral cytophotometry on cryostats sections after nitro blue tetrazolium histochemical staining in normality and in conditions of experimentally caused partial and completed pharmacological nicotinic cholinergic (n-AcR) synapses blockade.

The neurons and satellite glial cells LDH isoenzyme profile differentiates substantially in a norm. The H-isoforms are more active in neurons. The M- isoforms are more active in satellite glial cells.

The blockade of n-XP results in the complete inversion satellite glial cells LDH isoenzyme profile, that in the conditions of complete deprivation of n-XP becomes the same, as at intact neurons.

It is suggested that the energy metabolism of neurons send their neighboring satellite glial cells in the direction of lactate production by n-XP.

Key words: sympathetic ganglion, holinoreceptors, neurons, gliocytes, isoforms of LDH

Информация об авторе

Гореликов Петр Леонидович – докт. биол. наук, заведующий лабораторией нейроморфологии НИИ морфологии человека РАМН
Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, 3. E-mail: petr_gorelikov@mail.ru

Материал поступил в редакцию 9 сентября 2013 года.

© Коллектив авторов, 2013

УДК 618.393.018.82

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА НА СОСТОЯНИЕ ИШЕМИЗИРОВАННОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС

**А.В. Макаров^{1,2,4}, И.В. Арутюнян^{1,2}, Т.Х. Фатхудинов^{1,2,3,4}, А.В. Ельчанинов^{1,2,3},
Е.Ю. Кананыхина^{1,2}, П.А. Володина¹, О.А. Васюкова^{1,3}, А.А. Ким³,
Е.Е. Кириенко^{1,2}, Г.Б. Большакова¹**

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва

² ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

³ ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

⁴ ООО «Клиника регенеративной медицины РМ-клиник», Москва

В работе представлены результаты функциональных тестов и морфометрического исследования состояния мышечной ткани крыс с моделированной ишемией задней конечности на 3-и, 10-е и 30-е сутки после локальной трансплантации аллогенных мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика.

Ключевые слова: мультипотентные стромальные клетки пупочного канатика, ишемия нижних конечностей, мышечная ткань, морфометрия

До 10% всего населения экономически развитых стран страдает от заболеваний периферических артерий, наиболее распространенным из которых является ишемия нижних конечностей. Существующие сегодня эндоваскулярные и хирургические методы лечения не могут полностью решить существующую проблему: на конечной стадии развития заболевания – стадии критической ишемии конечности – каждому третьему пациенту выполняют ампутацию конечности, при этом уровень смертности составляет 20% в течение 6 месяцев после подтверждения диагноза [21].

Развитие клеточных технологий позволило разработать новые методы терапии у пациентов с ишемией нижних конечностей. На сегодняшний день FDA (США) зарегистрировано больше 100 подобных клинических исследований с использованием стволовых/прогениторных клеток. В качестве терапевтического агента используют ауто- и аллогенные гладкомышечные клетки, эндотелиальные клетки, субпопуляции CD133+ или CD34+ клеток, нефракционированные моноклеарные клетки (МНК) костного мозга, мультипотентные стромальные клетки (МСК), выделенные из костного мозга, жировой ткани, пуповинной крови, плаценты, и некоторые другие [9]. При этом исследователи до сих пор не имеют четкого представления о механизмах терапевтической активности трансплантированных клеток, а также единых критериях оценки их эффективности [5].

Систематизация данных, полученных в ходе доклинических исследований, то есть на животных с моделированной ишемией конечностей, позволяет хотя бы частично ответить на основные вопросы клеточной терапии, касающиеся состава трансплантата, срока и способа его введения.

Источник выделения стволовых/прогениторных трансплантируемых клеток теоретически может влиять на эффективность реваскуляризации и восстановления поврежденной конечности. И если для некоторых типов клеток значимые различия не были обнаружены (например, между аллогенными МСК из костного мозга и зародышевых оболочек [3]), то для других неодинаковая эффективность подтверждена исследованиями *in vitro* и *in vivo*. Так, МСК, выделенные из жировой ткани, лучше и быстрее восстанавливали кровоток в ишемизированной конечности мыши, чем МСК костного мозга [8], которые, в свою очередь, были более эффективны, чем нефракционированные МНК костного мозга [4]. При этом в настоящее время многие работы подтверждают гипотезу о большем репаративном потенциале МСК, выделенных из неонатальных тканей (пуповинно-плацентарного комплекса), по сравнению с МСК, выделенными из тканей взрослого организма. Неонатальные МСК имеют более высокий пролиферативный потенциал, лучше отвечают на индукцию эндотелиальной дифференцировки, обладают более выраженным им-

муномодулирующим эффектом, более устойчивы к условиям гипоксии и поэтому могут рассматриваться в качестве оптимального агента для клеточной терапии ишемизированной мышечной ткани [7, 9, 12].

Экспериментальные исследования также однозначно свидетельствуют в пользу локального введения клеток в очаг ишемии по сравнению с системным методом (в периферические сосуды). Показано, что при внутривенном введении лишь незначительная часть меченых клеток попадает в поврежденную мышечную ткань [20] или вовсе в ней отсутствует [16, 17]. В настоящее время подавляющее большинство исследований на животных с моделированной ишемией конечности предполагает локальный способ введения клеток (в очаг ишемии или перифокальную зону) [13].

Также с помощью исследований на животных были получены не менее важные данные об оптимальном временном интервале для трансплантации клеток. Введение МСК через 7 суток после моделирования ишемии оказалось более эффективным, чем введение того же количества клеток через 1 час или 2 недели [19]. На мышинной модели ишемии задних конечностей было продемонстрировано, что введение МСК через 1 неделю после индукции ишемии эффективнее восстанавливало кровоток в поврежденной конечности, чем трансплантация через 24 часа [10]. Наиболее поздний срок, при котором введение МСК в ишемизированную конечность было эффективным, по данным литературы, – 10 суток для мышей и 3 недели для крыс [13].

Основной проблемой доклинических исследований эффективности клеточной терапии является отсутствие единых критериев ее оценки. Существует достаточное число методов исследования ишемии конечности [1], однако большинство исследователей ограничиваются оценкой кровотока с помощью доплерометрии и определением плотности капилляров, причем часто в неповрежденной мышечной ткани [13]. Гистологическое и морфометрическое исследование ишемизированных мышц, дающее реальное представление о состоянии поврежденных тканей, представлено в единичных работах, в которых данное исследование выполнено в конечной временной точке [11, 14, 15]. На сегодняшний день литературные данные о динамике репаративных процессов в ишемизированной мышечной ткани крыс после трансплантации МСК отсутствуют.

В настоящей работе представлены результаты функциональных тестов и морфометрического исследования состояния мышечной ткани крыс с моделированной ишемией задней конечности на 3-и, 10-е и 30-е сутки после локальной трансплантации аллогенных МСК пупочного канатика.

Материалы и методы

Моделирование критической ишемии задних конечностей проводили на половозрелых самцах аутбредных крыс Спрейг-Дули массой 180–200 граммов. Крыс наркотизировали золетилом (20 мг/кг) и рометаром

(5 мг/кг). Операционный доступ осуществляли на правой задней конечности. На бедренный сосудисто-нервный пучок накладывали лигатуры: первую лигатуру – в области паховой связки вторую – на 0,5 см дистальнее. Проводили иссечение бедренной артерии, операционную рану ушивали.

Для выделения подколенной артерии операционный доступ обеспечивали на задней поверхности конечности на уровне коленного сустава. Мышцы голени расширяли тупым способом, устанавливали ранорасширитель. Выделяли подколенную артерию и седалищный нерв. Подколенную артерию иссекали между двумя лигатурами. Воспроизводимость модели была подтверждена результатами морфологического исследования [1].

Мультипотентные стромальные клетки выделяли из стромы пупочного канатика крыс Спрейг-Дули методом эксплантов [2]. Клетки культивировали в ростовой среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки до 10% (PAA Laboratories, США). Принадлежность выделенных клеток к МСК подтверждали в соответствии с требованиями International Society for Cellular Therapy [18]. В эксперименте использовали клетки на 2–3-м пассаже.

Клетки открепляли от подложки стандартным методом, дважды отмывали физиологическим раствором от культуральной среды. Клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе до конечной концентрации 5 млн клеток в 1 мл и переносили в инсулиновые шприцы (игла 30G).

Экспериментальное исследование проводили на самцах крыс Спрейг-Дули массой 180–200 граммов ($n=30$), которые были разделены на две группы: в опытной группе животным вводили аллогенные МСК пупочного канатика, в контрольной – физиологический раствор (табл.).

Таблица

Распределение животных по группам

Группа №	Вещество	Число животных	Доза	Объем введения (мл)
1	Суспензия МСК в физиологическом растворе	15	5 млн клеток	1
2	Физиологический раствор	15	–	1

Все процедуры в исследовании соответствовали этическим принципам обращения с животными. Условия содержания животных соответствовали стандартам, указанным в руководстве The Guide for Care and Use of Laboratory Animals. В экспериментальные группы были отобраны животные без признаков отклонений внешнего вида, случайным образом, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на 10%.

Трансплантацию осуществляли на 7-й день после моделирования ишемии конечности путем равномерно-пятикратного обкалывания инсулиновым шприцем икроножной мышцы правой задней конечности.

За сутки до выведения животных из эксперимента, то есть на 2-е, 9-е или 29-е сутки после трансплантации, проводили функциональные тесты толерантности к физическим нагрузкам «принудительное плавание» (измеряли продолжительность плавания до погружения животного под воду) и *rota-rod* (измеряли продолжительность бега до первого падения животного с вращающегося стержня).

Животных ($n=5$ в каждой группе) выводили из эксперимента с помощью CO_2 -камеры на 3-и, 10-е или 30-е сутки после трансплантации.

Полученный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина на фосфатном буфере по Лилли в течение 72 часов, после чего в течение 24 часов образцы ткани промывали в проточной воде. После стандартной гистологической проводки образцы тканей заливали в парафин. Для изучения морфологических изменений, происходящих в ишемизированной мышце, делали поперечные серийные срезы на 10 уровнях. Микропрепараты мышц окрашивали гематоксилином и эозином («Биовитрум», Россия).

На препаратах методом точечного счета с помощью решетки с 250 узлами определяли относительный объем поврежденной ткани (некротизированных и атрофированных мышечных волокон), инфильтрата, интактных мышечных волокон. На каждую группу было просчитано 3750 точек со срезов, сделанных на различных уровнях. Данные представлены в виде медиан и перцентилей или средних значений и стандартных ошибок среднего, которые в случае физиологических тестов вычисляли традиционным методом, а при морфометрическом исследовании определяли по формулам для долей. Границы 95% доверительных интервалов для долей рассчитывали с помощью ϕ -критерия. После проверки нормальности распределения данных сравнение выборочных долей проводили с помощью z -теста, времени выполнения тестов при нормаль-

ном распределении – с помощью t -теста для парных сравнений и теста Хольма–Сидака для множественных сравнений, а при отличающемся от нормального распределении – с помощью теста Манна–Уитни для парных сравнений и теста Данна для множественных. Различия считали достоверными при 5% уровне значимости. Данные были проанализированы с помощью программы Sigma Stat 3.5 (Systat Software Inc., США).

Результаты и обсуждение

Исследование временной динамики теста «принудительное плавание» показало, что в обеих группах время значительно уменьшалось после моделирования ишемии. При этом на каждом сроке (до и после моделирования, через 2, 9 или 29 суток после трансплантации) время выполнения крысами теста «принудительное плавание» в экспериментальной группе статистически значимо не отличалось от такового в контрольной (рис. 1).

Данный физиологический тест в большей степени отражает общее состояние сердечно-сосудистой системы, так как поврежденная конечность может быть частично выключена из процесса плавания. Таким образом, трансплантация МСК существенно не влияла на общее состояние организма экспериментальных животных.

Как и для теста «принудительное плавание», было отмечено значимое сокращение времени прохождения животными теста *rota-rod* после моделирования ишемии в обеих группах, однако дальнейшая временная динамика результатов этого теста отличалась от таковой теста «плавание». В контрольной группе время бега резко уменьшалось (с $20,8 \pm 0,7$ минуты сразу после операции до $8,0 \pm 2,4$ минуты на 29-е сутки). В экспериментальной группе уменьшение происходило менее интенсивно (с $21,0 \pm 0,6$ минуты после операции до $13,2 \pm 1,4$ минуты на 29-е сутки). Более того, в группе МСК на 9-е и 29-е сутки время прохождения теста было достоверно больше, чем в контрольной (рис. 2).

Данный физиологический тест более точно отражает функциональное состояние мышечной ткани конечностей экспериментальных животных, так как выключение поврежденной конечности из процесса

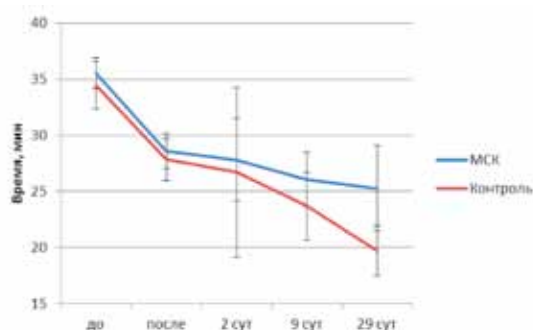


Рис. 1. Результаты теста «принудительное плавание» (средние арифметические и доверительные интервалы) в экспериментальной и контрольной группах (до и после моделирования ишемии, через 2, 9 или 29 суток после трансплантации)

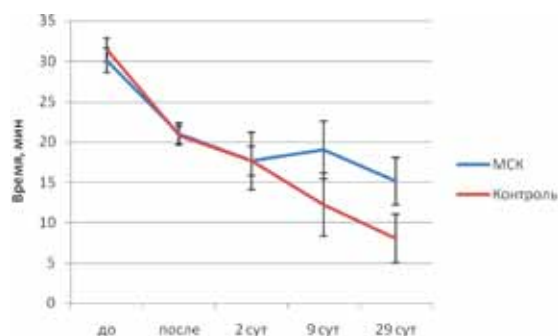


Рис. 2. Результаты теста *rota-rod* (средние арифметические и доверительные интервалы) в экспериментальной и контрольной группах (до и после моделирования ишемии, через 2, 9 или 29 суток после трансплантации)

бега невозможно. Прогрессирующее ухудшение показателей в контрольной группе свидетельствует об адекватности выбранной модели хронической ишемии. Замедление этого процесса в экспериментальной группе подтверждает наличие положительного эффекта трансплантации МСК на функциональное состояние ишемизированной мышечной ткани крыс.

Повреждение мышечной ткани конечности после моделирования хронической ишемии имело очаговый характер и локализовалось на разных участках икроножных мышц. Для морфометрического исследования участки мышечной ткани были распределены на три зоны в зависимости от степени повреждения: очаг ишемии, перифокальная область, интактная область (рис. 3).

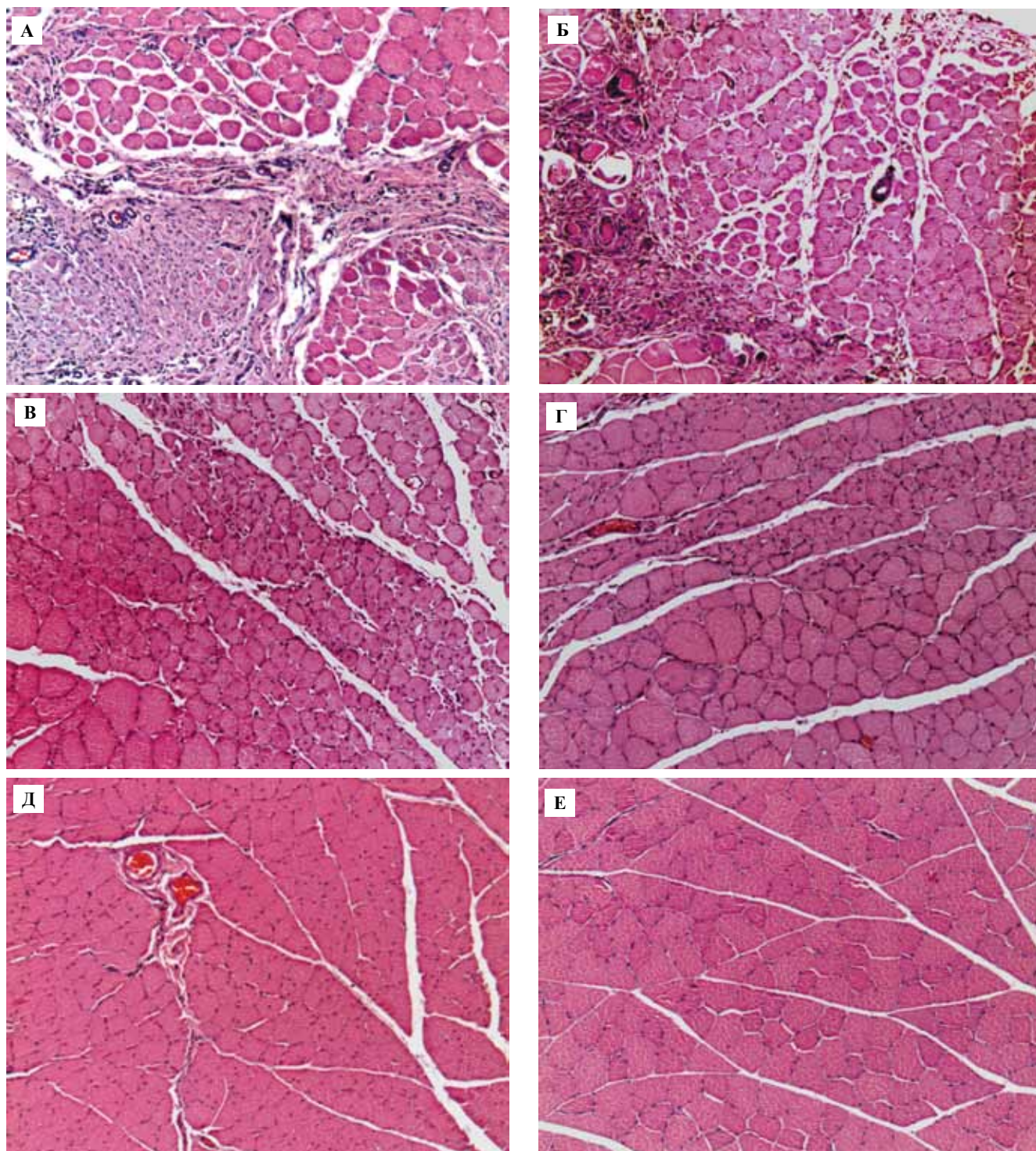


Рис. 3. Области, учитываемые при морфометрическом исследовании мышечной ткани конечности с моделированной ишемией на 10-е сутки после трансплантации: А и Б – очаг ишемии, В и Г – перифокальная зона, Д и Е – интактная зона. А, В, Д – контрольная группа. Б, Г, Е – группа с введением МСК. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 100$

В очаге ишемии выявляли зоны коагуляционного некроза с глыбчатым распадом мышечных волокон и выраженной лимфогистиоцитарной инфильтрацией по периферии (рис. 3 А и Б).

В перифокальной области чередовались участки неповрежденной мышечной ткани и участки с гипо- и атрофированными мышечными волокнами. Поврежденные волокна имели меньший диаметр при сравнении с нормальными миоцитами и располагались на значительном расстоянии друг от друга вследствие отека и разрастания стромы (рис. 3 В и Г).

В неповрежденной мышечной ткани диаметр мышечных волокон и толщина перимизия не изменялись, отек стромы не наблюдался. Миосимпласты содержали большое количество ядер по периферии волокна (рис. 3 Д и Е).

Для оценки объемной плотности области повреждения ишемизированной ткани определяли относительную площадь некротизированных и поврежденных мышечных волокон в очаге ишемии и перифокальной области. На всех сроках исследования область повреждения в группе МСК была статистически значимо меньше, чем в контрольной. Были выявлены и различия в динамике: если у контрольных крыс площадь области повреждения значимо возрастала к 30-м суткам после воздействия (от $34,93 \pm 0,78\%$ до $40,40 \pm 0,80\%$), то в экспериментальной группе площадь некротизированных и поврежденных мышечных волокон достоверно возрастала на 10-е сутки (от $17,79 \pm 0,62\%$ до $26,93 \pm 0,72\%$), а на 30-е статистически значимо снижалась до $20,37 \pm 0,66\%$ (рис. 4).

Исследование инфильтрата в очаге ишемии на разных сроках исследования также подтвердило влияние трансплантированных МСК на репаративные процессы в поврежденной мышечной ткани. На 3-и сутки после трансплантации в обеих группах наблюдали множественный некроз мышечных волокон, верифицируемый по их характерному набуханию и отсутствию ядер по периферии волокон, а также выраженную лимфогистиоцитарную инфильтрацию (рис. 5 А и Б). На 10-е сутки инфильтрация сохранялась, как и отдельные не-

кротизированные мышечные волокна (рис. 5 В и Г), однако на 30-е сутки после трансплантации при оценке инфильтрата между двумя группами было выявлено отличие: если в контрольной группе продолжались процессы некротизации отдельных волокон и диффузной инфильтрации, то в группе МСК некроз не выявляли, а поврежденные мышечные волокна были замещены прослойками фиброзной ткани (рис. 5 Д и Е).

Проведенная количественная оценка объемной плотности инфильтрата подтвердила различия между экспериментальной и контрольной группами. В группе МСК на 3-и сутки инфильтрация была статистически значимо меньше, чем в контроле (соответственно, $4,67 \pm 0,34\%$ против $5,97 \pm 0,39\%$), на 10-е сутки достоверно не различалась между группами, на 30-е сутки объемная плотность инфильтрата резко уменьшалась по сравнению с контрольными значениями ($1,20 \pm 0,18\%$ против $4,53 \pm 0,34\%$) (рис. 6).

Таким образом, объемная плотность инфильтрата уменьшалась к 30-м суткам после моделирования ишемии в обеих группах, что свидетельствует о постепенном угасании реакции мышечной ткани на повреждение, но в группе МСК это уменьшение было значительно более выраженным.

Морфометрическое исследование также показало, что объемная плотность неповрежденных мышечных волокон (рис. 7) в обеих группах достоверно снижалась на 10-е сутки, а затем возвращалась к исходным значениям. При этом в группе МСК объемная плотность неповрежденных мышечных волокон на всех сроках была статистически значимо больше, чем в контроле (рис. 8).

Заключение

Исечение бедренной и подколенной артерий у крыс обеспечивает длительную и устойчивую ишемию икроножных мышц, которая сопровождается их некрозом и хроническим воспалением как минимум в течение месяца. Характер морфологических изменений и функциональные тесты толерантности к физическим нагрузкам подтверждают соответствие выбранной нами экспериментальной модели морфологической картине ишемического повреждения скелетных мышц на стадии декомпенсации (критической ишемии) в соответствии с классификацией по Рутерфорду [1].

Трансплантация аллогенных мультипотентных стромальных клеток приводит к ускорению регенерации скелетной мышечной ткани, что проявляется в уменьшении относительной площади области повреждения и воспалительной инфильтрации. По-видимому, ограничение распространения сосудистого некроза и восстановление мышечных волокон происходят за счет проангиогенных и противовоспалительных свойств трансплантированных клеток. Таким образом, трансплантация мультипотентных стромальных клеток может быть эффективным способом лечения хронической ишемии конечностей, однако механизмы стимуляции

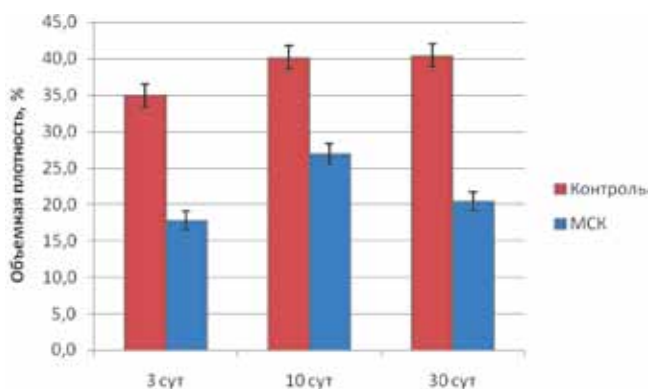


Рис. 4. Объемная плотность области повреждения ткани на 3-и, 10-е и 30-е сутки после трансплантации

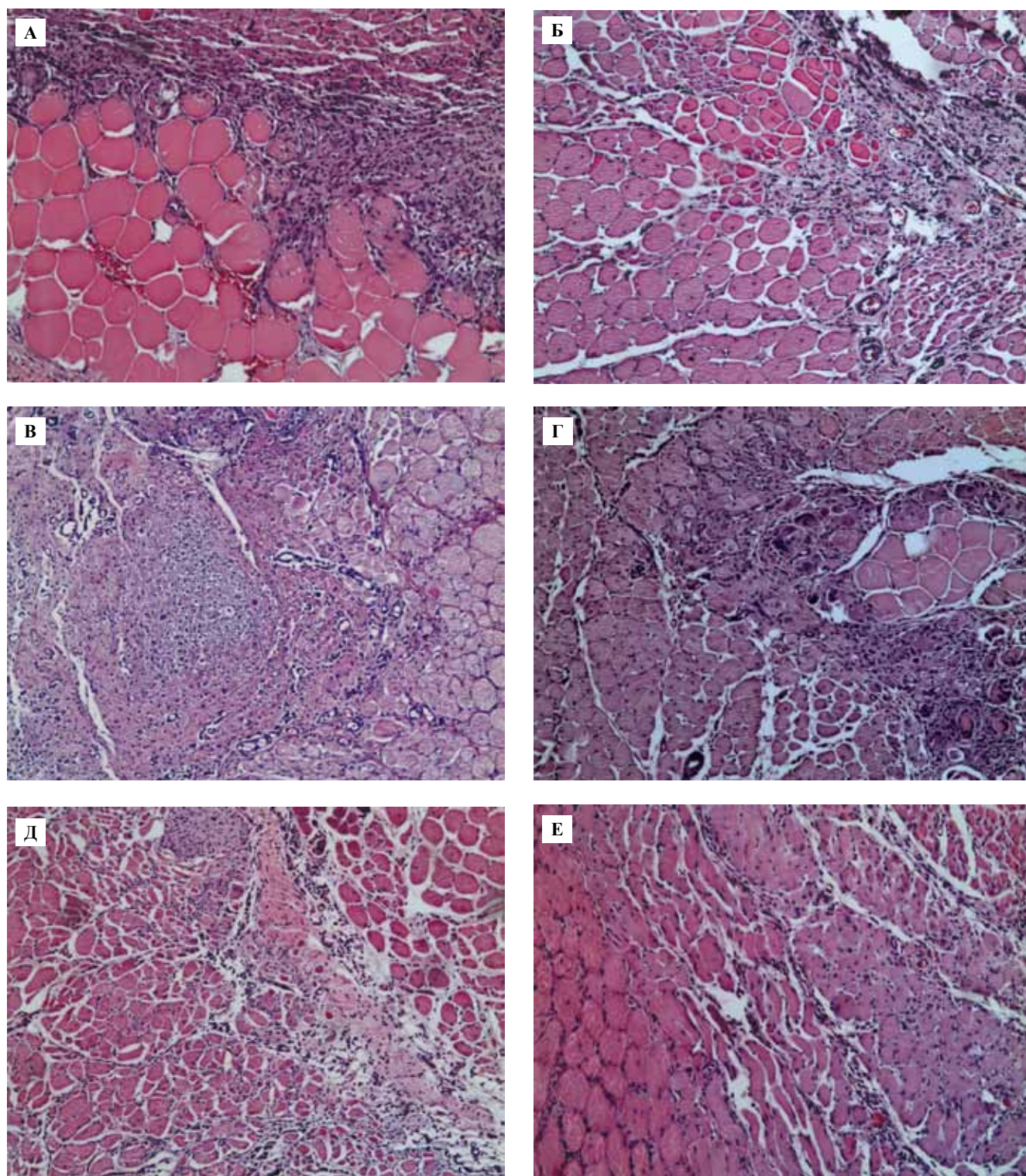


Рис. 5. Воспалительная клеточная инфильтрация мышечной ткани в очаге ишемии:
 А и Б – 3-и сутки, В и Г – 10-е сутки, Д и Е – 30-е сутки после трансплантации.
 А, В, Д – контрольная группа. Б, Г, Е – группа с введением МСК.
 Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 100$

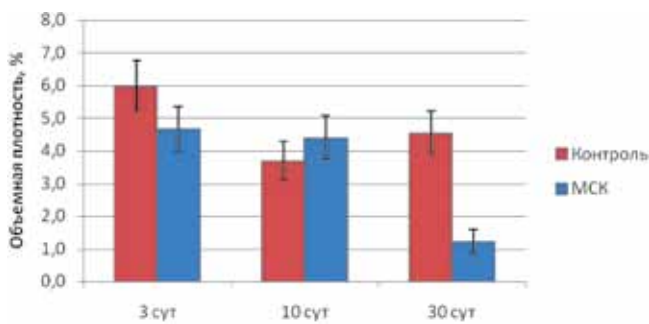


Рис. 6. Объемная плотность инфильтрата на 3-и, 10-е и 30-е сутки после трансплантации

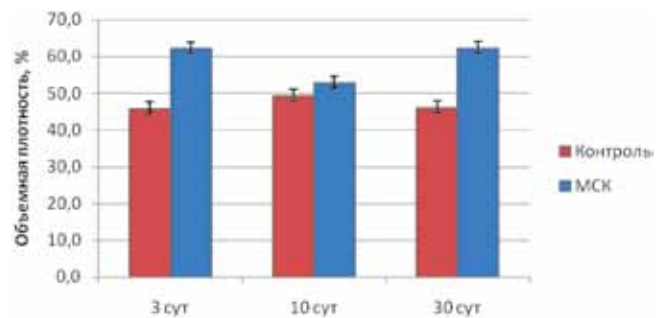


Рис. 7. Объемная плотность неповрежденных мышечных волокон на 3-и, 10-е и 30-е сутки после трансплантации

ангиогенеза и регенерации скелетных мышц при трансплантации этих клеток по-прежнему остаются малоизученными и являются предметом дальнейших исследований.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному соглашению № 8784 от 4 октября 2012 года.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в соответствии с соглашением № 12-04-32255/12 от 31 октября 2012 года.

Литература

1. Верификация хронической ишемии нижних конечностей при моделировании на лабораторных животных / И.В. Арутюнян и др. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 3. С. 47–53.
2. Выделение культуры мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика крысы методом эксплантов / И.В. Арутюнян и др. // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 3. С. 57–62.
3. Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia / S. Ishikane et al. // Stem Cells. 2008. V. 26 N 10. P. 2625–33. doi: 10.1634/stemcells.2008-0236.
4. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia / T. Iwase et al. // Cardiovasc Res. 2005. V. 66. N 3. P. 543–51.
5. Conte M.S. Understanding objective performance goals for critical limb ischemia trials / M.S. Conte // Semin Vasc Surg. 2010. V. 23. N 3. P. 129–37. doi: 10.1053/j.semvascsurg.2010.06.001.
6. Database of publicly and privately supported clinical studies of human participants: [Электронный ресурс]. URL: <http://www.clinicaltrials.gov/> (Дата обращения 14.10.2013).
7. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC / R. Hass et al. // Cell Commun Signal. 2011. 9:12. doi: 10.1186/1478-811X-9-12.
8. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia / Y. Kim et al. // Cell Physiol Biochem. 2007. V.20. N 6. P. 867–76.
9. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells / M.Y. Chen et al. // Exp Hematol. 2009. V. 37. N 5. P. 629–40. doi: 10.1016/j.exphem.2009.02.003.
10. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia / M.H. Moon et al. // Cell Physiol Biochem. 2006. V. 17. N 5–6. P. 279–90.
11. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway / L. Leroux et al. // Mol Ther. 2010. V. 18. N 8. P. 1545–52. doi: 10.1038/mt.2010.108.
12. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells / P.M. Chen et al. // J Biomed Sci. 2011. 18:49. doi: 10.1186/1423-0127-18-49.
13. Liew A. Therapeutic potential for mesenchymal stem cell transplantation in critical limb ischemia / A. Liew, T. O'Brien // Stem Cell Res Ther. 2012.3:28.
14. Locally delivered growth factor enhances the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs / S.H. Bhang et al. // Stem Cells. 2009. V. 27. N 8. P. 1976–86. doi: 10.1002/stem.115.
15. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms / T. Kinnaird et al. // Circ Res. 2004. V. 94. N 5. P. 678–85.
16. Mesenchymal stem cell administration at coronary artery reperfusion in the rat by two delivery routes: a quantitative assessment / S.L. Hale et al. // Life Sci. 2008. V. 83. N 13–14. P. 511–5. doi: 10.1016/j.lfs.2008.07.020.
17. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion / E. Eggenhofer et al. // Front Immunol. 2012. 3:297. doi: 10.3389/fimmu.2012.00297.
18. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici et al. // Cytotherapy. 2006. V. 8. N 4. P. 315–7.
19. Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction / C.Y. Jiang et al. // J Zhejiang Univ Sci B. 2008. V. 9. N 8. P. 630–7. doi: 10.1631/jzus.B0820004.

20. Stem cell transplantation: the lung barrier / S. Schrepfer et al. // Transplant Proc. 2007. V. 39. N 2. P. 573–6.
21. TASC II section F on revascularization in PAD / L. Norgren et al. // J Endovasc Ther. 2007. V. 14. N 5. P. 743–4.

EFFECT OF MULTIPOTENT STROMAL CELLS OF THE UMBILICAL CORD ON THE ISCHEMIC MUSCLE TISSUE IN RAT LIMB

A.V. Makarov, I.V. Arutyunyan, T.Kh. Fatkhudinov, A.V. Elchaninov, E.Yu. Kananykhina, P.A. Volodina, O.A. Vasyukova, A.A. Kim, E.E. Kiriyeenko, G.B. Bolshakova

We present the results of functional tests and morphometric study of muscle tissue in hindlimb ischemia rat model on days 3, 10 and 30 after local transplantation of allogeneic multipotent stromal cells of the umbilical cord.

Key words: multipotent stromal cells of the umbilical cord, lower limb ischemia, muscle tissue, morphometry

Информация об авторах

Арутюнян И.В. – научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.

E-mail: morfolhum@mail.ru

Макаров А.В. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.

E-mail: morfolhum@mail.ru

Фатхудинов Т.Х. – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.

E-mail: morfolhum@mail.ru

Большакова Г.Б. – докт. биол. наук, заведующая лабораторией роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.

E-mail: morfolhum@mail.ru

Материал поступил в редакцию 1 октября 2013 г.

© Яглова Н.В., 2013

УДК: 616.441-02-092-091.8-08

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА СИНДРОМА НЕТИРЕОИДНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРИ ОСТРОМ ЭНДОТОКСИКОЗЕ

Н.В. Яглова

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Синдром нетиреоидных заболеваний при остром эндотоксикозе развивается вследствие усиления синтеза и депонирования тиреоглобулина и уменьшения его протеолиза с последующим снижением секреции тиреотропного гормона. У особей со слабо выраженной реакцией иммунной системы присоединение дисфункции гипофиза происходило быстрее. Морфологическое исследование щитовидной железы выявило у особей с более выраженным иммунным ответом меньшие размеры фолликулов и преобладание признаков синтеза тиреоглобулина над его резорбцией. У особей с менее выраженным иммунным ответом наблюдались проявления неэффективной резорбции тиреоглобулина в центральной зоне долей щитовидной железы. При регрессе синдрома нетиреоидных заболеваний происходит восстановление баланса между синтезом тиреоглобулина, его выделением в полость фолликулов, резорбцией и внутриклеточным протеолизом. У особей с менее выраженным иммунным ответом указанные процессы наблюдались преимущественно в центральной зоне щитовидной железы, а с более выраженным – в центральной и периферической зоне, что определяло различия в сроках восстановления тиреоидного статуса.

Ключевые слова: синдром нетиреоидных заболеваний, тиреоидные гормоны, щитовидная железа, эндотоксикоз, липополисахарид, цитокины

Развитие синдрома нетиреоидных заболеваний (СНТЗ) при синдроме системного воспалительного ответа (ССВО) и сепсисе, проявляющееся снижением продукции тиреоидных гормонов, значительно ухудшает состояние пациента и является плохим прогностическим признаком. Исследование механизмов развития и регресса СНТЗ – актуальная проблема современной медицины, так как лечение этого синдрома позволит повысить эффективность терапии ССВО и сепсиса и снизить летальность, которая характеризуется высоким уровнем, – 24–25%. В наших предыдущих исследованиях была выявлена связь между тиреоидным статусом и эндотоксинемией, а также уровнем продукции провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов [1, 3]. Показано, что СНТЗ при остром грамотрицательном эндотоксикозе имеет два механизма развития – периферический и центральный, заключающиеся в нарушении секреторных процессов в фолликулярных тироцитах и снижении синтеза тиреотропного гормона (ТТГ) гипофизом [2]. Малоизученным аспектом проблемы являются индивидуальные особенности развития и регресса СНТЗ в зависимости от выраженности реакции иммунной системы и, в частности, их морфологические проявления.

Цель исследования – изучение морфологических, в том числе ультраструктурных, проявлений секреторных процессов в фолликулярных тироцитах щитовидной железы (ЩЖ) при развитии и регрессе СНТЗ у особей с разной выраженностью продукции Th1 цитокинов при остром экспериментальном грамотрицательном эндотоксикозе.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 45 самцах крыс Вистар массой тела 200–220 граммов. Крысам опытной группы (n=30) однократно вводили ЛПС *E. coli* штамм 026:B6 (Sigma, США) в дозе 20 мг/кг интраперитонеально, крысам контрольной группы (n=15) – аналогичный объем физиологического раствора. Животных выводили из эксперимента передозировкой зоветила через 1 и 7 суток после введения ЛПС. Содержание тиреотропного гормона (ТТГ), общих тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3), свободных фракций этих гормонов (сТ4 и сТ3), эндотоксина, а также концентрации интерлейкинов (ИЛ) 2, 12, интерферона-γ (ИНФ-γ), фактора некроза опухолей-α (ФНО-α) в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов (Monobind

Inc., Invitrogen, США). Для количественного определения эндотоксина в сыворотке крови использовали хромогенный LAL-тест (НВТ, США). Правую долю ЩЖ после фиксации в жидкости Буэна и стандартной проводки заливали в парафин. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрический анализ проводили с использованием компьютерной программы Image ProPlus (Leica Microsystems, Австрия). Определяли площадь фолликулов, долю стромы, относительную долю площади эпителия в фолликуле, высоту фолликулярных тироцитов и площадь их ядер. Содержание коллоида в фолликулах определяли по отношению площади коллоида к площади просвета фолликула и выражали в процентах. Оценку указанных выше параметров в периферических и центральных зонах ЩЖ проводили по отдельности. Левую долю ЩЖ фиксировали в 2,5% раствора глутарового альдегида с постфиксацией в 1% растворе OsO_4 (Fluka, Швейцария). Контрастирование проводили 2,5% спиртовым раствором уранила ацетата (Fluka, Швейцария). Подготовленные кусочки заливали в смесь смол Эпон-812, Аралдит М, дибутилфталат, додециловый ангидрид янтарной кислоты, 2,4,6,-диметил,-аминометилфенол (Fluka, Швейцария). Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме (LKB, Швеция). Дополнительно срезы контрастировали солями свинца. Изучение препаратов проводили на трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 с автоматическим сканированием изображений (Carl Zeiss, Германия). Статистическая обработка данных производилась с использованием кластерного анализа, критерия Манна–Уитни. Центральные тенденции и меры рассеяния признаков описывали как среднее (М) и среднее квадратичное отклонение (SD). Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

Результаты

Через сутки после введения сублетальной дозы ЛПС у крыс развился эндотоксикоз, характеризующийся 10-кратным повышением уровня эндотоксина в сыворотке крови, увеличением концентрации Th1 цитокинов (ИЛ-2 и ИНФ- γ) в сыворотке крови и развитием СНТЗ, проявляющегося снижением концентрации Т4 и сТ4 в системном кровотоке в среднем на 70,1% и 46,6%, соответственно. Средние значения концентрации Т3 и сТ3 незначительно отличались от контрольных и также имели большой диапазон колебаний.

Через сутки после введения ЛПС при исследовании гистологических препаратов ЩЖ выявлены отек стромы, расширение и неравномерное полнокровие сосудов микроциркуляторного русла с явлениями стаза и сладжа форменных элементов в центральной и особенно в периферической зонах долей железы. Анализ морфологических изменений показал гетерогенность реакций в пределах органа. В центральных зонах наблюдались незначительное уменьшение размеров фолликулов и снижение высоты фолликулярных тироцитов, в то

время как в периферических зонах отмечались статистически значимые увеличение площади фолликулов и высоты фолликулярных тироцитов по отношению как к значениям центральной зоны, так и к контрольным значениям для периферической зоны, и размеров их ядер. Наблюдалось увеличение доли коллоида в полости фолликулов. Резорбционные вакуоли встречались в единичных фолликулах. Десквамация фолликулярных тироцитов в полость фолликула была менее выражена по сравнению с контрольной группой.

В изучаемой выборке выявлены два кластера, отличающиеся уровнем эндотоксинемии, Th1 цитокинов и тиреоидных гормонов в сыворотке крови (табл.).

У крыс с более высоким уровнем эндотоксинемии и более низкой концентрацией в сыворотке крови Th1 цитокинов (ИЛ-12, ИЛ-2, ИНФ- γ) обнаружены снижение концентрации ТТГ и Т3 в сыворотке крови по сравнению со значениями контрольной группы. У крыс с меньшим уровнем эндотоксинемии и более высокой продукцией Th1 цитокинов отмечено повышение концентрации ТТГ и снижение концентрации сТ3 по сравнению с контрольной группой. Концентрация Т3 соответствовала значениям контрольной группы. Общим для обоих кластеров было снижение уровня Т4 и сТ4 в сыворотке крови.

У крыс разных кластеров были выявлены существенные различия в значениях морфометрических характеристик ЩЖ и особенности ультраструктуры фолликулярных тироцитов.

У крыс кластера с более низкой концентрацией в сыворотке крови Th1 цитокинов в центральной и периферической зонах были более крупные размеры фолликулов, меньшая высота фолликулярных тироцитов. Доли площади эпителия в срезах фолликулов и коллоида в срезах полости фолликулов была меньше по сравнению со значениями кластера с более высокой концентрацией в сыворотке крови Th1 цитокинов (рис. 1 А, Б).

При изучении ультраструктуры фолликулярных тироцитов крыс кластера с более высоким уровнем эндотоксинемии и более низкой концентрацией в сыворотке крови Th1 цитокинов в центральной зоне ЩЖ выявлены более интенсивно протекающие процессы резорбции, выражающиеся в наличии в цитоплазме коллоидных капель, их слиянии и образовании крупных коллоидных капель, что свидетельствует о снижении процессов расщепления резорбированного тиреоглобулина, то есть наблюдается феномен «неэффективной резорбции» [4]. Митохондрии имели просветленный матрикс, часто наблюдалась деструкция крист. Количество лизосом было небольшим (рис. 2 А).

У крыс кластера с более высокой концентрацией в сыворотке крови Th1 цитокинов наблюдалось расширение канальцев ГЭПС, наличие большого количества секреторных гранул в апикальной части клеток и отсутствие коллоидных капель в цитоплазме (рис. 2 Б).

При изучении ультраструктуры фолликулярных тироцитов периферической зоны долей ЩЖ выявля-

Таблица

Концентрация гормонов, эндотоксина и цитокинов в сыворотке крови крыс через 1 и 7 суток после введения ЛПС (M±SD)

Параметр	Контрольная группа	Через 1 сутки после введения ЛПС		Через 7 суток после введения ЛПС	
		кластер 1	кластер 2	кластер 3	кластер 4
ТТГ, мкМЕ/мл	0,14±0,05	0,07±0,02*	0,20±0,14*#	0,07±0,02*	0,04±0,02*#
Т4, мкг/дл	4,05±0,85	1,10±0,80*	0,89±0,72*	2,72±1,15	2,50±0,89
сТ4, пг/мл	2,05±0,64	0,91±0,12*	1,15±0,66*#	1,10±0,69*	1,15±0,37*
Т3, мкг/дл	0,88±0,19	0,72±0,09*	0,89±0,51	0,89±0,13	0,71±0,07*#
сТ3, пг/мл	1,75±0,47	2,25±1,58	0,39±0,35*#	1,27±0,18	0,76±0,11*#
Эндотоксин, ЭЕ/мл	0,70±0,11	260,00± 4,17*	154,70± 30,29*#	17,20±1,33*	50,80±4,95*#
ИЛ-2, пг/мл	69,46±11,03	107,27± 16,18*	151,85± 14,65*#	78,48±14,05	69,20±19,19
ИЛ-12, пг/мл	1774,80±166,40	296,80± 8,92*	990,60± 126,03#	1643,67± 106,11	807,0±70,05*#
ФНО-α, пг/мл	13,50±2,97	12,27±0,68	27,32±1,51#	12,27±0,68	27,32±1,51#
ИНФ-γ, пг/мл	6,85±2,82	1,13±0,16*	96,23± 19,65*#	4,03±0,85	9,87±0,12*#

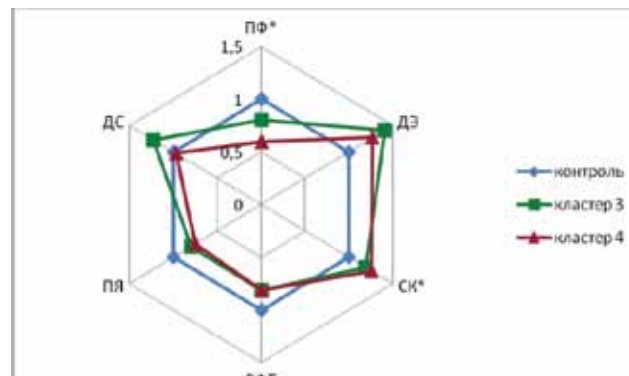
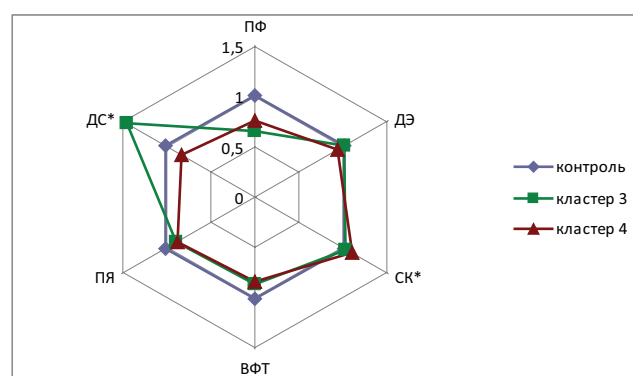
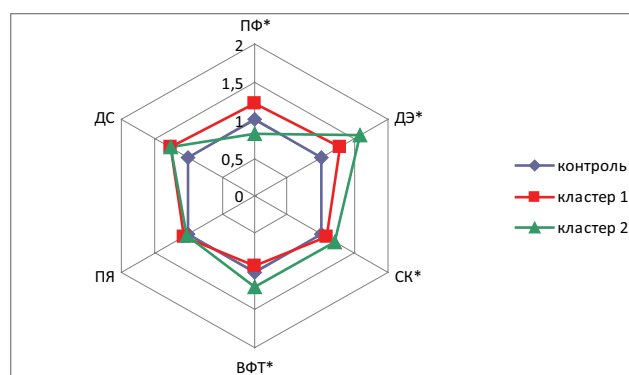
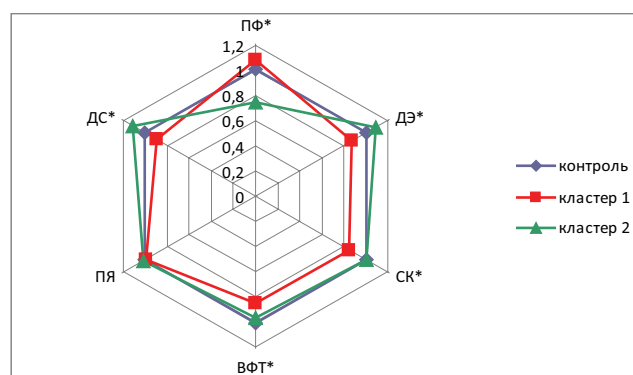


Рис. 1. Изменения морфометрических показателей щитовидной железы крыс кластеров с различной выраженностью уровня эндотоксинеми и продукции провоспалительных и Th1 цитокинов при развитии (А – в центральной зоне, Б – в периферических зонах долей щитовидной железы) и регрессе (В – в центральной зоне, Г – в периферических зонах долей щитовидной железы) СНТЗ, обусловленного острым эндотоксикозом. Значения контрольной группы приняты за единицу
 ПФ – площадь фолликулов; ДЭ – относительная доля эпителия; СК – содержание коллоида в фолликуле; ВФТ – высота фолликулярных тироцитов; ДС – относительная доля стромы.
 Статистическая значимость различий между кластерами отмечена *

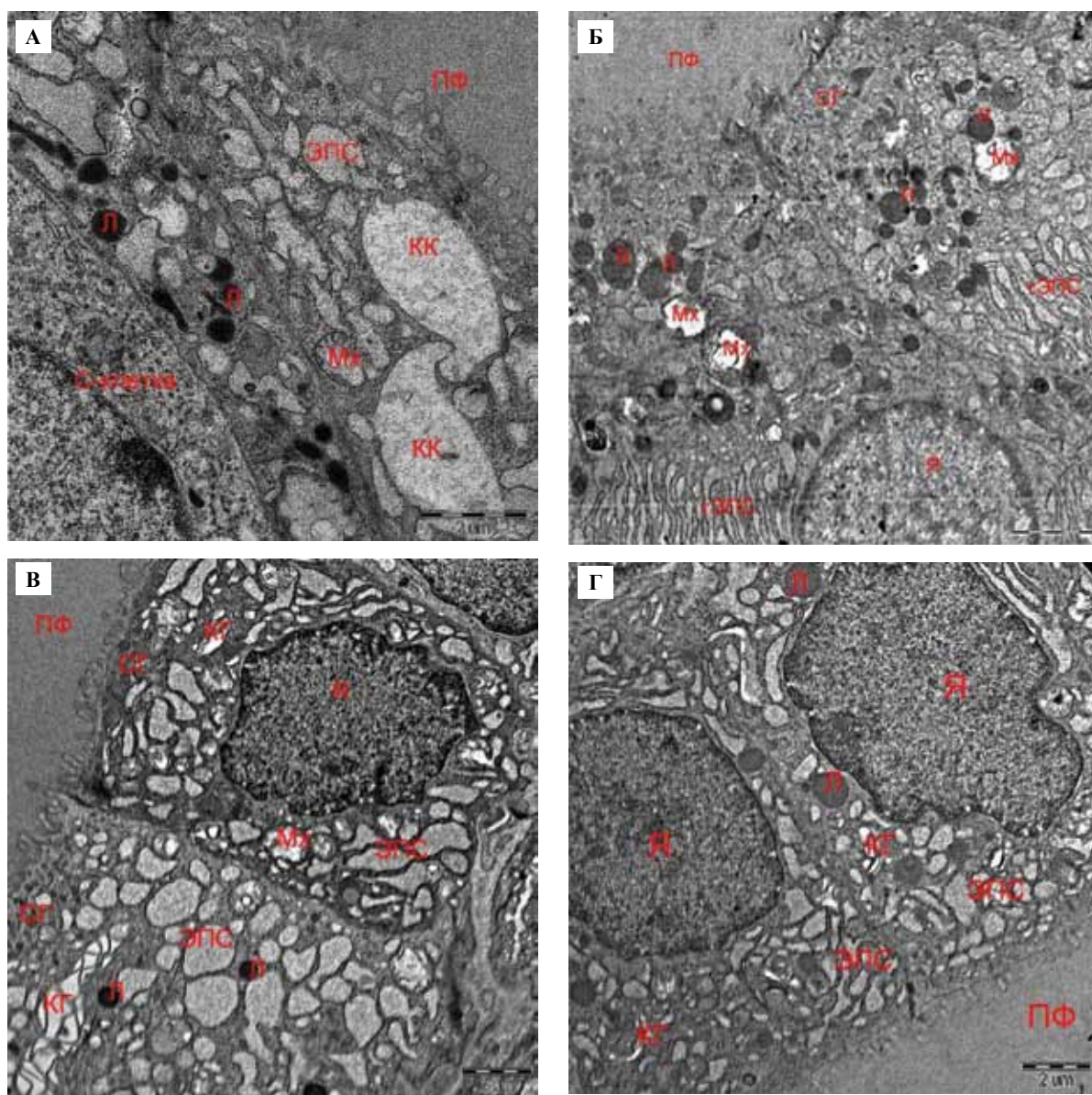


Рис. 2. Ультраструктура фолликулярных тироцитов при развитии СНТЗ (через 1 сутки после введения ЛПС).

А – ультраструктура фолликулярных тироцитов центральной зоны долей ЩЖ крысы с высоким уровнем эндотоксемии и низкой продукцией провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

В цитоплазме фолликулярного тироцита, расположенного с правой стороны, находятся крупные коллоидные капли (КК). Имеются просветления матрикса митохондрий (Мх). Лизосомы отсутствуют. В цитоплазме фолликулярного тироцита, расположенного левее, видны зрелые лизосомы (Л). С левой стороны к фолликулярным тироцитам прилежит С-клетка.

Б – ультраструктура фолликулярных тироцитов центральной зоны долей ЩЖ крысы с низким уровнем эндотоксемии и высокой продукцией провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

Митохондрии (Мх) набухшие, с просветленным матриксом и разрушенными кристами. Некоторые из них контактируют с лизосомами (Л). В клетках большое количество зрелых лизосом. ГЭПС хорошо развита и находится в базальной части клеток. Под апикальной мембраной большое количество секреторных гранул (СГ). Коллоидные капли в цитоплазме не наблюдаются.

В – ультраструктура фолликулярных тироцитов периферической зоны долей ЩЖ крысы с высоким уровнем эндотоксемии и низкой продукцией провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

В ядре (Я) преобладает эухроматин. ЭПС занимает большую часть клетки. Канальцы ЭПС расширены. Комплекс Гольджи (КГ) гипертрофирован. Цистерны комплекса Гольджи резко расширены, заполнены осmioфобным содержимым низкой электронной плотности. В цитоплазме единичные зрелые лизосомы. Коллоидные капли не выявляются. Под апикальной мембраной умеренное количество секреторных гранул (СГ). Митохондрии (Мх) с просветленным матриксом и деструктивно измененными кристами.

Г – ультраструктура фолликулярных тироцитов периферической зоны долей ЩЖ крысы с низким уровнем эндотоксемии и высокой продукцией провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

В ядрах (Я) преобладает эухроматин. ЭПС занимает большую часть клетки. Канальцы ЭПС расширены. Цистерны комплекса Гольджи (КГ) расширены, заполнены осmioфобным содержимым низкой электронной плотности. В цитоплазме небольшое количество зрелых лизосом (Л). Коллоидные капли не выявляются. Микроворсинки на апикальной поверхности укорочены, имеют гомогенный матрикс

ны значительное увеличение площади, занимаемой ЭПС, расширение канальцев ЭПС и цистерн комплекса Гольджи, отек матрикса и деструкция крист митохондрий. Под апикальной мембраной находились секреторные гранулы. Микроворсинки были укорочены и имели гомогенное содержимое. Признаки резорбции коллоида не выявлены. В целом ультраструктура фолликулярных тироцитов периферической зоны долей ЩЖ крыс разных кластеров не имела принципиальных различий (рис. 2 В, Г).

Через 7 суток после введения ЛПС уровень эндотоксинемии снизился до $33,54 \pm 20,89$ ЭЕ/мл, но все-таки превышал значения контрольной группы (табл.). Отмечались повышение концентрации ИЛ-12 и снижение концентрации ИНФ- γ в сыворотке крови крыс. Таким образом, цитокиновый профиль сыворотки крови крыс не имел статистически значимых отличий от контрольной группы (табл.).

Через 7 суток после введения ЛПС были выявлены изменения тиреоидного статуса, указывающие на начало регресса СНТЗ. На фоне пониженных значений ТТГ отмечено повышение концентрации Т4 в сыворотке крови. Концентрация сТЗ была ниже значений контрольной группы.

Морфологический анализ препаратов ЩЖ показал, что на 7-е сутки после введения ЛПС отек стромы, выраженность кровенаполнения сосудов и явления стаза и сладжа эритроцитов уменьшились. В центральной зоне отмечалось уменьшение размеров фолликулов. Высота фолликулярных тироцитов продолжала снижаться по сравнению с первыми сутками. Также отмечалось значительное уменьшение размеров ядер. Наблюдалась умеренная базофилия цитоплазмы. Резорбционные вакуоли практически отсутствовали. Доля коллоида в полости фолликулов увеличилась по сравнению с предыдущим сроком и контрольными значениями. Десквамация эпителия была слабо выражена. В периферической зоне также отмечалось уменьшение размеров фолликулов, высоты фолликулярных тироцитов и размера их ядер.

В изучаемой группе также были выявлены два кластера, отличающиеся уровнем эндотоксинемии, Th1 цитокинов в сыворотке крови и показателями тиреоидного статуса (табл.).

У крыс кластера с более низким уровнем эндотоксинемии содержание ФНО- α и ИНФ- γ в сыворотке крови было статистически значимо ниже, а ИЛ-12 выше. Таким образом, цитокиновый профиль крыс этого кластера был близок к значениям контрольной группы, а концентрации в сыворотке крови ТТГ, ТЗ и сТЗ статистически значимо выше, чем у крыс кластера с более высоким уровнем эндотоксинемии и провоспалительных и Th1 цитокинов (табл.).

В морфологических изменениях в ЩЖ также были выявлены различия (рис. 1 В, Г).

В периферической зоне долей ЩЖ крыс кластера с менее выраженной продукцией Th1 цитокинов раз-

меры фолликулов и доля площади коллоида в срезах полости фолликулов были меньше, чем у крыс кластера с более выраженной продукцией Th1 цитокинов. В коллоиде часто встречались резорбционные вакуоли. Размеры фолликулов центральной зоны были меньше, но статистической значимости эти различия не достигли. Значения морфометрических показателей центральной зоны долей ЩЖ крыс обоих кластеров не имели статистически значимых различий.

При электронномикроскопическом исследовании установлено, что у крыс кластера с более выраженной продукцией Th1 цитокинов в фолликулярных тироцитах как в центральной, так и в периферической зонах долей ЩЖ содержалось большое количество коллоидных капель (рис. 3 Б). У крыс кластера с менее выраженной продукцией Th1 цитокинов описанные выше признаки выявлены в основном в центральной зоне долей ЩЖ (рис. 3 А), а в периферической зоне долей отмечались увеличение количества лизосом и их контакт с коллоидными каплями (рис. 3 В). Также у крыс кластера с более выраженной продукцией Th1 цитокинов отмечено восстановление структуры митохондрий, особенно в центральной зоне долей, в то время как у крыс кластера с менее выраженной продукцией Th1 цитокинов митохондрии имели более выраженные деструктивные изменения (рис. 3 Б, Г).

Обсуждение

Полученные данные показывают, что связь между развитием СНТЗ и уровнем эндотоксинемии и продукции провоспалительных цитокинов неоднозначна. Известно, что Th1 цитокины подавляют секреторную активность фолликулярных тироцитов [8], однако блокирование рецепторов цитокинов не препятствует развитию СНТЗ [6, 7]. Цитокиновый каскад является одним из механизмов запуска системного воспалительного ответа, приводящего к снижению продукции тиреоидных гормонов. В литературе описано развитие СНТЗ как при повышенной, так и при пониженной концентрации ТТГ в сыворотке крови [5, 9]. Изучение взаимосвязей между выраженностью проявлений СНТЗ и реакций иммунной системы позволило объяснить формирование двух, описанных ранее в научной литературе, форм СНТЗ с различным уровнем ТТГ в сыворотке крови. Исследование показало, что при более выраженной продукции Th1 цитокинов и меньшем уровне эндотоксинемии снижение секреции ТТГ гипофизом (центральный механизм развития СНТЗ) начинается в более поздние сроки, о чем свидетельствует повышенный уровень ТТГ в крови в сочетании со сниженным содержанием тиреоидных гормонов. При менее выраженной продукции Th1 цитокинов и более выраженной эндотоксинемии секреция ТТГ гипофизом снижается в более ранние сроки, что и приводит к изменениям тиреоидного статуса, характеризующегося снижением ТТГ на фоне пониженных значений тиреоидных гормонов в крови.

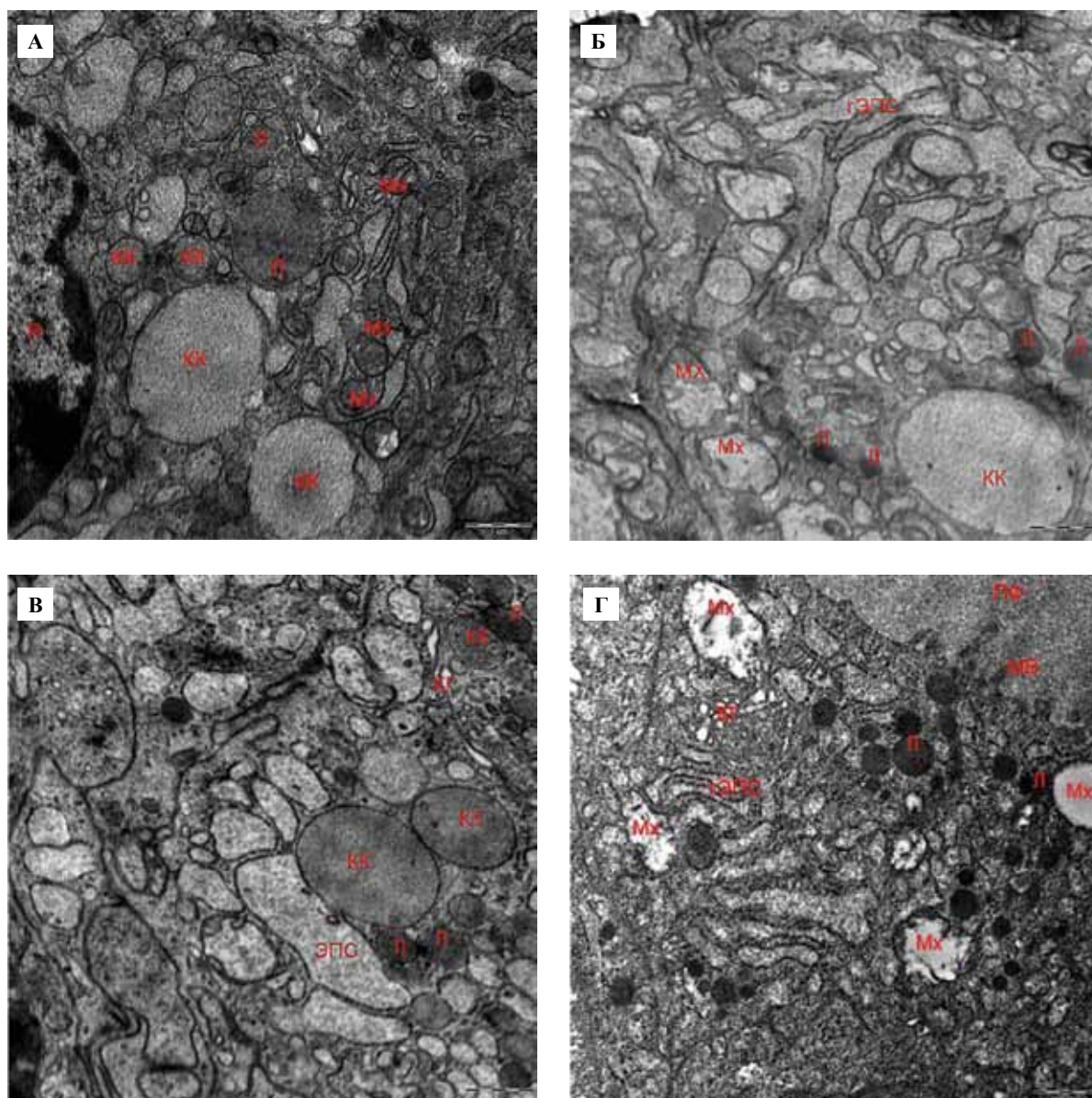


Рис. 3. Ультраструктура фолликулярных тироцитов при регрессе СНТЗ (через 7 суток после введения ЛПС).

А – ультраструктура фолликулярного тироцита центральной зоны долей ЩЖ крысы кластера с низким уровнем эндотоксинемии и низкой продукцией провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

В цитоплазме фолликулярного тироцита находятся множественные коллоидные капли (КК) разного размера. Количество лизосом (Л) небольшое. Лизосомы крупного размера с содержимым умеренной электронной плотности. Митохондрии небольшого размера без признаков патологических изменений.

Б – ультраструктура фолликулярного тироцита центральной зоны долей ЩЖ крысы с высоким уровнем эндотоксинемии и высокой продукцией провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

В цитоплазме фолликулярного тироцита встречаются коллоидные капли (КК) среднего размера, окруженные лизосомами (Л). Канальцы ГЭПС расширены. Отек матрикса и деструкция крист митохондрий (Мх).

В – ультраструктура фолликулярного тироцита центральной зоны долей ЩЖ крысы с низким уровнем эндотоксинемии и низкой продукцией провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

В цитоплазме клетки появились коллоидные капли (КК) разного размера, окруженные и контактирующие с лизосомами (Л). Комплекс Гольджи (Г) умеренно развит. Канальцы ГЭПС расширены.

Г – ультраструктура фолликулярного тироцита периферической зоны долей ЩЖ крысы с высоким уровнем эндотоксинемии и высокой продукцией провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов.

Расширение канальцев ГЭПС и цистерн комплекса Гольджи (Г). Большое количество зрелых лизосом (Л) в апикальной части клетки. Митохондрии (Мх) набухшие, с просветленным матриксом и деструктивно измененными кристами. Микроворсинки (МВ) укорочены, их количество уменьшено

Эти особенности развития СНТЗ имеют отражение и в морфологических изменениях щитовидной железы. При более выраженном иммунном ответе по Th1 типу наблюдаются меньшее увеличение размеров фолликулов и преобладание признаков синтеза тиреоглобулина над его резорбцией, а при менее выраженном иммунном ответе по Th1 типу отмечаются более крупные размеры фолликулов, а также выраженные проявления неэффективной резорбции тиреоглобулина в центральной зоне долей щитовидной железы.

Выраженность реакции иммунной системы влияет и на темпы регресса СНТЗ. У крыс с более высокой продукцией провоспалительных и Th1 цитокинов концентрации ТЗ и сТЗ в сыворотке крови выше, чем у крыс с менее выраженной продукцией провоспалительных и Th1 цитокинов, а увеличение продукции Т4 происходит при пониженной концентрации ТТГ. Восстановление баланса между фазами секреторного цикла фолликулярных тироцитов при менее выраженной реакции иммунной системы развивается в начале преимущественно в центральной зоне щитовидной железы, а при более выраженной – одновременно в центральной и периферической зонах, что определяет различия в сроках восстановления тиреоидного статуса организма.

Выводы

Развитие синдрома нетиреоидных заболеваний морфологически проявляется увеличением размеров фолликулов щитовидной железы, высоты фолликулярных тироцитов и размеров их ядер и усилением синтетических процессов в фолликулярных тироцитах на фоне снижения или отсутствия резорбции и расщепления лизосомами тиреоглобулина в периферической зоне долей, или неэффективной его резорбции фолликулярными тироцитами (накопление множественных коллоидных капель в цитоплазме фолликулярных тироцитов и отсутствие их контакта с лизосомами) в центральной зоне долей щитовидной железы.

Особенностями морфологических изменений щитовидной железы при синдроме нетиреоидных заболеваний у крыс с более выраженным иммунным ответом являются меньшие размеры фолликулов и преобладание признаков синтеза тиреоглобулина над его резорбцией фолликулярными тироцитами. У крыс с менее выраженным иммунным ответом наблюдаются более крупные размеры фолликулов, а также выраженные проявления неэффективной резорбции тиреоглобулина в центральной зоне долей щитовидной железы.

Морфологическими проявлениями регресса синдрома нетиреоидных заболеваний являются уменьше-

ние размеров фолликулов щитовидной железы, усиление синтетической и резорбционной активности ее тироцитов как в центральной, так и в периферической зонах, восстановление баланса между синтезом тиреоглобулина, его выделением в полость фолликулов и резорбцией с последующим внутриклеточным расщеплением лизосомальными ферментами. У крыс с менее выраженным иммунным ответом указанные процессы развиваются преимущественно в центральной зоне щитовидной железы, а у крыс с более выраженным – в центральной и периферической зонах, что определяет различия в сроках восстановления тиреоидного статуса организма.

Литература

1. Яглова Н.В. Взаимосвязь функциональной активности щитовидной железы и уровня провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов при остром экспериментальном эндотоксикозе / Н.В. Яглова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 147. № 6. С. 635–638.
2. Яглова Н.В. Морфофункциональный анализ развития синдрома нетиреоидных заболеваний при экспериментальном эндотоксикозе / Н.В. Яглова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 148. № 11. С. 584–588.
3. Яглова Н.В. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в механизмах регуляции тиреоидного статуса организма / Н.В. Яглова // Вопросы питания. 2010. № 3. С. 18–24.
4. Яглова Н.В. Ультраструктурные изменения в фолликулярных клетках щитовидной железы при воздействии липополисахарида / Н.В. Яглова // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 1. С. 47–53.
5. Adler S. The nonthyroidal illness syndrome / S. Adler, L. Wartofsky // Endocrinol. Metab. Clin. N. Am. 2007. V. 36. P. 657–72.
6. Boelen A. Immunoneutralization of interleukin-1, tumor necrosis factor, interleukin-6 or interferon does not prevent the LPS-induced sick euthyroid syndrome in mice / A. Boelen, M. Platvoet ter-Schiphorst, W. Wiersinga // J. Endocrinol. 1997. V. 153. N 1. P. 115–22.
7. Interleukin-1 receptor blockade does not affect endotoxin-induced changes in plasma thyroid hormone and thyrotropine concentration in man / T. Van der Poll et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995. V. 80. N 4. P. 1341–6.
8. Poncin S. Differential interactions between Th1/Th2, Th1/Th3, and Th2/Th3 cytokines in the regulation of thyroperoxidase and dual oxidase expression, and of thyroglobulin secretion in thyrocytes in vitro / S. Poncin, B. Lengele, I. Colin, A. Gerard // Endocrinology. 2008. V. 149. N 4. P. 1534–42.
9. Warner M. Mechanism behind the non-thyroidal illness syndrome: an update / M. Warner, G. Beckett // J. Endocrinol. 2010. V. 205. P. 1–13.

INDIVIDUAL FEATURES OF PATHOGENESIS OF NONTHYROIDAL ILLNESS SYNDROME IN ACUTE ENDOTOXICOSIS

N.V. Yaglova

Nonthyroidal illness syndrome in acute endotoxycosis develops because of enhanced depositing and reduced proteolysis of thyroglobulin in thyrocytes followed by decrease of thyroid stimulating hormone secretion. Supplementation of thyroid dysfunction by drop of thyroid stimulating hormone happens earlier in individuals with attenuated immune response. Light and electron microscopy of the thyroid revealed smaller size of follicles and prevalence of synthesis of thyroglobulin upon its reabsorbtion by thyrocytes in individuals with strong immune response and block of thyroglobulin proteolysis in individuals with attenuated immune response. The morphological sign of regression of thyroid dysfunction is balanced thyroglobulin synthesis, reabsorbtion and proteolysis by thyrocytes. These signs are observed both in cells of central and peripheral parts of the thyroid in individuals with strong immune response and only in cells of central part of the gland in individuals with attenuated immune response.

Key words: nonthyroidal illness syndrome, thyroid hormones, thyroid gland, endotoxycosis, lipopolysaccharide, cytokines

Информация об авторе

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

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон/факс 8 (499) 120-80-65, моб. 8 910 404-21-01. E-mail: yaglova@mail.ru

Материал поступил в редакцию 20 сентября 2013 года.

ИМПРЕГНАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНИЦИАЛЬНОГО ЛИМФАТИЧЕСКОГО РУСЛА

И.И. Марков¹, В.И. Маркова¹, Е.С. Петров², Е.В. Любаева¹

¹ НОУ ВПО «Медицинский институт «Реавиз», Самара,

² ГБУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара

В работе представлены данные об оригинальных методах импрегнации инициального лимфатического русла. Они позволяют выявить как интра- и экстрасосудистые конструкции лимфатических микрососудов, так и сопровождающие их сосудисто-нервные пучки.

Ключевые слова: метод импрегнации, азотнокислое серебро, лимфатические микрососуды

До настоящего времени основными методами выявления внутриорганный лимфатический русла полых и паренхиматозных органов остаются внутритканевые инъекции массы Герата [7] и слабых растворов азотнокислого серебра [6]. К сожалению, экстрасосудистый метод импрегнации сильными растворами азотнокислого серебра [3] оказался воспроизводимым только на пленочных препаратах. Тем не менее, несмотря на малую информативность указанных методов и получение многочисленных артефактов, именно на их основе базируются современные представления об анатомии и физиологии лимфатической системы [1, 6].

Цель работы – представить информацию об оригинальных импрегнационных методах выявления инициального лимфатического русла.

Традиционные методы импрегнации, которыми до настоящего времени пользуются анатомы и гистологи, по-прежнему остаются эмпирическими. Это особо касается и импрегнации серебром стенки кровеносных и лимфатических микрососудов.

Импрегнация ее возможна двумя способами – инъекцией слабых растворов азотнокислого серебра в кровеносное русло и иммерсией ее снаружи вместе с окружающими тканями. Первый способ (Ранвье–Гойера) оказался непригодным для выявления внутриорганный лимфатического русла.

Это связано с техническими трудностями его реализации: 1) невозможностью создания изотонического раствора солей серебра; 2) ненадежностью способов редукции серебра из раствора на сосудистой стенке; 3) слабой диффузией растворов солей серебра через стенку кровеносных микрососудов. Второй способ реализуется иммерсионной импрегнацией, применение которой для выявления микрососудистого русла ограничено феноменом конкурентной аргирофилии окружающих тканей. Указанные трудности были преодолены при реализации оригинальных технических решений [2, 4, 5].

Представленные данные получены на экспериментальных животных: кошках (n=7) и собаках (n=5). Все манипуляции с животными осуществлялись в соответ-

ствии с отечественными и международными этическими нормативами. Интрасосудистую импрегнацию 0,1% раствором азотнокислого серебра проводили через брюшную аорту животных, находящихся под эфирным наркозом. Предварительно кровеносное русло перфузировали изотоническим раствором до появления в открытой воротной вене чистого прозрачного перфузата. Для восстановления серебра до металла на стенке кровеносных и лимфатических микрососудов в качестве редуктора использовали 4% водный раствор гидрохинона. Его вводили в брюшную аорту через 3–5 минут после введения раствора азотнокислого серебра.

Для успешной экстрасосудистой импрегнации инициальных лимфатических микрососудов необходимо было добиться значительного повышения аргирофилии их стенки. С этой целью используется изотонический раствор гидроокиси бария $[Ba(OH)_2]$. Он вводится в брюшную аорту, поступает в кровеносное русло, диффундирует через стенку его микрососудов в окружающие ткани и затем резорбируется лимфатическими микрососудами. Раствор гидроокиси бария является физиологическим трассером, поэтому эндотелий кровеносных и лимфатических микрососудов сохраняет свою функциональную стабильность. Дальнейшие этапы экстрасосудистой импрегнации: 1) быстрый (в течение 3–5 минут) забор материала и его фиксация в 15% растворе аметанольного формалина в течение 2–10 суток; 2) приготовление замороженных срезов толщиной 15–50 мкм; 3) обработка срезов 0,6% раствором азотнокислого серебра в течение 5–7 минут; 4) обработка срезов 10% раствором азотнокислого серебра в течение 10–15 минут; 5) проведение срезов через батарею спиртов возрастающей крепости; 6) просветление в ксилоле; 7) заключение в канадский бальзам.

Предлагаемые способы импрегнации инициального лимфатического русла достаточно эффективны. Это достигается тем, что в их основу положен принцип целенаправленного изменения прижизненных восстановительных свойств сосудистой стенки. Так, интрасосудистая импрегнация позволяет выявить не

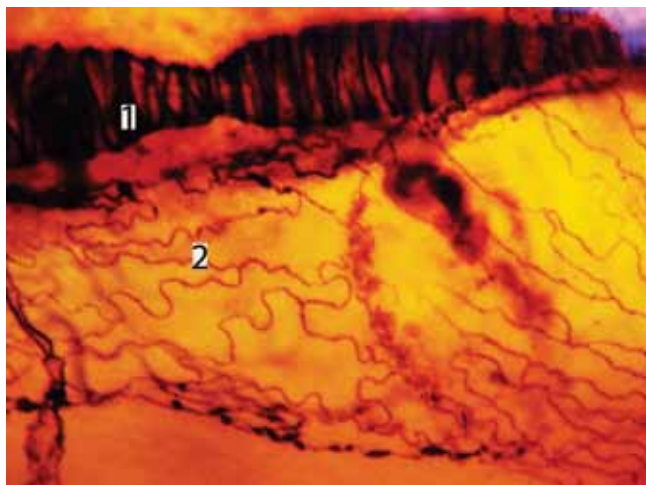


Рис. 1. Гематолимфатические взаимоотношения в подслизистой основе тонкой кишки кошки.

1) артериола; 2) лимфатический капилляр.

Интрасосудистая импрегнация азотнокислым серебром. $\times 200$

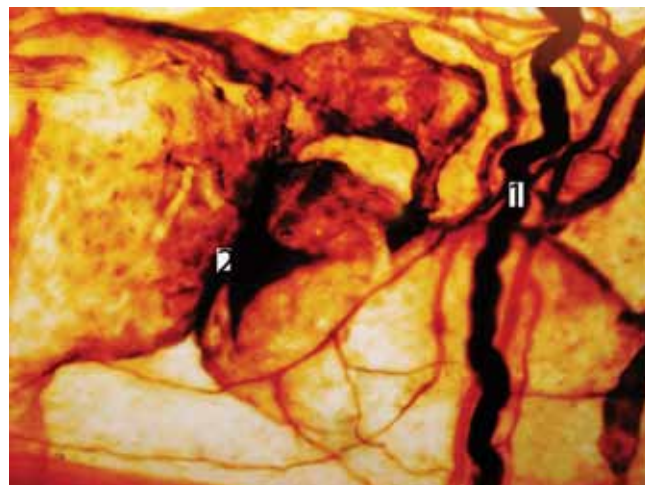


Рис. 2. Лимфатические микрососуды (2)

и сосудисто-нервный пучок (1) в подслизистой основе толстой кишки собаки. Экстрососудистая импрегнация азотнокислым серебром. $\times 200$

только границы эндотелиоцитов кровеносных и лимфатических микрососудов, но и участки их гематолимфатических контактов (рис. 1). Экстрососудистая импрегнация, в свою очередь, дает возможность выявить интра- и экстрососудистые конструкции инициальных лимфатических микрососудов и сопровождающие их сосудисто-нервные пучки (рис. 2).

Литература

1. Жданов Д.А. Общая анатомия и физиология лимфатической системы / Д.А. Жданов. Л.: Медгиз, 1952. 336 с.
2. Кошев В.И. Эндолимфососудистая контрактильная трабекулярная система / В.И. Кошев, Е. Петров, И.И. Марков и др. Самара: Офорт, 2010. 193 с.
3. Куприянов В.В. К морфологии органного кровеносного русла / В.В. Куприянов // Архив анатомии. 1961. № 4. С. 87–98.
4. Марков И.И. Импрегнация внутриорганного лимфатического русла по Ранвье / И.И. Марков // Архив анатомии. 1985. № 6. С. 77–79.
5. Марков И.И. Способ исследования микрососудистого русла большого сальника / И.И. Марков. Авторское свидетельство № 1619100 от 08.09.1990 г.
6. Сушко А.А. Некоторые особенности функциональной анатомии лимфатической системы / А.А. Сушко, Л.В. Чернышенко. Киев: Здоров'я, 1966. 160 с.
7. Gerota D. Zur techihnique der Lumphgefesinjection. Eine neue ijectionmasser. Polychrome injection / D. Gerota // Anat. Anz. 1896. Bd. 12. S. 216–21.

IMPREGNATION METHODS TO REVEAL INITIAL LYMPHATIC VESSELS

I.I. Markov, V.I. Markova, E.S. Petrov, E.V. Lyubayeva

We present the data on original methods of impregnation of initial lymphatic vessels. It provides a mean to reveal both intra-and extra-vascular structures of lymphatic microvessels and the accompanying neurovascular bundles.

Key words: impregnation method, silver nitrate, lymphatic microvessels

Информация об авторах

Марков Игорь Иванович – докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе Первого НИИ реабилитации ветеранов войн Медицинского института «Реавиз».

E-mail: markov.ii@hotmail.com

Маркова Валерия Игоревна – ассистент кафедры морфологии и патологии Медицинского института «Реавиз».

E-mail:markovalera@lenta.ru

Петров Евгений Сергеевич – канд. мед. наук, доцент кафедры оперативной хирургии и клинической анатомии с курсом инновационных технологий Самарского государственного медицинского университета.

Адрес: 443001, Самара, ул. Чапаевская, д. 227.

Любаева Екатерина Владимировна – канд. мед. наук, доцент кафедры морфологии и патологии Московского филиала Медицинского института «Реавиз».

Материал поступил в редакцию 31 сентября 2013 года.

ПЕРЕВИВАЕМЫЙ ШТАММ ГЛИОМЫ КРЫСЫ 101.8 I. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

А.С. Халанский, Л.И. Кондакова

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

В обзоре представлены биологические характеристики перевиваемого штамма злокачественной глиомы крысы 101.8, широко используемой в качестве модели опухоли мозга в области экспериментальной нейроонкологии.

Ключевые слова: глиобластома, глиома крысы 101.8, экспериментальная нейроонкология

Злокачественные глиальные опухоли мозга являются одной из наиболее опасных форм неоплазии, отличающейся быстрым течением и неблагоприятным прогнозом. Они составляют около половины всех новообразований головного мозга, 85% опухолей больших полушарий [9] и занимают второе место среди опухолей мозга у детей [1, 3, 6]. Отмечается постепенный, но неуклонный рост заболеваемости этими новообразованиями ЦНС. Начиная с 50-х годов прошлого столетия число случаев опухолей мозга увеличивается на 1% в год для всех возрастных групп и на 3% для лиц старше 65 лет [40]. В России и странах СНГ в последние годы также прослеживается тенденция к постепенному увеличению показателя первичных опухолей ЦНС. Если в 1989 году уровень заболеваемости только злокачественными опухолями был 3,4 среди женщин и 4,7 среди мужчин на 100 000 населения, то в 1995 году эти показатели возросли, соответственно, до 3,8 и 5,1 [18, 23].

Характерными чертами злокачественных глиом являются общее происхождение из астроцитарной глии, высокая пролиферативная активность и степень васкуляризации, быстрый рост, частое рецидивирование, а также быстрая прогрессия глиальных опухолей от относительно доброкачественных к злокачественным вариантам.

Основной метод лечения глиом – хирургическое вмешательство, однако сложная локализация этих новообразований и диффузная инвазия опухолевыми клетками окружающей нервной ткани, приводящая к размыванию границы между опухолью и мозгом, затрудняют тотальное удаление глиомы хирургическим путем. Применение хирургического метода, одного либо в сочетании с лучевой или химиотерапией, приводит только к небольшому увеличению продолжительности жизни, которая не превышает 1–2 года [30, 44]. По мнению большинства специалистов, полное излечение от опухоли хирургическим, лучевым,

химиотерапевтическим или другими методами, как правило, не удается, что ставит лечение этих опухолей в ряд наиболее сложных проблем современной нейрохирургии [8, 12].

Недостаточная эффективность химиотерапии глиом в значительной степени обусловлена неспособностью большинства противоопухолевых препаратов проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Поступление препаратов в мозг ограничивается плотными контактами клеток эндотелия сосудов мозга, отсутствием фенестров и присутствием в них активных выводящих ксенобиотики транспортеров, одним из которых является Р-гликопротеин (P-glicoprotein-Pgp) [28].

Признано, что в процессе развития опухоли барьерные функции ГЭБ нарушаются и его проницаемость увеличивается, но ряд полученных в последние годы данных говорит о неравномерном характере нарушений проницаемости ГЭБ в разных областях опухоли. Кроме того, ГЭБ может сохранять свою барьерную функцию в зоне активного роста опухоли на границе с нормальной тканью [29, 30, 39, 43, 49].

Таким образом, неудовлетворительность отдаленных результатов лечения глиом современными методами определяет необходимость широкого поиска новых препаратов, средств и методов, что невозможно без экспериментальных доклинических исследований на клеточном, тканевом и организменном уровне.

В свою очередь, исследования на уровне организма невозможны без использования экспериментальных моделей и, в первую очередь, опухолей мозга лабораторных животных как наиболее доступных объектов.

Сформулированы определенные требования к экспериментальным глиальным опухолям мозга [25, 26, 27].

1. Опухоль должна происходить из глиальных клеток.
2. Новообразование должно расти и поддерживаться *in vitro* и *in vivo* с помощью серийной трансплантации.

3. Опухолевый рост и возникшие в результате него изменения должны быть предсказуемыми и репродуцируемыми.

4. По своим свойствам опухоль должна иметь характеристики, подобные характеристикам глиом человека при интрацеребральном росте: неоваскуляризацию, нарушение ГЭБ, отсутствие капсулы и инвазивный характер роста.

5. Срок жизни животного-хозяина после интрацеребральной трансплантации опухоли должен быть достаточным для того, чтобы позволить провести курс экспериментальной терапии и определить ее эффективность.

6. Ответ на терапию должен примерно соответствовать наблюдаемому при подобных опухолях человека.

7. Опухолевый рост должен происходить интрацеребрально. Опухоли не должны прорастать в эпидуральное пространство и распространяться за пределы мозга.

8. Опухоль не должна оказывать выраженный иммуногенный эффект на животное-хозяина.

Опыт работы с имеющимися экспериментальными моделями глиальных опухолей показывает, что ни одна из используемых в настоящее время моделей не отвечает всем перечисленным критериям [32]. По-видимому, это и невозможно, учитывая большое разнообразие нейроэктодермальных опухолей человека, различающихся по гистологическому строению и степени злокачественности.

Имеющиеся экспериментальные опухоли отличаются как друг от друга, так и от опухолей мозга человека по степени злокачественности, характеру роста, взаимоотношению с окружающей тканью мозга, резистентности к применяемому воздействию и другим биологическим характеристикам. Среди основных отличий экспериментальных глиом от опухолей человека называют отсутствие гетерогенности, что может быть результатом клонирования во время пассирования или культивирования. Опухоли мозга лабораторных животных могут также различаться по гистологическому строению и по способности к инвазии [38]. У некоторых экспериментальных глиом обнаруживается способность к спонтанной регрессии [37, 42, 44].

Тем не менее опухоли мозга лабораторных животных в течение длительного времени были и остаются, несмотря на появление новых методов – ксенотрансплантации, использования клеточных линий, сфероидов и т.д. [32], основным инструментом поиска и оценки новых подходов к лечению нейроопухолей из-за относительной доступности и легкости воспроизведения.

Одной из таких моделей является полученная и поддерживаемая в НИИ морфологии человека РАМН злокачественная глиома (глиобластома) крысы 101.8, которая в течение нескольких десятилетий использовалась для разнообразных исследований в области нейронкологии и нейробиологии. В связи с этим возникла потребность обобщить данные по биологическим свой-

ствам этой модели и полученные при ее использовании результаты.

Интрацеребральная опухоль – глиома 101.8 – получена в 1967 году в результате имплантации пилюли 7,12-диметил-(а)-бензантрацена в правую гемисферу мозжечка крысы-самки Вистар [24]. Первоначальный диагноз возникшей опухоли – протоплазматическая астроцитомы (рис. 1). Опухоль состояла из беспорядочно расположенных мономорфных астроцитарных клеток с хорошо выраженной цитоплазмой, эксцентрично расположенными светлыми ядрами и умеренным содержанием хроматина. Срок развития опухоли на первых пассажах составлял в среднем 32 дня.

В процессе серийного интрацеребрального пассирования, начиная с 14-го пассажа, произошло озлокачествление глиомы. Сначала опухоль приобрела строение анапластической астроцитомы с участками мультиморфной глиобластомы, типичными ландшафтообразными некрозами, псевдопапиллярными структурами и многочисленными митозами. Вскоре после этого опухоль 101.8 приобрела однородное строение глиобластомы (рис. 2), которое устойчиво сохраняется на протяжении последующей работы с данной моделью.

Клинические признаки выросшей глиомы у крыс сначала проявлялись в потере веса, снижении двигательной активности и поведенческих нарушениях. Затем менялось состояние шерсти, постепенно нарастали парезы, гиперкинезы. На конечной стадии наблюдался кровавый выпот в области века и носа. С момента появления первых клинических признаков интрацеребрального опухолевого роста до гибели животного обычно проходило 1–2 суток. Смерть наступала на 12–22-е сутки роста, однако большая часть животных заболела и умерла в период от 14 до 18 суток.

Гибель животных происходила в результате распространения опухоли в окружающие отделы мозга и его отека или, реже, в результате внезапного кровоизлияния.

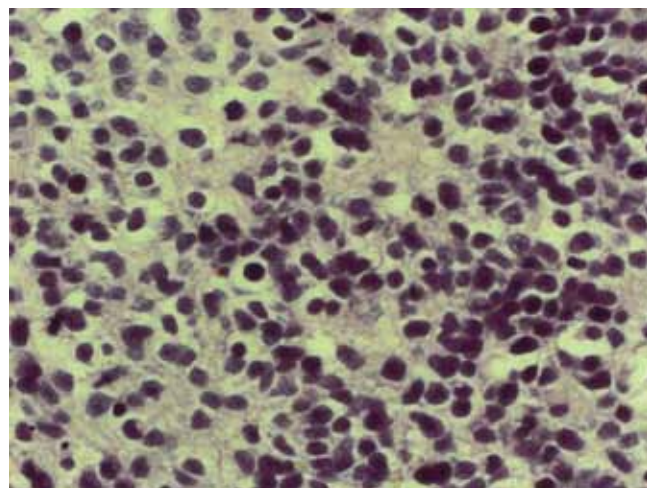


Рис. 1. Гистологическое строение глиомы 101.8. Пассаж 16. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Для трансплантации опухоли использовали разные виды наркоза (нембуталовый наркоз: 1% раствор, 2,5 мг на 100 г веса тела; хлоралгидрат: 300 мг/кг; кетамин-ксилазин: 80/20 мг/кг). Кожу головы животных обрабатывали спиртом и затем йодом. Трансплантацию опухоли в мозг производили через трепанационное отверстие в теменной кости черепа, на расстоянии 4 мм справа от сагиттального шва (*Sutura sagittalis*) и 2 мм каудально от венечного шва (*Sutura coronalis*), которое наносили зубо-врачебным шаровидным бором диаметром 1,5 мм. Размельченную ткань опухоли подсаживали троакаром на глубину 4 мм (с учетом костей черепа) в дно правого бокового желудочка (верхние отделы таламуса и хвостатого ядра). При необходимости кровотечение останавливали перекисью водорода. Рану засыпали порошком стрептоцида или других сульфаниламидных препаратов. Края кожной раны сближали и заклеивали коллодием. Количество имплантируемых клеток в подсаживаемой измельченной опухолевой ткани составляло около 1 миллиона. Прививаемость составляла 90–100%. Кроме крыс Вистар глиома 101.8 при интрацеребральном введении хорошо росла и у беспородных крыс. Различия в характере роста опухоли у самцов и самок отсутствовали [19].

На данный момент экспериментальная модель – пересаживаемая глиома крысы 101.8 – на гистологических препаратах мозга представляет собой злокачественную глиальную опухоль с высокой клеточностью, выраженной митотической активностью, фокальной микроваскулярной пролиферацией (рис. 2). Клетки глиомы имеют высокое ядерно-цитоплазматическое отношение. Ядра плеоморфны, мелкого или среднего размера, с атипичным расположением гетерохроматина. Границы опухоли нечеткие, с выраженной инфильтрацией окружающей ткани мозга опухолевыми клетками. Капсула отсутствует.

Структура опухоли неоднородна, поля сплошного скопления опухолевых клеток чередуются с участками

распада ткани и мелкими кровоизлияниями. В зрелом состоянии в опухоли формируются обширные центральные некрозы, окруженные псевдопалисадами. Также наблюдаются многочисленные кровоизлияния. В ткани опухоли видны делящиеся клетки и большое количество патологических митозов. Сосуды в опухоли распространены неравномерно. Местами наблюдаются единичные сосуды на большой площади, местами скопления в виде пучков. Большинство сосудов имеет разный диаметр и измененную форму: извитые, с неровными контурами просвета или лакунообразно расширенные. Эндотелиальная выстилка очагово нарушена.

Число сосудов в поле зрения опухоли меньше, чем в соответствующем здоровом полушарии. На ранних стадиях роста глиомы их количество больше по сравнению с поздними, где их число более постоянно. Средний размер сечения сосудов опухоли больше, чем у сосудов здоровой стороны, но клетки эндотелия (линейная плотность) расположены реже [11].

Растущий опухолевый узел четко определяется на срезе мозга почти у всех животных уже на 6-е сутки. В эти сроки растущая глиома имеет небольшие размеры и однородное строение. Кровеносные сосуды заметно не изменены и некротические процессы слабо выражены. При достижении опухолью более крупных размеров (10-е сутки) резко увеличивается некротизация центральной части опухоли (рис. 2) с формированием обширных зон некроза. Также появляются лакунообразные сосудистые полости и мелкие кровоизлияния.

В поздние сроки (12–18-е сутки) основные признаки зрелой глиобластомы (большая величина, выраженность некрозов, состояние сосудистого русла, инфильтративный рост и т.д.) менялись мало.

На ранних пассажах клетки опухоли 101.8 имели преимущественно диплоидное или околодиплоидное содержание ДНК [22]. Радиоавтографические в первичной культуре опухоли 101.8 выявлен высокий пролиферативный пул (72–76% включающих ^3H -тимидин клеток), а также растянутый период G_1 (38 часов), короткий S-период (5 часов) и период G_2 , равный 8 часам [2]. Эти результаты совпадают с данными, полученными позже на срезах опухоли, растущей *in vivo*, с использованием антител к Ki-67 (рис. 4). При этом процент опухолевых клеток, экспрессирующих Ki-67, находился в диапазоне от 84–86% во время раннего периода роста (6–10-е сутки после трансплантации) до 76% в поздние сроки роста (12–18-е сутки) [21, 46, 47, 48].

Индекс митотически делящихся клеток в глиоме 101.8 колебался в пределах 2%. Митозы чаще всего встречались в краевой зоне опухоли, граничащей с нормальным мозгом, и около крупных сосудов. Патологические митозы составляли около 20,1% от общего числа делений.

Использование иммуноэлектрофореза показало, что содержание белка S-100 в глиоме 101.8 было значительно снижено и колебалось в пределах 3–24% от нормы.

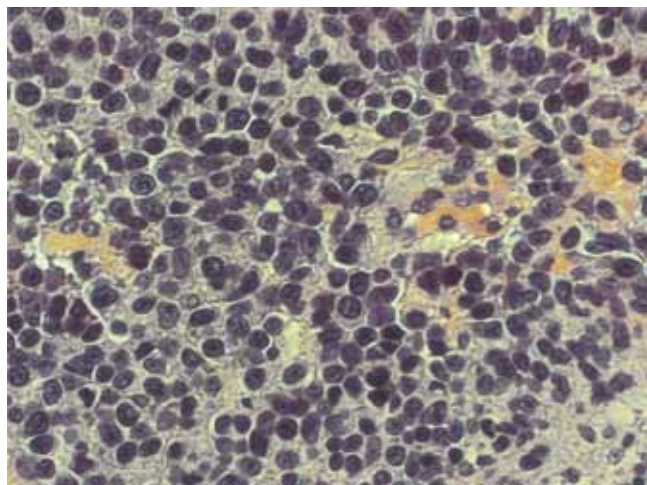


Рис. 2. Гистологическое строение глиомы 101.8. Пассаж 66. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Этот же метод выявил присутствие в опухоли 101.8 глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ), его повышенное содержание по сравнению с нормальным мозгом (в среднем 158%) на ранних пассажах (11–19-й) и приближающееся к норме (в среднем 110%) на поздних (39–54-й пассаж). Колебания содержания ГФКБ в отдельных опухолях были достаточно велики (37,3–225%) [3, 20].

При иммуногистохимическом исследовании с антителами против ГФКБ, если не учитывать реактивные астроциты в составе астроцитарного вала вокруг новообразования, в паренхиме опухоли встречались только единичные ГФКБ-позитивные клетки. В то же время плотные скопления и группы ГФКБ-позитивных клеток можно было наблюдать вокруг сосудов. Это позволяет с большой долей вероятности предположить, что ГФКБ-позитивные клетки скорее связаны с реакцией астроцитарной глии на опухоль мозга или с так называемыми рекрутируемыми астроцитами (рис. 3).

В опухоли была отмечена слабopоложительная реакция на эзрин – актинсвязывающий белок цитоскелета астроглии [41].

Клетки глиобластомы 101.8 и других глиом крыс экспрессировали на своей поверхности молекулы клеточной адгезии N-CAM типа A, уровень экспрессии которой возрастал с увеличением времени существования опухоли в мозге крысы-хозяина. При этом наблюдалась обратная корреляция уровней экспрессии N-CAM и фибронектина. Предполагается индукция N-CAM окружающей нормальной тканью мозга. Кроме того, отмечены различия в полипептидном составе N-CAM между злокачественными (101.8) и другими, более доброкачественными штаммами глиом [4, 33, 34, 35].

Клетки глиобластомы 101.8 в значительном количестве экспрессировали рецепторы глюкокортикоидов. При трансплантации этой опухоли самцам и самкам их присутствие наблюдалось примерно в одинаковом числе случаев (соответственно, 75% и 71%), однако уровень экспрессии в опухоли был значительно выше у самцов (30,8 фмоль/мг белка), чем у самок (11,4 фмоль/мг белка) [17].

На поверхности клеток глиобластомы также были обнаружены рецепторы к эпидермальному фактору роста и трансферрину [7].

Рост глиомы 101.8 сопровождался активацией NO-синтазы и накоплением стабильных окисленных метаболитов [17]. При этом установлена корреляционная связь между дестабилизацией процессов перекисного окисления липидов в мозге и крови экспериментальных животных и интенсивностью роста опухоли как следствие имплантации штамма глиомы 101.8. В мозге больных животных на фоне достоверного повышения активности перекисного окисления липидов наблюдали снижение активности системы антиоксидантной защиты организма [13].

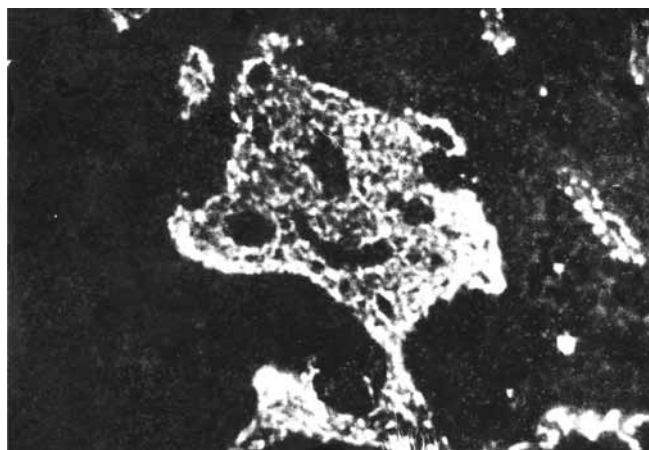


Рис. 3. Скопления ГФКБ-позитивных клеток вокруг сосудов в глиоме крысы. Иммунофлуоресценция. $\times 100$

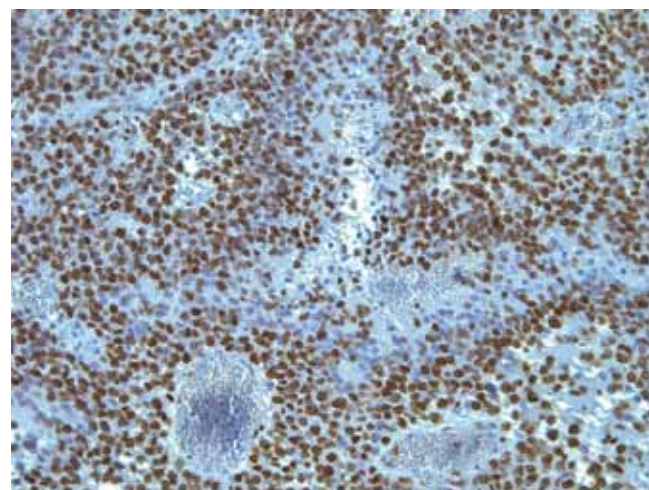


Рис. 4. Экспрессия пролиферативного антигена Ki-67 в клетках глиомы 101.8. $\times 200$

При изучении глиомы 101.8 методом динамической термоэнцефалографии выявлены температурная асимметрия (понижение температуры дорсальной коры над интрацеребральной опухолью) и медленные локальные температурные колебания в коре головного мозга крыс, которые связаны с волнами распространяющейся депрессии и могут усиливаться в ответ на сенсорные и другие раздражители [10].

В клетках глиомы 101.8 обнаружена высокая активность транскрипционного фактора SOX-2 – одного из генов стволовых клеток, отмеченного в эмбриональных нейральных клетках, и гена хрящевого гликопротеина (Human cartilage protein, HC gp-39). Активность последнего была отмечена в высокозлокачественных глиомах человека, что, возможно, может иметь диагностическое значение в качестве молекулярного маркера злокачественных глиом [6].

Таким образом по морфологической картине и биологическим свойствам, а также по аналогии с глиаль-

ными опухолями мозга человека перевиваемая глиома крысы 101.8 соответствует критериям ВОЗ для мультиформной глиобластомы IV степени и может быть использована в экспериментальной нейроонкологии как адекватная модель для оценки новых подходов к лечению опухолей мозга.

Литература

1. Авцын А.П. Биологические основы нейроонкологии / А.П. Авцын, Л.И. Кондакова, А.С. Халанский // Вестник РАМН. 1993. № 7. С. 51–54.
2. Авцын А.П. Биологическая характеристика перевиваемой глиомы крысы штамма 101/8 / А.П. Авцын, А.С. Халанский, Л.И. Кондакова и др. // Сборник научных трудов НИИ морфологии человека РАМН. Актуальные вопросы современной гистопатологии. М., 1988. С. 45–46.
3. Березин В.А. Специфические белки промежуточных филаментов в нормальной нервной ткани / В.А. Березин, Г.М. Шевченко, Г.Г. Бунатян и др. // Нейрохимия. 1987. Т. 6. № 1. С. 621–623.
4. Березин В.А. Экспрессия нейроспецифических белков клеточной адгезии (N-CAM) и промежуточных филаментов (ГФКБ) в перевиваемых глиомах / В.А. Березин, И.М. Кривко, Г.Г. Бунатян и др. // Функции нейроглии. Тбилиси: Мецниереба. 1993. С. 259–265.
5. Верхоглядова Т.П., Аннин Е.А. Морфологическое исследование противоопухолевой активности химиотерапевтических препаратов на экспериментальной модели опухоли мозга // Республиканский межведомственный сборник «Нейрохирургия». Киев: Здоровье, 1981. Вып. 14. С. 94–97.
6. Гарифулин О.М. Повышенная экспрессия генов SOX-2 и NCgr-39 в глиомах / О.М. Гарифулин, К.А. Шостак, В.В. Дмитриенко и др. // Биополимеры и клетка (Укр.). 2002. Т. 18. № 4. С. 324–328.
7. Кирпичников М.П. Противоопухолевое действие конъюгата рекомбинантного эпидермального фактора роста и А-субъединицы рибина / М.П. Кирпичников, Я.С. Ермолюк, М.М. Мойсенович и др. // Российский химический журнал. 1998. Т. 42. № 5. С. 97–100.
8. Коновалов А.Н. Магнитно-резонансная томография в нейрохирургии / А.Н. Коновалов, В.Н. Корниенко, И.Н. Пронин. М.: Видар, 1997. 472 с.
9. Коновалов А.Н. Нейрорентгенология детского возраста / А.Н. Коновалов, В.Н. Корниенко, В.И. Озерова, И.Н. Пронин. М.: Антидор, 2001. 456 с.
10. Кузнецова Г.Д. Тепловые реакции мозга животных на развитие интракраниальной опухоли / Г.Д. Кузнецова, А.М. Подолец, А.С. Халанский // Тепловая аппаратура и практика ее применения ТЕМП-88. Л., 1988. С. 141–145.
11. Левитман М.Х. Некоторые количественные параметры сосудистой сети перевиваемых опухолей головного мозга в эксперименте на крысах / М.Х. Левитман, Н.В. Любимова, Е.Д. Плотникова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1990. Т. 60. № 12. С. 638–641.
12. Медяник И.А. Некоторые аспекты химио- и радиорезистентности злокачественных опухолей головного мозга / И.А. Медяник // Вопросы нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. 2002. № 1. С. 30–33.
13. Розуменко В.Д. Состояние свободнорадикальных процессов и системы антиоксидантной защиты организма при глиомах головного мозга в клинике и эксперименте / В.Д. Розуменко, Д.А. Сутковой, А.И. Троян // Украинський нейрохірургічний журнал. 2008. № 2. С. 38–41.
14. Самойлов В.И. Диагностика опухолей головного мозга. М.: Медицина, 1985. 302 с.
15. Семенова В.М., Лисяный Н.И., Читаева Г.Е., Ключникова А.И., Лисяный А.Н., Бельская Л.Н., Шевчук О.В. Изучение противоопухолевой активности препаратов украин и цисплатин в эксперименте на модели экспериментальной глиомы мозга (штамм 101.8) / В.М. Семенова, Н.И. Лисяный, Г.Е. Читаева и др. // Украинський нейрохірургічний журнал. 2008. № 1. С. 32–37.
16. Сенько Л.Н., Зозуля Ю.А. Роль оксида азота в патогенезе глиом / Экспериментальная онкология. 2000. Т. 22. С. 246–250.
17. Смирнова З.С., Зависимость противоопухолевого действия гормоноцитостатика кортифен от экспрессии рецепторов глюкокортикоидов в клетках опухолей мозга крыс / З.С. Смирнова, Ю.В. Родионова, А.С. Халанский и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. № 3. С. 331–333.
18. Трапезников Н.Н. Статистика злокачественных новообразований и состояние онкологической помощи в государствах СНГ / Н.Н. Трапезников, Е.М. Аксель, Ж.Н. Абдрахманов // II съезд онкологов стран СНГ. Киев, 2000. С. 10.
19. Халанский А.С. Новые перевиваемые опухоли головного мозга крыс / А.С. Халанский, Л.И. Кондакова, А.П. Авцын // Вопросы нейрохирургии. 1995. № 2. С. 23–25.
20. Халанский А.С. Распределение глиального фибриллярного кислого белка и белка S-100 в экспериментальных опухолях мозга крыс / А.С. Халанский, Г.М. Шевченко, В.А. Березин // Вопросы нейрохирургии. 1991. № 1. С. 19–22.
21. Халанский А.С. Морфологическая оценка противоопухолевого эффекта наносомальной формы доксорубина в отношении экспериментальной глиобластомы у крыс / А.С. Халанский, Т. Хекматара, А. Бернройтер и др. // Биофармацевтический журнал. 2011. Т. 3. № 2. С. 41–50.
22. Халанский А.С., Яблоновская Л.Я. Цитофотометрическое определение содержания ДНК в клетках экспериментальных опухолей мозга. I. Перевиваемые штаммы опухолей мозга лабораторных животных // Цитология. 1973. Т. 15. № 7. С. 912–918.
23. Холин А.В. Магнитно-резонансная томография при заболеваниях центральной нервной системы. СПб.: Гиппократ, 1999. 192 с.
24. Яблоновская Л.Я., Спрышкова Н.А. Морфологическая и биологическая характеристика экспериментальных опухолей мозжечка крыс // Архив патологии. 1977. Т. 33. № 2. С. 50–53.
25. Barker M. Development of an Animal Brain Tumor Model and Its Response to Therapy with I,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea / M. Barker, T. Hoshino, O. Gurcay et al. // Cancer Research. 1973. V. 33. P. 976–86.

26. Barth R.F. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas // J. Neurooncol. 1998. V. 36. P. 91–102.
27. Barth R.F., Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas // J. Neurooncol. 2009. V. 94. N 3. P. 299–312.
28. Begley D.J. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities // Pharmacol. Ther. 2004. V. 104. P. 29–45.
29. Caruso G. Could nanoparticle systems have a role in the treatment of cerebral gliomas? / G. Caruso, M. Caffo, C. Alafaci et al. // Nanomedicine. 2011. V. 7. N 6. P. 744–52.
30. Donelli M.G. Do anticancer agent reach the tumor target in the human brain? / M.G. Donelli, M. Zuchetti, M. D'Incalci // Cancer. Chemother. Pharmacol. 1992. V. 30. N 4. P. 251–60.
31. Grossman S.A., Batara J.F. Current management of glioblastoma multiforme // Semin. Oncol. 2004. V. 31. N 5. P. 635–46.
32. Huszthy P.S. In vivo models of primary brain tumors: pitfalls and perspectives / P.S. Huszthy, I. Daphu, S.P. Niclou et al. // Neuro Oncol. 2012. V. 14. N 8. P. 979–93.
33. Krivko I.M. Neural cell adhesion molecule in transplanted rat gliomas / I.M. Krivko, A.S. Khalansky, V.A. Beresin // Abstract 20-th FEBS Meeting. August 19-24. 1990. P. 34.
34. Krivko I.M. Characterization of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in transplanted rat gliomas and neurinomas during tumorigenesis / I.M. Krivko, A.S. Khalansky, V.A. Beresin // Abstracts of the 14-th Annual Meeting of the European Neuroscience Association. Cambridge 8-12 Sept. European Journal of Neuroscience. 1991. Suppl. 4. P. 210.
35. Krivko I.M. Influence of surrounding brain tissue upon the N-CAM expression in transplanted rat glioma cells / I.M. Krivko, A.S. Khalansky, V.A. Beresin // Clinical Neuropathology. 1992. V. 11. N 4. P. 268.
36. Packer R.J. Brain tumors in children // Curr. Opin. Pediatr. 1995. V. 7. P. 64–72.
37. Parsa A.T. Limitations of the C6/Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy / A.T. Parsa, I. Chakrabarti, P.T. Hurley et al. // Neurosurgery. 2000. V. 47. N 4. P. 993–1000.
38. Pilkington G.J., Lantos P.L. Biological markers for tumours of the brain. // Adv. Tech. Stand. Neurosurg. 1994. V. 21. P. 3–41.
39. Raudino G. Nanoparticle-based cerebral drug-delivery systems and antiangiogenic approach in gliomas treatment / G. Raudino, M. Caffo, G. Caruso // Recent Pat. Nanotechnol. 2011. V. 5. N 3. P. 239–44.
40. Schwartz R.B., Mantello M.T. Primary brain tumours in adults // Semin. Ultrasound, CT, MT. 1992. V. 13. P. 449–72.
41. Steiniger S.C. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles / S.C. Steiniger, J. Kreuter, A.S. Khalanski et al. // Int. J. Cancer. 2004. V. 109. P. 757–67.
42. Vince G.H. Spontaneous regression of experimental gliomas--an immunohistochemical and MRI study of the C6 glioma spheroid implantation model. / G.H. Vince, M. Bendszus, T. Schweitzer et al. // Exp. Neurol. 2004. V. 190. N 2. P. 478–85.
43. Vries de H.E. Brain-Blood-Barrier in brain tumors / H.E. de Vries, L. Mouragne, C.D. Dijkstra et al. // Brain tumors. 2005. Ed. F. Ali-Osman. Human Press Inc. Toxowa New Jersey. P. 157–74.
44. Watanabe K., Feasibility and limitations of the rat model by C6 gliomas implanted at the subcutaneous region. / K. Watanabe, M. Sakamoto, M. Somiya // Neurol Res. 2002. V. 24. N 5. P. 485–90.
45. Westphal M. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma / M. Westphal, D.C. Hilt, E. Bortey et al. // Neurooncol. 2003. V. 5. P. 79–88.
46. Wohlfart S. Increased numbers of injections of doxorubicin bound to nanoparticles lead to enhanced efficacy against rat glioblastoma 101/8 / S. Wohlfart, C. Bernreuther, A.S. Khalansky et al. // J. Nanoneuroscience. 2009. V. 1. P. 144–51.
47. Wohlfart S., Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers / S. Wohlfart, A. Khalansky, S. Gelperina et al. // PLoS ONE. 2011. V. 6. N 5. e19121.
48. Wohlfart S. Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood-brain barrier / S. Wohlfart, A.S. Khalansky, S. Gelperina // Journal of Controlled Release. 2011. V. 154. P. 103–7.
49. Zhan C., Lu W. The Blood-Brain Tumor Barriers: Challenges and Chances for Malignant Gliomas Targeted Drug Delivery // Curr Pharm Biotechnol. 2012. V. 13. N 12. P. 2380–7.

TRANSPLANTED RAT GLIOMA 101.8. I. BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

A.S. Khalansky, L.I. Kondakova

There are presented biological characteristics of the transplanted rat malignant glioma 101.8, which was induced in 1968 and used as a brain tumor model in experimental neurooncology.

Key words: glioblastoma, rat glioma 101.8, experimental neurooncology

Информация об авторах

Кондакова Л.И. — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека РАМН.
Халанский А.С. — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека РАМН.
Адрес: Москва 117218, ул. Цюрупы, д. 3. E.mail: rubbor.ru-52 @ mail.ru.

Материал поступил в редакцию 16 сентября 2013 года.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС

И.С. Цветков¹, О.В. Макарова^{1,2}, В.А. Мхитаров¹

¹ ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

В работе проанализированы литературные данные о макро- и микроскопическом строении предстательной железы лабораторных крыс. С помощью морфометрических методов исследования авторами проведена сравнительная оценка структуры вентральной и дорсальной долей предстательной железы у крыс Вистар в норме. Показано, что в дорсальной доле выше объемная плотность ацинусов и ацинусов, содержащих секрет, показатель индекса дегрануляции тучных клеток и ниже плотность внутридольковой стромы. Выявленные морфологические различия соотносятся с функциональными особенностями долей предстательной железы.

Ключевые слова: предстательная железа, тестостерон

Половая система самцов крыс представлена половыми железами (гонадами) – семенниками и дополнительными органами – семявыносящими протоками и вспомогательными железами. Семявыносящие пути включают в себя прямые каналы семенника, сеть семенника, выносящие каналы семенника, канал придатка, семявыносящий проток и мочеиспускательный канал [7, 19]. К вспомогательным половым железам относятся парные семенные пузырьки, коагуляционная, предстательная и бульбоуретральная железы. Продукты, вырабатываемые этими железами, входят в состав жидкой части спермы – семенной жидкости. Семенные пузырьки у крыс крупные, трубчатые, дольчатые, за исключением гладкого концевого отдела. Расположены они краниолатерально в области шейки мочевого пузыря, их протоки открываются в простатический отдел мочеиспускательного канала. Семенные пузырьки заключены в капсулу, переходящую в наружную соединительнотканную адвентициальную оболочку, за которой следуют мышечный и эпителиальный слои. Коагуляционная железа узкая, с расширенным краниальным концом, тесно прилежит к внутреннему изгибу семенного пузырька. Бульбоуретральная железа (луковичная, куперова железа) грушевидная, с гладкой поверхностью, имеет дольчатое строение. Она прилежит к луковично-пещеристой мышце и прикрыта седалищно-пещеристой мышцей, открывается протоком в каудальную часть мочеиспускательного канала рядом с зоной прикрепления луковично-пещеристой мышцы к половому члену. Бульбоуретральная железа имеет капсулу, состоящую из поперечнополосатых мышечных волокон.

В эмбриональном периоде предстательная железа образуется путем выпячивания стенки мочеполового синуса и окружающей мезенхимы. Она является мышечно-железистым органом, окружающим мочеиспускательный канал в виде муфты сразу после выхода из мочевого пузыря [19]. Предстательная железа крыс (prostate) – альвеолярно-трубчатый орган, состоит из ацинусов, выстланных однослойным цилиндрическим каемчатым эпителием и окруженных одним слоем гладкомышечных миоцитов и стромой.

Предстательная железа состоит из двух долей, охватывает проксимальный отдел семявыносящего протока, расположена вдоль латеральной стенки мочеиспускательного канала, в который она открывается множественными выводными предстательными протоками. Железа поддерживается фасцией, идущей от мочевого пузыря.

По сравнению с центральной зоной ацинусы вентральной доли простаты, особенно в ее периферической зоне, имеют выраженную складчатость и меньший диаметр. Эпителий ацинусов базофильный, столбчатый или кубический с базально расположенными ядрами. В цитоплазме эпителиальных клеток при световой микроскопии определяется супрануклеарное просветление, что соответствует выявляемому в этой зоне при ультраструктурном исследовании комплексу Гольджи [11]. При окраске гематоксилином и эозином секрет ацинусов вентральной доли слабо эозинофильный.

Латеральная доля связана с уретрой соединительной тканью и протоками. Ацинусы этой доли имеют переменные размеры, в них определяется большое количество эпителиально-стромальных выростов.

Между ацинусами определяются тонкие прослойки рыхлой волокнистой соединительной ткани. Ацинусы выстланы кубическим эпителием. Ядра эпителиальных клеток расположены центрально, в цитоплазме выявляется супрануклеарная зона просветления. Секрет ацинусов латеральной доли интенсивно окрашивается эозином.

Дорсальная доля отделена от латеральной и связана с уретрой соединительной тканью и множеством протоков. Ацинусы дорсальной доли большие, характеризуются меньшей складчатостью, чем ацинусы вентральной доли. Они тесно упакованы, выстланы главным образом кубическим эпителием с центрально расположенным ядром и супрануклеарной светлой зоной. Секрет ацинусов дорсальной доли характеризуется промежуточной по сравнению с латеральной и вентральной долями интенсивностью окрашивания эозином. Строма всех долей состоит из тканевых элементов, волокон и межклеточного вещества, кровеносных сосудов, нервных окончаний [19].

Протоки предстательной железы имеют схожее строение в вентральной, дорсальной и латеральной долях [19]. Они длинные и тонкие, выстланы цилиндрическим или кубическим эпителием. Стенки протоков складчатые, состоят из соединительной ткани и нескольких слоев гладкомышечных клеток. Каждая доля вентральной простаты дренируется 4–5 протоками, исходящими из центральной зоны доли, которые следуют по направлению к вентролатеральному мышечному слою стенки уретры. Мелкие протоки дренируют ацинусы и образуют главные протоки. В отличие от дорсальной доли, протоки латеральной и вентральной долей отличаются тем, что дренируют только 3–4 ацинуса. От каждой латеральной доли отходит 7–8 протоков. Часть латеральной доли прилежит к вентральной, и она дренируется 2 протоками, которые открываются в просвет уретры вентролатерально. Средняя часть латеральной доли дренируется 1–2 протоками, которые открываются в дорсальную часть уретры. Дорсальная доля дренируется 10–14 тонкими и длинными протоками. Строма предстательной железы представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью, среди клеточных элементов которой наряду с фиброцитами и фибробластами выявляется большое количество тучных клеток, небольшое число лимфоцитов и единичные макрофаги.

Биохимический состав секрета предстательной железы разных долей у крыс отличается. Секрет дорсальной доли предстательной железы характеризуется высоким уровнем фруктозы [21]. Вентральная доля простаты секретирует большое количество лимонной кислоты, спермина, а также спермидина – специфического белка, относящегося к простатеину [23, 24]. Секрет латеральной доли простаты крыс богат цинком [15]. Основными белками дорсальной доли простаты являются дорсальный протеин-1, протеин-2, большой белковый комплекс, содержащий гликопротеины

[33]. Дорсальный протеин-1 является андрогензависимым секреторным белком. У крыс после кастрации отмечается прогрессирующее снижение его содержания в течение 4 недель. Снижение концентрации цинка в предстательной железе коррелирует с уменьшением уровня тестостерона [18].

Иннервация предстательной железы крысы осуществляется ветвями подчревного, почечного, аортального и брыжеечного нервных сплетений. В предстательной железе выявлено два вида нервных волокон – симпатические и парасимпатические [19]. Простатический комплекс (предстательная железа, мочевого пузыря, коагуляционные железы, семенные пузырьки и семявыносящий проток) кровоснабжается верхними мочепузырными артериями и их ветвями, исходящими из внутренней подвздошной артерии.

В межацинарной строме предстательной железы выявляются фиброциты, фибробласты, тучные клетки и единичные гистиоциты. Тучные клетки предстательной железы, секретируя биологически активные вещества, регулируют кровоток в ее сосудах [12, 17, 27, 28]. Факторы роста, которые высвобождаются тучными клетками при дегрануляции, регулируют процессы синтеза коллагеновых волокон и межклеточного вещества [4].

E.V. Vykhovanets et al. [31] показали, что лимфоциты предстательной железы крыс Спрейг-Дуоли представлены тремя субпопуляциями: $\alpha\beta$ Т-лимфоцитами, натуральными киллерами NK (natural killer) и NKT (natural killer T-lymphocytes) клетками [10]. $\alpha\beta$ Т-лимфоциты дифференцируются в тимусе и заселяют эпителиальный пласт и собственную пластинку слизистых оболочек. Они относятся к длительно живущим популяциям, срок их жизни составляет месяцы и годы. В составе $\alpha\beta$ Т-клеток выявляют четыре субпопуляции, которые различаются по экспрессии CD4 или CD8-молекул и по способу распознавания антигена в составе МНС-I или МНС-II. NKT-клетки – особая популяция лимфоцитов, формирующаяся в процессе Т-лимфопоэза и экспрессирующая маркеры Т и NK клеток CD56 и CD16 [8]. По сравнению с популяциями лимфоцитов, заселяющими селезенку, печень, подвздошную кишку и мезентеральные лимфатические узлы, предстательная железа содержит значительную долю NK клеток и Т-лимфоцитов, несущих маркеры NK клеток, среди которых преобладают CD45, CD4+ Т-клетки. При анализе популяций лимфоцитов дорсолатеральной и вентральной простаты у крыс Вистар и Спрейг-Дуоли E.V. Vykhovanets et al. [32] выявили низкое соотношение CD4/CD8 Т-лимфоцитов.

Установлено, что рост и физиологическое функционирование простатических желез зависят от уровня андрогенов [6, 14]. Выраженность экспрессии рецепторов к андрогенам, в том числе клеточными элементами простаты, контролируется тестостероном и его метаболитами [26, 29]. Уровень экспрессии рецепторов к тестостерону уменьшается после кастрации и воз-

вращается к норме после заместительной андрогенной терапии [26]. Показано, что кастрация половозрелых крыс вызывает апоптотическую гибель эпителиальных клеток ацинусов в дистальных отделах долей простаты, в то время как в проксимальных выраженность апоптоза не изменяется [9, 20].

Продукцию тестостерона контролирует гипоталамо-гипофизарно-гонадная ось [2]. Тестостерон регулирует в гипоталамусе секрецию рилизинг-гормона и секрецию гипофизом лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов посредством отрицательной обратной связи между гипоталамусом и гипофизом. Гипоталамо-гипофизарная недостаточность приводит к развитию гипогонадизма, гиперплазии предстательной железы с инволюцией ацинусов и разрастанием стромы. У пациентов с хроническим простатитом по данным биохимических анализов определяются разные по степени выраженности и сочетаниям соматотропная, тестикулярная, тиреоидная и надпочечниковая недостаточность [3].

Эпителий ацинусов и выводных протоков предстательной железы в норме экспрессирует рецепторы к андрогенам и эстрогенам [16, 34]. Показано, что на морфофункциональное состояние предстательной же-

Таблица

Морфометрическая характеристика структурных изменений разных долей предстательной железы крыс Вистар, $M \pm SE$, Me (25L; 75U)

Показатели	Доли предстательной железы	
	дорсальная	вентральная
Ацинусы (об. доля)	63,41 $\pm$ 1,90	56,89 $\pm$ 2,07
Строма (об. доля)	36,40 $\pm$ 2,15	42,47 $\pm$ 1,85
Эпителий (об. доля)	34,52 $\pm$ 2,21	23,77 $\pm$ 1,27
Ацинусы с секретом (об. доля)	30,04 $\pm$ 2,10	22,22 $\pm$ 5,12
Ацинусы без секрета (об. доля)	9,96 $\pm$ 2,41	25,00 $\pm$ 4,82
Десквамация эпителия (абс. пок.)	4,5 (2;6)	11,5 (9;16)
Клеточные элементы в строме (об. доля)	0,0 (0;2,5)	3,0 (1;6)
Число тучных клеток (абс. пок.)	8,46 $\pm$ 1,26	9,20 $\pm$ 1,21
Индекс дегрануляции тучных клеток (усл. ед.)	2,23 $\pm$ 0,16	1,56 $\pm$ 0,17

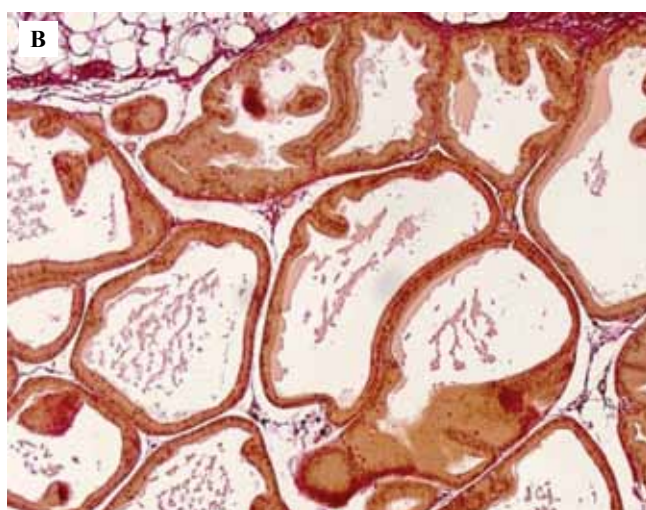
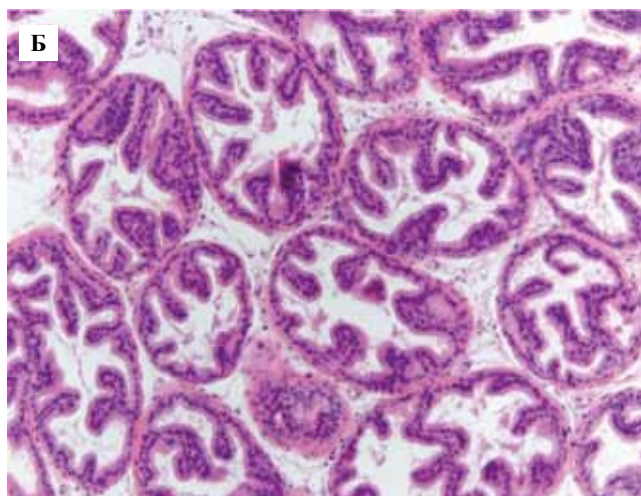
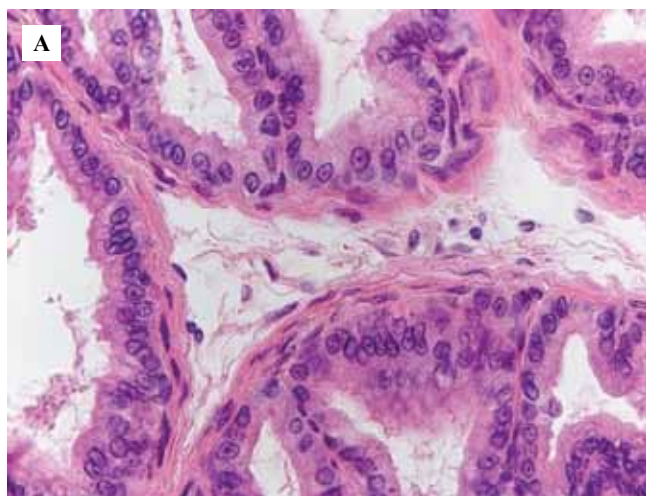


Рис. 1. Морфологическая характеристика дорсальной доли предстательной железы половозрелых крыс Вистар.

А – в просвете ацинусов небольшое количество волокнистого эозинофильного секрета. Эпителий образует большое число эпителиально-стромальных выростов. Эпителий ацинусов кубический, цилиндрический. Межацинарная строма представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью, в ней небольшое количество клеточных элементов.

Б – эпителий цилиндрический, образует эпителиально-стромальные выросты. В строме фиброциты, фибробласты, единичные лимфоциты.

В – большая часть ацинусов частично заполнена гомогенным эозинофильным секретом. Эпителий однорядный кубический, образует небольшое количество папиллярных выростов. Строма рыхлая, в ней единичные клеточные элементы.

Внутридолевая строма рыхлая, пикринофильная.

А, Б – окраска гематоксилином и эозином; В – окраска по ван Гизону. А, В – $\times 100$, Б – $\times 320$

лезы оказывают воздействие полипептидные факторы роста – TGF- α (transforming growth factor) и EGF (epidermal growth factor) [13]. Экспрессия TGF- α выявлена в вентральной доле предстательной железы у крыс [30]. Уровень экспрессии TGF- α зависит от содержания андрогенов в сыворотке крови [22, 25].

Андрогены вызывают гипертрофию и усиливают секреторную функцию эпителия ацинусов простаты. Эстрогены, напротив, трансформируют высокий цилиндрический секреторирующий эпителий в несекретирующий кубический. При злокачественных опухолях простаты показаны применение эстрогенов и кастрация, которые приводит к выраженной андрогенной недостаточности и модуляции пролиферативной активности эпителия [5].

Нами с помощью гистологических и морфометрических методов исследована предстательная железа половозрелых крыс-самцов Вистар массой тела 240–280 граммов (питомник «Столбовая»). Все эксперименты выполнены в осенне-зимний период. Проводили гистологическое исследование препаратов вентральной и дорсальной долей предстательной железы, окрашенных гематоксилином и эозином, по

ван Гизону, альциановым синим, толуидиновым синим (pH 2,0). Гликопротеиды выявляли с помощью PAS-реакции. Морфометрическое исследование проводили методом точечного счета с применением 100-узловой тест-сетки [1].

Полученные цифровые данные оценивали на нормальность распределения при помощи метода Колмогорова и Смирнова в пакете Statistica 7.0. Цифровые данные, подчиняющиеся нормальному распределению, обрабатывали параметрическими методами, сравнение групп проводили по t-критерию Стьюдента, в противном случае использовали непараметрический метод Манна–Уитни. Статистически значимыми считали значения при $p < 0,05$.

У крыс Вистар ацинусы вентральной и дорсальной долей предстательной железы были округлой и овальной формы, просветы их были частично заполнены эозинофильным, слабо PAS-положительным гомогенным секретом (рис. 1, 2). Эпителий призматический, с небольшим количеством эпителиально-стромальных выростов. В просветах части ацинусов выявлены клетки десквамированного эпителия. Строма представлена тонкими прослойками пикринофильной рыхлой воло-

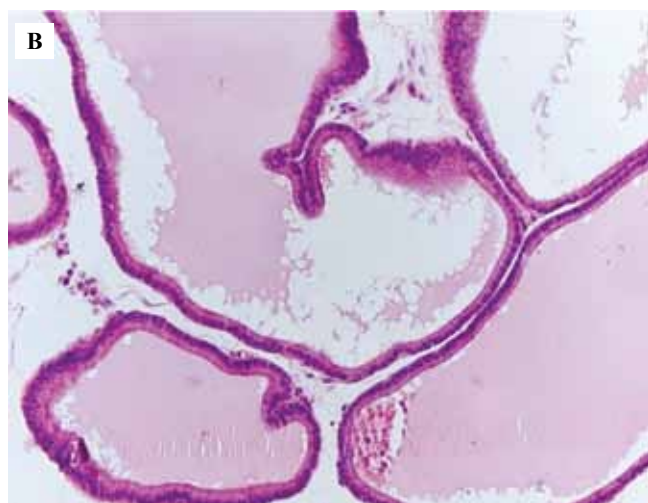
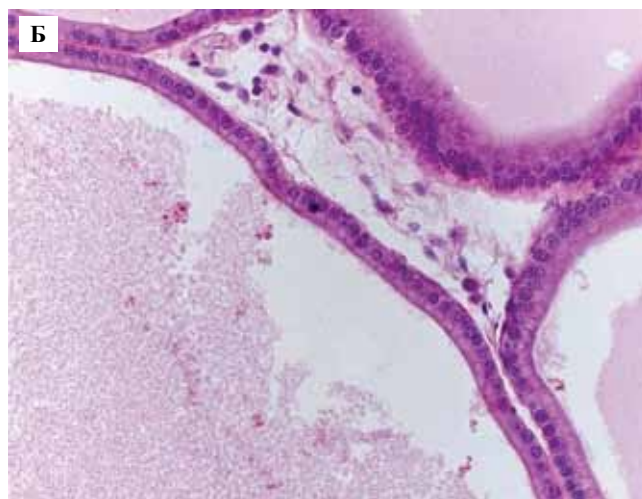
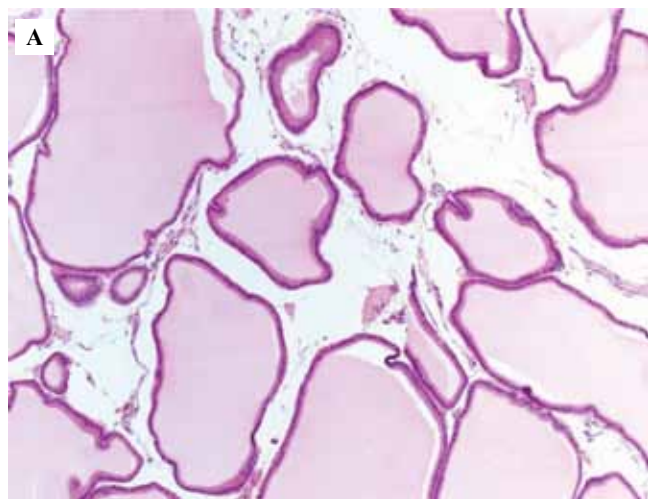


Рис. 2. Морфологическая характеристика вентральной доли предстательной железы половозрелых крыс Вистар.

А – ацинусы заполнены слабо эозинофильным гомогенным секретом. Эпителий кубический, образует единичные стромальные выросты. Строма образована рыхлой волокнистой соединительной тканью.

Б, В – просветы ацинусов частично заполнены гомогенным секретом. В просвете десквамированный эпителий. Строма представлена рыхлой соединительной тканью с небольшим количеством клеточных элементов.

Эпителий ацинусов кубический.

Окраска гематоксилином и эозином.

А – $\times 100$, Б – $\times 320$, В – $\times 200$

нистой соединительной ткани, в которой располагались диффузно рассеянные тучные клетки, лимфоциты, единичные гистиоциты. Цитоплазма большинства тучных клеток была заполнена плотно упакованными метакрохроматическими при окраске толуидиновым синим гранулами. Выводные протоки выстланы кубическим эпителием, вокруг них определялся тонкий слой пикринофильной и очагово слабо фуксинофильной соединительной ткани. В отличие от вентральной доли предстательной железы, в дорсальной доле ацинусы шире, имеют меньшую складчатость (рис. 1, 2).

По данным выполненного нами морфологического и морфометрического исследования структура дорсальной и вентральной долей предстательной железы у крыс Вистар различается (табл.). В дорсальной доле выше объемная доля ацинусов и их эпителия, показатель индекса дегрануляции тучных клеток и ниже показатель объемной доли внутридольковой стромы.

Таким образом, по данным литературы и результатам морфологического и морфометрического исследования предстательной железы у половозрелых крыс Вистар, структура и функции вентральной и дорсальной долей различаются. Ацинусы вентральной доли имеют по 4–5 выводных протока, тогда как в дорсальной их 3–4.

В отличие от вентральной доли предстательной железы, в дорсальной доле ацинусы шире, имеют меньшую складчатость. Строма представлена рыхлой волокнистой тканью с небольшим количеством клеточных элементов – фиброцитов, фибробластов, тучных клеток и лимфоцитов. По биохимическому составу дорсальная доля предстательной железы крыс содержит большее количество фруктозы, спермина, спермидина и большого белкового комплекса.

В дорсальной доле железы объемная доля ацинусов, эпителия и индекса дегрануляции тучных клеток были выше, чем в вентральной, в то время как количество внутридольковой стромы, содержащей фиброциты, оказалось ниже.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 382 с.
2. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.Ф. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-медицина, 2007. 432 с.
3. Гуськов А.Р. Истоки хронического простатита. М.: Медика, 2008. 400 с.
4. Кондашевская М.В. Гепарин – новая парадигма эффектов действия. М.: Москва, 2011. 274 с.
5. Печерский А.В. Частичный возрастной андрогенный дефицит. СПб., 2007. 48 с.
6. Щеплев П.А. Простатит. М.: МЕДпресс-информ, 2007. 232 с.
7. Яглов В.В., Яглова Н.В. Основы частной гистологии.. М.: КолосС, 2011. 430 с.
8. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 752 с.
9. Banerjee P.P., Banerjee S., Tilly K.I., Tilly J.T., Brown T.R., Zirk B.R. Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration // *Endocrinology*. 1995. V. 136. P. 4368–76.
10. Bostwick D.G., de la Roza G., Dundore P., Corica F.A., Iczkowski K.A. Intraepithelial and stromal lymphocytes in the normal human prostate // *Prostate*. 2003. V. 55. P. 187–93.
11. Brandes D. The fine structure and histochemistry of prostatic glands in relation to sex hormones // *Int Rev Cytol*. 1966. V. 20. P. 207–76.
12. Coussens L.M., Raymond W.W., Bergers G., Laig-Webster M., Behrendtsen O., Werb Z., Caughey G.H., Hanahan D. Inflammatory mast cells up regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis // *Genes Dev*. 1999. V. 13. P. 1382–97.
13. Derynck R. Transforming growth factor- α : structure and biological activities // *J Cell Biochem*. 1986. V. 32. P. 293–304.
14. Griffiths K., Cockett A.K., Coffey D. Regulation of Prostatic Growth. Proc. 4th International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia (BPH), Paris, 1997. P. 83–128.
15. Gunn S.A., Gould T. C. A correlative anatomical and functional study of the dorsolateral prostate of the rat // *Anat. Rec*. 1957. V. 128. P. 41–53.
16. Heston W.D., Menon M., Tananis C., Walsh P.C. Androgen, estrogen and progesterone receptors of the R3327H Copenhagen rat prostatic tumor // *Cancer Lett*. 1979. V. 6(1). P. 45–50.
17. Iamaroon A., Pongsiriwet S., Jittidecharaks S., Pattanaporn K., Prapayastok S., Wanachantararak S. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma // *J Oral Pathol Med*. 2003. V. 32. P. 195–9.
18. Iguchi K., Morihara N., Usui S., Hayama M., Sugimura Y., Hirano K. Castration- and aging-induced changes in the expression of zinc transporter and metallothionein in rat prostate // *J Androl*. 2011. V. 32(2). P. 144–50.
19. Jesik C.J., Holland J. M., Lee C. An Anatomic and Histologic Study of the Rat Prostate // *The Prostate*. 1982. V. 3. P. 81–97.
20. Kyprianou N., Isaacs J.T. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration // *Endocrinology*. 2010. V. 122. P. 552–62.
21. Mann T. Spermatophores and spermatozoa of the squid loligo pealii // *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1964. V. 15. P. 143–52.
22. Liu X., Wiley H., Meikle W.A. Androgens regulate proliferation of human prostate cancer cells in culture by increasing transforming growth factor- α (TGF- α) and epidermal growth factor (EGF)/TGF- α receptor // *J Clin Endocrinol Metab*. 1993. V. 77. P. 1472–8.
23. Lea O.A., Petrusz P., French F.S. Prostatein a major secretory protein of the rat ventral prostate // *J Biol Chem*. 1979. V. 254. N 13. P. 6196–202.
24. Maccioni M., Rivero V.E., Riera C.M. Prostatein (or rat prostatic steroid binding protein) is a major autoantigen in experimental autoimmune prostatitis // *Clin Exp Immunol*. 1998. V. 112. P. 159–65.
25. Nishi N., Oya H., Matsumoto K., Nakamura T., Miyataka H., Wada F. Changes in gene expression of growth factors and their receptors during castration-induced involution and andro-

- gen-induced regrowth of rat prostates // *Prostate*. 1996. V. 28. P. 139–52.
26. *Prins G.S., Birch L.* Immunocytochemical analysis of androgen receptor along the ducts of the separate rat prostate lobes after androgen withdrawal and replacement // *Endocrinology*. 1993. V. 132. P. 169–78.
 27. *Ribatti D., Crivellato E., Candussio L., Vacca A., Nico B., Benagiano V., Roncali L., Dammacco F.* Angiogenic activity of rat mast cells in the chick embryo chorioallantoic membrane is down-regulated by treatment with recombinant human alpha-2a interferon and partly mediated by fibroblast growth factor-2 // *Haematologica*. 2002. V. 87. P. 465–71.
 28. *Soucek L., Lawlor E.R., Soto D., Shchors K., Swigart L.B., Evan G.I.* Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors // *Nat Med*. 2007. V. 13. P. 1211–8.
 29. *Steinsapir J., Evans Jr A.C., Bryhn M., Muldoon T.G.* Androgen receptor dynamics in the rat ventral prostate // *Biochim Biophys Acta*. 1985. V. 842. P. 1–11.
 30. *Taylor T.B., Ramsdell J.S.* Transforming growth factor- α and its receptor are expressed in the epithelium of the rat prostate gland // *Endocrinology*. 1993. V. 133. P. 1306–11.
 31. *Vykhovanets E.V., Resnick M.I., Marengo S.R.* The healthy rat prostate contains high levels of natural killer-like cells and unique subsets of CD4+ helper-inducer T cells: implications for prostatitis // *J Urol*. 2005. V. 173. P. 1004–10.
 32. *Vykhovanets E.V., Resnick M.I., Marengo S.R.* Intraprostatic lymphocyte profiles in aged Wistar rats with estradiol induced prostate inflammation // *J Urol*. 2006. V. 175. P. 1534–40.
 33. *Wilson E.M., French F.S.* Biochemical homology between rat dorsal prostate and coagulating gland. Purification of a major androgen-induced protein // *J Biol Chem*. 1980. V. 255(22). P. 10946–53.
 34. *Wilson E.M., French F.S.* Effects of proteases and protease inhibitors on the 4.5 S and 8 S androgen receptor // *J Biol Chem*. 1979. V. 254(14). P. 6310–9.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PROSTATE IN RATS

I.S. Tsvetkov, O.V. Makarova, V.A. Mkhitarov

This paper analyzes the literature data on macro- and microscopic structure of rat prostate. Comparative morphometric evaluation was conducted of the structure of ventral and dorsal prostate lobes in normal Wistar rats. Dorsal lobe showed higher volume fraction of total acini, acini with prostatic fluid, and index of mast cell degranulation as well as reduced fraction of lobular stroma. Revealed morphological differences correlate with functional features of prostate lobes.

Key words: prostate, testosterone.

Информация об авторах

Цветков Иван Сергеевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: +7 926 808 38 38. E-mail davedm-66@yandex.ru

Макарова Ольга Васильевна – докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе НИИ морфологии человека РАМН, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: +7 905 538 05 86. E-mail morfolhum@mail.ru

Мхитаров Владимир Аршакович – канд. биол. наук, старший научный сотрудник, руководитель группы информатики и морфометрии НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: +7 903 225 01 88. E-mail mkhitarov@mail.ru

Материал поступил в редакцию 11 сентября 2013 года.

У Чтения памяти О.К. Хмельницкого (Санкт-Петербург, 4–5 октября 2013 года)

Пятые научные чтения, посвященные памяти члена-корреспондента РАМН, Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, профессора Олега Константиновича Хмельницкого, прошли 4–5 октября 2013 года в Северо-Западном государственном медицинском университете им. И.И. Мечникова в Санкт-Петербурге.

В актовом зале бывшего ЛенГИДУВа – СПбМАПО на Кирочной улице собрались не только ведущие специалисты Москвы и Санкт-Петербурга, но и патологоанатомы России и стран ближнего (Казахстан, Украина, Беларусь) и дальнего зарубежья (Польша, США). Профессиональное служение своей специальности у большинства патологоанатомов среднего и старшего поколений воспитано на кафедре патологической анатомии академии последипломного образования во второй половине XX века. Название учреждения сменилось, но школа учителя и наставника осталась.

Вклад Олега Константиновича Хмельницкого в последипломное обучение патологоанатомов России на протяжении полувека трудно переоценить. Созданная им система подготовки патологоанатомов на основе алгоритмизации морфологического исследования не потеряла своего значения и в новом столетии. Сформированный в рамках кафедры патологической анатомии в 1982 году первый в стране доцентский курс клинической цитологии позволил подготовить высокопрофессиональные кадры цитологов, имеющих базисную специальность – патологическая анатомия. Проведение выездных циклов усовершенствования в разных городах России способствовало обогащению и укреплению





профессиональных связей и уровня подготовки врачей-патологоанатомов. Под руководством О.К. Хмельницкого патологоанатомами России было выполнено более 20 кандидатских диссертаций.

Научные чтения, посвященные памяти О.К. Хмельницкого, проводятся каждые два года, и число желающих принять в них участие не уменьшается. Радует, что среди участников конференции много молодых специалистов, которых подготовили их наставники, поддерживающие славные традиции патологоанатомической школы России.

Участники конференции – не только патологи, но и представители клинических специальностей – обсуждали актуальные проблемы клинико-морфологической диагностики и лечения заболеваний человека, необходимость повсеместной модернизации оборудования в патологоанатомических учреждениях России, подготовки кадров, в том числе среднего звена, лаборантов-гистологов и цитологов, которые являются непосред-

ственными участниками диагностического процесса. Участвующие в работе конференции фирмы наглядно показали современные возможности оснащения учреждений патологоанатомической службы, позволяющие получить гистологическое заключение за один день с гарантией качества препарата.

К началу конференции был издан сборник трудов, включающий материалы проводимых научных исследований и клинико-морфологических наблюдений из практики прижизненной и посмертной морфологической диагностики, рассматривая их с новых современных позиций.

Проведение подобных профессиональных встреч – не только дань прошлому. Это потребность, необходимость настоящего и будущего – мы постоянно учимся слушать и слышать друг друга.

*Профессор Н.М. Хмельницкая
(Санкт-Петербург)*

25-й ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС ПАТОЛОГОВ

31 августа – 5 сентября 2013 года в Лиссабоне (Португалия) проходил 25-й европейский конгресс патологов. Начиная с 2011 года данный форум для наших европейских коллег стал ежегодным, и это неудивительно, ведь прогресс в накоплении опыта, получении знаний, совершенствовании методик в современной патологической анатомии развивается быстрее, чем в прежние десятилетия. Множество пленарных заседаний, специальных семинаров, симпозиумов конгресса было посвящено новой гистологической классификации опухолей мягких тканей и костей (ВОЗ, 2013) под редакцией Christopher D.M. Fletscher (США). В пленарных и специальных заседаниях председательствовали и принимали активное участие в качестве докладчиков ведущие мировые специалисты в области патологии сарком, прежде всего С. Fletscher (США), Р. Hogendoorn (Нидерланды), А.Р. Dei Tois (Италия) и другие. Их выступления пользовались большой популярностью. В частности, на слайд-семинаре, проводимом А.Р. Dei Tois и посвященном сложным случаям в дифференциальной диагностике опухолей мягких тканей, не было ни одного свободного места, и многие участники конгресса слушали знаменитого профессора, разместившись прямо на полу.

Неменьший интерес вызвали и пленарные выступления С. Fletscher (опухоли мягких тканей), Р. Hogendoorn (опухоли костной системы). Стало больше сообщений в семинарах и сессиях, посвященных молекулярной патологии и IT-технологиям в современной патологии. Несколько докладов и сообщений сделали профессора Н. Van Krieken (Нидерланды) и М. Dietel (Германия). Примечательно, что впервые на конгрессе в свете самых новых взглядов и подходов к диагностике глиальных опухолей разной степени дифференцировки полноценно были представлены нейропатология и нейроонкология.

Среди участников конгресса, по официальным данным, представляемым его организаторами, преобладали коллеги – патологи из Португалии и Испании, за ними следовали патологи из Великобритании.

Российские патологоанатомы также имели достаточно внушительное представительство – более 30 человек, в их числе были Л.В. Кактурский, Л.М. Ми-

халева, Г.А. Франк, И.А. Казанцева, А.М. Ковригина, А.Г. Талалаев, Е.А. Коган, В.В. Делекторская (Москва), В.А. Цинзерлинг, М.Г. Рыбакова (Санкт-Петербург), А.Э. Мационис (Ростов-на-Дону), С.В. Петров (Казань), Т.В. Павлова (Белгород) и другие. Около четверти всех участников составляли молодые ученые из разных городов Российской Федерации.





Российские патологи представили девять устных докладов и 38 постеров в разных областях и категориях. Преобладали доклады посвященные исследова-

ниям патологии мочеполовой и пищеварительной систем, сердечно-сосудистым заболеваниям. Профессор В.А. Цинзерлинг представил доклад в специальной сессии, посвященной истории патологической анатомии и современным взглядам на самые знаменитые манускрипты патологии. Его доклад был посвящен работам К. Рокитанского.

Наши коллеги и все другие заинтересованные лица будут с нетерпением ждать следующего конгресса, который пройдет в августе–сентябре 2014 года в Лондоне (Великобритания). Надеемся на успешное завершение и правильное оформление работ, которые в качестве тезисов к устному докладу и постеру можно будет подать уже в феврале 2014 года.



*О.В. Паклина, Д.Л. Ротин,
Москва*

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

Журнал издается Научно-исследовательским институтом морфологии человека РАМН.

Научные статьи, публикуемые в журнале «Клиническая и экспериментальная морфология», отражают круг интересов в области медицины и биологии, в частности клинической и экспериментальной морфологии, патологии.

В журнале могут быть опубликованы оригинальные исследования, новые методы, обзоры и дискуссии, а также краткие сообщения, случаи из практики и хроники.

Все статьи, представляемые к публикации, рецензируются в обязательно порядке.

Редакция журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» предъявляет следующие требования к оформлению статей и других материалов, представляемых для публикации:

1. Статья должна иметь визу руководителя и сопроводительное письмо учреждения (с круглой печатью), а в необходимых случаях – акт экспертизы.

2. Статья (текст, иллюстрации, таблицы, подписи под рисунками, список литературы и реферат) направляется в двух экземплярах компьютерного текста, напечатанного через 1,5 интервала с полями по 2,5 см с каждой стороны. Максимальный объем оригинальных статей не должен превышать 7–8 страниц (включая иллюстрации, таблицы и список литературы), кратких сообщений – 3–4 страницы, обзорных и дискуссионных статей – 10–12 страниц.

3. В начале страницы указываются ключевые слова, название статьи, затем инициалы и фамилия автора (авторов), ниже – полное название учреждения и город. Перед началом текста статьи печатается краткий реферат, размером 1/4 машинописной страницы, в котором отражается основное содержание работы. На отдельной странице необходимо представить перевод названия статьи, фамилии авторов, реферата и ключевых слов на английский язык.

Образец первой страницы:

Ключевые слова

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОДИНАМИКИ У БОЛЬНЫХ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

И.И. Иванов, М.П. Николаев

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва

4. В тексте оригинальных статей должны быть выделены следующие рубрики: «Материал и методы», «Результаты» «Обсуждение», «Выводы» или «Заключение».

5. Статья должна быть тщательно отредактирована и выверена автором. При обнаружении большого количества стилистических ошибок и опечаток статья будет возвращена.

6. Кроме общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, РНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте (не более 4 аббревиатур). Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании. Не допускаются сокращения простых слов, даже если они часто повторяются. Единицы измерения даются по системе СИ.

7. Объем иллюстративного материала (рисунки, чертежи, диаграммы, фотографии) должен быть минимальным. Оба экземпляра иллюстраций должны быть идентичны (по качеству, увеличению и размерам). Фотографии должны быть контрастными, напечатанными на глянцевого бумаге, на обороте каждой ставится номер, фамилия автора и пометки «верх» и «низ». Рисунки, чертежи, диаграммы должны быть выполнены тушью.

8. Статьи с иллюстрациями низкого качества возвращаются.

Место расположения рисунков и таблиц обозначается на полях, в тексте статьи на них дается ссылка.

Подписи к рисункам и фотографиям выполняются на отдельном листе.

9. Таблицы должны быть наглядными, озаглавленными и пронумерованными, заголовки граф – соответствовать их содержанию, цифры в таблицах – соответствовать цифрам в тексте.

10. Цитаты, приводимые в статье, должны быть тщательно выверены и заверены подписью автора на полях. В ссылке обязательно нужно указать источник (автор, название, издание, том, год, выпуск, страница).

11. Библиографические ссылки в тексте статьи даются **в квадратных скобках** номерами в соответствии с приставленным списком литературы.

12. Библиография должна содержать помимо основополагающих работ публикации за последние 5 лет. **В оригинальных статьях цитируется не более 15–20 источников, в переводных статьях и обзорах – не более 50.** Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

Список литературы должен быть напечатан на отдельном листе.

13. При представлении в печать экспериментальных работ авторы должны руководствоваться Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Кроме вида, пола и количества использованных животных, авторы обязательно должны указывать применявшиеся при проведении болезненных процедур методы обезболивания и методы умерщвления животных. При отсутствии этих данных работы приниматься не будут.

14. Список литературы оформляется в соответствии с ГОСТ 7.1-2003; ГОСТ 7.82-2001:

- а) библиографические источники должны быть расположены в алфавитном порядке и пронумерованы (сначала отечественные, затем иностранные), ссылки на них в тексте статьи приводятся в квадратных скобках;
- б) если цитируются несколько работ одного автора, их нужно указывать по возрастанию годов издания;
- в) статьи (монографии), написанные коллективом авторов от 1 до 3, помещаются в списке литературы по фамилии 1-го автора, затем дается название работы, ставится косая черта и приводится имя, отчество, фамилия всех авторов (для статьи: ФИО 1-го автора. Название / И.О.Ф. авторов // Название журнала. – Год. – Т., № – С.; для монографии: ФИО 1-го автора. Название: в 3 т.: пер. с англ. / ИОФ авторов; под ред. ИОФ редактора. – Место издания: Издательство, Год. – кол-во с.).
- г) статьи (монографии), написанные коллективом авторов (более 3 человек), помещаются в списке литературы по названию работы, затем ставится одна косая черта и приводится имя, отчество, фамилии первого автора с добавлением слов [и др.], для иностр. -[et al.];
- д) для монографий необходимо указать место издания, издательство, год и кол-во страниц; для периодических и продолжающихся изданий – полное название источника, год, том, номер (выпуск), страницы (от и до);
- е) в монографиях и сборниках при наличии двух мест издания приводят оба и отделяют их друг от друга точкой с запятой (М.; Л., Л.; Новосибирск);

Образец оформления литературы:

Шестак Н. Ревматический кардит / Н. Шестак // Врач. 2004. № 4. С. 5-9.

Маринзук В.Л. Психологические основы формирования профессионально значимых качеств: Автореф. дис. ... д-ра психол. наук / В.Л. Маринзук. М., 2003. 35 с.

Леорда А.И. Оксигеназы биологических мембран / А.И. Леорда; Ин-т физиологии АН Респ. Молдова. – Кишинев, 1998. 7 с. Деп. в ВИНТИ 30.12.98, № 3980-98.

Лудевит Р. Острые отравления: пер. с нем. / Р. Лудевит, К. Лос / Под ред. Е.В. Гембицкого. М.: Медицина, 1986. 560 с.

Губарев Ю.А. Проблемы боевого стресса в авиации / Ю.А. Губарев, И.Б. Ушаков, С.И. Ромасюк // Боевой стресс: сб. науч. тр. / Под общ. ред. И.Б. Ушакова, Ю.С. Голова. М.: Воениздат, 2002. С. 7–11.

Руководство по урологии: в 3 т. / В.П. Авдомин и др. / Под ред. Н.А. Лопаткина. М.: Медицина, 1988. Т. 2. 786 с.

15. Статья должна быть подписана всеми авторами. В конце статьи следует указать полный почтовый адрес автора, его телефон, электронную почту, фамилию, имя, отчество полностью.

Статьи, отосланные авторам для исправления, должны быть возвращены в редакцию не позднее, чем через месяц после получения. При возвращении статьи в более поздние сроки меняются дата ее поступления в редакцию и сроки публикации.

16. Нельзя направлять в редакцию работы, ранее напечатанные или посланные в другие журналы.

17. К тексту необходимо приложить электронную копию статьи и всех прилагающихся материалов (иллюстрации, рисунки, фото) на носителях CD-R, CD-RW в формате Microsoft Word с расширением doc. или RTF на дискете 3,5", или. Шрифт Times New Roman, 14 пунктов. Формат абзацев: полуторный интервал, красная строка каждого абзаца начинается отступом в 0,75 см. Формат заглавия: название работы – прописными буквами полужирным шрифтом; имена авторов (инициалы, фамилия) – курсивом; полное название организации (с указанием города) – обычным шрифтом. Иллюстративный материал представляется в формате рисунков TIFF.

18. К статье обязательно прикладывается полная информация об авторах (соавторах) статьи, включающая ученую степень, ученое звание, должность и место работы, адрес электронной почты автора и адрес учреждения, в котором работает автор (соавторы.)

19. Редакция оставляет за собой право корректировать и сокращать тексты материалов, представляемых к публикации. Статьи, не принятые к печати, не возвращаются.

Адрес редакции: 117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 3 Редакция журнала «Клиническая и экспериментальная морфология»

Дополнительную информацию можно узнать по телефону +7(903)641-82-85 к.м.н. *Мнихович Максим Валерьевич* (mnichmaxim@yandex.ru)