На правах рукописи

Отлыга Дмитрий Александрович

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРОТИДНОГО КЛУБОЧКА ЧЕЛОВЕКА

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Савельев Сергей Вячеславович

доктор медицинских наук, профессор
Черняев Андрей Львович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой анатомии человека ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»
Румянцева Татьяна Анатольевна

кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии ФГБНУ «Научный центр неврологии»
Воронков Дмитрий Николаевич

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 (Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12)

Защита диссертации состоится _____ 2021 года в _____ часов на заседании диссертационного совета (Д 001.004.01) Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на сайте http://www.morfolhum.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук А.М. Косырева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Любой живой организм – от прокариот до млекопитающих – в процессе своей жизнедеятельности должен непрерывно сохранять постоянство своей внутренней среды, или поддерживать гомеостаз. Для этого организму нужно, во-первых, определять изменения тех или иных параметров внешней и внутренней сред, во-вторых, отвечать на эти изменения специфическим образом. Первое называется чувствительной функцией, или чувствительностью, второе – эффекторной функцией. У одноклеточных единая клетка выполняла сразу обе функции, однако в процессе эволюции у многоклеточных организмов шло появление новых тканей и органов, которые брали на себя выполнение преимущественно одной функции.

Важную роль в поддержании гомеостаза играет параганглионарная система, включающая мозговое вещество надпочечников, аортальный поясничный параганглий (орган Цукеркандля), каротидный клубочек и множество разбросанных по всему организму других параганглиев. Все они тесно связаны с вегетативной нервной системой, формируя совместно с последней единую симпато-адреналовую систему.

В последнее время исследователи придают всё большее значение в регуляции дыхательной и сердечно-сосудистой деятельности одному из представителей параганглионарной системы – каротидному клубочку – маленькому хеморецепторному органу, расположенному в области бифуркации общей сонной артерии. Морфологические изменения каротидного клубочка, обнаруживаемые при различных заболеваниях – бронхиальной астме, хронической обструктивной болезни лёгких, артериальной гипертензии и синдроме внезапной детской смерти – могут оказывать влияние на их течение (Edwards C. et al., 1971; Paton J. et al., 2013; Porzionato A. et al., 2013; Narkiewicz K. et al., 2016). Более того, некоторые исследователи предполагают, что реакция тканей каротидного клубочка на остро возникшую гипоксию может быть её маркёром, что имеет значение в судебной медицине при установлении причин смерти (Kubo S. et al., 1994).

Несмотря на успехи медицины, вышеперечисленные заболевания остаются одними из самых распространённых причин снижения уровня жизни в развитых странах. Например, в 2005 году астмой в мире страдало около 327 миллионов человек, в 2015 году количество больных увеличилось уже до 358 миллионов (Vos T. et al., 2016), в этом же году она стала причиной смерти 397 тысяч человек (Wang H. et al., 2016). Хроническая обструктивная болезнь лёгких в 2015 году отмечалась у 174 миллионов человек (Vos T. et al., 2016), а из них умерли 3,2 миллиона человек, что составляет почти 6% от общего количества умерших от различных заболеваний (Wang H. et al., 2016). Сложная ситуация сохраняется и с синдромом внезапной детской смерти, который ряд авторов связывает с теми или иными изменениями в каротидном клубочке (Pavai Z. et al., 2005; Porzionato A. et al., 2008). Согласно исследованиям, самой распространённой причиной смерти детей до года вне лечебных учреждений в России в 2017 году стал синдром внезапной детской смерти, что составило 24% от общего числа случаев (Крючко Д.С. и соавт., 2018).

Только в США за 2013 год от этой причины погиб 1561 младенец, что составляет 46% от всех внезапных младенческих смертей (Moon R., 2016).

Несмотря на важность, которую придают каротидному клубочку в развитии этих заболеваний, наши знания остаются во многом противоречивыми. Значительная вариабельность иннервации и кровоснабжения, быстрое нарастание посмертных изменений и подверженность тканей возникновению артефактов при изготовлении гистологических препаратов затрудняют интерпретацию полученных результатов.

Со времени выхода выдающихся работ de Castro (de Castro F., 1929; De Castro F., 2009) и Heymans (Bouckaert J. и Heymans C., 1933; Heymans C. и Bouckaert J., 1939), раскрывающих роль каротидного клубочка, учёные сосредоточили своё внимание на исследованиях лишь хеморецепторной функции последнего. При этом любые морфологические и физиологические находки, даже не укладывающиеся в эти узкие рамки, например, наличие большого количества эфферентных синапсов (Biscoe T., 1971), трактуются только с этих позиций. Всё факты, которые не соответствуют общепринятой теории, зачастую игнорируются и не получает теоретического обобщения (Смиттен Н.А., 1972). Лишь в последнее время благодаря накопившимся фактам появились указания на то, что этот маленький орган играет гораздо большую роль, чем считалось ранее.

Таким образом, в настоящий момент понимание морфофункциональных особенностей каротидного клубочка неполно. Огромное количество различного рода исследований часто противоречат друг другу, что отрицательно сказывается на попытках применения результатов этих работ для разработки новых методов лечения различных заболеваний дыхательной и сердечно-сосудистой систем.

Степень разработанности темы исследования

На данный момент мы имеем большое количество разрозненных фактов об ультраструктуре, гистологии, физиологии каротидного клубочка и молекулярных механизмах хемочувствительности его клеток. Хорошо изучены гистологические и ультраструктурные особенности каротидного клубочка человека (Grimley P. и Glenner G., 1968; Heath D. et al., 1970; Heath D. et al., 1987) и различных животных (de Kock L., 1954; Ross L., 1959; Biscoe T. и Stehbens W., 1966; Biscoe T. et al.,1970; Abbott C. et al., 1972; King A. et al., 1975; Verna A., 1979). В свою очередь, функциональные особенности органа исследованы в основном на материале различных лабораторных животных, а не человека (Eyzaguirre C. и Koyano H., 1965; Eyzaguirre C. и Zapata P., 1968; Eyzaguirre C. et al., 1977). Это касается и молекулярных механизмов хемочувствительности клеток (López-Barneo J. et al., 2001; López-Barneo J. et al., 2009; López-Barneo J. et al., 2016; Mkrtchian S. et al., 2017), а также иммуногистохимических характеристик каротидного клубочка (Kondo H. et al., 1982; Kummer W. и Habeck J., 1992; Gauda E. et al., 1996; Izal-Azcárate A. et al., 2008; Lazarov N. et al., 2009; Kåhlin J. et al., 2010; Fagerlund M. et al., 2010). Значительные пробелы в наших знаниях связаны со структурными и иммуногистохимическими особенностями каротидного клубочка человека во внутриутробном периоде.

Стоит отметить, что часть установленных фактов об органе категорически не согласуется с его ролью только как начального звена в хеморецепторном ответе организма на гипоксию. К таким фактам относятся: большое количество нервных окончаний, несущих на себе эфферентные синапсы (Biscoe T. и Stehbens W., 1967; Biscoe T., 1971; McDonald M. и Mitchell R., 1975; Verna A., 1979); выделение клетками катехоламинов в ответ на гипоксию (Hanbauer I., 1977; Hellström S., 1977), которые, вопреки ожиданиям, тормозят импульсацию афферентных нервов (Hellström S., 1977; Nishi K., 1977); интенсивный синтез катехоламинов клетками органа во внутриутробном периоде (Hervonen A. и Korkala O., 1972); наличие хеморецепторного ответа афферентных волокон даже при нарушении формирования синапсов между ними и клетками органа (Zapata P. et al., 1969).

Более того, не отражена роль каротидного клубочка в единой симпато-адреналовой системе, к которой он, безусловно, принадлежит. Отсутствует понимание взаимоотношений, возникающих в процессе онтогенеза между ним, органом Цукеркандля и мозговым веществом надпочечника. При этом в большинстве работ каротидный клубочек рассматривается либо отдельно от этой системы, либо даже противопоставляется ей (Смиттен Н.А., 1972).

Несмотря на многочисленные исследования связи органа с течением различных заболеваний (Sedwitz J., 1963; Marschke G. et al., 1965; Naeye R. et al., 1976; Perrin D. et al., 1984; Lack E. et al., 1986), до сих пор нет единого мнения, какие изменения в каротидном клубочке действительно связаны с той или иной патологией, а какие являются лишь артефактами гистологических и ультраструктурных методов.

Цель исследования

Охарактеризовать морфологические и иммуногистохимические особенности каротидного клубочка во взаимодействии с другими органами единой симпато-адреналовой системы на разных этапах онтогенеза человека.

Задачи исследования

1. Провести гистологическое и иммуногистохимическое исследование каротидного клубочка на разных этапах онтогенеза человека с помощью антител к bIII-тубулину, PGP9.5, синаптофизину, тирозингидроксилазе, нейрофиламентам 200кД, GFAP, S100.
2. Сравнить гистологическое строение и иммуногистохимические характеристики каротидного клубочка, органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочечников на разных сроках внутриутробного развития человека.
3. Определить изменения относительных размеров каротидного клубочка по отношению к сонным артериям на разных этапах онтогенеза человека.
4. Экспериментальным путём определить влияние аутолиза и различных фиксаторов на морфологию каротидного клубочка, затрудняющих интерпретацию морфологической картины и результатов иммуногистохимических реакций.

Научная новизна

1. Впервые показано, что уже на 8-ой неделе после оплодотворения клетки I типа каротидного клубочка человека активно экспрессируют тирозингидроксилазу и bIII-тубулин, что свидетельствует об их эндокринной функции.

2. Установлено, что в эмбриональном периоде каротидный клубочек человека и орган Цукеркандля имеют сходные морфологические и иммуногистохимические характеристики, что свидетельствует об общности их происхождения и выполняемых ими функций.
3. В антенатальном периоде относительные размеры каротидного клубочка, а также синтез тирозингидроксилазы его клетками I типа выше, чем в постнатальном периоде.
4. Впервые на человеческом материале методом иммуногистохимии показано, что во внутриутробном периоде каротидный клубочек наряду с органом Цукеркандля выполняет эндокринную функцию, компенсируя недостаточность незрелого мозгового вещества надпочечника.
5. Выделены стабильные и нестабильные по отношению к аутолизу антигены. Стабильными являются bIII-тубулин, PGP9.5, тирозингидроксилаза, синаптофизин и S100, а нестабильными – GFAP и нейрофиламенты 200кД. Это необходимо учитывать при планировании иммуногистохимических исследований на аутопсийном человеческом материале.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные на основе изучения трёх ключевых органов симпато-адреналовой системы – каротидного клубочка, органа Цукеркандля, мозговго вещества надпочечника – данные позволяют сформулировать новую гипотезу функционирования каротидного клубочка человека на разных этапах онтогенеза. Обнаруженное морфологическое и иммуногистохимическое сходство между каротидным клубочком и органом Цукеркандля позволяет предположить не только единство их происхождения, но также и выполнение ими сходной эндокринной функции на ранних этапах внутриутробного развития. Низкий синтез тирозингидроксилазы в постнатальном периоде свидетельствует о том, что каротидный клубочек в значительной степени утрачивает эндокринную функцию и становится периферическим хеморецепторным органом, в то время как эндокринную функцию на себя берёт мозговое вещество надпочечника.

Выявленные закономерности функционирования каротидного клубочка, органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочечника целесообразно учитывать при разработке новых подходов к лечению заболеваний дыхательной и сердечно-сосудистой системы.

Полученные данные о влиянии аутолиза на морфологию клеток органа и иммуногистохимические характеристики его тканей обосновывают сроки забора материала и применение тех или иных маркёров. Среди наиболее широко используемых в практической нейроморфологии антигенов выявлены устойчивые и неустойчивые к аутолизу, что может помочь патоморфологам при создании алгоритмов иммуногистохимического исследования каротидного клубочка на аутопсийном материале плодов и взрослых людей.

Методология и методы исследования

При исследовании применялся системный подход с использованием целого ряда методов. Среди них были как описательные гистологические и иммуногистохимические методы, позволяющие выявить и оценить изменения

структуры каротидного клубочка человека на разных этапах онтогенеза, так и экспериментальный метод, необходимый для определения влияния на ткани каротидного клубочка различных фиксаторов и аутолиза, неизбежного при исследовании человеческого материала. Объективность полученных данных была подтверждена статистической обработкой результатов морфометрии.

Положения, выносимые на защиту

1. Каротидный клубочек человека во внутриутробном периоде так же, как и орган Цукеркандля, выполняет эндокринную функцию, осуществляя синтез катехоламинов, тем самым оба органа компенсируют недостаточность функции незрелого мозгового вещества надпочечников.
2. В постнатальном периоде каротидный клубочек меняет эндокринную функцию на хеморецепторную, которую он сохраняет на протяжении всей жизни человека.
3. Уменьшение относительных размеров каротидного клубочка человека в процессе онтогенеза, а также атрофия его паренхимы в старческом возрасте при отсутствии нарушения дыхательной функции свидетельствуют об избыточности систем регуляции гомеостаза, реализуемых за счёт компенсаторных возможностей нервной системы.
4. Тёмные, светлые и прогениторные субтипы клеток I типа, а также пенистость их цитоплазмы являются не результатом структурных изменений при заболеваниях сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а следствием воздействия аутолиза и формалиновой фиксации ткани.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством исследованных образов ткани, воспроизводимостью результатов, использованием современных адекватных поставленным задачам методов, применением статистических методов обработки полученных данных, критическим анализом собственных результатов и сопоставлением их с данными других исследователей.

Материалы диссертации доложены на научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2018 г), межлабораторной конференции ФГБНУ НИИМЧ (Москва, 2020 г), научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (Москва, 2020 г).

Личный вклад автора

Автором был проведён анализ литературы, написан обзор, осуществлено планирование и проведение экспериментов, сбор аутопсийного материала, проведены гистологические, иммуногистохимические и морфометрические исследования, систематизация и статистический анализ полученных результатов, написание статей.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология согласно пунктам 1, 2, 3.

Публикации и внедрение

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 научных работ, в том числе 3 оригинальные статьи и 1 обзорная статья в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, рекомендованных для публикации

основных научных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и учёной степени доктора наук.

Основные результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследования, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, включающий 165 источников, из них 14 российских и 151 зарубежный. Работа иллюстрирована 48 рисунками, данные представлены в 9 таблицах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика материала. Аутопсийный материал был получен из МОНИИАГ, ГБУЗ ГКБ имени С.С. Юдина ДЗМ и ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, ГКБ №31 ДЗМ, а также из коллекции лаборатории развития нервной системы ФГБНУ НИИМЧ. В диссертации использован материал от 1 эмбриона, 20 плодов и 13 взрослых людей (Таблица 1).

Таблица 1.

Характеристика использованных в работе образцов каротидного клубочка

Антенатальный период		Постнатальный период	
№	Возраст в неделях	№	Возраст, лет
1.	8 недель п.о.	22.	24
2.	10 недель п.о.	23.	87
3.	13-14 недель п.м.	24.	63
4.	18-19 недель п.м.	25.	69
5.	19-20 недель п.м.	26.	62
6.	21-22 недели п.м.	27.	78
7.	17-18 недель п.м.	28.	67
8.	30 недель п.м.	29.	86
9.	30 недель п.м.	30.	80
10.	19-20 недель п.м.	31.	79
11.	19-20 недель п.м.	32.	95
12.	19-20 недель п.м.	33.	68
13.	16-17 недель п.м.	34.	56
14.	14-15 недель п.м.		
15.	15-16 недель п.м.		
16.	15-16 недель п.м.		
17.	18-19 недель п.м.		
18.	15-16 недель п.м.		
19.	16 недель п.м.		
20.	16 недель п.м.		
21.	21 неделя п.м.		

При сборе образцов плодов и эмбриона учитывали пол, гестационный возраст, клинический диагноз матери и плода, причины прерывания беременности

и причины смерти плода. Если клинические данные отсутствовали, определение возраста плодов проводили согласно критериям, разработанным А.П. Милованом и С.В. Савельевым (Савельев С.В., 2002; Милованов А.П. и Савельев С.В., 2006). Для взрослых людей при сборе материала учитывали пол, возраст, клинический и патологоанатомический диагнозы. Лица с выраженной хронической гипоксией и хронической дыхательной недостаточностью были исключены.

Чтобы определить влияние неизбежных при исследовании аутопсийного материала процессов аутолиза, а также различных фиксаторов на ткани, был поставлен эксперимент на лабораторных животных.

Эксперимент был выполнен на самках крыс Вистар (n=20), возрастом 3-4 месяца, массой тела 200-280 гг. (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии ФГБНУ «НИИ морфологии человека» (протокол №16 от 11.11.2015 г). При работе с экспериментальными животными руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях (ETS №123), Страсбург, 2006. Животных содержали по 5-6 особей в клетке при естественном освещении, температуре 20-22°С и свободном доступе к воде и пище. Животных выводили из эксперимента с помощью передозировки золетила («Virbac Sante Animale»; Франция).

Моделирование процессов аутолиза. Крыс экспериментальной группы (n=10) через 30 минут после остановки сердца помещали в холодильную камеру с температурой 3^0С на 24 часа, затем проводили вскрытие. Крыс контрольной группы (n=5) вскрывали сразу после остановки сердца. Каротидные клубочки с обеих сторон (30 каротидных клубочков) вместе с фрагментами окружающих тканей извлекали под контролем бинокуляра («Fisher Scientific»; США). Образцы ткани фиксировали в течение суток в 10% забуференном формалине («БиоВитрум»; Россия), промежуток времени между остановкой сердца и помещением образцов ткани контрольной группы крыс в формалин не превышал 6 минут.

Определение влияния фиксаторов на ткань. Крыс (n=5) вскрывали сразу после остановки сердца. Аналогичным образом извлекали каротидные клубочки с обеих сторон (10 каротидных клубочков). Методом рандомизации отбирали 5 каротидных клубочков для фиксации в 70% спирте, оставшиеся фиксировали в жидкости Карнуа. Промежуток времени между остановкой сердца и помещением образцов ткани в фиксаторы также не превышал 6 минут.

Аутопсийный материал. Плоды из коллекции лаборатории развития нервной системы и некоторые плоды, полученные из МОНИИАГ и ГБУЗ ГКБ имени С. С. Юдина ДЗМ, были зафиксированы целиком. 8-ми недельный эмбрион был фиксирован, проведён, залит в парафин целиком и порезан тотально. У плодов №2-5 брали каротидные клубочки, орган Цукеркандля и надпочечники. У плодов №6-21 и у взрослых людей брали только каротидные клубочки.

При препаровке фиксированных и нефиксированных плодов выделяли сонные артерии в области бифуркации вместе с окружающей соединительной тканью, надпочечники и орган Цукеркандля вместе с аортой и окружающей соединительной тканью. У взрослых выделяли сонные артерии в области

бифуркации вместе с прилежащими тканями, затем каротидный клубочек отпрепаровывали от окружающих тканей. Каротидные клубочки, надпочечники и органы Цукеркандля фиксировали в 10% формалине.

Методы исследования

Гистологические. Ткань проводили по стандартному протоколу через изопреп («БиоВитрум»; Россия), заливали в «Histomix» («Биовитрум»; Россия). Тотальные серийные срезы образцов толщиной 5 мкм (каротидные клубочки крыс) и 6 мкм (каротидные клубочки человека) изготавливали на микротоме («Leica RM2245»; Германия). Каждый 20-ый срез наклеивали на предметное стекло, депарафинировали и окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином, заключали в бальзам или синтетическую среду.

Методы иммуногистохимического исследования. Для проведения иммуногистохимических реакций выбирали самые большие по площади срезы органа. Их депарафинировали, регидратировали и обрабатывали 3% раствором перекиси водорода для блокировки эндогенной пероксидазы. Затем срезы помещали в раствор «Ultra V Block» (Thermo Fisher Scientific; USA), для демаскировки антигенов предварительно проводили кипячение в цитратном буфере (pH 6.0). Проводили иммуногистохимические реакции с первичными антителами, срезы инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. В качестве системы детекции использовали набор UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific; США).

Для позитивного контроля использовали срезы верхнего шейного ганглия и мозга человека. Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител на раствор фосфатного буфера.

Методы микроскопического исследования гистологических и иммуногистохимических препаратов. Срезы оценивали при помощи светового микроскопа («Leica DM2500»; Германия). При обнаружении патологических изменений иной этиологии (воспаление, тракционные артефакты и т.д.) образцы исключали из эксперимента (5 органов крыс экспериментальной группы).

Моделирование процессов аутолиза. Проанализированы 25 каротидных клубочков крыс (контрольной и экспериментальной групп). При просмотре гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, описывали структуру каротидных клубочков, обращали внимание на состояние цитоплазмы и ядер клеток.

Каждый 20 срез органа, окрашенный гематоксилином и эозином, полностью фотографировали при помощи камеры («LOMO TCA-9.0»; Россия) при увеличении 400х. Цифровые изображения были сохранены в форматах JPEG и TIFF, выравнивание яркости и контраста производили при помощи программы Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA). Подсчёт светлых, тёмных и пикнотичных клеток осуществляли с использованием программы ImageJ 1.52n (США).

Определение влияния фиксаторов на ткань. Анализу были подвергнуты 10 каротидных клубочков крыс. При исследовании гистологических препаратов,

окрашенных гематоксилином и эозином, описывали структуру каротидных клубочков, обращали внимание на состояние цитоплазмы и ядер клеток.

При оценке иммуногистохимических препаратов отмечали наличие или отсутствие специфической иммунопозитивной реакции, распределение иммунореактивного материала в строме и паренхиме, внутри клеток – ядерная или цитоплазматическая локализация.

Исследование аутопсийного материала. Исследованы 35 каротидных клубочков, 5 органов Цукеркандля и 10 надпочечников. При просмотре гистологических препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, описывали структуру органов, обращали внимание на состояние цитоплазмы и ядер клеток, соотношение стромы и паренхимы.

При оценке иммуногистохимических препаратов отмечали наличие или отсутствие специфической иммунопозитивной реакции, распределение иммунореактивного материала в строме и паренхиме, а также внутри клеток – ядерная или цитоплазматическая локализация.

Для морфометрического анализа срезы органов фотографировали целиком при помощи камеры («LOMO TCA-9.0»; Россия) при увеличении 100х. Цифровые изображения были сохранены в форматах JPEG и TIFF, выравнивание яркости и контраста и морфометрию производили при помощи программ Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) и ImageJ 1.52n (США).

Для оценки эндокринной функции определяли «коэффициент TH/bIII» (TH/bIII), показывающий соотношение площади окрашенного материала маркёром к тирозингидроксилазе к площади окрашенного материала маркёром к bIII-тубулину. Площади подсчитывали с помощью программы ImageJ 1.52n (США) автоматически, соотношение вычисляли в программе Microsoft Excel 2019.

Статистические методы. Для оценки статистической значимости полученных результатов использовали программу Statistica 13.5. Характер распределения определяли при помощи критерия Колмогорова-Смирнова, поскольку он был отличен от нормального, для оценки достоверности различий использовали непараметрический критерий Уилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние аутолиза на морфологию каротидного клубочка. *Контрольная группа (время до фиксации не более 6 минут после смерти).* При световой микроскопии в контрольной группе крыс в органе наблюдали практически однородную популяцию клеток I типа (Рис.1Г). Они имели округлые либо овальные светлые ядра с нежными нитями хроматина, иногда обнаруживались 2-4 мелких ядрышка. Цитоплазма была светлая, пенистая. Лишь незначительное число клеток можно было отнести к подтипу тёмных. Их ядра были более гиперхромными, овальной или круглой формы, по размеру соответствовали ядрам светлых клеток. Цитоплазма их была аналогичной светлым. Отмечались единичные пикнотичные клетки с мелкими гиперхромными ядрами. Цитоплазма окружала ядро в виде узкого ободка.

Клетки II типа были представлены однородной популяцией, окружающей скопления клеток I типа. Они были веретеновидной формы с вытянутыми ядрами.

Ганглионарные нейроны прилежащего к каротидному клубочку верхнего шейного ганглия имели большие светлые круглые ядра с крупным эозинофильным ядрышком и нежными нитями хроматина. В ядрах некоторых клеток определялись по два ядрышка. Цитоплазма нейронов светлая слабо зернистая с небольшим количеством базофильных гранул, отмечалась её неравномерная вакуолизация.

Экспериментальная группа (время до фиксации 24 часа после смерти). При световой микроскопии в экспериментальной группе в органе было обнаружено значительное увеличение тёмных и пикнотических клеток, причем число тёмных в разы превышало количество светлых (Рис.1Д). При этом различия между контролем и экспериментальной группой были статистически значимыми (Рис.1А,Б,В). Помимо этого, цитоплазма практически всех клеток образовывала узкий ободок вокруг ядер и распадалась на глыбки. Таким образом, морфологическая картина каротидного клубочка крыс через 24 часа после смерти была практически идентична морфологической картине каротидного клубочка человека.

Ганглионарные нейроны, как и в контроле, имели круглые ядра. Однако хроматин во многих клетках был смещён на периферию к ядерной оболочке так, что в центре ядер образовывались пустоты, а сама ядерная оболочка становилась более выраженной и базофильной. В цитоплазме наблюдали большое число хорошо заметных вакуолей. В целом морфологическая картина напоминала картину выраженной гидропической дистрофии.

Таким образом, обнаруживаемое через 24 часа после смерти деление клеток I типа на субтипы является ничем иным как артефактом. Следовательно, подсчёт соотношения различных субтипов клеток не может являться критерием, подтверждающим связь той или иной патологии с нарушением функции каротидного клубочка, о которой заявляли исследователи (Pavai Z. et al., 2005; Heath D. и Smith P., 2012).

Иммуногистохимическое исследование. Иммуногистохимические реакции с антителами к bIII-тубулину, PGP9.5, тирозингидроксилазе, синаптофизину и S100 не теряли своей интенсивности в экспериментальной группе по сравнению с контролем. Первые четыре маркёра обнаруживались в клетках I типа и нервных волокнах, S100 – в клетках II типа и шванновских клетках. Нейрофиламенты не выявлялись в тонких интра- и межлобулярных волокнах каротидного клубочка через 24 часа после смерти, но реакция сохранялась в более крупных экстраорганных нервных волокнах.

Необычной оказалась позитивная ядерная реакция с антителами к нейрофиламентам, наблюдаемая только на фиксированной не более чем через 6 минут ткани. Положительное окрашивание ядер нейронов и гломусных клеток сочеталось с окрашиванием ядер клеток соединительной ткани. Вероятно, в данном случае имеет место неспецифическое связывание антител с каким-либо ядерным белком, концентрация которого резко падает в результате аутолиза.

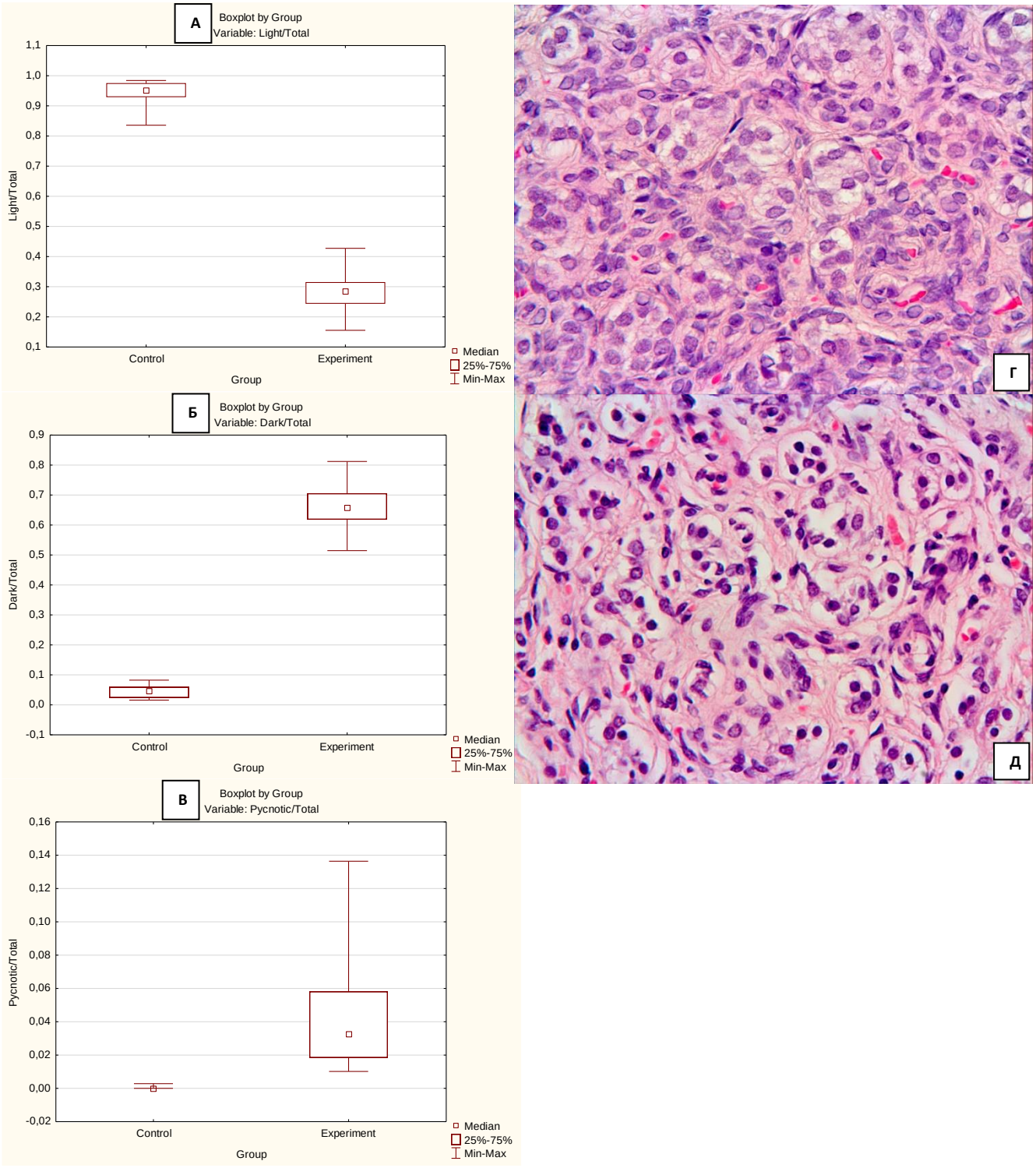

Рис. 1. Отношение светлых (А), тёмных (Б) и пикнотических (В) клеток к общему числу клеток I типа в контроле (Г) и через 24 часа после смерти (Д). Окраска гематоксилином и эозином, х400. Статистически значимые различия ($p<0,05$)

Используемый клон антител к GFAP оказался очень нестабильным маркёром для периферической нервной системы и каротидного клубочка, разведение пришлось варьировать от 1:200 до 1:1000, хотя в центральной нервной системе он показывал стабильные результаты при разведении 1:1000. Через 24 часа после смерти реакция резко теряла интенсивность вплоть до полного её отсутствия, хотя в центральной нервной системе реакция сохранялась.

Исходя из полученных результатов, можно выделить стабильные и нестабильные по отношению к аутолизу антигены. К стабильным можно отнести bIII-тубулин, PGP9.5, тирозингидроксилазу, синаптофизин и S100. К нестабильным – GFAP и нейрофиламенты 200кД. Это необходимо учитывать при планировании иммуногистохимических исследований на аутопсийном человеческом материале.

Влияние типа фиксатора на морфологию каротидного клубочка. По сравнению с формалиновой фиксацией ткань, фиксированная в жидкости Карнуа и 70% спирте, имела ряд отличий.

Фиксация в жидкости Карнуа. При световой микроскопии клетки I типа имели круглые ядра с более выраженной зернистостью хроматина. Их цитоплазма была более эозинофильна с мелкими едва видимыми эозинофильными гранулами. Клетки I типа лежали плотно друг к другу, образуя чётко определяемые гнёзда или тяжи, окружённые вытянутыми веретеновидными клетками II типа. Клетки I типа представляли мономорфную популяцию, то есть не было обнаружено никакого деления на светлые, тёмные или пикнотические субтипы.

Ганглионарные нейроны так же, как и при фиксации формалином, имели круглые ядра с крупным ядрышком, однако хроматин был с более грубыми глыбками. Цитоплазма нейронов была ярко эозинофильной. По сравнению с фиксацией формалином в цитоплазме определялось множество базофильных глыбок вещества Ниссля, вакуолей в цитоплазме не было обнаружено.

Фиксация в 70% спирте. Наблюдаемая микроскопическая картина ткани, фиксированной в 70% спирте, была схожей таковой, фиксированной в жидкости Карнуа. Однако наблюдали более выраженную эозинофилию цитоплазмы и ядер клеток I и II типов и ганглионарных нейронов. Помимо этого, клетки каротидного клубочка подверглись более сильному сжатию, поэтому они уже не лежали плотными группами, а между ними были выявлены узкие щели.

Иммуногистохимическое исследование. На первый взгляд, на фиксированных в жидкости Карнуа и спирте органах иммуногистохимические реакции с антителами к bIII-тубулину, PGP9.5, тирозингидроксилазе и синаптофизину выглядели аналогично реакциям на органах, фиксированнных в нейтральном забуференном формалине. Однако контроль с заменой первичных антител фосфатным буфером показал наличие сильно выраженного фонового окрашивания цитоплазмы клеток I типа, более сильного в случае фиксации в жидкости Карнуа.

Для других маркёров имели место неудовлетворительные результаты при использовании обоих фиксаторов. Реакция с антителами к S100 неспецифично окрашивала цитоплазму клеток I типа, что не позволяло отличить их от шванновских клеток и клеток II типа. Нейрофиламенты в случае с фиксацией в жидкости Карнуа также давали сильное фоновое окрашивание цитоплазмы клеток I типа, однако реакция в самих нервных волокнах была более выражена, поэтому последние выявлялись относительно отчётливо. В случае с фиксацией спиртом нейрофиламенты показали только неспецифическое фоновое окрашивание.

При фиксации ткани каротидного клубочка в жидкости Карнуа и в спирте антитела к GFAP показали даже более выраженное неспецифическое окрашивание цитоплазмы клеток I типа, чем антитела к S100.

Таким образом, различные фиксаторы оказывают существенное влияние на морфологические особенности ткани каротидного клубочка. Пенистость цитоплазмы, которую ряд авторов связывает с бронхиальной астмой (Гилевич И. и соавт., 1967), полностью пропадает, если фиксировать ткань не в формалине, а в жидкости Карнуа или спирте. Однако, несмотря на хорошую сохранность структуры ткани эти фиксаторы не могут быть применены при иммуногистохимических исследованиях, так как антитела, предназначенные в большей степени для фиксированной в формалине ткани, не показывают удовлетворительного результата.

Сравнение организации каротидного клубочка, органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочечника в антенатальном периоде развития человека. Каротидные клубочки, органы Цукеркандля и мозговое вещество надпочечников были изучены у эмбриона №1 и плодов №2-5.

Эмбрион №1 (8 недель п.о.). Каротидные клубочки эмбриона были образованы небольшим скоплением двух типов клеток в области бифуркации общей сонной артерии. Первый тип клеток представлял собой мономорфные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. Они имели большие круглые или овальные ядра с нежным хроматином, иногда в них обнаруживались 1-2 ядрышка. Эти клетки с большой долей вероятности можно отнести к незрелым клеткам I типа. Они формировали гнёзда, или гломерулы, окружённые тонкими отростками вытянутых клеток, вероятно, предшественников клеток II типа. Каждая гломерула состояла из 4-11 клеток.

Гломерулы каротидного клубочка располагались в мезенхиме между внутренней и наружной сонными артериями, а в некоторых местах они тесно прилежали к самой медии артерий.

Вокруг органа не была обнаружена соединительнотканная капсула, лишь в некоторых участках вокруг органа наблюдали вытянутые мезенхимальные клетки.

Орган Цукеркандля у эмбриона был хорошо развит и состоял из относительно крупных долек. Каждая долька была отделена от других тонкими мезенхимальными перегородками и представлена скоплением мономорфных клеток с большим ядерно-цитоплазматическим отношением. При более тщательном исследовании видно, что клетки, в свою очередь, формируют внутри долек достаточно крупные гнёзда. Эти гнёзда были крупнее, чем гломерулы в каротидном клубочке. Но так как каждое гнездо отделялось от другого очень тонкими отростками вытянутых клеток, границы между ними были не так заметны. Каждое гнездо состояло из 25-60 клеток, однако вполне вероятно, что гнёзда были меньших размеров, так как границы между ними на светооптическом уровне были нечёткими, из-за чего несколько отдельных гнёзд могли быть приняты за одно.

Мозговое вещество надпочечника при стандартной окраске гематоксилином и эозином у эмбриона не определялось.

Плоды №2-5 (10 недель п.о. – 20 недель п.м.). Каротидные клубочки плодов №2-5 были более зрелыми, чем у 8-ми недельного эмбриона. Клетки I типа у плода №2 имели больший по сравнению с эмбрионом на предыдущем сроке ободок слабо эозинофильной цитоплазмы вокруг ядер, а клетки I типа плодов №3-5 имели уже более эозинофильную цитоплазму. Каротидный клубочек плода №2 имел гломерулы со слабовыраженными границами в виде тонких прослоек отростков клеток II типа. Более крупных долек, которые у взрослых формируют гломерулы, не обнаруживалось. В клубочках плодов №3-5 гломерулы имели более выраженные границы, отростки клеток II типа были толще. В клубочке плода №3 наблюдали образование долек, формируемых гломерулами. Хорошо выраженные дольки обнаружены у плодов № 4 и 5. Между гломерулами и дольками было заметно наличие тонкостенных капилляров, заполненных эритроцитами. Вокруг органа определялось формирование коллагеновых волокон, окружающих орган по периферии, но не образующих отдельную капсулу.

Орган Цукеркандля плода №2 в отличие от эмбриона №1 был представлен более крупными клетками со светлой пенистой цитоплазмой, но в целом имел схожее строение. Органы Цукеркандля плодов №3-5 имели вид зрелого эндокринного органа. Группы клеток со светлой слабо эозинофильной пенистой цитоплазмой и овальными или округлыми ядрами были собраны в гнёзда по 15-30 штук. Гнёзда были отделены друг от друга отростками клеток II типа. Между гнёздами было обнаружено большое количество тонкостенных капилляров. Однако первоначальное дольчатое строение, наблюдавшееся у эмбриона №1 и плода №2, у плодов на данном этапе внутриутробного развития не было выражено.

Мозговое вещество надпочечника плодов №2-5 было представлено мелкими скоплениями двух типов клеток, разбросанными посреди вещества фетальной коры. Бóльшая их часть представлена незрелыми клетками с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, меньшая – более зрелыми клетками с пенистой цитоплазмой, напоминающими клетки органа Цукеркандля.

Иммуногистохимическое исследование. Во всех исследованных образцах каротидного клубочка, органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочечника клетки I типа были положительны на bIII-тубулин и тирозингидроксилазу. Реакция на синаптофизин и PGP9.5 обнаруживалась лишь у плодов №4 и 5. На S100, GFAP и нейрофиламенты реакция была очень слабой либо отсутствовала.

Во всех исследованных каротидных клубочках обнаружено очень высокое отношение TH/bIII, приближающееся к единице. Однако в органе Цукеркандля во всех случаях отношение TH/bIII оказалось значительно выше, чем в каротидном клубочке. Еще большее отношениие TH/bIII было обнаружено в надпочечниках плодов на сроках от 10 недель п.о. до 20 недель п.м. Тем не менее, в надпочечнике 8-ми недельного эмбриона показатель отношения был даже ниже, чем в каротидном клубочке. Выявлялись лишь единичные позитивные к тирозингидроксилазе и bIII-тубулину клетки, что связано с тем, что мозговое вещество надпочечников на данном сроке ещё не развито.

Таким образом, было показано, что на ранних этапах эмбриогенеза каротидный клубочек и орган Цукеркандля имеют схожие морфологию и

иммуногистохимические характеристики. При этом на всех исследованных сроках (8-20 недель) мозговое вещество надпочечника было незрелым. Исходя из этого, можно предположить, что во внутриутробном периоде развития каротидный клубочек выполняет эндокринную функцию наравне с органом Цукеркандля. Оба органа синтезируют катехоламины, компенсируя этим недостаточность функции мозгового вещества надпочечников.

Из литературы известно, что даже после рождения мозговое вещество надпочечника остаётся незрелым, а его функции, вероятно, берёт на себя орган Цукеркандля, который достигает максимального развития к трём годам. В дальнейшем наблюдается его инволюция с одновременным ростом и созреванием мозгового вещества надпочечника (Subramanian A. и Maker V., 2006).

Сравнение структуры каротидного клубочка человека в антенатальном и постнатальном периодах развития. В анте- и постнатальном периодах во всех исследованных образцах каротидный клубочек располагался в области бифуркации общей сонной артерии, однако его относительный размер варьировал. У эмбриона №1 максимальная площадь поперечного среза левого каротидного клубочка была в 6,7 раза больше, чем площадь поперечного сечения левой внутренней сонной артерии, а площадь поперечного среза правого каротидного клубочка – в 7,1 раза больше площади поперечного сечения правой внутренней сонной артерии. Если брать отношения наибольших размеров органа к диаметру внутренней сонной артерии, то размер левого клубочка был в 3,3 раза больше диаметра левой внутренней сонной артерии, а правого – в 4,04 раза больше диаметра правой внутренней сонной артерии.

У плода №2 наибольший размер органа был в 1,86 раза больше диаметра внутренней сонной артерии. У остальных обследованных плодов не было возможности напрямую сопоставить размеры каротидного клубочка с диаметром внутренней сонной артерии, так как направление срезов не всегда соответствовало продольному сечению сосуда или каротидного клубочка. Однако на основании анализа серии срезов можно утверждать, что наибольший поперечный размер каротидного клубочка примерно в 1,1-1,5 раза больше диаметра внутренней сонной артерии.

По сравнению с антенатальным материалом, относительные размеры органов взрослых были значительно меньше. Из-за значительного разрастания соединительной ткани у лиц пожилого возраста невозможно было точно измерить размеры паренхимы органа, так как она была разбросана дискретными порциями между коллагеновыми волокнами. Но даже с учётом соединительной ткани максимальный поперечный размер каротидного клубочка составлял не больше трети диаметра внутренней сонной артерии (случай №22), в среднем – около четверти её диаметра.

Вокруг каротидных клубочков эмбриона №1 и плода №2 был обнаружен лишь тонкий ободок вытянутых мезенхимальных клеток, которые окружали орган по периметру в 1-3 слоя, однако не наблюдалось формирования соединительнотканной капсулы. Вокруг каротидных клубочков плодов №3-21 также не отмечалось формирования капсулы. По периферии органа, вокруг его

гломерул, наблюдали локальные разрежения соединительнотканной ткани. Последняя состояла из редких коллагеновых волокон и веретеновидных фибробластоподобных клеток. Снаружи выявили скопление более плотных коллагеновых волокон, лежащих в несколько слоёв, и наличие большого количества веретеновидных фибробластоподобных клеток. Однако назвать это образование истинной капсулой нельзя, хотя оно и напоминает её по структуре. Она не была непрерывной, местами отмечались участки разрежения коллагеновых волокон. Иногда коллагеновые волокна меняли своё направление и ориентировались не по касательной периметру органа, а перпендикулярно к нему. На некоторых срезах было обнаружено вхождение в орган тонкостенной артериолы диаметром 50-90 мкм. Вокруг каротидного клубочка также иногда обнаруживались тонкостенные вены, заполненные эритроцитами.

В случае №22 (женщина 24 лет) макроскопически орган представлял собой чётко отграниченный от окружающей его рыхлой соединительной ткани узелок овальной формы. Микроскопически орган был окружён плотной волокнистой соединительной тканью по всему периметру. На краниальном и каудальном полюсе органа эта ткань имела чёткую границу с прослойками жировой ткани. С края, прилежащего к внутренней сонной артерии, плотная волокнистая соединительная ткань незаметно переходила в адвентицию артерии. С противоположного края она имела более отчётливую границу с более рыхлой соединительной тканью. Плотная волокнистая соединительная ткань входила в орган, разделяя его на дольки. В ней было обнаружено большое количество кровеносных сосудов и нервов.

В остальных случаях (№23-34) наблюдали значительное увеличение соединительной ткани, располагающейся в области бифуркации общей сонной артерии. Соединительная ткань сильно разрасталась между долек каротидного клубочка и, по-видимому, врастала в ранее единые дольки, разделяя их на более мелкие.

В анте- и постнатальном периодах все исследованные каротидные клубочки состояли из двух типов клеток, организованных по общему плану в гломерулы: группа из 4-15 (в антенатальном) и 10-20 (в постнатальном) овальных или округлых клеток I типа была окружена по периферии веретеновидными клетками II типа.

По мере увеличения срока гестации морфология органа менялась следующим образом. Если у эмбриона №1 клетки первого типа были в основном круглыми или овальными с узким, почти незаметным ободком базофильной цитоплазмы, то у плода №2 было заметно незначительное увеличение объёма цитоплазмы. У остальных плодов было обнаружено увеличение объёма цитоплазмы, которая к тому же обладала слабовыраженной эозинофилией. Отмечалась пенистость цитоплазмы и её распад на глыбки, однако, как было показано ранее, подобные изменения являются артефактом, вызванным воздействием на ткань формалина.

Наличие «пикнотического субтипа» клеток было отмечено уже в случае №1 (8 неделя п.о.), деление на «тёмный» и «светлый субтипы» клеток наблюдалось начиная с 18-19 недели развития. Это, как было установлено ранее, является ничем иным, как результатом аутолиза.

У эмбриона №1 и плода №2 гломерулы имели слабовыраженные границы, так как отростки клеток II типа были очень тонкими. Помимо этого, гломерулы в этих двух случаев не формировали дольки. Хорошо выраженные дольки, состоящие из групп гломерул, были впервые выявлены у плода №3 на 13-14 неделе гестации.

По мере увеличения срока гестации дольки становились всё более выраженными, были окружены веретеновидными клетками по периметру и отделены друг от друга тонкими прослойками разреженной ткани, которая состояла в основном из скопления веретеновидных клеток, вероятно, шванновских клеток и фибробластов.

Каротидные клубочки взрослых напоминали по гистологическому строению органы плодов, однако имели значительно большее количество соединительной ткани. При этом дольки органа были более выражены. Во всех исследованных случаях органов взрослых клетки I типа также имели овальные или округлые ядра. Их цитоплазма была светлой эозинофильной, очень часто фрагментированной (артефакт фиксации формалином). Как и в антенатальном периоде у взрослых было обнаружено наличие «трёх субтипов»: светлого, тёмного и пикнотического (артефакт аутолиза). Стоит отметить, что из-за наличия этих неизбежных при работе с человеческим материалом артифициальных изменений, часть клеток, не являющихся клетками I типа, могла быть ложно принята за них. Особенно это касалось перицитов и шванновских клеток, через которые срез прошёл поперечно.

Клетки II типа имели веретеновидную форму и вытянутые ядра. Они окружали клетки I типа по периферии. Однако из-за большого числа стромальных и шванновских клеток со схожей морфологией, расположенных рядом с гломерулами, отличить эти типы клеток не всегда представлялось возможным. Таким образом, без иммуногистохимического исследования или специальных окрасок не всегда можно чётко дифференцировать клетки I и II типа от иных видов клеток.

Иммуногистохимическое исследование каротидного клубочка. В антенатальном и постнатальном периодах во всех исследованных каротидных клубочках наблюдали позитивную реакцию клеток I типа и нервных волокон на bIII-тубулин. Отчётливую позитивную реакцию на синаптофизин и PGP9.5 наблюдали в клетках I типа плодов №4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 19, 20, 21 и во всех образцах органа взрослых, как и позитивную реакцию на PGP9.5 в нервных волокнах. В постнатальном периоде и у плодов №6, 8, 9 нервные волокна были позитивны также на нейрофиламенты. У плодов №8, 9, 19, 20 была выявлена позитивная реакция шванновских клеток оболочек нервов и клеток II типа на GFAP. В случае №7, 19, 20 шванновские клетки оболочек нервов и клетки II типа дали позитивную реакцию на S100. Шванноские клетки и клетки II типа во всех исследованных образцах каротидных клубочков взрослых имели позитивную реакцию на два последних маркёра.

Из приведённых данных видно, что помимо выявленных в эксперименте по аутолизу нестабильных маркёров (GFAP, нейрофиламенты) нестабильно работали в большей степени S100, в меньшей – синаптофизин и PGP9.5. Можно

предположить, что в этих случаях помимо аутолиза на результат повлияла фиксация в формалине ненадлежащего качества антенатального материала. Позитивная реакция на все исследованные маркёры во всех образцах взрослых людей свидетельствует о более медленном протекании аутолитических процессов в тканях в постнатальном периоде.

В случаях №1 (8 недель п.о.) и №2 (10 недель п.о.) клетки клубочка располагались так плотно, что внутри органа было невозможно проследить ход нервных волокон. С 13-14 недели внутриутробного развития (плод №3), когда в органе появляются хорошо выраженные дольки, становится возможным проследить ход нервных волокон. Они входят в орган и, проходя по межлобулярному пространству, густой сетью оплетают дольки. При этом в нервных волокнах наблюдали позитивную реакцию как на bIII-тубулин, так и на тирозингидроксилазу.

Очень сложно было проследить ход нервных волокон внутри самих гломерул, так как находящиеся в них клетки также были позитивными на bIII-тубулин, тирозингидроксилазу и PGP9.5. Поэтому представлялось возможным оценить ход нервных волокон, позитивных на нейрофиламенты. Отмечалось, что эти нервные волокна входили в сами гломерулы и формировали промежуточные и концевые утолщения. Эти утолщения образовывали контакты с клетками I типа.

Помимо утолщений внутри гломерул, часть нервных волокон образовывала утолщения, расположенные рядом со стенкой кровеносных сосудов. Данные утолщения тесно прилежали к их базальной мембране.

Значительным отличием каротидного клубочка женщины 24 лет (случай №22) от каротидных клубочков лиц старше 50 лет стало уменьшение паренхимы и разрастание стромы. Исследование с применением антител к синаптофизину и нейрофиламентам показало, что уменьшение числа клеток I типа не сопровождается уменьшением плотности нервных волокон. При этом их плотность либо не изменяется, либо даже возрастает.

Вероятно, это может быть связано с гибелью клеток I типа с сохранением нервного аппарата органа. Особо стоит отметить, что хотя физиологических тестов проведено не было, большинство умерших, судя по анамнезу, не имели в течение жизни хронической дыхательной недостаточности. Таким образом, несмотря на выраженную атрофию органа, функция дыхания у пациентов была сохранна или, по крайней мере, обеспечивала осуществление ими нормальной повседневной деятельности. Это, в свою очередь, согласуется с данными M. Pokorski соавторами (2004), которые отметили отсутствие каких-либо различий в ответе на гипоксию между молодыми (в среднем 24 года) и пожилыми (в среднем 71 год) женщинами (Pokorski M. et al., 2004).

Исследование с применением маркёров к тирозингидроксилазе и bIII-тубулину показало следующую картину (Рис.3). Уже с 8 недели развития клетки I типа иммунопозитивны к bIII-тубулину и тирозингидроксилазе. При этом во всех случаях отношение TH/bIII оказалось довольно высоким (медианное значение – 0,8) (Рис.2, 3Б). Минимум 0,51 наблюдался в случае №17, максимум 0,93 в случае №5 и 0,92 в случае №1. Связи между сроком гестации и отношением TH/bIII

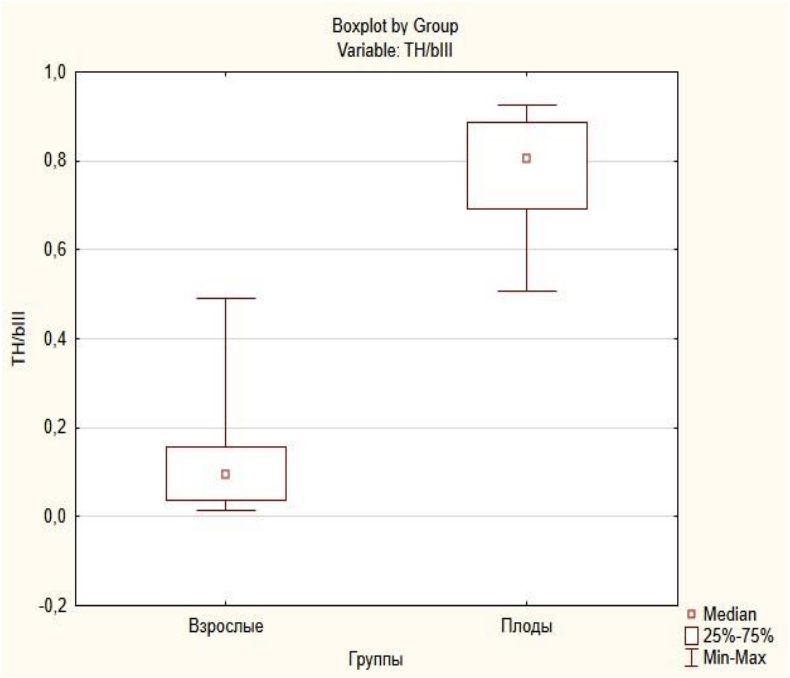

Рис. 2. Отношение TH/bIII в каротидном клубочке взрослых и плодов. Статистически значимые различия ($p<0,05$)

обнаружено не было. В отличие от антенатального материала в постнатальном периоде клетки I типа показали довольно слабую реакцию на тирозингидроксилазу (Рис.3Г). Отчётливую реакцию на неё демонстрировали лишь единичные клетки, только в случаях №25 и 30 было отмечено большее количество иммунопозитивных клеток. Отношение TH/bIII оказалось довольно низким (медианное значение – 0,09) (Рис.2). Минимум 0,01 наблюдался в случае №34, максимум 0,49 в случае №25.

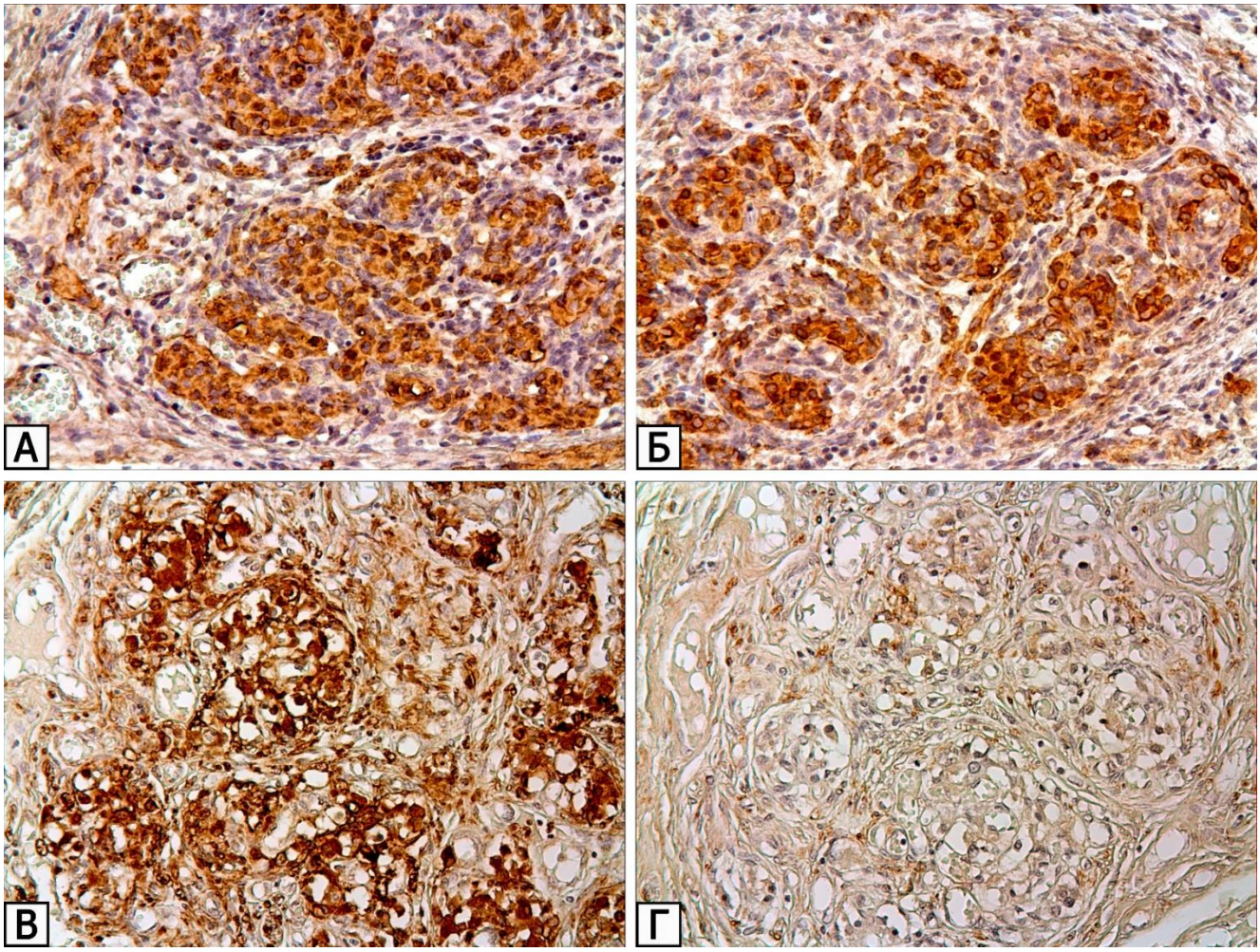

Рис. 3. Сравнение каротидного клубочка плода на 21-й неделе п.м. (сверху) и каротидного клубочка человека возрастом 68 лет (снизу). А и В – bIII-тубулин, Б и Г – тирозингидроксилаза. Увеличение 200х.

Из литературных данных известно, что уже у 4-х месячных младенцев количество клеток, иммунопозитивных к тирозингидроксилазе, довольно низкое (Lazarov N. et al., 2009). Эта особенность не только отличает орган взрослых и детей от каротидного клубочка в антенатальном периоде, но и от каротидного клубочка крыс, который также характеризуется высоким содержанием тирозингидроксилазы, что видно из настоящей работы и литературных данных (Lazarov N. et al., 2009; Fagerlund M. et al., 2010).

Однако этот факт не говорит в пользу более высокого содержания самих катехоламинов в клетках I типа крыс. Продуцируя большое количество тирозингидроксилазы, клетки I типа у крыс имеют очень низкий уровень катехоламинов, что свидетельствует о замедлении синтеза на последующих этапах биохимических превращений. Но, несмотря на это, у крыс также отмечается снижение продукции тирозингидроксилазы уже на вторые сутки после рождения (Gauda E. et al., 1996). При этом ряд авторов отмечает, что если на момент рождения чувствительность клеток I типа минимальна, то затем, по мере взросления, она значительно возрастает (Blanco C. et al., 1984; Carroll J. et al., 1993; Wasicko M. et al., 1999).

Таким образом, на основании собственных и литературных данных можно предположить следующую модель работы каротидного клубочка. В антенатальном периоде каротидный клубочек наравне с органом Цукеркандля выполняет эндокринную функцию, тем самым компенсируя недостаточность мозгового вещества надпочечника. Однако после рождения каротидный клубочек человека практически сразу перестаёт синтезировать тирозингидроксилазу, тем самым уменьшая количество продуцируемых катехоламинов. Одновременно с этим происходит переключение функции каротидного клубочка с эндокринной на хеморецепторную. Затем, после второго года постнатального развития, подвергается инволюции орган Цукеркандля, и функцию выработки катехоламинов берёт на себя мозговое вещество надпочечника.

Такое переключение функций одного органа станет ещё более понятным, если рассмотреть эволюцию самой хромаффинной ткани. Начиная с круглоротых и рыб, хромаффинная ткань выполняла сразу две функции – хемочувствительную и эндокринную (Смиттен Н.А., 1972). Однако в процессе эволюции произошло разделение хромаффинной ткани на две группы. Первая группа взяла на себя в большей мере эфферентную эндокринную функцию, а вторая – хемочувствительную.

Однако обе группы не утратили полностью одну из функций, в большей или меньшей степени сохраняя обе. Так, согласно исследованиям, хромаффинные клетки надпочечника взрослых животных выделяют катехоламины лишь в ответ на стимуляцию симпатическими нервными волокнами, однако при их денервации к ним возвращается способность выделять катехоламины в ответ на гипоксию (Seidler F. и Slotkin T., 1986; Levitsky K. и López-Barneo J., 2009). Таким образом, помимо своей основной функции клетки сохраняют хемочувствительность, которая, однако, тормозится влиянием эфферентных симпатических нервных волокон.

То же можно сказать и о каротидном клубочке. Несмотря на то, что основной его функцией стала регуляция парциального давления газов в крови у взрослых людей, он сохраняет свою эндокринную функцию в антенатальном периоде, возмещая тем самым недостаточность функции незрелого мозгового вещества надпочечника.

О единстве мозгового вещества надпочечника и каротидного клубочка также свидетельствует тот факт, что оба органа одинаково реагируют выделением катехоламинов на острую гипоксию, а также гиперплазией хромаффинных клеток в ответ на хроническую гипоксию (Heath D. et al., 1970; Gosney J., 1985). Данные о том, что в ответ на хроническую гипоксию увеличивается синтез катехоламинов в обоих органах подтверждает идею о том, что эндокринная функция присуща им обоим.

Однако самое интересное касается чувствительной иннервации каротидного клубочка. В большинстве работ отмечено наличие на окончаниях, принадлежащих аксонам чувствительных нейронов ганглия языкоглоточного нерва, эфферентных и реципрокных синапсов (Biscoe T., 1971; Nishi K. и Stensaas L., 1974; McDonald D. и Mitchell R., 1975). Но все исследователи трактовали их наличие односторонне, только как способ регуляции хеморецепторной функции.

Исследователи наблюдали уменьшение хеморецепторного ответа клеток I типа в ответ на электрическую стимуляцию языкоглоточного нерва, причём этот эффект опосредуется выделением катехоламинов (McDonald D. и Mitchell R., 1981). Все объяснения этого феномена с позиции лишь хеморецепторной функции выглядят неубедительными.

На наш взгляд, данный феномен можно объяснить, если допустить наличие в каротидном клубочке аксон-рефлекса. Так, согласно Заварзину (1950), чувствительные нейроны одновременно могут выполнять и эфферентную функцию. Этим объясняется, к примеру, кожно-сосудистая реакция в ответ на раздражение (Заварзин А.А., 1950).

Вероятно, нечто подобное происходит и в каротидном клубочке. При слабых изменениях химического состава крови нет смысла задействовать все механизмы симпато-адреналовой системы. Однако при сильно выраженной гипоксии клетки I типа должны сильнее возбуждать чувствительные волокна синусного нерва, выбрасывая большее количество ацетилхолина и АТФ в качестве медиаторов. В ответ на это чувствительные волокна не только передают сигнал в ствол мозга, но и одновременно через свои же эфферентные синапсы в обратном направлении на клетки I типа. Это приводит к усиленному выделению клетками I типа катехоламинов, включая дофамин. Именно это может объяснить результаты эксперимента S. Hellström (1977), который наблюдал сокращение выделения дофамина и норадреналина клетками I типа в ответ на гипоксию, если за 14 дней до этого была выполнена перерезка синусного нерва (Hellström S., 1977).

Эта гипотеза также отлично объясняет наблюдения P. Zapata (1975), который отмечал двухфазное воздействие дофамина, который вначале тормозил импульсацию синусного нерва, а при дробном повторном введении – усиливал (Zapata P., 1975). Вероятно, первоначальное возбуждение ацетилхолином приводит

к увеличению импульсации синусного нерва. Если гомеостаз организма не приходит в норму, клетки I типа начинают самостоятельно, а также под воздействием самого синусного нерва дробно выделять дофамин, который вызывает ещё большее увеличение импульсации синусного нерва, а также, вероятно, попадает в кровоток, приводя к системным эффектам. Последние, однако, не могут быть сильно выраженными у взрослых людей, так как эндокринная функция каротидного клубочка в значительной мере редуцирована.

Таким образом, хотя клетки I типа и утратили частично свои эндокринные функции во взрослом состоянии, в эмбриональном и плодном периодах развития они сохраняются. С этим согласуются наши результаты, свидетельствующие о большом количестве тирозингидроксилазы в клетках эмбриона и плодов, а также обнаружение в работе O. Korkala самих катехоламинов (Korkala O. и Hervonen A., 1973). В свою очередь A. Hervonen подтверждает наличие вполне зрелой иннервации на клетках I типа в каротидном клубочке плодов во втором триместре внутриутробного развития (Hervonen A. и Korkala O., 1972).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За миллионы лет эволюции у многоклеточных организмов сформировалось огромное количество механизмов регуляции гомеостаза. Изменение работы каротидного клубочка лишь один из возможных.

Каротидный клубочек входит в сложную систему контроля внешнего дыхания, тесно взаимодействующую с системами регуляции сердечной и сосудисто-двигательной функции. Эта система имеет множество звеньев, через которые сигнал об изменении внутренней среды организма доходит до эффекторных органов. Естественно, что на своём пути сигнал значительно преобразовывается, а эффекторные органы по механизму обратной связи в свою очередь меняют деятельность аффекторных органов.

Организм – это целостная система, которая всегда реагирует целиком, даже если видимые нами изменения наблюдаются локально. Всё это лишь видимые явления, за которыми скрываются процессы, остающиеся в тени. Уже сам этот факт говорит о невозможности лечения любого типа системной патологии лишь локальным воздействием на какое-либо отдельное звено цепи. Таким образом, идеи о таргетной терапии, направленной лишь на модификацию работы одного органа, не обоснованы.

Именно по причине тесной взаимосвязи органов между собой в настоящей работе каротидный клубочек был изучен одновременно с двумя другими важнейшими представителями симпато-адреналовой системы – мозговым веществом надпочечника и органом Цукеркандля.

В нашей работе было показано, что клетки каротидного клубочка имеют высокий уровень синтеза тирозингидроксилазы на всём протяжении внутриутробного периода развития, при этом на ранних этапах эмбриогенеза морфология и иммуногистохимические характеристики клубочка сходны с таковыми органа Цукеркандля. В тоже самое время мозговое вещество надпочечника представлено единичными скоплениями незрелых клеток и не может полноценно выполнять свою функцию. Таким образом, каротидный клубочек

наравне с органом Цукеркандля, вероятно, выполняют эндокринную функцию, компенсируя тем самым недостаточность синтеза катехоламинов мозговым веществом надпочечника.

Нами установлено, что по мере старения организма каротидный клубочек претерпевает атрофические изменения. При этом у пациентов не наблюдалось каких-либо расстройств дыхания. Это может быть связано только с тем, что изменяющийся сигнал от органа начинает иначе преобразовываться на других уровнях: уровне чувствительной нервной клетки ганглия языкоглоточного нерва, чувствительных и моторных ядер ствола мозга и т.д.

Таким образом, наше исследование показало, что нельзя останавливаться на изучении одного органа целой системы. Лишь комплексное изучение организма как целого может помочь в разработке новых подходов к лечению той или иной патологии.

ВЫВОДЫ

1. В антенатальном периоде развития каротидного клубочка человека специфические иммуногистохимические маркёры клеток органа (bIII-тубулин и тирозингидроксилаза) выявляются с возраста 8 недель после оплодотворения. В клубочках эмбриона и плодов (8-30 недель) выявляется высокая активность тирозингидроксилазы на протяжении всего срока гестации. В постнатальном периоде развития тирозингидроксилаза выявляется только в единичных клетках.
2. Показано, что иннервация каротидного клубочка формируется уже на 8-й неделе после оплодотворения. Иммуногистохимический анализ с маркёром к bIII-тубулиину выявил обильную иннервацию органа уже во внутриутробном периоде.
3. Установлено, что каротидный клубочек плодов по относительным анатомическим размерам больше органа взрослых. Сравнение каротидного клубочка с диаметрами сонных артерий показало, что у плодов он больше диаметра внутренней сонной артерии.
4. Высокая активность тирозингидроксилазы наряду с относительно крупными размерами органа свидетельствуют о том, что во внутриутробном периоде каротидный клубочек наряду с органом Цукеркандля выполняет эндокринные функции, которые состоят в выработке катехоламинов, необходимых для эмбрионального и плодного развития организма.
5. Во внутриутробном периоде высокий синтез тирозингидроксилазы, сменяемый резким его снижением в постнатальном периоде, свидетельствует о том, что функция каротидного клубочка человека изменяется: в пренатальном периоде он выполняет эндокринную, в постнатальном – хеморецепторную функцию.
6. В результате сопоставления светооптических характеристик клеток клубочка на различных сроках фиксации материала было установлено, что при фиксации органа через 24 часа после смерти происходит разрушение клеток I типа. Таким образом, тёмные, светлые и прогениторные субтипы клеток I типа являются следствием воздействия аутолиза, а не самостоятельными субтипами клеток.
7. На основании сравнения экспериментальных данных с аутопсийным материалом человека удалось установить, что выделяемые на светооптическом

уровне пенистые изменения цитоплазмы клеток I типа являются артефактом формалиновой фиксации, а не изменениями, возникающими в процессе развития различных заболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, входящих в Перечень РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и учёной степени доктора наук

1. **Otlyga D.A.**, Junemann O.A., Dzhalilova D.S., Tsvetkova E.G., Saveliev, S.V. Immunohistochemical Study of Dark and Progenitor Carotid Body Cells: Artefacts or Real Subtypes? // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2020. – Vol.168, Iss.6. – P.807-11.
2. **Отлыга Д.А.**, Юнеман О.А., Цветкова Е.Г., Харламова А.С., Бесова Н.В., Савельев С.В. Сонный гломус, мозговое вещество надпочечника и орган Цукеркандля как единая симпатоадреналовая система в пренатальном развитии человека // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2020. – Т.9, №2. – С.61-9.
3. **Отлыга Д.**А., Юнеман О.А., Цветкова Е.Г., Горохов К.Р., Савельев С.В. Иммуногистохимические особенности каротидного клубочка человека. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2020. – Т.9, №3. – С.61-7
4. **Отлыга Д.**А., Юнеман О.А., Цветкова Е.Г., Савельев С.В. Функциональная морфология сонного гломуса человека. // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2019. – Т.8, №3. – С.13-20.

Другие публикации

Отлыга Д.А., Юнеман О.А., Мнихович М.В., Горохов К.Р., Савельев С.В. Иммуногистохимическая характеристика каротидного клубочка человека. Сборник научных трудов научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Москва. – 2018. – С.47-48.