

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

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

ISSN 2226-5988

№ 2/2012

## «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. *М.В. Кондашевская*

Профессор *И.А. Казанцева*

Профессор *И.И. Марков*

Профессор *А.П. Милованов*

Д.м.н. *Л.П. Михайлова*

К.м.н. *В.А. Мхитаров*

Профессор *Н.П. Омеляненко*

Профессор *Ю.Г. Пархоменко*

Профессор *С.В. Савельев*

Академик РАМН *М.Р. Сапин*

Академик РАМН *Ю.Н. Соловьев*

Профессор *А.Б. Шехтер*

Профессор *А.Л. Черняев*

Профессор *В.В. Яглов*

Д.м.н. *Н.В. Яглова*

## Редакционный совет

*Н. Булаева* (Хьюстон, США)

*И.Н. Волощук* (Москва)

*Ю.И. Гуминский* (Винница,  
Украина)

*А.Е. Доросевич* (Смоленск)

*Л.М. Ерофеева* (Москва)

*В.В. Климачев* (Барнаул)

*А.В. Кононов* (Омск)

*М. Кочуков* (Хьюстон, США)

*А.Э. Мационис* (Ростов-на-Дону)

*О.Д. Мишнев* (Москва)

*Л.М. Михалева* (Москва)

*Л.М. Непомнящих* (Новосибирск)

*Е.В. Новичков* (Киров)

*В.В. Новочадов* (Волгоград)

*А.Н. Романюк* (Сумы, Украина)

*М.Г. Рыбакова* (Санкт-Петербург)

*И.В. Твердохлеб* (Днепропетровск,  
Украина)

*В.А. Туманский* (Запорожье,  
Украина)

*М.Г. Узбеков* (Москва)

*Ю.И. Ухов* (Рязань)

*Л.В. Фомина* (Винница, Украина)

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

*В.П. Черников* (Москва)

*В.Ф. Чехун* (Киев, Украина)

*И. Шварц* (Тель-Авив, Израиль)

*А.Н. Яцковский* (Москва)

## ПЕРЕДОВЫЕ СТАТЬИ, ЛЕКЦИИ EDITORIALS, LECTURES

- А.Г. Бабаева, Н.М. Геворкян, А.В. Ельчанинов* 4 *A.G. Babaeva, N.M. Gevorkyan, A.V. Elchaninov*  
Рекапитуляция и ее признаки при патологических  
процессах Recapitulation and its manifestations in pathological  
processes

## КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ CLINICAL MORPHOLOGY

- О.В. Зайратьяни, Г.О. Зайратьяни, П.Р. Мовтаева* 9 *O.V. Zayratyants, G.O. Zayratyants, P.R. Movtaeva*  
Проблемы современной гастроэнтерологии:  
пищевод Барретта Current problems of gastroenterology:  
Barrett's esophagus
- Л.М. Михалева, Т.Г. Бархина, Н.Н. Щеголева,  
Е.В. Иванова, В.Е. Голованова* 17 *L.M. Mikhaleva, T.G. Barkhina, N.N. Schegoleva,  
E.V. Ivanova, V.E. Golovanova*  
Морфологические особенности слизистой  
оболочки пищевода при бронхиальной астме Morphological features of the mucous membrane  
of the esophagus in bronchial asthma
- Н.А. Старосветская, С.В. Назимова,  
И.И. Степанова, А.А. Степанов, М.Н. Болтовская* 22 *N.A. Starosvetskaya, S.V. Nazimova, I.I. Stepanova,  
A.A. Stepanov, M.N. Boltovskaya*  
Получение комплекса моноклональных антител  
для иммуногистохимических исследований  
в области физиологии и патологии репродукции Production of monoclonal antibodies set  
for immunohistochemical studies in the field  
of physiology and pathology of human reproduction
- Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, Е.И. Фокин,  
С.В. Савельев* 28 *Yu.S. Krivova, V.M. Barabanov, E.I. Fokin,  
S.V. Savelev*  
Иммуногистохимическое исследование  
эндокринной части и нервного аппарата  
поджелудочной железы у ребенка  
при сахарном диабете 1-го типа Immunohistochemical study of the endocrine part  
of the pancreas and its nervous elements in child  
with diabetes mellitus type 1
- М.В. Мнихович, И.В. Васин, Л.М. Соломатина* 32 *M.V. Mnikhovich, I.V. Vasin, L.M. Solomatina*  
Лимфангиоматоз большого сальника Lymphangiomatosis of greater omentum

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

- Н.В. Яглова, В.В. Яглов* 36 *N.V. Yaglova, V.V. Yaglov*  
Секреция тучных клеток щитовидной железы  
при воздействии тиреотропного гормона Secretion of thyroid mast cells induced  
by thyroid-stimulating hormone

*Е.Н. Вареник, Т.В. Липина, Л.С. Погодина,  
М.В. Шорникова, Ю.С. Ченцов*  
Ультраструктурная характеристика миокарда  
правого предсердия крыс в условиях  
моделирования эффектов невесомости  
и искусственной силы тяжести

41

*E.N. Varenik, T.V. Lipina, L.S. Pogodina,  
M.V. Shornikova, Yu.S. Chentsov*  
Myocardial ultrastructure in rat right atrium  
under simulation of weightlessness effects  
and artificial gravity

*И.В. Арутюнян, А.В. Макаров, Т.Х. Фатхудинов,  
Г.Б. Большакова*  
Моделирование цирроза печени  
на лабораторных животных

45

*I.V. Arutyunyan, A.V. Makarov, T.H. Fathudinov,  
G.B. Bolshakova*  
Liver cirrhosis models in laboratory animals

*Л.И. Кондакова, Б.В. Рубцов, А.С. Халанский*  
Использование перевиваемых клеточных  
линий опухолей мозга в экспериментальной  
нейропатоморфологии

51

*L.I. Kondakova, B.V. Rubtsov, A.S. Khalansky*  
The approach for using the transplatable tumorous  
brain cell lines in experimental neuromorphology

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

*И.М. Расстригина, А.П. Милованов, Т.В. Фокина*  
Особенности второй волны  
цитотрофобластической инвазии:  
регуляция дифференцировки цитотрофобласта,  
роль эндоваскулярного фенотипа  
и многоядерных гигантских клеток

59

*I.M. Rasstrigina, A. P. Milovanov, T. V. Fokina*  
Second stage of cytotrophoblastic invasion:  
regulation of cytotrophoblast differentiation  
with special reference to the role of endovascular  
phenotype and multinucleated giant cells

*М.В. Кондашевская, В.А. Мхитаров*  
Морфофункциональные нарушения  
аденогипофиза и мужских половых желез  
при алкоголизме

66

*M.V. Kondashevskaya, V.A. Mkhitarov*  
Impaired structure and function of adenohypophysis  
and male gonads under the conditions of alcoholism

## ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ MORBID ANATOMY SERVICE

*А.П. Милованов, Е.Ю. Лебедеенко, А.Ф. Михельсон,  
М.П. Курочка, А.А. Михельсон*  
Роль уточненного заключительного клинического  
и патологоанатомического диагноза  
в формировании нозологической структуры  
материнской смертности

74

*A.P. Milovanov, E.Yu. Lebedenko, A.F. Mikhelson,  
M.P. Kurochka, A.A. Mikhelson*  
Role of specified final clinical and pathologic diagnosis  
in the formation of nosological structure of maternal  
mortality

## РЕКАПИТУЛЯЦИЯ И ЕЕ ПРИЗНАКИ ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

*А.Г. Бабаева<sup>1</sup>, Н.М. Геворкян<sup>2</sup>, А.В. Ельчанинов<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» РАМН, Москва

Представлен анализ явления рекапитуляции и его взаимосвязи с патологическими процессами. Очерчены перспективы развития исследований признаков рекапитуляции и их возможное использование в тактике лечения.

*Ключевые слова:* морфофункциональная рекапитуляция, злокачественная анемия, хронический лейкоз, полицитемия, хроническая почечная недостаточность, флюороз

Согласно современному определению, рекапитуляция – это повторение признаков далеких предков в онтогенезе организмов: в их структуре, химизме и функциях.

На всем протяжении второй половины XIX и начала XX века рекапитуляция была одним из самых изучаемых явлений, однако исключительный интерес к этой проблеме к середине XX столетия резко снизился, а к его концу закончился почти полным ее забвением. Причиной утраты интереса к этой проблеме является разочарование в ее основополагающей идее, выраженной в биогенетическом законе Дарвина–Мюллера–Геккеля, согласно которому онтогенез есть краткое и быстрое повторение филогенеза. Это произошло в связи с появлением ряда фактов, не подтверждающих данный закон. Под давлением этих фактов, ожесточенной дискуссии, подробно отраженной в монографии Э.Н. Мирзояна [10], справедливых, не совсем справедливых и совсем несправедливых упреков закон был признан несостоятельным, и его дальнейшее развитие почти полностью прекратилось. Негативное отношение к биогенетическому закону и его главному разработчику Э. Геккелю [2], по-видимому, за рубежом остается до настоящего времени, что следует из имеющихся публикаций. Р. Рэфф и Т. Кофмен [16] в своей монографии пишут, что биогенетический закон – лишь иллюзия. Л.И. Корочкин [8] утверждает, что в зарубежных руководствах в настоящее время об этом законе обычно не упоминают, а если и упоминают, то полностью отвергают.

В России отношение как к самому закону, так и к его авторам было совсем иное. А.Н. Северцов [18] и И.И. Шмальгаузен [23] свое внимание – и не без успеха – сосредоточили на анализе причин отсутствия явления рекапитуляции в эмбриогенезе ряда признаков. А.Н. Северцов дал подробное научное обоснование

отсутствия в эмбриогенезе признаков рекапитуляции и вариаций проявления некоторых ее закономерностей. Его теория филэмбриогенеза вносит существенные поправки в биогенетический закон, но, свидетельствуя об отсутствии универсальности этого закона, она его полностью не отвергает. А.Н. Северцов показал, что наличие или отсутствие рекапитуляции зависит от способа эволюции животных и их признаков. В своей теории филэмбриогенеза он выделил три способа эволюции: анаболии, девиации и архаллакисы. Все они сопровождаются изменением строения организма взрослых форм, однако степень проявления рекапитуляции в каждом из этих случаев разная.

При анаболии изменения происходят на конечных стадиях развития структуры (признака) путем надставок признаков. Это должно приводить к удлинению онтогенеза, но этого не происходит из-за общего ускорения эмбриогенеза и за счет укорочения некоторых его стадий, вплоть до их исчезновения.

При девиации изменения происходят на средних стадиях развития признаков. Это приводит к более резким изменениям строения взрослого организма, чем при анаболии. Однако при этом способе эволюции рекапитулировать могут лишь ранние стадии онтогенеза потомков.

Наконец, при архаллакисах изменения онтогенеза происходят на самых ранних стадиях эволюции признаков. В этих случаях изменения у взрослых форм самые существенные, а рекапитуляция отсутствует.

Согласно имеющимся данным, приведенным Э.Н. Мирзояном [10], наиболее частой является эволюция путем анаболии (до 80%), причем при развитии как животного, так и растительного мира. Это очень большой процент, что дает основание утверждать, что теория рекапитуляции в принципе верна, вопреки возражениям зарубежных авторов.

В России теория рекапитуляции получила широкое распространение в изучении процессов не только первичного развития (эмбриогенеза), но и вторичного развития (регенерации), воспаления, патологии нервной системы и других патологических состояний. Это направление работ связано с именами крупных отечественных ученых – И.И. Мечникова, А.О. Ковалевского, К.Н. Давыдова, П.П. Иванова, В.А. Догеля, А.А. Заварзина, А.М. Уголева, Л.А. Орбели и многих других. Такой интерес в нашей стране к этой проблеме и ее методологическим основам дал возможность обогатить ее новыми теоретическими обобщениями и фактами, в частности в области гистогенетической рекапитуляции [5, 7, 15, 20, 21, 24] и эволюции гормонов [19], которые свидетельствуют о правильности основной идеи биогенетического закона. В современных российских учебных пособиях биогенетический закон и теория рекапитуляции получили достаточное освещение и позитивную оценку их роли в развитии биологических наук [25]. Периодически появляются экспериментальные и клинические сведения о проявлениях признаков функциональной и морфологической рекапитуляции при поражениях патологическим процессом почек, печени, кроветворных органов, ЦНС, костей [6, 9, 11–14]. Правда, чаще всего в них имеются указания на эмбриональную рекапитуляцию без упоминания о том, что эмбриональные признаки в известной мере являются морфофункциональным повторением филогенеза.

Задача настоящей статьи – показать, что рекапитуляция является масштабным явлением, которое сопровождается патологические процессы главным образом с затяжным (хроническим) течением, и что органы, проявляющие признаки рекапитуляции в эмбриогенезе, повторно проявляют их при патогенезе некоторых заболеваний. Нам представляется целесообразным выделить те признаки заболевания, которые относятся к рекапитуляции, показать, какими могут быть масштабы и глубина этой рекапитуляции, подчеркнуть, что она может выходить за пределы класса и даже типа животных и носить временный характер. Важно понять, какова биологическая суть этого явления, каковы его положительные и отрицательные стороны для большого организма. Ответы на эти вопросы мы попытались получить путем анализа болезней с четко выраженными и бесспорными признаками рекапитуляции: заболеваний крови, сопровождающихся появлением экстрамедуллярных очагов кроветворения (хронические лейкозы, злокачественная анемия, истинная полицитемия, или плетора), хроническая почечная недостаточность (ХПН) и поражение костной ткани при флюорозах.

Не вдаваясь в подробности этиологии, патогенеза и клинической картины этих заболеваний, остановимся лишь на тех моментах, которые имеют непосредственное отношение к явлению рекапитуляции и причинам ее появления. Так, хронические лейкозы (ХЛ) и пернициозная (злокачественная) анемия (ЗА) – совершенно

разные заболевания, но их объединяет ярко выраженная анемия, обусловленная не только нарушением нормального эритропоэза, но и усиленным разрушением эритроцитов. Анемия при обоих заболеваниях сопровождается гетеротопным возникновением множественных очагов внекостномозгового кроветворения, причем в самых невероятных, на первый взгляд, местах. В соответствии с описанием И.В. Давыдовского [4], очаги эритропоэза и гранулоцитопоэза обнаруживаются в слизистой тонкой кишки и желудка, печени, почке, гонадах, лимфатических узлах, эпикарде, перикарде, матке, вокруг мелких сосудов, в коже. Диафиз длинных трубчатых костей и селезенка вновь становятся местом активного эритропоэза. Очаги кроветворения, по словам И.В. Давыдовского [4], появляются в местах, которые никакого отношения к кроветворению не имеют. В этом получила отражение разобщенность медиков и биологов. Все названные места локализации экстрамедуллярных очагов кроветворения (сюда следует добавить полость черепа над IV желудочком), по данным биологов, являются местами локализации органов кроветворения у животных, стоящих на более низких ступенях эволюционной лестницы, главным образом у рыб [3, 22]. Подробности филогенетического и онтогенетического развития кроветворной ткани представлены в ряде статей и руководств [3, 22, 25].

Такое множественное появление очагов внекостномозгового кроветворения является проявлением топографической рекапитуляции, которая легко распознается и масштабы которой указывают на тяжесть заболевания. Перечень мест появления очагов кроветворения также дает очень важную информацию о глубине рекапитуляции. В филогенезе первый кроветворный орган появляется в кишечнике у круглоротых – самых примитивных позвоночных животных, а следовательно, очень далеких предков млекопитающих. Появление таких очагов вокруг мелких сосудов и в коже (диффузный тип кроветворения) свидетельствует о еще более глубокой рекапитуляции, характерной для беспозвоночных животных, в частности для червей. В процессе филогенетического развития одновременно с увеличением количества перечисленных кроветворных органов происходит и их более узкая специализация. Некоторые из них перестают быть универсальными органами гемопоэза и специализируются либо на эритропоэзе, либо на лимфопоэзе, либо на гранулоцитопоэзе, поэтому возобновление в селезенке и печени при ХЛ и ЗА универсального кроветворения является также признаком рекапитуляции. Они утратили универсальность гемопоэза, соответственно, уже у рептилий и бесхвостых амфибий [22]. Аналогичный возврат функции универсального кроветворения отмечен и в отношении почки и кишки. При ХЛ и ЗА очень четко проявляются и другие признаки рекапитуляции: вновь начинает синтезироваться эмбриональный гемоглобин, снова начинает превалировать мегалобластический тип кроветворения с меньшим содержанием в клетках ге-

моглобина, что усугубляет несостоятельность системы кроветворных органов и увеличивает степень анемии.

Если отвлечься от этиологии, патогенеза, прогноза и других вопросов, характеризующих специфику данных болезней, и остановиться на основных вехах их неспецифических «попутчиков», можно сделать следующее заключение. Явными компонентами этих заболеваний являются разрушение ткани органов, их функциональная недостаточность, признаки морфофункциональной компенсации этой недостаточности за счет включения механизма рекапитуляции – и конечный результат: увеличение сроков жизни больных, что, безусловно, является положительной стороной этого процесса. Острые лейкозы не сопровождаются появлением экстрамедуллярного кроветворения, и сроки жизни таких больных несоизмеримо короче. К числу отрицательных сторон процесса рекапитуляции следует отнести их нежелательное появление в ряде мест из-за того, что они являются объемными образованиями (величиной с грецкий орех), которые могут быть причиной серьезных нарушений функции (в сердце или черепной полости) и ошибочного диагноза [9]. Другими словами, при рассматриваемой патологии налицо те же компоненты процесса, которые имеются при любом регенерационном процессе: повреждение органа, его функциональная несостоятельность, регенерационный рост и окончательный регенерационный эффект. Это указывает на то, что при хроническом лейкозе и злокачественной анемии разворачиваются восстановительные процессы, так как идет регенерация, конечный итог которой не дает полного и полноценного восстановления поврежденной тканевой структуры, что обычно характерно для регенерации патологически измененных органов.

Третье рассматриваемое нами заболевание – истинная полицитемия (эритремия, плетора), сопровождаемая появлением экстрамедуллярных очагов кроветворения; она принципиально отличается от ХЛ и ЗА тем, что на первых двух стадиях болезни характеризуется не недостаточной, а избыточной продукцией эритроцитов и, соответственно, за счет их количества, увеличением уровня гемоглобина. При полицитемии гиперплазия охватывает все ростки кроветворения. В результате усиленного эритропоэза и тромбоцитопоэза увеличивается количество эритроцитов и тромбоцитов, а следовательно, кровенаполнение органов, в том числе печени и селезенки, и повышается тромбообразование (особенно мелких сосудов). Это приводит к замедлению кровообращения и гипоксии тканей. Кислородная недостаточность тканей является тем постоянным сопутствующим признаком эритремии, который может спровоцировать необходимость компенсаторного увеличения эритропоэза, тем более что образующиеся вновь эритроциты по своим функциональным свойствам уступают нормальным (на некоторых стадиях заболевания они содержат фетальный гемоглобин, и сроки их жизни существенно короче; появляются и

единичные эритрокарициты). Однако при всем этом полицитемия – болезнь неопластического типа со всеми трудностями и нарушениями систем регуляции, как при злокачественных опухолях.

Из этого следует, что функциональная недостаточность – не единственная причина инициации рекапитуляции, хотя и весьма весомая. В то же время следует напомнить, что и регенерационные процессы в норме могут сопровождаться гиперрегенерацией, неконтролируемым ростом, переходящим в опухолевый рост.

Хроническая почечная недостаточность, как показал В.В. Разумов, сопровождается функциональной рекапитуляцией. Регуляция мочеобразования у высших и низших позвоночных отличается. У низших позвоночных она обеспечивается клубочковой фильтрацией (гидрурез), а у высших осуществляется по канальцевому типу за счет реабсорбционной и секреторной способности канальцевого эпителия (диурез). Как показал В.В. Разумов [13], по мере развития ХПН постепенно канальцевый тип регуляции изменяется на клубочковый, более древний способ мочеобразования, то есть имеет место рекапитуляция более древнего механизма мочеобразования.

Наблюдается рекапитуляция и способа метаболизма азотистых соединений, и способа их выделения из организма. При тяжелых формах ХПН азотистые метаболиты выделяются не в виде мочевины, а либо в виде аммиака (как у рыб), либо в виде мочевой кислоты (как у рептилий и птиц). Кроме того, происходит «возврат» способа их выведения через органы дыхания, как у рыб (жабры), и слизистые желудочно-кишечного тракта и кожные покровы [16].

Признаки морфологической рекапитуляции почки не менее демонстративны. В эволюции почки налицо поэтапное замещение менее совершенных структур более совершенными путем наставок и исчезновение (частичное) основополагающих структур: пронефрос (предпочка, дефинитивный орган у личинок рыб и амфибий) замещается мезонефросом (первичная почка, дефинитивный орган у взрослых рыб и амфибий), а затем метанефросом (вторичная почка с более совершенной канальцевой системой, включающей в себя особо важный фрагмент – петлю Генле, дефинитивный орган у птиц и млекопитающих). Совершенствуется и клубочковая система. При этом мезонефрос и канальцы пронефроса, как и хорда, совсем не исчезают. Она оказывает большое индукционное влияние на формирование мочеполовой системы в целом.

Почка относится к числу тех органов, на эволюцию функциональной деятельности которых существенное влияние оказывала адаптационная изменчивость, вызываемая изменением условий существования, образом жизни и стадией онтогенетического развития. Ее функция претерпевает изменения в зависимости от образа жизни животных, в частности при переходе от водного образа жизни к наземному, и наоборот. Если эта смена образа жизни периодически повторяется то в одну, то

в другую сторону, как у двоякодышащих рыб и амфибий, с такой же периодичностью меняется и функциональная деятельность почек от водного образа жизни к сухопутному, и наоборот.

Р. Рэфф и Т. Кофмен [16] приводят интересный пример, который свидетельствует о том, что рекапитуляция сопряжена с изменением активности генов и что они начинают функционировать до того, как наступает реальная потребность в их активации. Так, американский тритон в личиночном состоянии является аммонителическим, в процессе метаморфоза у него появляется фермент, способствующий переходу аммония в мочевины. При завершении метаморфоза тритон становится уреотелическим, при этом он меняет свою серо-зеленую окраску на красную, теряет жабры и органы боковой линии, переходит к использованию в зрительном пигменте витамина  $A_1$ , характерного для наземных животных, вместо витамина  $A_2$ , характерного для водных животных. В половозрелом возрасте тритоны возвращаются к водному образу жизни (через 3 года). В связи с этим у них происходит вторичный метаморфоз. Возвращаются признаки водного животного: окраска, плавниковая складка на хвосте, органы боковой линии, соответствующая смена уротелии аммонителией, витамина  $A_1$  на витамин  $A_2$ . Восстанавливаются все признаки водного животного, кроме жабр.

Возможность рекапитуляции костной ткани при патологических процессах показал В.В. Разумов [14] на примере хронической интоксикации фтором (флюорозы). Патоморфология этой болезни изучена очень подробно как на клиническом материале (у рабочих алюминиевых производств это профессиональное заболевание), так и в эксперименте на животных [1]. Длительное воздействие этого элемента на организм вызывает очень серьезное генерализованное повреждение костной ткани. Оно выражается в рассасывании костной ткани, деминерализации, утончении компактного слоя, остеомалиции и повышенной порозности кости вообще и в местах, в которых в норме этого не бывает, а именно в компактном слое и субпериосте, разрушении перегородок между ячейками спонгиозной кости с образованием больших лакун, которые заполняются разрастающейся в результате параллельно идущих восстановительных процессов грубоволокнистой костью. Сама спонгиозизация кости отражает проходящие в ней процессы энхондрального остеогенеза. И энхондральный остеогенез, и разрастание грубоволокнистой кости являются признаками рекапитуляции как более древние формы морфогенеза. Обращает на себя внимание очаговое сохранение участков хрящевой ткани во вновь образованной спонгиозной кости, то есть местах, где обычно ее нет. Если принять определение Р. Рэффа и Т. Кофмена об атавизме [16], то сохранение структур, относящихся к более ранним периодам развития, можно расценивать как атавистическую регенерацию. Регенерационные процессы, которые сопровождают длительно протекающее разрушение костной ткани,

приводят к нарушению архитектоники кости и атипизму ее строения. Компактный слой в таких костях неравномерен, с очаговым утончением и, наоборот, с утолщениями, и, конечно же, функционально неполноценен.

Таким образом, представленный материал свидетельствует о том, что хронические патологические процессы сопровождаются рекапитуляциями признаков филогенетического развития поврежденной органной системы. При заболеваниях, так же как при регенерации, рекапитуляция является повторной (первично она проявляется в эмбриогенезе). Она повторяется столько раз, сколько раз повторяется заболевание. Она представлена тем масштабнее, чем тяжелее заболевание. Признаки экстремедулярного кроветворения обнаруживаются при анемиях и другого генеза, но их число и топографическое разнообразие значительно меньше. В большинстве случаев рекапитуляция является проявлением компенсаторно-восстановительных процессов и направлена на восстановление функционального потенциала поврежденного органа. Рекапитуляция сродни процессам регенерации и компенсаторной гипертрофии этих органных систем.

Морфофункциональная характеристика рекапитулировавшихся структур всегда соответствует уровню эволюционной лестницы, поэтому она не может полностью компенсировать функциональные потребности более высокоорганизованного животного. Рекапитуляция при хронических заболеваниях, в отличие от рекапитуляции регенерирующих нормальных органов, характеризуется сохранением признаков атавизма до тех пор, пока сохраняются признаки заболевания. Принципиальная возможность их исчезновения при нормальной регенерации дает основания надеяться на успешные поиски условий, способствующих завершению их дифференцировки и при патологии, а следовательно, согласно учению Д.С. Саркисова о регенерации патологически измененных органов [17], на успешные поиски средств лечения этих расстройств. При этом важно помнить, что, как указывал И.И. Шмальгаузен, рекапитулирует орган, а не организм.

В связи с этим, по-видимому, следует искать средства лечения, адекватные более низкому уровню эволюционного развития поврежденного органа. Его клетки, судя по имеющимся данным, не имеют рецепторов к различным регуляторным гуморальным факторам животных более высокого класса.

## Литература

1. Авцын А.П. Патология флюороза / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков. Новосибирск: Наука, 1981. 300 с.
2. Мюллер Ф., Геккель Э. Основной биогенетический закон. Избранные работы. М. –Л.: Изд-во АН СССР, 1940. 297 с.
3. Грушко М.П. Клеточный состав кроветворных органов половозрелых самок представителей класса рыб, земновод-

- ных и пресмыкающихся: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук / М.П. Грушко. Астрахань, 2010. 50 с.
4. *Давыдовский И.В.* Патологическая анатомия и патогенез болезней человека. Т. II. Болезни систем и органов / И.В. Давыдовский. М.: Медгиз, 1958. 692 с.
  5. *Заварзин А.А.* Основы частной цитологии и сравнительной гистологии; эволюционный аспект / А.А. Заварзин. Л.: Наука, 1976. 411 с.
  6. *Карамян А.И.* Закон рекапитуляции и его значение в морфофункциональной эволюции мозга позвоночных / А.И. Карамян // Успехи современной биологии. 1974. Т. 78. № 3(6). С. 469–485.
  7. *Кнорре А.Г.* Эмбриональный гистогенез (морфологические очерки) / А.Г. Кнорре. Л.: Медицина, 1971. 432 с.
  8. *Корочкин Л.И.* Биология индивидуального развития / Л.И. Корочкин. М.: Изд-в МГУ, 2002. 263 с.
  9. *Краевский Н.А.* Патологическая анатомия и вопросы патогенеза лейкозов / Н.А. Краевский, М.Н. Немёнова, М.П. Хохлова. М.: Медицина, 1965. 420 с.
  10. *Мирзоян Э.Н.* Развитие учения о рекапитуляции / Э.Н. Мирзоян. М.: Наука, 1974. 365 с.
  11. *Молдавский М.И.* Возможность и способы проявления рекапитуляции / М.И. Молдавский // Архив патологии. 1976. Т. 38. № 4. С. 91–95.
  12. *Разумов В.В.* К ревизии представлений о конституциональных типах телосложений, инволютивном остеопорозе, характере фтористой остеопатии и причинности перестройки костной ткани с позиций системного подхода к соединительной ткани как к системе функциональной / В.В. Разумов // Методические рекомендации для терапевтов, эндокринологов, профпатологов и врачей разных специальностей, интересующихся остеологией. Новокузнецк: ИКПГ и ПЗ СО РАМН, 1998. 29 с.
  13. *Разумов В.В.* Хроническая почечная недостаточность как рекапитуляция закономерностей филогенетического развития почечных функций / В.В. Разумов // Фундаментальные исследования. 2008. № 8. С. 126–130.
  14. *Разумов В.В.* Фтористая остеопатия как рекапитуляция ранних этапов филогенетического развития костной ткани / В.В. Разумов // Фундаментальные исследования. 2008. № 8. С. 123–126.
  15. *Румянцев А.В.* Опыт исследования эволюции хрящевой и костной тканей / А.В. Румянцев. М.: Изд. АН СССР, 1958. 375 с.
  16. *Рэфф Р., Кофмен Т.* Эмбрионы, гены и эволюция / Р. Рэфф, Т. Кофмен. М.: Мир, 1986. 402 с.
  17. Регенерация и ее клиническое значение / Д.С. Саркисов. М.: Медицина, 1970. 283 с.
  18. *Северцов А.Н.* Морфологические закономерности эволюции / А.Н. Северцов. М.; Л., 1939. 610 с.
  19. *Уголев А.М.* Эволюция пищеварения и принципы эволюции пищеварительной функции / А.М. Уголев. Л.: Наука, 1985. 544 с.
  20. *Хлопин Н.Г.* Общебиологические и экспериментальные основы гистологии / Н.Г. Хлопин. Л.: Наука, 1946. С. 492.
  21. *Хлыстова З.С.* Особенности роста эпителия различного происхождения, культивируемого в организме по методу Ф.М. Лазаренко / З.С. Хлыстова // Морфология эпителия переднего отдела пищеварительной и дыхательной систем / Под ред. З.С. Хлыстовой. М.: Медицина, 1971. С. 57–62.
  22. *Хрущов Г.К.* Эволюция кроветворных органов позвоночных / Хрущов Г.К. // Лимфоидная ткань в восстановительных и защитных процессах / Под ред. А.Н. Студитского. М.: Наука, 1966. С. 7–24.
  23. *Шмальгаузен И.И.* Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии / И.И. Шмальгаузен. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1938. 144 с.
  24. *Яглов В.В., Яглова Н.В.* Основы цитологии, эмбриологии и общей гистологии / В.В. Яглов, Н.В. Яглова. М.: КолосС, 2008. 276 с.
  25. *Яглов В.В., Яглова Н.В.* Основы частной гистологии / В.В. Яглов, Н.В. Яглова. М.: КолосС, 2011. 431 с.

## RECAPITULATION AND ITS MANIFESTATIONS IN PATHOLOGICAL PROCESSES

*A.G. Babaeva, N.M. Gevorkyan, A.V. Elchaninov*

We present an analysis of the recapitulation phenomenon and its relationship to pathological processes. Prospects in the research on the signs of recapitulation and their potential use in medical practice are outlined.

*Key words:* morphofunctional recapitulation, pernicious anaemia, chronic leukemia, polycythemia, chronic kidney disease, fluorosis.

### Информация об авторах

Бабаева А.Г. – докт. мед. наук, профессор лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.  
Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Тел.: +7 (499) 120-1456.

Геворкян Н.М. – научный сотрудник НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН.  
Адрес: Москва, ул. Погодинская, д. 10. Тел.: +7 (495) 422-3987. E-mail: GevorkianN@yandex.ru

Ельчанинов А.В. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.  
Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Тел.: +7 (499) 120-1456. E-mail: elchandrey@yandex.ru



# ПРОБЛЕМЫ СОВРЕМЕННОЙ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ: ПИЩЕВОД БАРРЕТТА

*О.В. Зайратьянц<sup>1,2</sup>, Г.О. Зайратьянц<sup>1</sup>, П.Р. Мовтаева<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет Минздравсоцразвития России», Москва

<sup>2</sup> ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Пищеводом Барретта следует называть кишечную метаплазию слизистой оболочки пищевода кардиального типа, развившуюся в результате гастроэзофагеального рефлюкса, независимо от ее отношения к эндоскопически определяемому пищеводно-желудочному соединению. Перспективны дальнейшие исследования основных типов цилиндроклеточной метаплазии пищевода: кардиального, кардиального кислотопродуцирующего и кишечной метаплазии.

*Ключевые слова:* пищевод Барретта, слизистая оболочка кардиального типа, патологическая анатомия, морфогенез

Впервые железистый эпителий в пищеводе был описан, по-видимому, W. Tileston в 1906 г. В 20–30-е годы XX века уже многие авторы отмечали островки гетеротопического железистого эпителия в его разных отделах, однако классическими стали исследования N. Barrett (1950, 1957) и P. Allison и A. Johnstone (1953), которые применили такие понятия как «желудочная слизистая мембрана пищевода» и «цилиндроклеточный пищевод», расценив их как порок развития. Вначале, в 1950 г., N. Barrett предполагал возможность существования «трубчатого желудка» и только в 1957 г. согласился с выводами P. Allison, что железистый эпителий появляется в пищеводе. Термин «пищевод Барретта» (ПБ) ввел P. Allison в 1960 г., и более корректным было бы название «пищевод Аллисона–Барретта» [6].

J. Nayward в 1961 г. предположил, что патогенез ПБ связан с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью (ГЭРБ) [10]. Уже в 1970 г. это экспериментально подтвердили С. Vremner и соавт. К середине 70-х годов XX века была установлена связь между ПБ и аденокарциномой пищевода, с тех пор называемой аденокарциномой Барретта. Бокаловидные клетки в железах цилиндроклеточного пищевода, ставшие позднее главным критерием диагностики кишечной метаплазии (КМ), впервые описаны в 1951 г. L. Bosher и F. Taylor. К концу 80-х годов было доказано, что облигатным предраковым состоянием является именно неполная КМ, названная специализированным типом эпителия пищевода. В результате в 90-е годы только КМ в цилиндроклеточном пищеводе стали расценивать как морфологический субстрат ПБ. Наиболее распро-

страненные синонимы ПБ – синдром или метаплазия Барретта, специализированный цилиндрический эпителий Барретта, специализированная интестинальная метаплазия пищевода [6].

ПБ развивается в дистальной части пищевода вследствие ГЭРБ, и эти изменения следует отличать от изолированных очагов желудочной гетеротопии, локализованных преимущественно в его верхней трети. Их описывают с частотой от 4 до 70%. Они могут быть ассоциированы со стенозом пищевода, его мембранами, эзофагитом и инфекцией *H. pylori*, часто протекают бессимптомно. Риск развития в них КМ и аденокарцином считают крайне низким [6].

Определение понятия «пищевод Барретта» многократно менялось (табл. 1). Интересно, что ни один из пациентов, которых описал N. Barrett, не имел КМ, а следовательно, и ПБ [6]. Это привело ряд авторов к мнению, что использование такого неясного искусственного термина как «пищевод Барретта» препятствует пониманию того состояния, к которому он применяется [10]. Возможно, что терминологическая проблема стала одной из причин поздней диагностики и неудовлетворительных результатов лечения аденокарцином дистального отдела пищевода и пищеводно-желудочного соединения (ПЖС). Лишь у 5% пациентов с аденокарциномой пищевода до развития опухоли диагностируют ПБ. В то же время точных статистических данных о частоте аденокарцином пищевода и проксимальной трети желудка нет, так как достаточно большую группу этих опухолей не удается локализовать в пищеводе или желудке, а аденокарциномы ПЖС выделены в отдельную группу [6, 20].

История развития представлений о пищеводе Барретта [6]

Год	Автор	Дефиниция / изменения	Комментарии
1950	N. Barrett	Предлагает термин «рефлюкс-эзофагит»; оспаривает существование гетеротопии слизистой оболочки желудка; называет пищевод, покрытый цилиндрическим эпителием, трубчатым желудком	Правильно Правильно  Неправильно (ошибочно)
1953	P. Allison и A. Johnstone	Описывают пищевод, покрытый цилиндрическим эпителием; называют его желудочной слизистой мембраной; полагают, что пищевод, покрытый цилиндрическим эпителием, – врожденное состояние	Правильно  Неправильно Неправильно
1957	N. Barrett	Предлагает термин «цилиндрический пищевод» (columnar-lined esophagus); полагает, что пищевод, покрытый цилиндрическим эпителием, – врожденное состояние	Правильно  Неправильно
60-е	P. Allison et al.	Предлагают термин «пищевод Барретта» для обозначения цилиндрического пищевода	Неправильно
1961	J. Hayward	Предполагает, что пищевод, покрытый цилиндрическим эпителием, индуцирован рефлюксом; в дистальном отделе пищевода до 2 см цилиндрического эпителия является нормой; кардиальная слизистая оболочка является пищеводной, а не желудочной; ПБ – наличие цилиндрического эпителия в дистальном отделе пищевода, превышающее по длине 2 см (по мнению других авторов, 3 см)	Правильно  Неправильно  Правильно Неправильно
1976	A. Paull et al.	Классифицирует ПБ по трем гистологическим типам, нет изменений в его дефиниции	Правильно
Конец 70-х	Многие авторы	Признается, что ПБ предрасполагает к аденокарциноме	Правильно
80-е	Многие авторы	Признается, что только КМ предрасполагает к аденокарциноме. Определение ПБ требует наличия КМ в дополнение к правилу «2–3 см выше ПЖС»	Правильно Неправильно
90-е	S. Spechler	Признается короткий сегмент ПБ (КМ в цилиндрическом эпителии меньше 2 см длиной)	Правильно
90-е	Многие авторы	ПБ – это КМ в любом видимом сегменте цилиндрического (железистого) эпителия в любой части пищевода. Деление на длинный, короткий и ультракороткий сегменты ПБ	Правильно
2006	P. Chandrasoma и T. DeMeester	ПБ – это КМ слизистой оболочки пищевода кардиального типа независимо от ее отношения к эндоскопически определяемому ПЖС	Правильно

До 80-х годов прошлого столетия диагноз «пищевод Барретта» ставили при выявлении в пищеводе железистого (цилиндрического) эпителия любого гистологического типа с минимальной длиной такого сегмента 2–3 см выше ПЖС. В конце 80-х годов были введены понятия «длинный сегмент ПБ» (более 2–3 см), «короткий сегмент ПБ» (менее 2–3 см над ПЖС) и позднее «ультракороткий сегмент ПБ» (для обозначения КМ на уровне Z-линии, до настоящего времени его нередко ошибочно описывают как КМ кардии желудка) [10, 15, 22].

Согласно современным международным критериям, основанным на предложениях Американской гастроэнтерологической ассоциации, диагноз «пищевод

Барретта» ставят при выявлении специализированного эпителия (неполной КМ) в биоптатах, взятых в эндоскопически визуализирующемся цилиндрическом пищеводе любой длины выше ПЖС. Диагностика ПБ включает в себя два этапа – эндоскопический и, только при выявлении патологии, морфологический. Так как применяют в основном рутинные методы эндоскопии и часто ошибаются в определении расположения ПЖС, определенная часть ПБ остается недиагностированной [6, 18].

Доказано, что КМ всегда развивается в ранее существовавшем цилиндрическом сегменте пищевода, причем нередко дистальнее конца трубчатого пищевода, в его расширенной при ГЭРБ части, эндоско-

Таблица 3

**Рекомендуемый протокол биопсии для диагностики пищевода Барретта [6]**

Локализация биопсии	Обстоятельства	Цель
В области Z-линии, попытаться взять биоптаты с двух сторон от этой линии	Всегда	Определить проксимальный предел цилиндроклеточного сегмента пищевода; определить эпителий в области проксимальной границы цилиндроклеточного сегмента пищевода
2–3 см дистальнее конца трубчатого пищевода	Всегда	Найти кислотопродуцирующую слизистую оболочку, чтобы определить дистальный край цилиндроклеточного сегмента пищевода
1 см дистальнее конца трубчатого пищевода	Всегда	Определяет ГЭРБ на стадии расширения дистального конца пищевода. Диагностирует микроскопический ПБ
Выполнение биопсии в интервале 1–2 см между ПЖС и Z-линией	Когда цилиндроклеточный пищевод виден эндоскопически	Определяет длину цилиндроклеточного сегмента пищевода. Картирование эпителиального состава цилиндроклеточного сегмента пищевода
Антрум и тело желудка	Всегда	Определяет сопутствующую патологию желудка

пически неотличимой от желудка. ПБ такого типа в настоящее время обычно пропускают из-за трудности эндоскопической диагностики ПЖС и рекомендаций, согласно которым пациентам без видимых эндоскопических изменений пищевода биопсию не проводят. Следует согласиться с предложением P. Chandrasoma и T. DeMeester уточнить определение ПБ как КМ слизистой оболочки пищевода кардиального типа независимо от ее отношения к эндоскопически определяемому ПЖС и отказаться от терминов КМ ПЖС или кардии желудка [6].

Эндоскопическое исследование пищевода с целью диагностики ПБ требуется в настоящее время проводить по пражской системе С и М критериев (табл. 2) [19] с взятием биоптатов, начиная от плоского эпителия пищевода проксимально до фундальной (желудочной) слизистой оболочки – дистально (табл. 3) [1]. При этом

Таблица 2

**Пражские С и М критерии эндоскопической диагностики пищевода Барретта [19]**

<p><b>Общие комментарии</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• глубина введения эндоскопа в сантиметрах определяется от места непосредственно перед характерным признаком, видимым полностью при извлечении эндоскопа;</li> <li>• для любой протяженности эндоскопически видимого ПБ меньше 1 см от ПЖС указывается длина сегмента ПБ меньше 1 см; для другой длины значение в сантиметрах округляется</li> </ul>
<p><b>Ориентиры при определении ПЖС</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• проксимальные границы (верхушки) желудочных складок</li> <li>• циркулярное кольцо или сужение над проксимальными краями желудочных складок (дистальный конец нижнего пищеводного сфинктера)</li> </ul>
<p><b>Ориентиры при определении границ ПБ</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• если имеется любое эндоскопическое подозрение на ПБ, должна быть определена протяженность циркулярных и любых проксимальных пальцевидных изменений</li> <li>• необходимо отметить точную глубину введения эндоскопа для проксимальных краев циркулярного сегмента и самого длинного пальцевидного сегмента ПБ</li> </ul>
<p><b>Заключение о распространенности эндоскопически выявляемого ПБ</b></p> <p>расчет циркулярного (С) и максимального (М) размеров, где С – разность в сантиметрах расстояния при введении эндоскопа между ПЖС и проксимальным краем циркулярного сегмента ПБ, а М – разность в глубине введения эндоскопа между позициями, зарегистрированными для ПЖС, и проксимальным краем максимально длинного линейного сегмента ПБ (в это определение не включены островки цилиндроклеточной метаплазии)</p> <p>Например, С3М5 – циркулярный сегмент ПБ длиной 3 см выше ПЖС и длина максимального линейного сегмента распространения – 5 см выше ПЖС;</p> <p>С &lt; 1М &lt; 1 – циркулярный сегмент ПБ меньше 1 см выше ПЖС и максимальное линейное распространение меньше 1 см выше ПЖС (эквивалентно иррегулярной Z-линии)</p>

выявление КМ даже в единственном биоптате, взятом выше ПЖС, достаточно для установления диагноза «пищевод Барретта» [9].

По локализации и распространенности выделяют два типа цилиндроклеточной слизистой оболочки пищевода: очаговый (островковый) и циркулярный (круговой с разной длиной «языков» линейного распространения). Очаговый тип может прогрессировать в циркулярный, причем стриктуры и язвы пищевода выявляются только у больных с циркулярным типом [15]. Несмотря на внедрение в практику новых методов эндоскопии (хромоскопия, электронная высокого разрешения, спектроскопия, оптическая когерентная томография, конфокальная микроскопия и т.д.), золотым стандартом диагностики ПБ остается гистологическое исследование биоптатов [1, 6].

Длинный сегмент ПБ чаще встречается у мужчин (соотношение мужчин и женщин составляет 4–8 : 1).

По мере уменьшения длины сегмента ПБ, особенно при ультракоротком сегменте ПБ, соотношение мужчин и женщин выравнивается. Половые различия при ПБ соответствуют гендерным особенностям аденокарциномы дистального отдела пищевода, которая является преимущественно болезнью мужчин, по сравнению с так называемой переходной аденокарциномой или аденокарциномой кардии желудка, частота которой у мужчин и женщин приблизительно одинакова [6].

Эндоскопические ошибки верификации ПЖС приводят к неверному выбору точек взятия биопсий и ошибочным гистологическим заключениям. Известные ориентиры ПЖС относительны или недоступны при рутинном эндоскопическом исследовании: дистальный край нижнего пищеводного сфинктера, дубликатура брюшины, точка прикрепления френозофагеальных связок, острый угол Гиса, проксимальный конец желудочных складок, дистальный край продольных вен подслизистого слоя пищевода, переход циркулярного и продольного мышечных слоев пищевода в мышечные слои стенки желудка, подслизистые эзофагеальные трубчато-альвеолярные железы [6, 15, 20].

Хотя наиболее серьезные анатомические аномалии дистального отдела пищевода наблюдаются при грыже пищеводного отверстия диафрагмы, и при ГЭРБ у большинства пациентов на 1–2 см и более расширяется дистальный отдел пищевода, имитируя кардию желудка, укорачивается его нижний сфинктер, смещаются угол Гиса, края складок пищевода и желудка [7].

Место плоскоклеточно-цилиндроклеточного перехода (зубчатая, или Z, линия) не может служить критерием ПЖС. Z-линия часто не совпадает с ПЖС, а у большинства взрослых пациентов она располагается на 1–2 см проксимальнее него [7]. A. Csendes и соавт. [12] показали, что такое перемещение Z-линии с возрастом – результат цилиндроклеточной метаплазии поврежденного рефлюксом пищевода даже у пациентов без клинических проявлений ГЭРБ. Рутинное эндоскопическое исследование, кроме того, не позволяет дифференцировать типы цилиндроклеточной слизистой оболочки.

Следует выделять три гистологических типа цилиндроклеточной (метаплазированной) слизистой оболочки пищевода, обусловленной ГЭРБ [6, 13, 22]: кардиальный (только со слизьпродуцирующими клетками), кардиальный кислотопродуцирующий (с разным количеством париетальных клеток) и КМ (специализированный).

Один из синонимов слизистой оболочки пищевода кардиального типа – переходная слизистая оболочка. Этот устаревший термин, предложенный впервые описавшем ее J. Hayward [10], создает иллюзию, что ПЖС является зоной определенной длины с особым типом слизистой оболочки. J. Hayward предположил, что слизистая оболочка кардиального (переходного) типа резистентна к рефлюксу и предохраняет дистальные 1–2 см пищевода от воздействия желудоч-

ного сока [10], однако позже было показано, что при ГЭРБ в ней неизменно развиваются воспаление, реактивная гиперплазия ямочной области с удлинением и растяжением слизистых клеток, пролиферация гладкомышечных клеток, коррелирующие с тяжестью рефлюкса [5]. Обычно такая слизистая оболочка имеет ворсинчатую поверхность, часто отличается короткими ямочными углублениями без правильно сформированных желез (фовеолярный тип), хотя последние могут быть полностью сформированы (железистый тип), но представлены только слизистыми клетками. Железы слизистой оболочки кардиального типа никогда не содержат париетальные или бокаловидные клетки. В ней могут выявляться клетки Панета, нейроэндокринные и панкреатические клетки, что не имеет клинического значения [6]. P. Chandrasoma и T. DeMeester [6] предложили для ее обозначения новый термин – метаплазированный цилиндроклеточный эпителий пищевода, тип I.

Некоторые авторы рассматривают как варианты слизистой оболочки кардиального типа однослойный цилиндрический эпителий в фазе заживления эрозий и язв пищевода, а также многослойный цилиндрический, сходный с нецилиарным псевдомногослойным. В нем может наблюдаться примесь плоских неороговевающих или базалоидных (резервных) клеток с формированием смешанного плоского неороговевающе-кардиального эпителия [6].

Поверхностный эпителий слизистой оболочки кардиального типа в основном состоит из одного слоя цилиндрических клеток с апикальной локализацией нейтрального муцина, идентичного желудочному. Иногда поверхностный эпителий местами бывает многослойным, представлен 4–7 слоями клеток, и выглядит как псевдомногослойный нецилиарный цилиндрический эпителий в виде смеси базалоидных плоских неороговевающих клеток в нижней части и цилиндрических призматических клеток в поверхностном слое. Присутствие такого эпителия ассоциировано с ГЭРБ [6].

Анатомическое понятие «кардия» (кардиальный отдел желудка) не имеет отношения к гистологическому термину «слизистая оболочка кардиального типа» и используется для обозначения неопределенной по протяженности (0,3–5 см) проксимальной части желудка, начиная от ПЖС [14].

После работ J. Hayward [10] долгое время было принято считать, что слизистая оболочка кардиального (переходного) типа является вариантом нормы и распространяется проксимально на 1–2 см в пищевод и дистально в кардию желудка. Согласно рекомендациям Американской гастроэнтерологической ассоциации, биопсию проводят только при эндоскопически диагностированной цилиндроклеточной (железистой) метаплазии пищевода, поэтому практически всегда в таких биоптатах выявляется слизистая оболочка кардиального, реже – других типов. Однако в биоптатах у «эндоскопически нормальных» пациентов слизистая

оболочка кардиального типа диагностируется значительно реже [6]. Ряд исследований показал, что слизистая оболочка кардиального типа в норме вообще отсутствует даже в кардии желудка примерно у 30% людей, причем имеется тенденция к ее появлению и/или увеличению длины с возрастом. При этом локализуется она чаще в кардии желудка в пределах не более чем 0,4–3 см дистальнее ПЖС. У детей типичен непосредственный переход плоского эпителия пищевода в фундальную (кислотопродуцирующую) слизистую оболочку желудка [11, 23].

Таким образом, нельзя исключить, что слизистая оболочка кардиального типа не только в пищеводе, но и в области ПЖС с распространением на кардию желудка является не вариантом нормы, а патологическим процессом, метаплазией плоского эпителия пищевода в результате гастроэзофагеального рефлюкса. Предполагают, что ее присутствие даже в микроскопических количествах в области ПЖС свидетельствует о существовании такого рефлюкса, а распространенность и протяженность с возрастом увеличиваются параллельно с частотой рефлюкса [13]. P. Chandrasoma и T. DeMeester [6] предлагают отказаться от использования термина «кардия», который в разное время являлся синонимом нижнего пищеводного сфинктера или проксимального отдела желудка и вносит неоднозначность в результаты биопсийных исследований изменений слизистой оболочки в области ПЖС.

P. Chandrasoma и T. DeMeester полагают, что слизистая оболочка кардиального типа по локализации и морфогенезу всегда является эзофагеальной [6], независимо от противоположного эндоскопического мнения, а в кардии желудка она диагностируется при ошибках определения ПЖС, поэтому истинное расположение ПЖС в норме и у пациентов с цилиндроклеточным пищеводом – это проксимальный край фундальной (кислотообразующей) слизистой оболочки желудка. Следовательно, при обнаружении в биоптате из области ПЖС слизистой оболочки кардиального типа ошибочно предполагать, что биопсия взята из кардии желудка [6].

Другим типом метаплазированной слизистой оболочки пищевода является кардиальная кислотопродуцирующая. Она диагностируется при выявлении желез, состоящих из смеси слизистых и париетальных (кислотопродуцирующих) клеток. При этом достаточно обнаружения в биоптате даже в одной железе одной париетальной клетки. Этот термин, как и «метаплазированный цилиндроклеточный эпителий пищевода, тип II», предложен P. Chandrasoma [6], а его синонимы – фундальный тип эпителия, определяемый в пищеводе [22], смешанная железистая слизистая оболочка, смешанная муцинозная/кислотопродуцирующая слизистая оболочка, переходный эпителий [13]. Когда париетальных клеток много, а слизистые клетки единичны, она становится трудноразличимой с фундальной слизистой оболочкой желудка. В ней могут присутствовать клетки Панета, панкреатические, нейроэндокринные

и даже главные (пепсиногенпродуцирующие) клетки, которые играют важную роль в генезе пептического повреждения пищевода [6].

Различия между кардиальным и кислотопродуцирующим кардиальным типами слизистой оболочки имеют фундаментальное значение. Появление париетальных клеток обусловлено экспрессией Sonic Hedgehog гена, что препятствует генетическим изменениям, ведущим к развитию КМ и создающим риск малигнизации [6], поэтому КМ возникает только в слизистой оболочке кардиального типа и никогда не наблюдается в кислотопродуцирующей [6, 22]. Слизистая оболочка кардиального кислотопродуцирующего типа является пищеводной по локализации и морфогенезу, выявляется в наиболее дистальной части цилиндроклеточного пищевода, обычно «вставлена» между кардиальной (проксимально) и фундальной (дистально). Ее переход в фундальную представляет собой истинную ПЖС. Она почти универсально представлена в ПЖС у взрослых и нередко встречается без сочетания с кардиальной. Ее следует рассматривать как маркер вызванного рефлюксом повреждения дистального отдела пищевода. Полагают, что ее присутствие почти у каждого взрослого человека свидетельствует о вездесущности рефлюкса, аналогично, например, широкому распространению в популяции атеросклероза [6].

КМ цилиндроклеточного эпителия пищевода характеризуется появлением бокаловидных клеток в поверхностном эпителии и/или в ямках и железах. Этиология и патогенез КМ в пищеводе и желудке различны. КМ в пищеводе развивается исключительно в ранее существовавшей слизистой оболочке кардиального типа. Синонимы КМ – специализированный эпителий [22] и специализированная КМ [6]. По мнению одних авторов, высокий риск развития аденокарциномы пищевода не зависит от площади распространения КМ [8]. Другие полагают, что он минимален при ее малых фокусах [18]. В биоптатах из области ПЖС при нормальной эндоскопической картине у пациентов, страдающих ГЭРБ, КМ обнаруживают в 5–15% случаев [21]. Иногда употребляемый термин «КМ кардии» не имеет смысла и обусловлен ошибками эндоскопического определения ПЖС. При четкой эндоскопической диагностике локализации ПЖС КМ кардии разделяется на КМ пищевода (собственно, ПБ) и КМ желудка [6].

Показано, что «генетическим переключателем», вызывающим кишечную дифференцировку в слизистой оболочке кардиального типа, является активизация системы homeobox генов транскрипции Cdx1 и Cdx2, экспрессированных в нормальной тонкой и толстой кишке. Эти гены в норме подавлены в пищеводе и желудке, но экспрессированы в большинстве случаев при ПБ [17].

Распространенность КМ растет по мере увеличения длины цилиндроклеточного сегмента пищевода. КМ чаще выявляют в наиболее проксимальной части цилиндроклеточного пищевода, слизистую оболочку кардиального кислотопродуцирующего типа – в наи-

более дистальной, а кардиального типа – между ними [6, 22]. Следовательно, присутствие КМ предотвращает дальнейшую цилиндроклеточную метаплазию плоского эпителия, длинный сегмент ПБ требует длинного сегмента кардиальной метаплазии прежде, чем в его пределах разовьется КМ, а короткий сегмент не прогрессирует в длинный, и у больных с микроскопически сегментами никогда не возникнет эндоскопически видимый ПБ [6].

КМ пищевода с наличием клеточных элементов, сходных с характерными для тонкой или толстой кишки, раньше расценивали, соответственно, как тонкокишечную или толстокишечную. Тонкокишечную отождествляли с полной КМ (метаплазия с наличием всех клеток, свойственных тонкой кишке), а толстокишечную – с неполной. В последние годы показана несостоятельность таких суждений. Даже при так называемой полной КМ не обнаруживают весь спектр клеток и их специализацию, характерные для тонкой кишки [1]. По-видимому, говорить о полной КМ в цилиндроклеточном пищеводе некорректно. Более перспективно выделение типов КМ на основании гистохимической верификация муцинов в цилиндрических клетках [6]: полная (условно) КМ (цилиндрические клетки не содержат муцинов, выявляется щеточная каемка, но специализация клеток все равно недостаточна); неполная КМ (цилиндрические клетки содержат кислые сиаломуцины); неполная толстокишечная КМ (цилиндрические клетки содержат сульфомуцины). Сиаломуцины окрашиваются альциановым синим (рН 2,5), а сульфатированные муцины – диаминном железом [6]. Риск неопластической трансформации наиболее высок при КМ с преобладанием сульфатированных муцинов в цилиндрических (не бокаловидных) клетках [3].

Возможна гипердиагностика КМ в связи с наличием в биоптате псевдобокаловидных клеток – слизистых клеток с вакуолями муцина (обычно множественными, с нечеткими границами, а не единичными, с четкими границами, как у истинных бокаловидных клеток). Важно, что они положительно окрашиваются альциановым синим (цилиндрические синие клетки), так же как истинные бокаловидные клетки, поэтому его применение, как и PAS-реакции, увеличивает вероятность ложнопозитивной диагностики КМ пищевода [6]. С практической точки зрения специфичность диагностики КМ важнее, чем ее чувствительность, так как диагноз «пищевод Барретта» – абсолютное показание для пожизненного наблюдения за больными, требующего значительных расходов и дискомфортного (оно должно быть ограничено только теми пациентами, у которых диагноз представляется точным) [6].

При необходимости проведения дифференциальной диагностики КМ пищевода и желудка рекомендуется использовать моноклональные антитела к виллину – актинсвязывающему белку щеточной каемки интестинального эпителия. Виллин определяется и в клетках аденокарцином пищевода. Фермент щеточ-

ной каемки тонкокишечных энтероцитов сукразо-изомальтаза также высокоспецифичен и выявляется в 82% аденокарцином пищевода. Результаты изучения экспрессии различных типов цитокератинов оказались недостоверными [6].

Эпителиоциты при КМ отличаются высоким пролиферативным индексом (экспрессией Ki-67), ассоциированным с экспрессией циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) и индуцибельной синтазы окиси азота (iNOS). Показано, что их экспрессия нарастает в последовательности КМ – дисплазия – аденокарцинома [6]. Три группы специфических железистых маркеров – *trefoil*-пептиды, человеческий спазмолитический полипептид (*hsp*) и кишечный специфический фактор транскрипции (CDX) – также повышено экспрессируются при ПБ по сравнению с плоским эпителием, подтверждая тот факт, что цилиндроклеточная трансформация плоского эпителия, возможно, служит ответом на хроническое воспаление, нарушающее процесс клеточной пролиферации и дифференцировки. Повышенная экспрессия в слизистой пищевода ЦОГ-2 – фермента, участвующего в регуляции воспаления и канцерогенеза, подтверждает эту гипотезу. Кроме того, исследования *in vivo* показали, что экспрессия гена ЦОГ-2 индуцируется желчными кислотами, компонентами желудочного секрета и может служить потенциальной мишенью хемофилактики [6].

Дисплазию эпителия при ПБ принято делить на низкую и высокую (тяжелую). Низкая встречается у 5% пациентов с ПБ, высокая – у 34%. Время прогрессии от низкой до высокой составляет от 1,5 до 4 лет, от высокой дисплазии до аденокарциномы – от 0,5 года до 2 лет. Частота развития аденокарциномы на фоне тяжелой дисплазии, по данным разных авторов, – от 8 до 75% [2].

Морфогенез цилиндроклеточного пищевода в настоящее время связывают не с проксимальной миграцией цилиндрического эпителия кардии желудка или врожденной эктопией железистого эпителия, хотя в отдельных случаях этого исключить нельзя [2], а с многоэтапным процессом нарушения дифференцировки мультипотентных стволовых клеток плоского эпителия пищевода под влиянием гастроэзофагеального рефлюкса. Главными кандидатами на эти стволовые клетки являются базальные клетки слизистой оболочки пищевода и клетки протоков эзофагеальных желез. Электронномикроскопически при ПБ обнаруживают клетки-гибриды с ультраструктурными особенностями как железистого, так и плоского неороговевающего эпителия [6]. Вначале при метаплазии многослойного плоского эпителия при ГЭРБ в результате комплекса изменений, которые являются высокоспецифичными для рефлюкса, возникает слизистая оболочка кардиального типа, наименее дифференцированная и состоящая только из слизистых клеток. Такая метаплазия не воспроизводится ни любым другим известным агентом, вызывающим повреждение пищевода, ни химическими

веществами, ни лекарствами, ни коррозивными или инфекционными агентами, в то время как другие виды повреждения плоского эпителия неспецифичны для ГЭРБ и могут возникать при других болезнях. Область метапластической трансформации сначала мала, возможно, состоит из одной клетки, но изменения имеют тенденцию к кумуляции [6].

Молекулярные агенты гастроэзофагеального рефлюксата и рецепторы клеток-предшественников, которые являются причиной переключения дифференцировки клеток пищевода, неизвестны. Доказано, что кислота действует только как ключ, который разрешает доступ многим молекулам к стволовым клеткам плоского эпителия. На роль молекул, влияющих на их дифференцировку, претендуют прежде всего холевая и дигидрохолевая желчные кислоты, которые дозозависимо увеличивают активность промотора Cdx2 и продукцию белка Cdx2 кератиноцитов пищевода [6, 9].

В морфогенезе ПБ можно выделить несколько фаз. Вначале молекулы рефлюксата вызывают повреждение плоского эпителия пищевода и его метаплазию в слизистую оболочку кардиального типа. Далее рассматривают разные варианты развития событий. Во-первых, может быть полная реверсия к плоскому эпителию, хотя без лечения это маловероятно. Во-вторых, может прогрессировать повреждение с воспалением, эрозиями и язвами (рефлюкс-эзофагит). В-третьих, могут появляться париетальные клетки с трансформацией слизистой оболочки кардиального типа в кислотопродуцирующий (благоприятный исход) или возникать бокаловидные клетки с развитием КМ, то есть, по современным представлениям, формироваться ПБ. КМ является наиболее восприимчивым типом слизистой оболочки к действию канцерогенных веществ рефлюксата [6].

Следует учитывать, что плоскоклеточная реэпителизация поверхности очага КМ часто сочетается с его сохранением ниже плоского эпителия и риском развития аденокарциномы [6]. В части наблюдений ПБ отмечают гиперплазию и фиброз мышечной пластинки слизистой оболочки пищевода, атрофию, очаговую гиперплазию и деформацию подслизистых эзофагеальных желез, нередко с дисплазией и иррегулярной компрессией протоков, что может вызвать трудности в дифференциальной диагностике с аденокарциномой [16].

Таким образом, необходимы дальнейшие исследования слизистой оболочки дистальной части пищевода, ПЖС и кардии желудка в норме и патологии. Целесообразно определять ПБ как развившуюся в результате гастроэзофагеального рефлюкса КМ слизистой оболочки пищевода кардиального типа независимо от ее отношения к эндоскопически определяемому ПЖС. Больных со слизистой оболочкой пищевода кардиального типа следует относить к группе риска развития ПБ, а пациентов с ПБ, соответственно, – аденокар-

циномы. При эндоскопическом исследовании важны настороженность в идентификации ультракороткого сегмента ПБ и взятие достаточного объема точно ориентированных биоптатов.

## Литература

1. Аруин Л.И. Пищевод Барретта и *Helicobacter pylori* // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2000. Т. 10. № 2. С. 5–9.
2. Белоус Т.А. Пищевод Барретта: морфологические основы развития // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2002. Т. 12. № 5. С. 63–66.
3. Barrett's esophagus: Correlation between mucin histochemistry, flow cytometry, and histologic diagnosis for predicting increased cancer risk / R.C. Haggitt et al. // Am. J. Pathol. 1988. V. 131. P. 53–61.
4. Basaloid-squamous carcinoma of the upper aerodigestive tract and so-called adenoid cystic carcinoma of the oesophagus: the same tumour type? / W.Y.W. Tsang et al. // Histopathology. 1991. V. 19. P. 35–9.
5. Carditis: A manifestation of gastroesophageal reflux disease / R. Der et al. // Am. J. Surg. Pathol. 2001. V. 25. P. 245–52.
6. Chandrasoma P.T. GERD. Reflux to Esophageal Adenocarcinoma / T.R. DeMeester – Amsterdam etc.: Academic. Press, 2006. 375 p.
7. Diagnostic inconsistencies in Barrett's esophagus / S.L. Kim et al. // Gastroenterology. 1994. V. 107. P. 945–9.
8. Effect of segment length on risk for neoplastic progression in patients with Barrett esophagus / R.E. Rudolph et al. // Ann. Intern. Med. 2000. V. 132. P. 612–20.
9. Gastrointestinal Pathology. Atlas and Text. /Ed. by C.Fenoglio-Preiser et al. 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999. 981 p.
10. Hayward J. The lower end of the oesophagus // Thorax. 1961. V. 16. P. 36–41.
11. Histology of gastroesophageal junction in fetal and pediatric autopsy / Y.S. Park et al. // Arch. Pathol. Lab. Med. 2003. V. 127. P. 451–5.
12. Location of the lower esophageal sphincter and the squamocolumar mucosal junction in 109 healthy controls and 778 patients with different degrees of endoscopic esophagitis / A. Csendes et al. // Gut. 1993. V. 34. P. 21–7.
13. Morphology of the cardia and significance of carditis in pediatric patients / J.N. Glickman et al. // Am. J. Surg. Pathol. 2002. V. 26. P. 1032–9.
14. On the existence and location of cardiac mucosa: An autopsy study in embryos, fetuses, and infants / G.De Hertogh et al. // Gut. 2003. V. 52. P. 791–6.
15. Optimal number of biopsy specimens in the diagnosis of carcinoma of the esophagus / N. Lal et al. // Gut. 1992. V. 33. P. 724–31.
16. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma / A.M. Mandard et al. // Cancer. 1994. V. 73. P. 2680–91.
17. Phillips R.W. Cdx2 as a marker of epithelial intestinal differentiation in the esophagus. / H.F. Frierson, C.A. Moskaluk // Am. J. Surg. Pathol. 2003. V. 27. P. 1442–7.

18. *Sampliner R.E.* Updated guidelines for the diagnosis, surveillance, and therapy of Barrett's esophagus // *Am. J. Gastroenterol.* 2002. V. 97. P. 1888–95.
19. *Sharma P.* Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma / R. Sampliner. 2nd ed. Blackwell Publishing, 2006. 580 p.
20. *Spechler S.J.* Barrett's esophagus // *N. Engl. J. Med.* 2002. V. 346. P. 836–42.
21. Specialized intestinal metaplasia, dysplasia, and cancer of the esophagus and esophagogastric junction: Prevalence and clinical data / W.K. Hirota et al. // *Gastroenterology.* 1999. V. 116. P. 277–85.
22. The histologic spectrum of Barrett's esophagus / A. Paull et al. // *N. Engl. J. Med.* 1976. V. 295. P. 476–80.
23. The presence and mucin histochemistry of cardiac type mucosa at the esophagogastric junction / W.A. Marsman et al. // *Am. J. Gastroenterol.* 2004. V. 99. P. 212–7.

## CURRENT PROBLEMS OF GASTROENTEROLOGY: BARRETT'S ESOPHAGUS

*O.V. Zayratyants, G.O. Zayratyants, P.R. Movtaeva*

Barrett's esophagus should be defined as intestinal metaplasia of esophageal cardiac type mucosa caused as a result of gastro-esophageal reflux, regardless of its relationship to endoscopically detected esophagogastric junction. Further studies of the major types of columnar metaplasia of the esophagus, namely cardiac, acid-producing cardiac and intestinal types of metaplasia, are promising.

*Key words:* Barrett's esophagus, esophageal cardiac type mucosa, patomorphology, morphogenesis.

### Информация об авторах

Зайратьянц О.В. – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета; ведущий научный сотрудник НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Стромьнка, д. 7, ГКБ № 14 им. В.Г. Короленко, корпус 10, кафедра патологической анатомии.

Телефон: 8 (499) 268 2330. E-mail: ovzair@mail.ru

Зайратьянц Г.О. – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета.

Адрес: Москва, ул. Стромьнка, д. 7, ГКБ № 14 им. В.Г. Короленко, корпус 10, кафедра патологической анатомии.

Телефон: 8 (499) 268 2330. E-mail: ovzair@mail.ru

Мовтаева П.Р. – аспирант кафедры патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета.

Адрес: Москва, ул. Стромьнка, д. 7, ГКБ № 14 им. В.Г. Короленко, корпус 10, кафедра патологической анатомии.

Телефон: 8 (499) 268 2330. E-mail: ovzair@mail.ru



# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПИЩЕВОДА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

*Л.М. Михалева<sup>1</sup>, Т.Г. Бархина<sup>1</sup>, Н.Н. Щеголева<sup>1</sup>, Е.В. Иванова<sup>2</sup>, В.Е. Голованова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва

Цель исследования – изучение морфофункционального состояния слизистой оболочки пищевода у пациентов, страдающих бронхиальной астмой разной степени тяжести, в зависимости от вида проводимой противовоспалительной терапии. На материале изучения 18 биоптатов слизистой оболочки пищевода подтверждено сочетанное течение бронхиальной астмы и эозинофильного эзофагита, а также сочетание бронхиальной астмы с неспецифическим хроническим эзофагитом, усугубляющимся по мере прогрессирования астмы. Обоснована необходимость дифференцированной тактики и ведения больных бронхиальной астмой с сопутствующей патологией пищевода и обращено внимание на проблему гиподиагностики и неэффективности лечения эозинофильного эзофагита при бронхиальной астме.

*Ключевые слова:* бронхиальная астма, эозинофильный эзофагит, кортикостероидная терапия

Бронхиальная астма (БА) за последние годы из гурбо медицинской проблемы превратилась в социальную и экономическую [12]. Несмотря на большое число работ, посвященных изучению механизмов патогенеза БА, морфологическим особенностям совместного реагирования пограничных тканей уделяется недостаточное внимание. Единство повреждения барьерных слизистых оболочек проявляется стереотипностью морфологических изменений органов и систем, являющихся основой концепции реакций пограничных тканей в современных экологических условиях [4, 5]. Взаимодействующие иммунокомпетентные клетки и клетки слизистых оболочек дыхательной и пищеварительной систем выполняют барьерные и защитные функции, сталкиваются с одними и теми же аллергенами и раздражителями.

В клинической практике часто можно наблюдать сочетание БА с патологией желудочно-кишечного тракта, которая в своих проявлениях может быть чрезвычайно многообразна [1, 2, 3, 10]. Как правило, сочетанное течение патологии органов дыхания и пищеварения носит взаимоотношающийся характер, а заболевания желудка и пищевода придается большое значение в возникновении обострений БА [2, 8].

Клиницисты имеют убедительные данные о тесной взаимосвязи БА с патологией органов брюшной полости. При этом, несмотря на ряд работ в данной области, многие частные, особенно практические, вопросы остаются недостаточно изученными. Особого внимания заслуживает вопрос об эозинофильном эзо-

фагите, гистологические критерии которого в отличие от клинических четко определены. Нельзя не сказать о том, что недостаточная осведомленность клиницистов об этой патологии препятствует ее полноценной диагностике и эффективному лечению.

Положительный эффект от приема физиологических доз глюкокортикостероидов (менее 15 мг/сут в пересчете на преднизолон) подтверждается некоторыми исследователями и на основании изучения иммуноглобулинов и циркулирующих иммунных комплексов в желудочном секрете при БА [7, 13, 15, 16]. Полагают, что одним из механизмов противорозовного и протективного эффекта физиологических доз глюкокортикостероидов является их способность уменьшать иммунорексисные реакции, роль которых в формировании эзофагогастродуоденальной патологии с утяжелением БА повышается [6, 7].

Эозинофильный эзофагит (ЭЭ) является самостоятельной нозологией, так как характерный воспалительный процесс не распространяется на другие отделы пищеварительной системы [19, 20]. При бронхиальной астме ЭЭ встречается довольно часто, примерно в 40% случаев, и у 30% пациентов с эозинофильным эзофагитом обнаруживается БА [17, 20]. Около 35–45% пациентов имеют семейный анамнез пищевой аллергии или астмы. Четких критериев эндоскопической диагностики у ЭЭ нет, однако существует ряд признаков, позволяющих заподозрить эту патологию: множественные борозды, кольца, белесые наложения в проксимальном отделе пищевода, высокая травматичность

слизистой [7, 9, 17]. У 25–50% пациентов с ЭЭ эндоскопическая картина соответствует норме [14].

Таким образом, изучение структурных и иммунных реакций слизистых оболочек пищевода при БА актуально как в теоретическом, так и в практическом отношении. Понимание особенностей реагирования слизистых оболочек дыхательной и пищеварительной систем, относящихся к единой системе пограничных тканей, может внести ясность в сложные механизмы взаимного отягощения БА и патологии эзофагогастроудоденальной зоны, а также причинно-следственные взаимоотношения между этими патологическими процессами.

### Материалы и методы

Комплексное клиничко-морфологическое исследование проведено на базе городской клинической больницы № 31 Департамента здравоохранения г. Москвы. Были обследованы 18 пациентов с БА разной степени тяжести в возрасте от 17 до 74 лет, которых разделили на 3 группы в зависимости от проводимой терапии. В 1-ю группу вошли 6 больных с БА легкой степени тяжести, принимающие только ингаляционные бронхолитики, во 2-ю группу были включены 7 пациентов с БА средней степени тяжести, принимающие ингаляционные бронхолитики и ингаляционные глюкокортикостероиды, 3-ю группу составили 5 пациентов с тяжелой степенью БА, лечение которых включает помимо ингаляционных препаратов прием системных глюкокортикостероидов в дозе выше 15 мг/сут в пересчете на преднизолон. В качестве группы сравнения обследованы 5 больных терапевтического отделения с патологией эзофагогастроудоденальной зоны без БА. Всем пациентам проведена диагностическая эзофагогастроудоденоскопия с биопсией.

Для гистологического исследования биоптат брали из проксимального и дистального отделов пищевода на всю глубину эпителия с захватом собственной пластинки слизистой оболочки. Полученный материал фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. После гистологической проводки кусочки заливали в парафин, срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, проводили окраску по Маллори, ван Гизону и ШИК-реакцию в сочетании с альциановым синим. Окрашенные срезы изучены под световым бинокулярным микроскопом DLMB с цифровой камерой и анализатором изображения (Leica). Во всех группах наблюдения было проанализировано состояние структурных компонентов слизистой оболочки. Морфометрически исследовали клетки воспалительного инфильтрата. Результаты подвергали статистической обработке с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность результатов оценивали по t-критерию Стьюдента. Количественные параметры, характеризующиеся нормальным распределением, представлены в виде средней арифметической и ее ошибки ( $M \pm m$ ). Различия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В результате анализа данных световой микроскопии в 1-й группе пациентов (БА легкой степени с приемом только ингаляционных бронхолитиков) были обнаружены признаки хронического неспецифического эзофагита в проксимальном отделе в 50% случаев. Патологический процесс характеризовался отечностью эпителиальных клеток и межклеточных промежутков, участками их атрофии с образованием микроэрозий и снижением секреции нейтральных гликопротеинов, акантозом, папилломатозом, умеренной лимфоцитарной инфильтрацией слизистой оболочки и подслизистой основы с примесью эозинофильных лейкоцитов от 1 до 4 в поле зрения. Окраска по Маллори и ван Гизону выявила незначительные признаки грануляционного процесса.

Среди 7 пациентов 2-й группы (БА средней тяжести с приемом ингаляционных бронхолитиков и ингаляционных глюкокортикостероидов) имелись 3 больных с типичными признаками эозинофильного эзофагита. В биопсийном материале из проксимального отдела пищевода этих пациентов обращает на себя внимание преобладание в воспалительном инфильтрате внутриэпителиальных эозинофильных лейкоцитов от 18 до 67 в поле зрения с наличием отдельных так называемых эозинофильных абсцессов (рис. 1а, б). Характерно наличие подэпителиального склероза (рис. 1в, г). Кроме того, отмечаются резкая атрофия и отечность эпителия, акантоз. У других 4 пациентов 2-й группы обнаружены признаки хронического эзофагита, сходные с таковыми у больных из 1-й группы, но с преобладанием нейтрофилов и примесью эозинофильных лейкоцитов.

В материалах пациентов 3-й группы (БА тяжелой степени, лечение которой включает помимо ингаляционных препаратов прием системных глюкокортикостероидов) характерно преобладание склеротических и атрофических процессов над воспалительными на фоне длительного приема супрафизиологических доз системных глюкокортикостероидов. Во всех биоптатах отмечаются отечность и атрофия эпителия, выраженный подэпителиальный фиброз, умеренная лимфоцитарная инфильтрация с примесью единичных эозинофильных лейкоцитов.

В группе сравнения сходные морфологические изменения были обнаружены в 60% случаев и только в материале из дистального отдела пищевода. В тканях отмечались умеренная лимфоцитарная инфильтрация с примесью единичных эозинофильных лейкоцитов и плазматических клеток, небольшой отек и атрофия эпителия без признаков фиброза.

Результаты морфометрического исследования представлены в таблице.

Морфометрические параметры клеточного состава инфильтрата имеют достоверные различия между группами. Максимальные показатели лимфоцитарной инфильтрации отмечаются в группе сравнения, пре-

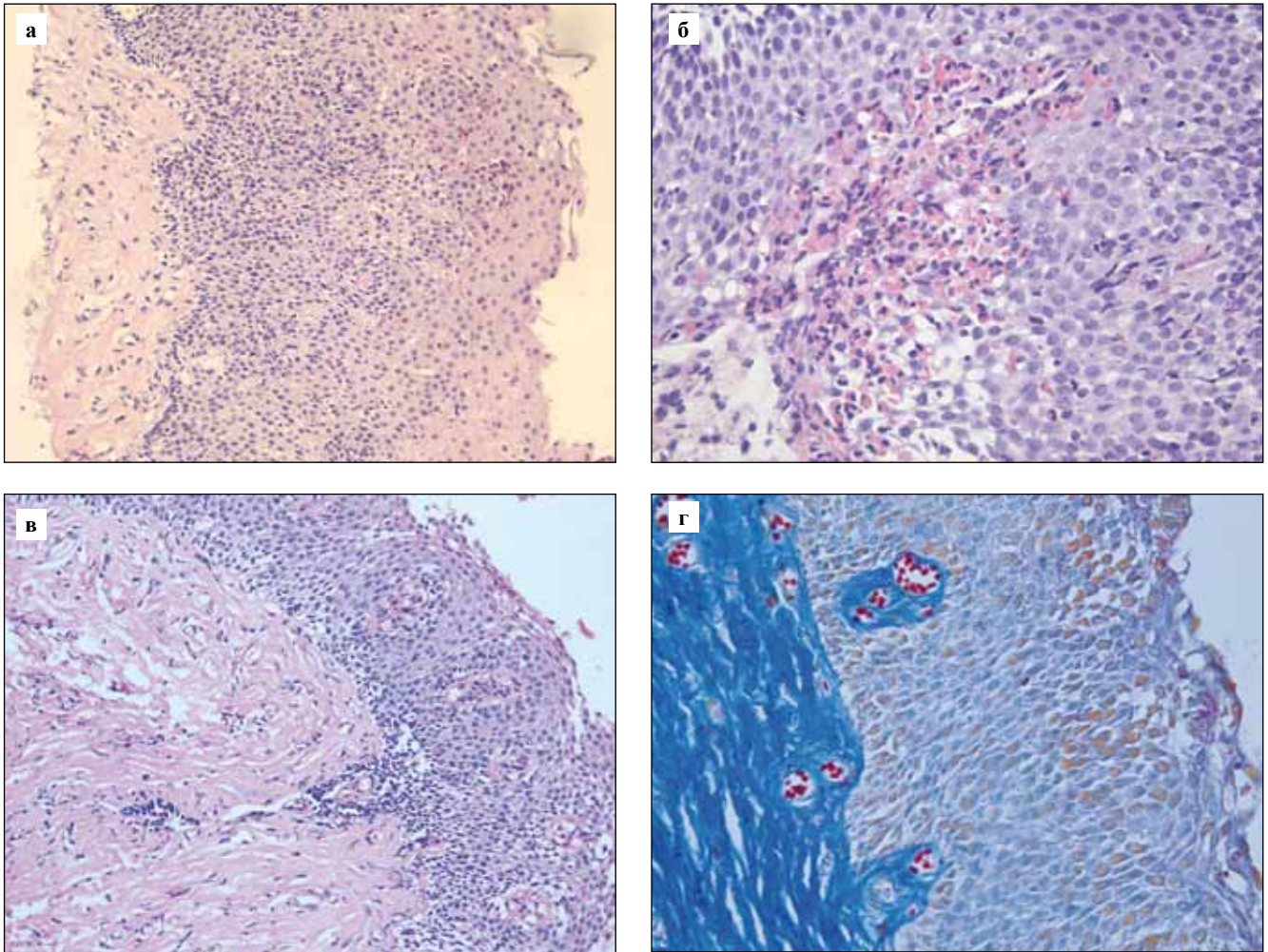


Рис. 1 (а–г). ЭЭ при БА средней степени тяжести.  
 а–в – окраска гематоксилином и эозином; г – окраска по Маллори  
 а, в × 240; б, г × 320

- а) в многослойном плоском неороговевающем эпителии определяются многочисленные эозинофильные лейкоциты
- б) массивная инфильтрация эозинофильными лейкоцитами многослойного плоского неороговевающего эпителия пищевода
- в, г) обширный подэпителиальный склероз

обладание эозинофильных и нейтрофильных лейкоцитов отмечено во 2-й группе, гистиоцитарная инфильтрация преобладает в 3-й группе.

Полученные результаты подтверждают и дополняют выводы работ других авторов по изучению патологии гастроудоденальной системы при БА, демонстрирующие системный характер этого заболевания, и соответствуют представлениям о единстве структурных и иммунных реакций слизистых оболочек [4, 11, 18]. Как известно, система местной защиты дыхательной и пищеварительной систем служит первым барьером на пути проникновения любого агента в организм. Нарушение отдельных механизмов этой защиты может привести к увеличению проницаемости слизистых оболочек и способствовать развитию сенсибилизации организма и возникновению

Таблица

**Морфометрические показатели клеточного состава воспалительного инфильтрата слизистой оболочки пищевода**

	1-я группа	2-я группа	3-я группа	Группа сравнения
Лимфоциты	13,9±1,1	15,1±3,1	10,3±1,0*	29,4±4,7**
Гистиоциты (макрофаги)	0,07±0,001*	2,1±0,04*	8,7±2,3*	2,9±0,06
Эозинофильные лейкоциты	2,1±0,07	34,0±18,2***	1,7±0,09	2,2±0,04
Нейтрофильные лейкоциты	0,04±0,002*	8,3±0,5*	1,9±1,1*	3,7±0,05

Примечание: значимость различий между количественными показателями клеток инфильтрата по группам: \* – p≤0,05, \*\* – p≤0,01, \*\*\* – p≤0,001.

новых аллергических заболеваний, каким в нашем случае стал ЭЭ [7].

Выраженные признаки склерозирования собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы у пациентов из 2-й группы являются причиной клинических проявлений и результатом отсутствия адекватной терапии эозинофильного эзофагита. Преобладание склеротических и атрофических процессов над воспалительными свидетельствует о срыве иммунных механизмов на тканевом уровне в результате длительного приема супрафизиологических доз системных глюкокортикостероидов [7, 13].

Обнаружение воспалительных изменений в группе сравнения только в материале из дистального отдела пищевода, вероятно, связано с нарушением моторики и повышением кислотности, характерными для больных гастроэнтерологического профиля. Соответствующие изменения слизистой оболочки дистальных отделов пищевода в группе сравнения можно расценивать как реактивные или вторичные.

## Выводы

Эозинофильный эзофагит обнаружен в 43% случаев при бронхиальной астме средней степени тяжести на фоне лечения ингаляционными глюкокортикостероидами, что составляет 17% от общего числа обследованных пациентов. Полученные результаты коррелируют с данными литературы.

Хронический неспецифический эзофагит с локализацией в проксимальном отделе обнаружен в 50% случаев у больных 1-й группы (бронхиальная астма легкой степени с приемом только ингаляционных бронхолитиков), в 58% – у пациентов 2-й группы (бронхиальная астма средней тяжести с приемом ингаляционных бронхолитиков и ингаляционных глюкокортикостероидов) и у всех пациентов 3-й группы (бронхиальная астма тяжелой степени, лечение которой включает помимо ингаляционных препаратов прием системных глюкокортикостероидов), что составляет 69% от общего числа обследованных.

В группе сравнения признаки хронического эзофагита обнаружены в 60% случаев, но с локализацией процесса в дистальном отделе пищевода.

## Литература

1. *Галимова Е.С.* Заболевания органов пищеварения у больных бронхиальной астмой / Е.С. Галимова, Г.М. Нурдинова, О.И. Кучер // *Фундаментальные исследования*. 2010. № 1. С. 36–40.
2. *Кириллов С.М.* Патология пищеварительной системы у больных бронхиальной астмой: сравнительный анализ / С.М. Кириллов, М.М. Кириллов // *Пульмонология*. 2010. № 5. С. 85–89.
3. *Корабельников Д.Н.* Бронхиальная астма и сопутствующие заболевания органов пищеварения / Д.Н. Корабельников, А.Г. Чучалин // *Пульмонология*. 2002. № 5. С. 87–92.
4. *Непомнящих Д.Л.* Биопсия в гастроэнтерологии: морфогенез общепатологических процессов / Д.Л. Непомнящих, Г.А. Лаптий, С.В. Айдагулова / Под ред. Г.И. Непомнящих. М.: Изд-во РАМН, 2010. 363 с.
5. *Федосеев Г.Б.* Бронхиальная астма / Г.Б. Федосеев, В.И. Трофимов. СПб., 2006. 327 с.
6. *Филаретова Л.П.* Роль эндогенных глюкокортикоидов в поддержании целостности слизистой оболочки желудка / Л.П. Филаретова, Т.Р. Багаева // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 1995. № 11. С. 1548–1558.
7. *Чернявская Г.М.* Бронхиальная астма: поражения гастроудоденальной системы (клинические, функциональные и патоморфологические аспекты) / Г.М. Чернявская, Г.И. Непомнящих, В.И. Айдагулова. Томск: Печатная мануфактура, 2004. 154 с.
8. *Шматок М.И.* Интегральная оценка развития риска патологии гастроудоденальной зоны у больных БА / М.И. Шматок // *Информатика и системы управления*. 2008. № 2. С. 184–185.
9. *Ahmed A.* A novel endoscopic appearance of idiopathic eosinophilic esophagitis / A. Ahmed, A. Matsui // *Endoscopy*. 2000. N 32. P. 233.
10. *Charles W.D.* Allergy and Eosinophil-associated Gastrointestinal Disorders (EGID) / W.D. Charles, M.E. Rothenberg // *Curr Opin Immunol*. 2008. N 20(6). P. 703–8.
11. *Variability in diagnostic criteria for eosinophilic esophagitis: a systematic review* / E.S. Dellon et al. // *Am J Gastroenterol*. 2007. N 102. P. 2300–13.
12. *GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention*. Published November 2006. URL: <http://www.gin-asthma.org/>
13. *Hansen R.A.* Risk of adverse gastrointestinal events from inhaled corticosteroids / R.A. Hansen., W. Tu, J. Wang // *Pharmacotherapy*. 2008. N 28 (11). P.1325–34.
14. *Katska D.A.* Eosinophilic esophagitis / D.A. Katska // *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2003. N 6 (1). P. 49–54.
15. *Kukkonen K.* High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases / K. Kukkonen, M. Kuitunen, T. Haahtela // *Pediatr Allergy Immunol*. 2010. Vol. 21. N 1 (Pt 1). P. 67–73.
16. *Parameswaran N.* The identification of eosinophilic gastroenteritis in prednisone-dependent eosinophilic bronchitis and asthma / N. Parameswaran, I. Ochkur, Ch. Protheroe // *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2011. Vol. 7. N 1. P. 4.
17. *Pasha S.F.* Patient characteristics, clinical, endoscopic, and histologic findings in adult eosinophilic esophagitis: a case series and systematic review of the medical literature / S.F. Pasha, J.K. DiBaise, J. Kim // *Dis Esophagus*. 2007. N 20. P. 311–9.
18. *Protheroe C.* A novel histologic scoring system to evaluate mucosal biopsies from patients with eosinophilic esophagitis / C. Protheroe, S.A. Woodruff, de Petris G // *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009. N 7. P. 749–55.
19. *Rothenberg M.E.* Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID) / M.E. Rothenberg // *J Allergy Clin Immunol*. 2004. N 113. P. 11–28.
20. *Straumann A.* Eosinophilic esophagitis: escalating epidemiology? / A. Straumann, H.U. Simon // *J. Allergy. Clin. Immunol*. 2005. N 115. P. 418–9.

## MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE MUCOUS MEMBRANE OF THE ESOPHAGUS IN BRONCHIAL ASTHMA

*L.M. Mikhaleva, T.G. Barkhina, N.N. Schegoleva, E.V. Ivanova, V.E. Golovanova*

18 esophageal biopsies were studied in patients with bronchial asthma of different severity level. It was confirmed the combination of a bronchial asthma with eosinophilic esophagitis and nonspecific chronic esophagitis, aggravated by process of asthma progression. In the work the necessity of differentiated tactics and management of the patients with bronchial asthma in the cases of accompanying pathology of oesophagus is postulated. We notice a problem of underdiagnosis and ineffective treatment of eosinophilic esophagitis in the patients with bronchial asthma.

*Key words:* a bronchial asthma, eosinophilic esophagitis, glucocorticsteroid therapy.

### **Информация об авторах**

Михалева Л.М. – докт. мед. наук, профессор, руководитель лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека РАМН.  
Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 903 621 4457. E-mail: mikhalevalm@yandex.ru

Бархина Т.Г. – докт. мед. наук, профессор, руководитель группы клеточных взаимодействий НИИ морфологии человека РАМН.  
Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 905 703 5035. E-mail: tbarkhina@mail.ru

Щеголева Н.Н. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека РАМН.  
Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 128 5878.

Иванова Е.В. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова.  
Адрес: Москва, ул. Лобачевского, д. 42.

Голованова В.Е. – научный сотрудник группы клеточных взаимодействий НИИ морфологии человека РАМН.  
Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 916 228 0342. E-mail: tara731@yandex.ru

# ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ РЕПРОДУКЦИИ

*Н.А. Старосветская, С.В. Назимова, И.И. Степанова, А.А. Степанов, М.Н. Болтовская*  
ФГБУ «НИИ морфологии человека РАМН», Москва

Описаны методы получения моноклональных антител для иммуногистохимического выявления основных секреторных эндометриальных белков и специфических для беременности плацентарных белков в тканях эндометрия и плаценты, заключенных в парафин. Исследованы распределение и локализация гликоделина, плацентарного  $\alpha 1$ -микроглобулина/IGFBP1, трофобластического  $\beta 1$ -гликопротеина и хорионического гонадотропина в материале соскобов из полости матки первого триместра беременности. Полученные моноклональные антитела являются полезным инструментом для иммуногистохимического исследования функциональных маркеров железистого эпителия, децидуализированной стромы и синцитиотрофобласта ворсин при нормальной и осложненной беременности.

*Ключевые слова:* репродукция человека, эндометриальные и плацентарные белки, моноклональные антитела, иммуногистохимия

Моноклональные антитела (МКА) являются одним из основных современных инструментов для решения фундаментальных и прикладных задач биологии и медицины, однако далеко не каждая исследовательская работа может быть обеспечена коммерчески доступными МКА, поэтому зачастую возникает необходимость получения собственных оригинальных МКА. Изучение клеточных и молекулярных механизмов репродукции человека, совершенствование оценки состояния репродуктивного здоровья и разработка новых технологий диагностики нарушений репродуктивной функции человека определили необходимость получения МКА против основных секреторных белков органов репродуктивной системы.

В последние годы особый интерес вызывает изучение роли эндометриальных и плацентарных белков как компонентов микроокружения эмбриона и активных участников эмбрионально-материнского диалога, необходимого для прогрессирования беременности. Основными секреторными белками эндометрия являются плацентарный  $\beta 1$ -микроглобулин/ПАМГ, антигенно идентичный белку IGFBP1, связывающему инсулиноподобные факторы роста и играющему важную роль в регуляции цитотрофобластической инвазии (ЦТИ), и альфа2-микроглобулин фертильности (АМГФ)/гликоделин, обладающий мощным

иммуносупрессорным действием [3]. Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), один из первых эмбриональных сигналов, помимо классического эндокринного действия, регулирует процесс имплантации, влияя на синтез гликоделина, IGFBP1, LIF, VEGF и MMP-9 в эндометрии [10], и участвует в формировании локальной иммунотолерантности через привлечение в маточно-плацентарную область Т-регуляторных клеток, усиление апоптоза Т-лимфоцитов и изменение активности дендритных клеток [6, 7, 8]. Трофобластический  $\beta 1$ -гликопротеин/ТБГ, или pregnancy-specific  $\beta 1$ -glycoprotein, используется в акушерско-гинекологической практике как маркер функциональной активности плаценты, однако его биологические функции долго оставались неясными [2]. В настоящее время установлено, что ТБГ обладает иммуномодулирующим эффектом, действуя на клетки системы врожденного и адаптивного иммунитета [4, 5, 12], и участвует в ремоделировании сосудов, усиливая продукцию ангиогенных факторов [9, 11]. В каталогах ведущих фирм (Dako, Novocast, LabVision и т.д.), предлагающих МКА для иммуногистохимических исследований, МКА для выявления комплекса белков, характеризующих функциональную активность микроокружения эмбриона/плода человека, отсутствуют.

Цель работы – создание гибридом и получение комплекса МКА для иммуногистохимического выявления гликоделина, ПАМГ, ТБГ, ХГЧ в срезах тканей.

### Материалы и методы

Гибридомы получали по общепринятой методике. Самок мышей Balb/c в возрасте 4–8 недель иммунизировали 2–3-кратным введением антигена в дозе 100 мкг/мышь внутрибрюшинно или в подушечки лап в полном, а затем в неполном адьюванте Фрейнда и фосфатно-солевом буфере. Клетки селезенки или лимфоузлов сливали с клетками миеломы линии SP2/0. Скрининг гибридом на продукцию МКА проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием кроличьих антител против мышинового иммуноглобулина G (Fitzgerald, США), конъюгированных с пероксидазой хрена по методу Nakane. Антигенспецифические гибридомы 3–4-кратно клонировали методом предельных разведений в жидкой фазе на фидерном слое перитонеальных макрофагов для отбора клонов, стабильно продуцирующих МКА. Для масштабной наработки МКА гибридомы выращивали в сингенных мышах Balb/c в виде асцитной опухоли, вводя внутрибрюшинно  $2-10 \times 10^6$  гибридомных клеток в 0,5 мл среды 199. Выделение и очистку МКА проводили в три этапа: высаливание антител из асцитной жидкости насыщенным раствором сульфата аммония (рН 7,0) в объеме соотношении 1:1; очистка методом аффинной хроматографии на Protein A Sepharose (Fast Flow 50% (v/v), Sigma); очистка методом ионообменной хроматографии на CM-Sepharose (Sigma). Выход белка с хроматографических колонок контролировали на проточном спектрофотометре Uvi-convord SII (Amersham). Концентрацию выделенных МКА определяли на спектрофотометре Ultrospec II (LKB). Иммуногистохимическую (ИГХ) реакцию проводили на материале соскобов из полости матки, полученных при медицинских абортах в I триместре беременности, предоставленном профессором А.П. Миловановым (лаборатория патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН). Ткани фиксировали в 10%-ном формалине, подвергали рутинной гистологической обработке, заключали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм размещали на стеклах с адгезивным покрытием.

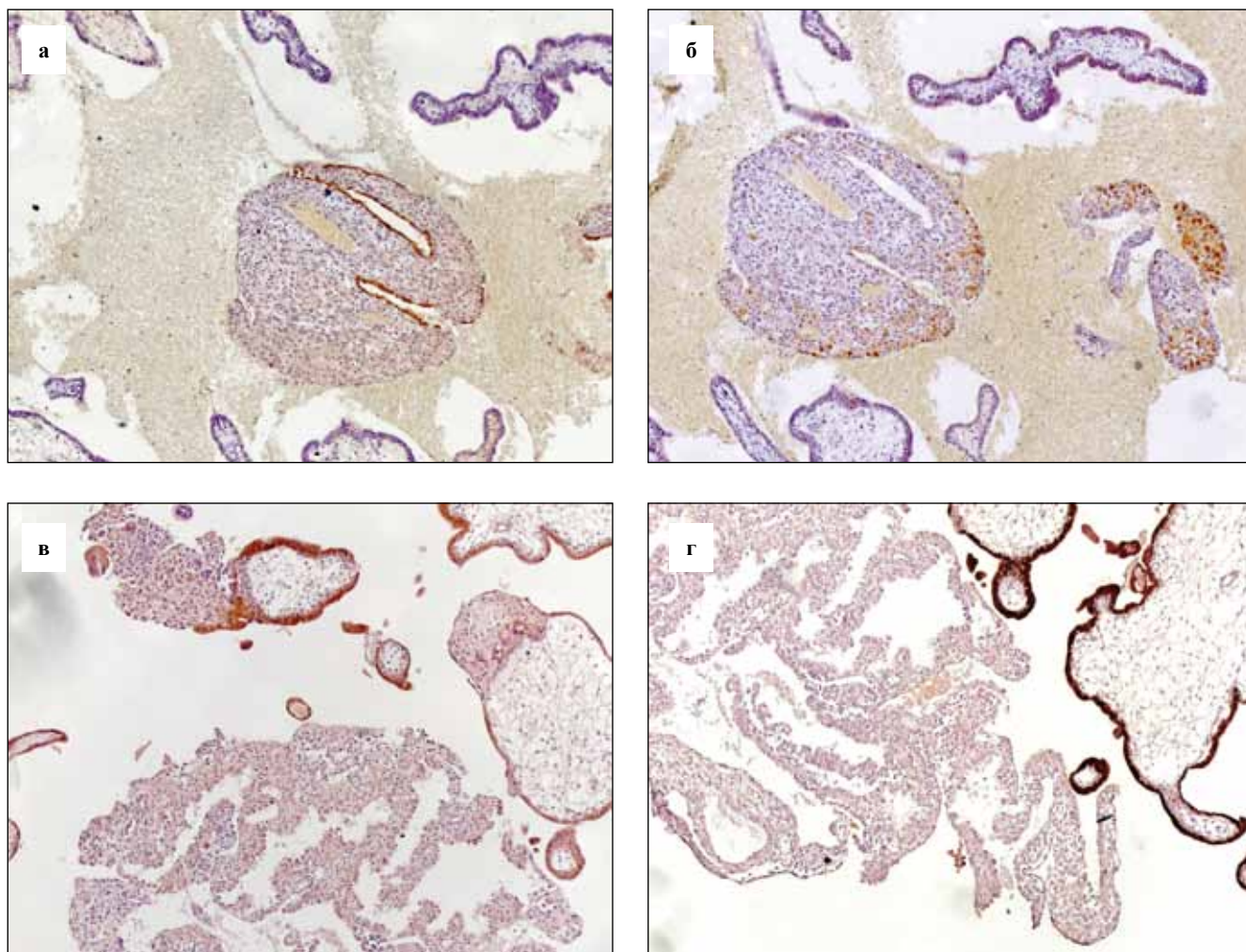
Для определения реактивности полученных МКА применяли метод непрямого иммуноокрашивания с использованием конъюгата кроличьих антимышиных антител с пероксидазой хрена и 3,3-диаминобензидина (Sigma, USA) в качестве хромогена или систему визуализации UltraVision TL-015-HD (LabVision). Срезы докрашивали гематоксилином Майера. Для оценки возможности неспецифических реакций проводили негативный контроль реагентов: исключали первичные МКА, заменяя их буфером; в качестве первичных антител использовали МКА к антигенам, заведомо отсутствующим в исследуемой ткани (С-реактивному

белку, альфа-фетопротеину); вместо первичных МКА наносили на срезы неиммунные мышинные иммуноглобулины.

### Результаты и обсуждение

В результате скрининга антигенспецифичных МКА, не дающих перекрестных реакций в ИФА (8 МКА против ТБГ, 4 МКА против ХГЧ, 7 МКА против ПАМГ/IGFBP1, 5 МКА против гликоделина), были определены МКА, дающие воспроизводимую специфическую ИГХ реакцию. Критериями отбора были выявление продукта реакции в известных местах синтеза белков (ТБГ и ХГЧ – синцитиотрофобласт ворсин плаценты, ПАМГ/IGFBP1 – децидуальные клетки гравидарного эндометрия, гликоделин – эпителий эндометриальных желез) и отсутствие иммуноокрашивания структур, не участвующих в продукции детектируемых антигенов (рис. 1). Модификация стандартного протокола ИГХ анализа (2-часовая инкубация с первичными МКА при +37°C вместо 18–20-часовой инкубации при +4°C) не влияла на специфичность или интенсивность реакции, но существенно уменьшала время проведения исследования. Предварительная микроволновая обработка срезов в цитратном (рН 6,0) или карбонатном (рН 9,0) буферах при мощности 600 Вт не изменяла локализацию продукта реакции и практически не влияла на интенсивность иммуноокрашивания.

Иммуноморфологическое исследование распределения ПАМГ в гравидарном эндометрии с помощью МКА (клон ПВ-4, культуральный супернатант, разведение 1:600) продемонстрировало смену клеточных продуцентов в течение неосложненной беременности. На ранних сроках (5–6 недель), в начале первой волны цитотрофобластической инвазии (ЦТИ), интенсивная экспрессия белка была обнаружена в эпителии маточных желез и лишь в отдельных децидуальных клетках (рис. 2а). Результаты ИГХ исследования подтверждаются результатами Han et al. (1996), которые методом гибридизации *in situ* продемонстрировали экспрессию IGFBP1 в эпителии желез decidua basalis до 12-й недели беременности [13]. Функциональная роль продукции ПАМГ в железах на ранних сроках гестации остается неизвестной. По мере развития беременности экспрессия ПАМГ в железах уменьшалась, его синтез переключался в децидуальные клетки. Уровень ПАМГ-положительных децидуальных клеток нарастал в течение 7–8 недель (рис. 2б) и достигал максимума к 9–10-й неделе беременности – сроку завершения первой волны ЦТИ (рис. 2в). Таким образом, исследование структурно-функциональной гравидарной перестройки эндометрия и ее сопоставление с темпами и глубиной миграции цитотрофобласта [3] выявило участие ПАМГ – продуцирующих децидуальных клеток промежуточного типа в регуляции первой волны ЦТИ и морфологически подтвердило роль ПАМГ как естественного «ограничителя» инвазивной активности цитотрофобласта.



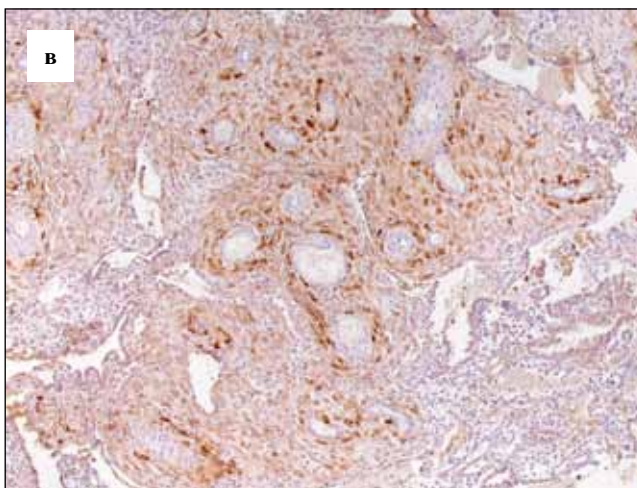
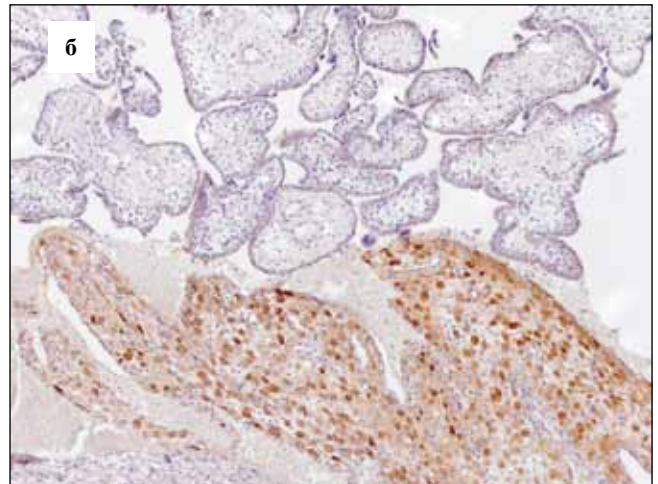
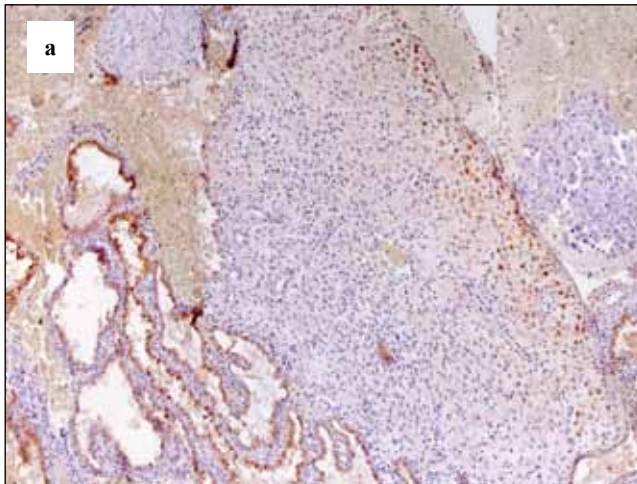
*Рис. 1.* Специфичность иммунодетекции эндометриальных и плацентарных белков с помощью оригинальных моноклональных антител. *а)* экспрессия гликоделина в эпителии маточных желез, отсутствие реакции в ворсинах плаценты и строме эндометрия; *б)* – экспрессия ПАМГ/IGFBP1 в децидуальных клетках, отсутствие реакции в ворсинах плаценты и железах эндометрия; *в)* – экспрессия ТβГ в ворсинах плаценты, отсутствие реакции в эндометрии; *г)* – экспрессия ХГЧ в ворсинах плаценты, отсутствие реакции в эндометрии. × 100

ИГХ исследование с использованием МКА (клонА4f8, культуральный супернатант, разведение 1:400) выявило интенсивную экспрессию гликоделина в эпителиоцитах желез эндометрия в I триместре неосложненной беременности (рис. 3а). Данные согласуются с результатами количественного определения гликоделина в гомогенатах эндометрия и смывах из полости матки, показавшими, что его продукция начинается на 4–5-й день после овуляции, усиливается в период имплантационного окна (19–24-й дни менструального цикла) и продолжает нарастать при наступлении беременности [1]. При неразвивающейся беременности эндокринного генеза экспрессия гликоделина в маточных железах резко уменьшалась (рис. 3б). Таким образом, использование МКА против гликоделина, участвующего в формировании локальной иммунотолерантности, позволяет оценить

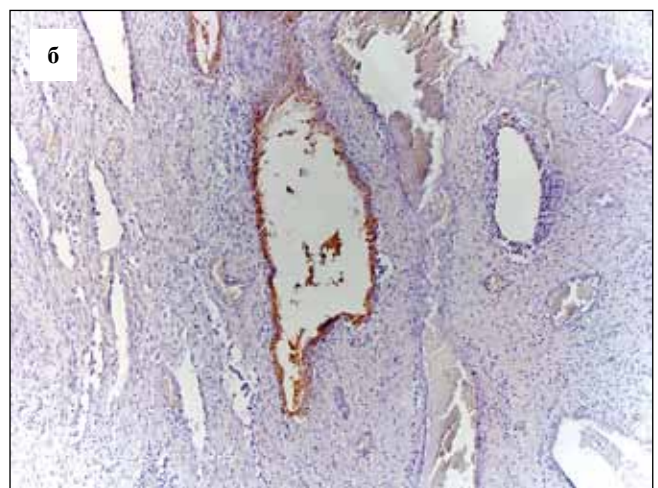
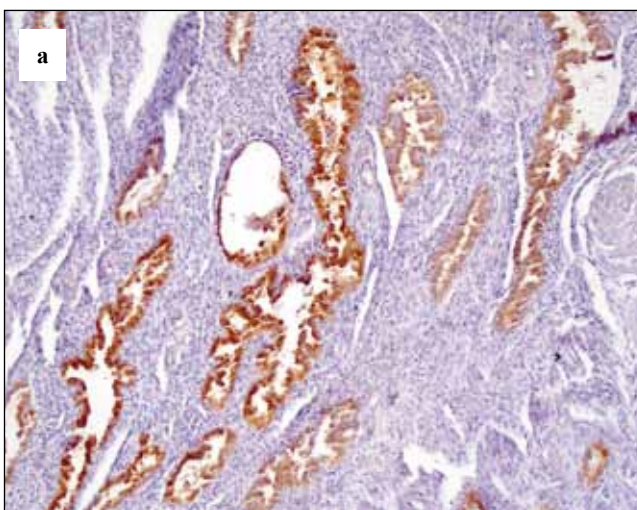
функциональную полноценность эндометрия в защите полуаллогенного эмбриона от иммунной атаки материнского организма.

МКА против ТβГ (клон Tg4, разведение 1:1000) и ХГЧ (клон Xh5, разведение 1:5000) выявили интенсивную продукцию этих плацентарных белков уже на самых ранних исследованных сроках беременности (5 недель). Продукт ИГХ реакции локализовался в синцитиотрофобласте, но не в цитотрофобласте или строме ворсин (рис. 4). Качественная оценка интенсивности иммуноокрашивания, проводимого в условиях максимально возможной стандартизации (разведение МКА, время экспозиции с первичными МКА и системой детекции, температура), показала, что экспрессия ТβГ и ХГЧ возрастала с увеличением срока беременности. МКА против плацентарных белков могут быть использованы для морфофункциональной оценки со-





*Рис. 2.* Экспрессия ПАМГ/IGFBP1 в гравидарном эндометрии в динамике неосложненной беременности.  
*а)* присутствие ПАМГ/IGFBP1 в железах и отдельных децидуальных клетках (ДК), 6 нед.;  
*б)* усиление экспрессии ПАМГ/IGFBP1 в ДК, 8 нед.;  
*в)* интенсивная экспрессия ПАМГ/IGFBP1 в ДК, 12 нед. × 100



*Рис. 3.* Экспрессия гликоделина в эндометриальных железах при неосложненной беременности (*а*) и неразвивающейся беременности гормонального генеза (*б*), 8–9 нед. × 100

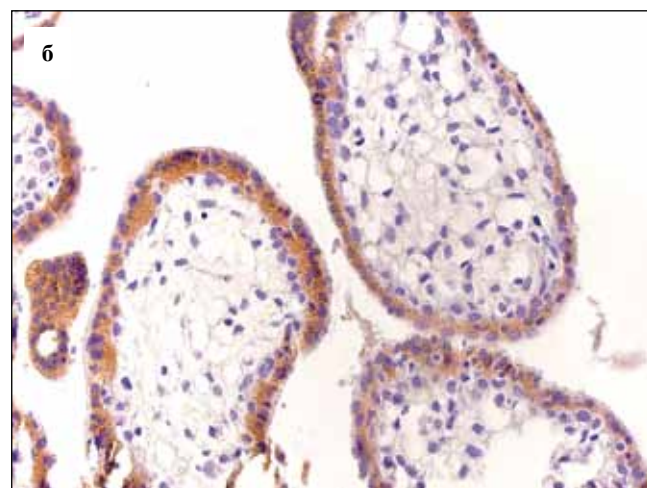
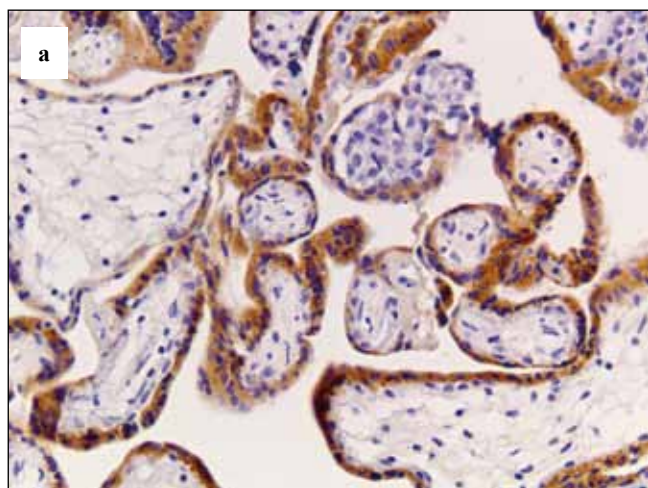


Рис. 4. Экспрессия ХГЧ (а) и ТБГ (б) в синцитиотрофобласте ворсин плаценты, 8 нед. беременности.  $\times 100$

стояния синцитиотрофобласта в норме и при патологии беременности, связанной с плацентарной недостаточностью.

#### Выводы

В результате масштабного скрининга получены МКА, позволяющие выявлять белки ПАМГ/IGFBP1, гликоделин, ТБГ и ХГЧ в тканях, фиксированных формалином, заключенных в парафин и подвергнутых рутинной гистологической обработке. Отсутствие необходимости в специальных способах фиксации и обработки тканей дает возможность широкого применения полученных МКА для иммуногистохимического исследования плаценты, соскобов из полости матки, пайпель-биопсий эндометрия.

Введение полученного комплекса МКА в научный арсенал исследований по проблеме репродукции человека расширяет возможности изучения клеточных взаимодействий в функциональной системе мать–маточно-плацентарная область–плацента–эмбрион/плод в норме и при патологии.

#### Литература

1. Альфа2-микроглобулин фертильности (гликоделин) как маркер функциональной активности эндометрия (обзор литературы) / Болтовская М.Н. и др. Проблемы репродукции. 2000. Т. 6. № 6. С. 6–11.
2. Посисеева Л.В., Назаров С.Б., Татаринов Ю.С. Трофобласт-специфический бета-гликопротеин в акушерстве и гинекологии. Иваново: ОАО «Издательство «Иваново», 2004. 240 с.
3. Причины и дифференцированное лечение раннего невынашивания беременности: Руководство для врачей / Под ред. А.П. Милованова, О.Ф. Серовой. М.: Студия МДВ, 2011. 216 с.
4. Bebo B.F. Jr., Dveksler G.S. Evidence that pregnancy specific glycoproteins regulate T-Cell function and inflammatory autoimmune disease during pregnancy. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005. V. 4. N 2. P. 231–7.
5. Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF- $\beta$ 1 / Ha C.N. et al. *J. Leukocyte Biology*. 2005. V. 77. P. 948–57.
6. Human Chorionic Gonadotropin Contributes to Maternal Immunotolerance and Endometrial Apoptosis by Regulating Fas-Fas Ligand System/ Kayisli U.A. et al. *J. Immunology*. 2003. V. 171. P. 2305–13.
7. Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy / Schumacher A. et al. *J. Immunology*. 2009. V. 182. N 9. P. 5488–97.
8. Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties / Tsampalas M. et al. *J. Reprod. Immunol*. 2010. V. 85. N 1. P. 93–8.
9. Human Pregnancy Specific Beta-1-Glycoprotein 1 (PSG1) Has a Potential Role in Placental Vascular Morphogenesis/ Ha C.N. et al. *Biol. Reprod*. 2010. V. 83. N 1. P. 27–35.
10. Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? / Licht P. et al. *Mol Cell Endocrinol*. 2007. V. 269. N 1–2. P. 85–92.
11. Murine Pregnancy-Specific Glycoprotein 23 Induces the Proangiogenic Factors Transforming-Growth Factor Beta 1 and Vascular Endothelial Growth Factor A in Cell Types Involved in Vascular Remodeling in Pregnancy/ Wu J.A. et al. *Biol Reprod*. 2008. V. 79. N 6. P. 1054–61.
12. Pregnancy-specific glycoproteins function as immunomodulators by inducing secretion of IL-10, IL-6 and TGF-beta1 by human monocytes / Snyder S.K. et al. *Am J Reprod Immunol*. 2001. V. 45. N 4. P. 205–16.
13. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interaction at the feto-maternal interface / Han V.J.M. et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1996. V. 81. P. 2680–93.

## PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES SET FOR IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES IN THE FIELD OF PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY OF HUMAN REPRODUCTION

*N.A. Starosvetskaya, S.V. Nazimova, I.I. Stepanova, A.A. Stepanov, M.N. Boltovskaya*

The techniques for generation hybridoma-produced monoclonal antibodies for immunohistochemical detection of the major secretory endometrial proteins and pregnancy-specific placental proteins in paraffin-embedded decidual and placental tissues are described. The distribution and localization of glycodefin, placental  $\alpha 1$ -microglobuline/IGFBP1, pregnancy-specific  $\beta 1$ -glycoprotein, and human chorionic gonadotropin in uterine scrapings obtained in 1st trimester of pregnancy has been examined. The generated monoclonal antibodies are valuable tools for the immunohistochemical study of functional markers of glandular epithelium, decidualized stroma, and villous syncytiotrophoblasts in normal and complicated pregnancy.

*Key words:* human reproduction, endometrial and placental proteins, monoclonal antibodies, immunohistochemistry

### Информация об авторах

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

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

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

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

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

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

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

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Болтовская М.Н. – докт. биол. наук, заведующая лабораторией клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: +7 (499) 128-8701. E-mail: morfolhum@mail.ru

# ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНДОКРИННОЙ ЧАСТИ И НЕРВНОГО АППАРАТА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У РЕБЕНКА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-го ТИПА

Ю.С. Кривова, В.М. Барабанов, Е.И. Фокин, С.В. Савельев

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Проведен иммуногистохимический анализ нарушений в эндокринной части и нервном аппарате поджелудочной железы ребенка (3 года 9 месяцев), страдавшего сахарным диабетом 1-го типа (СД1), с использованием антител к инсулину, глюкагону и белкам нервной системы – SNAP-25, NCAM, NSE, нейронспецифическому  $\beta$ -III тубулину и периферину. В исследованном случае наблюдалось практически полное отсутствие В-клеток, которое сопровождалось уменьшением количества тонких нервных волокон, расположенных в паренхиматозной части железы. В эндокринных клетках поджелудочной железы выявлена иммунопозитивная реакция на 4 нейральных белка – SNAP-25, NCAM, NSE, нейронспецифический  $\beta$ -III тубулин, что подтверждает их антигенное сходство с нейронами. Полученные данные демонстрируют, что аутоантитела к белкам нервной системы могут появляться в крови больных СД1 в результате разрушения как В-клеток, так и структур нервной системы.

*Ключевые слова:* сахарный диабет 1-го типа, поджелудочная железа, эндокринные клетки, нервные волокна

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) – аутоиммунное заболевание, приводящее к нарушениям эндокринной функции поджелудочной железы вследствие гибели инсулинпродуцирующих В-клеток [1, 2]. К факторам, приводящим к развитию СД1, относят в первую очередь генетическую предрасположенность организма, а также наличие стресса, вирусных инфекций и т.д. [1, 12]. Несмотря на интенсивное исследование этиологии аутоиммунной реакции при СД1, механизмы ее развития до сих пор неясны.

В настоящее время активно разрабатывается нейральная модель развития СД1, согласно которой на начальном этапе развития СД1 наблюдаются разрушение структур нервного аппарата поджелудочной железы и аутоиммунизация белками нервной системы. Впоследствии развивается аутоиммунная реакция на В-клетки из-за их сходства с нейронами по ряду экспрессируемых белков [8, 14, 16, 17]. На NOD-мышьях (*nonobese diabetic mice*) было показано, что при развитии аутоиммунной реакции первыми появляются Т-лимфоциты, аутореактивные к GFAP, GAD, S-100 – антигенам глиальных клеток [14, 16]. На мышьях NOD также было показано, что привлекать лимфоциты при развитии диабета могут расположенные внутри островков сенсорные нейроны, поскольку блокировка этих нейро-

нов капсаицином приводит к значительному снижению проникновения лимфоцитов в островки и замедлению развития диабета [17].

Вопрос об участии структур нервной системы в развитии СД1 у человека не решен. Известно, что СД1 сопровождается развитием нейропатий [1]. Кроме того, в крови больных СД1 пациентов и их ближайших родственников обнаружены аутоантитела к нейральным белкам – GFAP, GAD, S-100 [8]. Эти факты подтверждают наличие нарушений в нервной системе при СД1, однако остается неясным, какие морфологические изменения наблюдаются в нервном аппарате поджелудочной железы больных СД1. В связи с этим целью работы было иммуногистохимическое исследование панкреатических островков и нервного аппарата поджелудочной железы у ребенка (мальчик, 3 года 9 месяцев), страдавшего СД1.

## Материалы и методы

Материалом для исследования послужила аутопсия поджелудочной железы мальчика (3 года 9 месяцев), страдавшего СД1 (сахар крови за 4 дня до смерти ребенка – 23,51 ммоль/л, диабетическая кома). Контролем послужила аутопсия поджелудочной железы мальчика (4 года 9 месяцев), не страдавшего СД1 (сахар крови по

клиническим данным 4,24–7,02 ммоль/л). Кусочки из тела поджелудочной железы размерами 1 x 1 x 0,5 см были зафиксированы в 4%-ном параформальдегиде на 0,1М фосфатном буфере, pH 7,5, обезвожены в спиртах восходящей концентрации и диоксане, залиты в парафин, приготовлены серийные срезы толщиной 10 мкм.

В иммуногистохимических реакциях использованы следующие антитела: мышинные моноклональные антитела к инсулину (Sigma, 1:32000), глюкагону (Sigma, 1:32000), SNAP-25 (Novocastra, 1:200–1:400), NCAM (Labvision, 1:100–1:200), NSE (Cell Marque, 1:100–1:200), периферину (Novocastra, 1:100–1:200) и кроличьи поликлональные антитела к нейронспецифическому  $\beta$ -III тубулину (AbCam, 1:8000–1:16000). В качестве визуализирующей системы применяли Ultra Vision ONE detection system (Labvision) – в реакциях на инсулин и глюкагон, CSA-II (Dako) – в реакциях на SNAP-25 и периферин, Ultra Vision LP Detection system (Labvision) – в реакциях на NCAM, NSE и нейронспецифический  $\beta$ -III тубулин. Хромогеном во всех реакциях служил раствор DAB.

Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител раствором для разведения антител Dako Diluent (Dako). Во всех случаях контроля неспецифическая реакция отсутствовала.

## Результаты и обсуждение

При патологоанатомическом исследовании у ребенка, страдавшего СД1, выявлены гиперплазия поджелудочной железы (масса 35 г при норме 17,5 г), диффузная гипоплазия островкового (инсулярного) аппарата, стромальный склероз, кистоз выводных протоков. В реакциях на инсулин в поджелудочной железе ребенка, страдавшего СД1, обнаружены лишь единичные панкреатические островки, содержащие инсулин-позитивные В-клетки. В большинстве долек поджелудочной железы у этого ребенка реакция на инсулин была иммунонегативной (рис. 1 а). При реакции на глюкагон обнаружены панкреатические островки, практически целиком состоящие из глюкагон-позитивных А-клеток (рис. 1 в). Количество и размер панкреатических островков у ребенка, страдавшего СД1, были снижены по сравнению с контролем, что подтверждает выявленную при патологоанатомическом исследовании гипоплазию островкового аппарата. Согласно данным литературы, подобная картина соответствует тяжелому СД1, при

котором аутоиммунная деструкция В-клеток приводит к их полному отсутствию, в атрофированных островках сохраняются многочисленные А-, D- и PP-клетки [15]. В ранее проведенном нами исследовании схожая картина тяжелого СД1 с полным и практически полным отсутствием  $\beta$ -клеток наблюдалась у двух взрослых пациентов [4].

У ребенка, не страдавшего СД1, изменений в структуре поджелудочной железы не обнаружено. Иммунопозитивная реакция на инсулин и глюкагон наблюдалась в панкреатических островках, а также в одиночных эндокринных клетках и их небольших группах, диффузно распределенных в ацинарной паренхиме (рис. 1 б, г). В большинстве панкреатических островков В- и А-клетки распределены мозаично, В-клетки преобладают (рис. 1 б, г), что является типичным для человека [7, 10].

Иммунопозитивная реакция на SNAP-25, NCAM, NSE, нейронспецифический  $\beta$ -III тубулин и периферин как в контроле, так и при СД1 наблюдалась в структурах нервного аппарата поджелудочной железы – пучках нервных волокон различного диаметра, нервных ганглиях и сети тонких нервных волокон в паренхиме железы (рис. 2). Сравнение исследованных образцов по всем пяти маркерам нервной системы показало, что при СД1 наблюдается значительное уменьшение количества тонких нервных волокон, расположенных в паренхиматозной ткани железы (рис. 2 а, в), по сравнению с контролем (рис. 2 б, г). При этом крупные пучки нервных волокон и нервные ганглии сохраняются в поджелудочной железе при СД1. Сходная картина

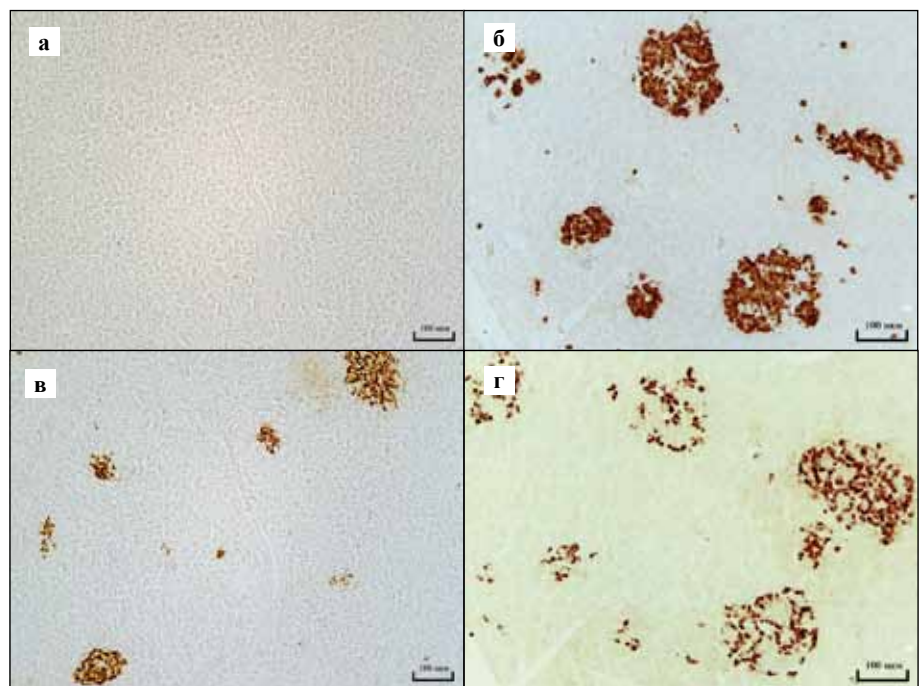


Рис. 1. Иммуногистохимические реакции на инсулин (а, б) и глюкагон (в, г) в поджелудочной железе при СД1 (а, в) и в контроле (б, г)

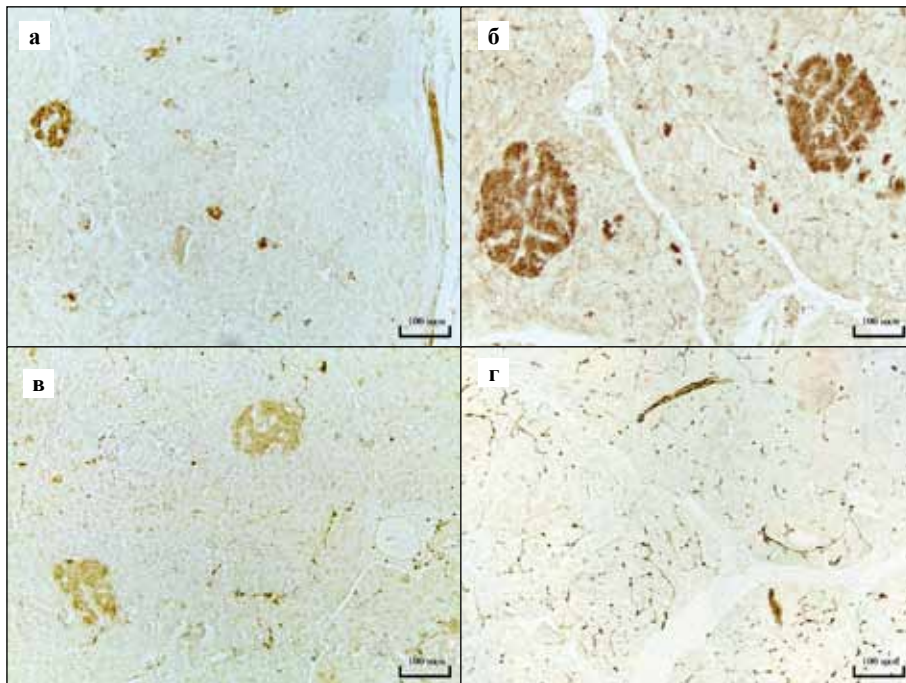


Рис. 2. Иммуногистохимические реакции на NSE (а, б) и нейронспецифический  $\beta$ -III тубулин (в, г) при СД1 (а, в) и в контроле (б, г)

нарушений в нервном аппарате поджелудочной железы была обнаружена и у взрослых с тяжелым СД1 [4]. Исследованный случай СД1 у ребенка (3 года 9 месяцев) демонстрирует, что изменения в нервном аппарате поджелудочной железы происходят еще до полного исчезновения В-клеток. Однако достоверно сказать о том, что уменьшение иннервации предшествует гибели В-клеток, нельзя. Для подтверждения гипотезы первичного аутоиммунного разрушения структур нервного аппарата поджелудочной железы необходим анализ случаев СД1, в которых сохраняется основная масса В-клеток (начальный этап СД1). Подобные случаи редки, поскольку СД1 у таких больных, как правило, не диагностируется клинически.

Иммунопозитивная реакция на SNAP-25, NCAM, NSE и нейронспецифический  $\beta$ -III тубулин помимо структур нервного аппарата выявлена в цитоплазме эндокринных клеток поджелудочной железы (рис. 2), что согласуется с данными литературы [3, 4, 9, 10, 11]. Интенсивность реакции на SNAP-25 и NSE (рис. 2 а, б) в эндокринных клетках была такой же, как в структурах нервного аппарата. Реакция на NCAM и нейронспецифический  $\beta$ -III тубулин (рис. 2 в, г) в эндокринных клетках была менее интенсивной, чем в структурах нервного аппарата. Позитивная реакция на все 4 маркера наблюдалась в эндокринных клетках как в контроле (рис. 2 б, г), так и при СД1 (рис. 2 а, в), когда В-клетки в большинстве островков отсутствовали. Эти факты указывают на наличие экспрессии SNAP-25, NCAM, NSE и нейронспецифического  $\beta$ -III тубулина не только в В-, но и в А-, и, возможно, D- и

PP-клетках поджелудочной железы. Экспрессия SNAP-25 при отсутствии инсулина наблюдается в панкреатических островках взрослых людей, страдавших СД1 [4].

Как говорилось выше, эндокринные клетки поджелудочной железы и нейроны синтезируют сходные белки, такие как S-100, глиальный фибриллярный кислый белок, нейронспецифическая энолаза, ВИП, соматостатин и т.д. [5, 6, 8, 14]. Наличие в эндокринных клетках поджелудочной железы человека иммунопозитивной реакции на SNAP-25, NCAM, NSE и нейронспецифический  $\beta$ -III тубулин подтверждает их сходство с нейронами по набору экспрессируемых белков. Данные белки не могут являться первичной мишенью для развития аутоиммунной реакции при СД1, поскольку выявляются как в В-клетках, так и в других типах

эндокринных клеток, то есть не являются специфическими для В-клеток. При появлении аутоантител к этим белкам помимо В-клеток должна наблюдаться деструкция и других типов эндокринных клеток, что, как показывают наши и литературные данные, не происходит при СД1.

### Выводы

В исследованном нами случае у ребенка (3 года 9 месяцев) наблюдался тяжелый СД1 с гипоплазией островкового аппарата поджелудочной железы и практически полным отсутствием В-клеток. Полученные данные подтверждают сходство В-клеток с нейронами по синтезу ряда белков и демонстрируют наличие нарушений в нервном аппарате поджелудочной железы человека при СД1. Таким образом, аутоантитела к нейральным белкам могут появляться в крови больных СД1 в результате деструкции как нервных элементов, так и В-клеток.

### Литература

1. Балаболкин М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений: Руководство для врачей / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Кремская. М.: Медицина, 2005. 512 с.
2. Злобина Е.Н. Современные концепции иммунопатогенеза инсулинозависимого сахарного диабета / Е.Н. Злобина, И.И. Дедов // Проблемы эндокринологии. 1993. Т. 3. № 9. С. 51–58.
3. Изучение иммунореактивности нейронспецифической энолазы (NSE) в поджелудочной железе человека в норме и при сахарном диабете 1 типа / А.Е. Прошина и др. // Бюлле-

- ть экспериментальной биологии и медицины. 2010. № 6. С. 704–708.
4. Неврогенные механизмы развития сахарного диабета 1-го типа / С.В. Савельев и др. // Архив патологии. 2008. № 6. С. 9–13.
  5. Яглов В.В. Актуальные проблемы биологии диффузной эндокринной системы / Яглов В.В. // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1989. Т. 96. № 1. С. 14–29.
  6. Яглов В.В. Нерешенные проблемы нормальной и патологической морфологии диффузной эндокринной системы / В.В. Яглов, Н.В. Яглова // Архив патологии. 2011. Т. 73. № 5. С. 58–62.
  7. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy / M. Brissova et al. // J Histochem Cytochem. 2005. V. 53. N. 9. P. 1087–97.
  8. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not  $\beta$ -cell exclusive / S. Winer et al. // Nat Med. 2003. V. 9. N. 2. P. 198–205.
  9. CD-56 positive cells with or without synaptophysin expression are recognized in the pancreatic duct epithelium: a study with adult and fetal tissues and specimens from chronic pancreatitis / M. Fujisawa et al. // Acta Med Okayama. 2003. V. 57. N. 6. P. 279–84.
  10. Cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function / O. Cabrera et al. // PNAS. 2006. V. 103. N. 7. P. 2334–9.
  11. Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells / G. Jacobsson et al. // Proc Natl Acad Sci USA. 1994. V. 91. N. 26. P. 12487–91.
  12. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes / J.G.M. Rosmalen et al. // Trends Endocrinol Metab. 2002. V. 13. N. 5. P. 209–14.
  13. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for islet cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets / F. Esni et al. // J Cell Biol. 1999. V. 144. N. 2. P. 325–37.
  14. Neuronal elements in the pathogenesis of type 1 diabetes / H. Tsui et al. // Rev Endoc Metab Disord. 2003. V. 4. N. 3. P. 301–10.
  15. *Rahier J.* Cellular composition of the human diabetic pancreas / J. Rahier, R.M. Goebbels, J.C. Henqui // Diabetologia. 1983. V. 24. P. 366–71.
  16. *Saravia F.* Is innervation an early target in autoimmune diabetes? / F. Saravia, F. Homo-Delarche // Trends Immunol. 2003. V. 24. N. 11. P. 574–9.
  17. TRPV1<sup>+</sup> sensory neurons control  $\beta$  cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes / R. Razavi et al. // Cell. 2006. V. 127. N. 6. P. 1123–35.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE ENDOCRINE PART OF THE PANCREAS AND ITS NERVOUS ELEMENTS IN CHILD WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1

*Yu.S. Krivova, V.M. Barabanov, E.I. Fokin, S.V. Savel'ev*

We studied immunohistochemically endocrine part of the pancreas and its nervous elements in child aged 3 year 9 month suffering from diabetes mellitus type 1 (T1D). We used antibodies against insulin, glucagon, and five neural proteins (SNAP-25, NCAM, NSE, neuron specific  $\beta$ -III tubulin, and periferin). In the pancreas, B-cells were almost absent; reduced thin nerve fiber immunostaining was revealed in the exocrine parenchima. Endocrine cells of the pancreas showed positive immunohistochemical staining for four neural proteins: SNAP-25, NCAM, NSE, and neuron specific  $\beta$ -III tubulin which confirms the antigenic similarity between endocrine cells and neurons. These data demonstrate that autoantibodies against neural proteins may appear in the blood of patients with diabetes type 1 as a result of destruction both of B-cell and neural elements.

*Key words:* diabetes mellitus type 1, pancreas, endocrine cells, nerve fibers.

### Информация об авторах

Кривова Ю.С. – канд. биол. наук, научный сотрудник НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, Сиреневый б-р, д. 16, к. 1, кв. 28. Телефон: 8 910 405-5256. E-mail: homulkina@gmail.com

Барабанов В.М. – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник НИИ морфологии человека РАМН.

Фокин Е.И. – канд. мед. наук, научный сотрудник НИИ морфологии человека РАМН.

Савельев С.В. – докт. биол. наук, профессор, руководитель лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека РАМН.

# ЛИМФАНГИОМАТОЗ БОЛЬШОГО САЛЬНИКА

*М.В. Мнихович<sup>1</sup>, И.В. Васин<sup>2</sup>, Л.М. Соломатина<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

<sup>2</sup> ГУЗ «Областная клиническая больница», Рязань

<sup>3</sup> ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздравсоцразвития России, Рязань

В статье приводится клиничко-анатомическое наблюдение редкого доброкачественного образования с локализацией в большом сальнике – лимфангиоматоз большого сальника. Заболевание рассматривалось как врожденный порок развития сосудов, а также было принято клиницистами за имплантационные отсевы множественной цистоаденомы яичника.

*Ключевые слова:* большой сальник, опухоль, лимфангиома, метастаз, врожденный порок развития

В многочисленных публикациях авторы называют большой сальник загадочным органом, в котором перекрещиваются все пути метастазирования злокачественных новообразований различной локализации [4, 9, 10, 11]. Факторы, определяющие удивительное постоянство и высокую частоту поражения сальника, пути и интенсивность метастазирования в зависимости от морфологической структуры опухоли и наличия выпота в серозных полостях, до настоящего времени изучаются [2, 4, 9].

Большой сальник занимает второе место (после поражения париетальной брюшины) по частоте обнаружения метастазов злокачественных опухолей, локализованных в брюшной полости, которая достигает, по данным разных авторов, 84–86% [1, 2, 10]. Клиницистам хорошо известно, что вовлечение большого сальника в опухолевый процесс отрицательно сказывается на течении и прогнозе заболевания [2, 3, 5]. Метастатически измененный большой сальник является постоянным источником дальнейшего метастазирования [2, 3, 5, 16].

Следует отметить, что метастазы в большом сальнике практически никогда не бывают единичными. Дистальная часть сальника вовлекается в опухолевый процесс в наибольшем проценте случаев [8, 9, 10, 11, 14]. При III–IV стадии заболевания в 72,5% случаев метастазы определяются выше уровня поперечной ободочной кишки. Макроскопическая картина метастатического поражения большого сальника при злокачественных опухолях яичников вариабельна: от небольших, едва заметных или пальпируемых метастатических узелков до тотального поражения сальника, который иногда приобретает вид панциря.

Топографо-анатомические и физиологические особенности большого сальника крайне неблагоприятны с точки зрения его вовлечения в опухолевый процесс. Способность к миграции в зону неоплазии и выражен-

ные адгезивные свойства большого сальника содействуют колонизации последнего опухолевыми элементами [4, 9].

Высокий ангиогенный потенциал, свойственный ткани большого сальника с его необычайно развитой системой кровеносных и лимфатических сосудов, создает благоприятные условия для образования многочисленных анастомозов с сосудами опухоли и последующего распространения опухолевых клеток по лимфатическим щелям и капиллярам [11].

Собственные опухоли сальника довольно редки [7, 13, 15]. По данным разных авторов, в сальнике встречаются сосудистые опухоли, липомы и опухоли из лимфатических сосудов – лимфангиомы. Последние довольно редки с локализацией в большом сальнике [7, 15].

Лимфангиома – опухоль из лимфатических сосудов – наблюдается чаще у детей как врожденный порок развития, но может встречаться в любом возрасте, без различия пола. Преимущественная локализация – шея, слизистая оболочка полости рта, язык, забрюшинное пространство, брыжейка, очень редко – внутренние органы. Чаще наблюдаются кавернозный или кистозный варианты опухоли.

Кавернозная лимфангиома имеет вид диффузного утолщения органа или бывает в форме узла, состоящего из множества полостей, разделенных перегородками и заполненных прозрачной бесцветной или кровянистой жидкостью. При большой примеси крови говорят о гемолимфангиоме.

Кистозная лимфангиома выглядит как одно- или многополостная киста с гладкими стенками. Микроскопически выстилка полостей состоит из одного ряда уплощенных эндотелиальных клеток. Часто в перегородках между полостями располагаются скопления лимфоидной ткани с образованием лимфатических фолликулов, что является характерным признаком



лимфангиомы. Она описана в средостении, забрюшинной клетчатке, в связи с грудным протоком и вдающимися в него крупными лимфатическими коллекторами.

В качестве примера приводим случай лимфангиоматоза большого сальника, принятого клиницистами за имплантационные отсевы множественной цистаденомы яичника.

Больная С., 46 лет, поступила в гинекологическое отделение ОКБ с жалобами на тянущие боль в низу живота, нарушение менструального цикла.

Объективно: кожные покровы бледные, живот мягкий, при пальпации безболезненный, симптомов раздражения брюшины нет.

УЗИ брюшной полости. Матка: форма обычная, структура миометрия не изменена, длина 57 мм, толщина 47 мм, ширина 52 мм, интрамурально округлое образование с ровными контурами 2,0 см в диаметре, субмукозно аналогичное образование диаметром 0,5 см. Эндометрий: толщина 9 мм (обычная). Контур эндометрия на границе с внутренним мышечным, четкие, кальцинаты не отмечаются. Полость матки не расширена, не деформирована. Шейка матки: длина 27 мм, ширина 30 мм, толщина 27 мм. Структура не изменена. Жидкостные включения с четкими контурами однородной структуры размерами 2–4 мм. Цервикальный канал не расширен. Эндоцервикс утолщен (12 мм). Правый яичник: длина 31 мм, толщина 23 мм, ширина 25 мм. Объем 8,53 мм<sup>3</sup>. Форма обычная. Структура неоднородная за счет диффузных изменений. Левый яичник: длина 62 мм, толщина 40 мм, ширина 45 мм. Объем 53,45 мм<sup>3</sup>. Форма шаровидная. Структура неоднородная за счет кистозного образования 50 x 48 мм. Рядом располагается кистозное анэхогенное образование по типу фолликула диаметром 32 мм. Жидкость в позадиатомном пространстве не отмечается. Признаки спаечного процесса таза отмечаются справа и слева. Дополнительные признаки: стенки кисты без внутренних разрастаний. Содержимое с мелкодисперсной взвесью. Ультразвуковая картина характерна для хронического цервикоза (?), эндоцервицита, кисты левого яичника по типу фолликулярной. Косвенные признаки хронического двустороннего аднексита.

После проведенного обследования пациентке проведено оперативное лечение. На операции по вскрытию брюшной полости выявлены округлые образования в большом сальнике диаметром от 0,5 до 5,0 см, заполненные серозным содержимым.

В левом яичнике выявлены многокамерные кисты диаметром от 5,0 x 4,5 x 3,0 см с тонкой стенкой, заполненные серозно-геморрагическим содержимым.

Во время операции проведено экстренное гистологическое исследование фрагмента большого сальника и удаленной кисты яичника.

Заключение: серозная цистаденома яичника. Ткань сальника с элементами лимфоидной инфильтрации в

строме, полнокровие сосудов, микротромбозы, неинвазивный имплантат серозной опухоли яичника (?).

При макроскопическом исследовании: прядь большого сальника 20 x 18 x 3,5 см с фокальной атрофией жировой ткани, выраженным полнокровием сосудов и наличием округлых кистозных образований диффузно по всему препарату диаметром от 0,5 до 3,0 см, в дистальных отделах препарата, некоторые образования диаметром до 5,0 см. Пузыри заполнены серозным и серозно-геморрагическим жидким содержимым (рис. 1).

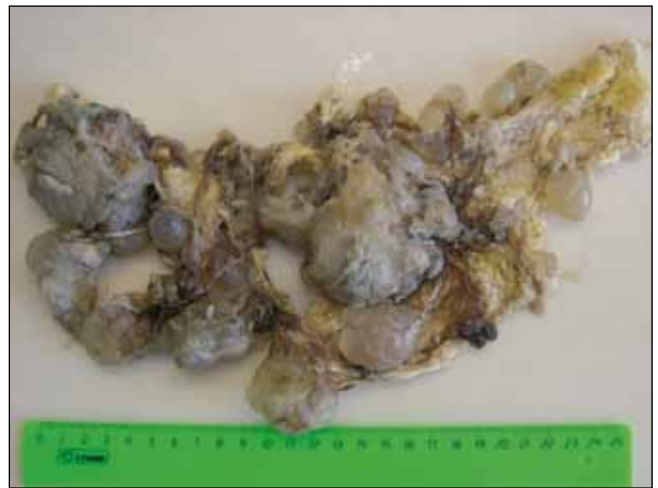


Рис. 1. Операционный макропрепарат: резецированная часть большого сальника

Кистозно измененный левый яичник с множественными кистами с гладкими тонкими стенками, вскрыты, содержимое отсутствует, собственно ткань яичника с очаговым склерозом, белыми телами. Маточная труба 7 x 0,8 см серозна, гиперемирована, в просвете слизь.

Правый яичник размерами 3,0 x 3,5 x 1,5 см склерозирован, маточная труба 6,5 x 1,0 см, в просвете слизь.

При микроскопическом исследовании образований сальника определяются многочисленные ветвящиеся тонкостенные лимфатические сосуды, имеющие вид широких щелей, выстланные уплощенным эндотелием, содержимое в некоторых – лимфа, в некоторых отсутствует (рис. 2). В строме – фиброз, выраженное полнокровие сосудов (рис. 3), воспалительная инфильтрация, преимущественно лимфоцитарного характера, очаговое скопление лимфоидной ткани с формированием лимфоидных фолликулов (рис. 4).

Заключительный гистологический диагноз: кистозная лимфангиома (лимфангиоматоз) большого сальника; серозная цистаденома левого яичника, хронический сальпингит.

Продемонстрировано редкое доброкачественное образование – лимфангиоматоз большого сальника.

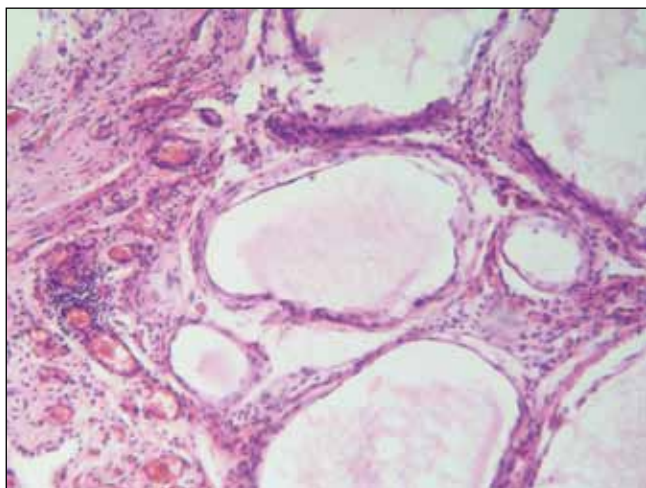


Рис. 2. Морфологическая картина лимфангиоматоза сальника: многочисленные ветвящиеся тонкостенные лимфатические сосуды в виде широких щелей, выстланные уплощенным эндотелием.

Окраска гем. – эозин. × 80

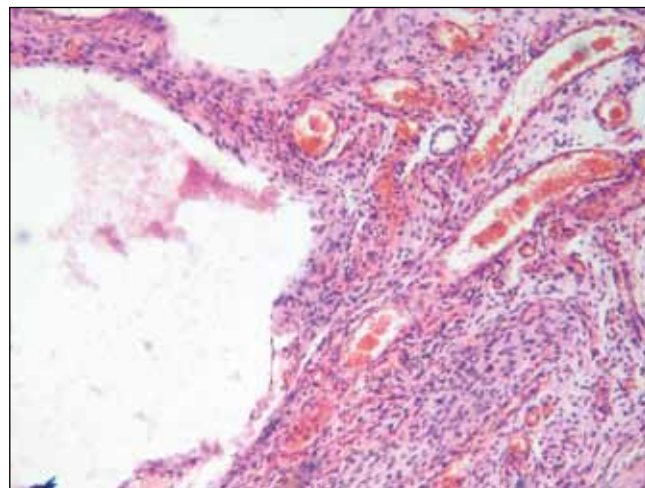


Рис. 3. Склероз вокруг резко расширенных лимфатических сосудов, резкое полнокровие и периваскулярный склероз кровеносных сосудов.

Окраска гем. – эозин. × 80

В данном случае заболевание рассматривалось как врожденный порок развития сосудов, но обращают на себя внимание возраст больной и отсутствие на протяжении жизни жалоб со стороны живота. Подчеркивается, что в таких случаях необходима правильная гистологическая верификация диагноза. При неправильной постановке диагноза лечебная тактика врача могла бы измениться, что повлекло бы за собой инвалидизацию больной.

### Литература

1. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. СПб.: Фолиант, 2002. 280 с.
2. Батталова Г.Ю. Пограничные опухоли яичников: оптимизация методов лечения и медико-социальная реабилитация больных: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2005. 43 с.
3. Винокуров В.Л. Рак яичников: закономерности метастазирования и выбор адекватного лечения больных. СПб.: Фолиант, 2004. 336 с.
4. Жетимкаримов Д.С., Островский В.К. Анатомия и хирургия большого сальника и связок желудка. Ульяновск: СВНЦ, 1999. 100 с.
5. Журило И.П. Опухоли и опухолеподобные образования брюшной полости и забрюшинного пространства у детей. / И.П. Журило, В.К. Литовка, В.П. Кононученко, В.З. Москаленко. Донецк: Донеччина, 1997. 152 с.
6. Кургузов О.П., Кузнецов Н.А., Артюхина Е.Г. Кисты брыжейки кишечника: обзор. Хирургия. 1991. № 2. С. 148–154.
7. Коледов С.А. Случай ультразвуковой диагностики многокамерной лимфангиомы брыжейки толстой кишки / С.А. Коледов, Г.И. Байкин. Ультразвуковая диагностика. 1999. № 3. С. 8–9.

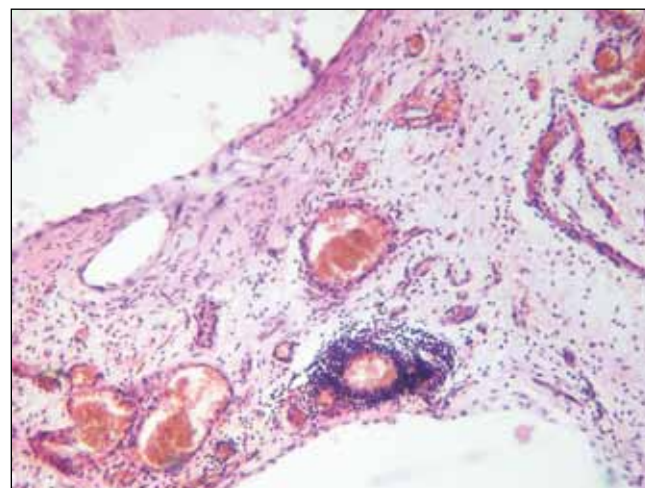


Рис. 4. Интерстициальное воспаление, формирование лимфоидных фолликулов вокруг резко расширенных и полнокровных кровеносных сосудов.

Окраска гем. – эозин. × 240

8. Литовка В.К., Грона В.Н., Латышов К.В., Тейшейра Ж. Хронический оментит, симулировавший необластический процесс // Хирургія дитячого віку. 2007. № 2. С. 50–51.
9. Нечипоренко Ф.П. Анатомические варианты большого сальника человека и их практическое значение в хирургии // Новый хирургический архив. 1957. № 3. С. 45.
10. Петровский Б.В. Хирургические болезни. М.: Медицина, 1980. 581 с.
11. Покровский Г.А., Сперанский В.С. Анатомия, гистология, эмбриология сальника // БМИ. 3-е изд. 1984. Т. 22. Столб. 1348–1354.
12. Чухриенко Д.П., Белый И.С., Бондаренко В.А. Спаечная болезнь. Киев, 1989. С. 98.

13. Intra abdominal and retroperitoneal lymphangiomas in pediatric and adult patients / B.K. Coh, Y.M. Tan, H.S. Ogn et al. // World J. Surg. 2005. Vol. 29. N. 7. P. 873–40.
14. *Correia F.M., Seabra B., Rego A.* et al. Cystic lymphangioma of the mediastinum // J. Bras. Pneumol. 2008. Vol. 34. N. 11. P. 982–4.
15. *Day W.* A small bowel lymphangioma presenting as a volvulus / W. Day, D.M. Kan // Hong Kong Med. J. 2010. Vol. 16. N. 3. P. 233–4.
16. *Ricketts R.R.* Mesenteric and Omental Cysts / In: Pediatric Surgery. St. Louis; Baltimore; Boston–Mosby, 1998. P. 1269–75.

## LYMPHANGIOMATOSIS OF GREATER OMENTUM

*M.V. Mnikhovich, I.V. Vasin, L.M. Solomatina*

We report a case of rare localization of benign lymphangiomatosis in the greater omentum regarded by clinicians as implantation metastasis of multiple ovarian cystadenoma. An anatomical and clinical study was performed. The disease was considered as a congenital vascular malformation.

*Key words:* large gland tumor, lymphangioma, metastasis, congenital malformation

### Информация об авторе

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

E-mail: mnichmaxim@yandex.ru

# СЕКРЕЦИЯ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА

*Н.В. Яглова, В.В. Яглов*

ФГБУ «НИИ морфологии человека РАМН», Москва

Тучные клетки щитовидной железы регулируют процессы фолликулогенеза и гормоногенеза в железе благодаря наличию рецепторов к тиреотропному гормону. Механизмы выделения веществ из секреторных гранул при воздействии гормонального стимула и морфологические проявления этого процесса мало изучены. В работе изучены секреторная деятельность тучных клеток щитовидной железы крыс через 1, 3, 6, 12, 24 и 48 часов после введения супрафизиологической дозы тиреотропного гормона. Методом световой и электронной микроскопии установлено, что стимуляция тиреотропным гормоном усиливает выделение секреторных продуктов из тучных клеток молекулярным способом, в основе которого лежат локальное оводнение гиалоплазмы вокруг секреторных гранул, растворение их содержимого и выделение его в гиалоплазму.

*Ключевые слова:* тучные клетки, щитовидная железа, ультраструктура, секреция, тиреотропный гормон

Тучные клетки (ТК) щитовидной железы являются многочисленной популяцией клеток. Роли ТК в регуляции секреторной активности щитовидной железы посвящено много работ, в которых описаны результаты изучения количественных показателей популяции ТК в онтогенезе, а также функциональной активности ТК с учетом возраста, пола и суточных ритмов активности щитовидной железы [8, 17]. В 70-е годы в работах L. Ericson и соавт. высказывалось мнение, что выброс биогенных аминов из ТК щитовидной железы контролируется тиреотропным гормоном (ТТГ) гипофиза [19]. В дальнейшем появились данные, что введение ТТГ крысам приводит к выбросу гистамина и серотонина, проникновению серотонина в фолликулярные тирциты и стенки артериол и микрофолликулярной перестройке паренхимы [6]. Таким образом, было установлено, что ТК являются также трансдукторами сигнала ТТГ. Объяснением этого феномена стало обнаружение у ТК рецепторов к ТТГ. Считается, что ТК не созревают до выхода из костного мозга в кровотоки и циркулируют в виде коммитированных предшественников, а процесс созревания завершается в периферических тканях, где у ТК формируется специфический рецепторный фенотип [11]. Таким образом, ТК приобретают регуляторные функции по отношению к фолликулярным тирцитам и регулируют их секреторную активность в норме и при состояниях, связанных с нарушением гипофизарной регуляции, таких как синдром нетиреоидных заболеваний и т.д. [5, 18].

Исследование ТК щитовидной железы показало, что выделение биогенных аминов в норме не связано

с дегрануляцией, то есть выбросом гранул за пределы ТК с нарушением целостности плазматической мембраны [19]. Основным способом выделения биогенных аминов считают постепенную дегрануляцию (в оригинале – *piecemeal degranulation*). Она заключается в переносе частей содержимого секреторных гранул к плазматической мембране везикулами и выделению веществ без нарушения целостности мембраны [9, 15]. Оценивая это явление с биохимических и цитофизиологических позиций, его следует рассматривать как молекулярный способ выделения секреторных продуктов. В современной научной литературе данные о механизмах молекулярного способа выделения продуктов из гранул ТК немногочисленны [7, 10]. Имеющиеся сведения не объясняют, каким образом происходит переход отдельных компонентов секреторных гранул разных химических классов в везикулы. По данным R. Melo et al., в эозинофилах человека преформированные интерлейкины различных семейств выделяются через разные тубуловезикулярные компартменты [12]. Следовательно, возможно существование и различных способов освобождения веществ из секреторных гранул, и разных механизмов молекулярного способа секреции в зависимости от вида рецепторов, активация которых приводит к выделению биологически активных веществ. Механизмы молекулярного способа выделения биологически активных веществ из секреторных гранул ТК под воздействием ТТГ и его морфологические проявления мало изучены.

Целью настоящего исследования было изучение секреторной деятельности ТК щитовидной железы

на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях в разные сроки после введения супрафизиологической дозы ТТГ.

### Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 53 самцах крыс Вистар с массой тела 200–250 г. Крысам опытной группы ( $n=29$ ) интраперитонеально вводили ТТГ (Sigma, США) в дозе 0,01 МЕ/кг массы тела в 200 мкл стерильного физиологического раствора. Опытных и контрольных животных выводили из эксперимента через 1, 6, 12, 24 и 48 часов после введения ТТГ. Умерщвление животных производили передозировкой золетила (Virbac Sante Animale, Франция). Эксперимент осуществлен в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977. Из щитовидной железы (ЩЖ) крыс традиционным способом изготавливали гистологические препараты, окрашенные 1%-ным раствором толуидинового синего с рН 2,0, и препараты для трансмиссионной электронной микроскопии. Изучение препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM2500 с применением морфометрической программы ImageScore (Leica mycosystems CMS GmbH, Австрия) и трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Методом компьютерной морфометрии определяли количество выявляемых ТК в  $1 \text{ мм}^2$  площади среза ЩЖ, их средний гистохимический коэффициент (СГК) по J. Astaldi и L. Verga, отражающий насыщенность ТК секреторным материалом, в нашей модификации, индекс дегрануляции (ИД) [3]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Сравнение количественных показателей производили с использованием критерия Стьюдента. Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0,01$ .

### Результаты и обсуждение

Колебания численности выявляемых ТК в ЩЖ крыс контрольной группы в течение первых суток исследования были слабо выраженными (рис. 1), однако их СГК значительно изменялся в течение суток с максимальными значениями через 1, 24 и 48 часов и минимальными значениями через 6 и 12 часов (рис. 1). Аналогичным образом изменялись значения ИД (рис. 1).

Через 1 час после интраперитонеального введения крысам ТТГ в дозе 0,01 МЕ/кг количество выявляемых ТК в единице площади среза статистически значимо превышало показатели контрольной группы. Насыщенность ТК секреторным материалом через 1 час после введения ТТГ не изменялась, о чем свидетельствуют значения СГК (рис. 1). Количество дегранулирующих ТК уменьшилось, но это различие не достигло статистической значимости (рис. 1). В течение 24 часов после введения ТТГ количество выявляемых ТК в щитовидной железе было выше, чем у крыс контрольной группы, но кривая изменения количества выявляемых

ТК в течение суток оставалась практически аналогична таковой в контрольной группе (рис. 1). В интервале от 3 до 48 часов после введения ТТГ СГК, отражающий насыщенность ТК секреторным материалом, значительно снизился, однако его суточные колебания сохраняли тот же ритм, что и в контрольной группе (рис. 1). Изменения ИД после введения ТТГ имели тот же ритм, что в контрольной группе (рис. 1). Отличием были более низкие показатели ИД через 12, 24 и 48 часов после введения ТТГ.

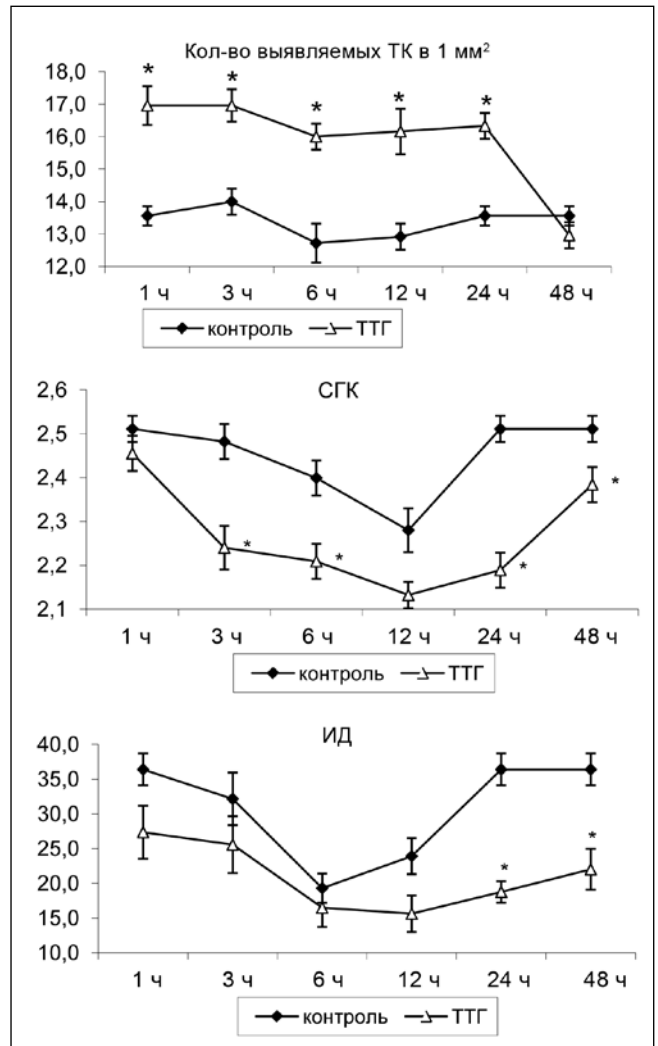


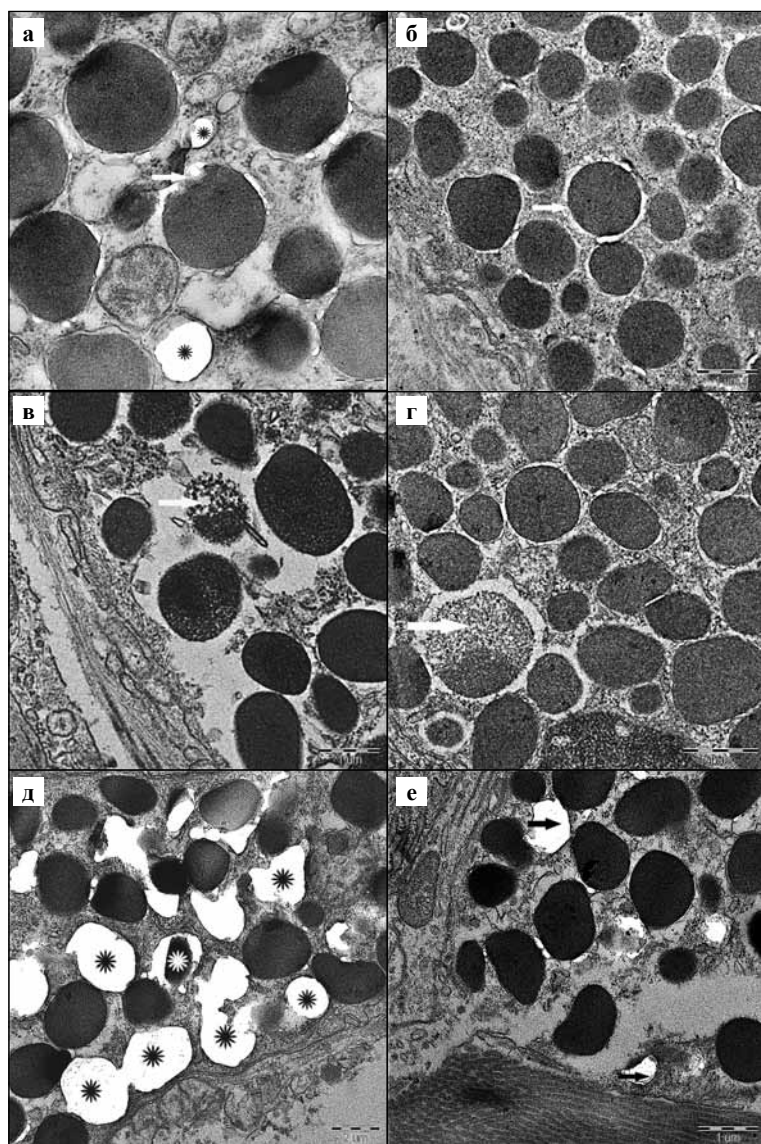
Рис. 1. Изменение цитофизиологических характеристик тучных клеток щитовидной железы крыс в сыворотке крови крыс контрольной группы и после введения ТТГ, ( $M \pm m$ ) \* – статистически значимые отличия от контрольной группы

Электронно-микроскопическое исследование ТК щитовидной железы крыс контрольной группы через 1 час после начала эксперимента показало, что они были плотно заполнены секреторными гранулами округлой и овальной формы с четкими ровными контурами. Гранулы были окружены мембраной и заполнены осмиофильным гомогенным содержимым высокой электронной плотности. В некоторых ТК отмечались

нарушение целостности плазматической мембраны и выделение секреторных гранул в окружающий клетку матрикс (дегрануляция), а также появление осмиофильных везикул вокруг единичных гранул. Через 3 часа после начала эксперимента в ультраструктуре ТК обнаружены просветления матрикса вокруг отдельных гранул и единичные случаи оводнения секреторных гранул, проявляющиеся в появлении мелких везикул снаружи их мембраны с последующим слиянием, и частичного растворения содержимого гранул (рис. 2). Через 6 часов при электронно-микроскопическом исследовании ТК наблюдались локальное просветление гиалоплазмы вокруг секреторных гранул и диспергирование их содержимого (рис. 2). Через 12 часов в ТК наблюдались расширение канальцев эндоплазматической сети и увеличение площади оводнения гиалоплазмы. В секреторных гранулах выявлено изменение гомогенности осмиофильного содержимого и его растворение, что вызывало появление на месте бывших гранул гидропических вакуолей (рис. 2). В последующие часы

выявлено уменьшение оводнения гиалоплазмы и растворения содержимого гранул.

При электронно-микроскопическом исследовании ТК щитовидной железы через 1 час после введения ТТГ в цитоплазме выявлено большое количество секреторных гранул, заполненных осмиофильным содержимым высокой электронной плотности. Просветления по периферии секреторных гранул встречались в единичных гранулах. Таким образом, ультраструктура ТК через 1 час после введения ТТГ практически не имела отличий от ультраструктуры ТК крыс контрольной группы. Через 3 часа после введения ТТГ увеличилось количество секреторных гранул с признаками растворения их содержимого (рис. 2). Через 6 часов количество секреторных гранул в ТК уменьшилось. В некоторых клетках секреторные гранулы неравномерно располагались в цитоплазме в виде очаговых скоплений, имелись участки цитоплазмы, не содержащие секреторных гранул, наблюдались диспергирование и частичное растворение содержимого гранул (рис. 2). Через 12 часов



*Рис. 2.* Изменения ультраструктуры тучных клеток щитовидной железы через 3 часа (*а*), 6 часов (*б*) и 12 часов (*д*) после введения ТТГ и контрольной группы в аналогичные сроки (*б, з, е*)

*а)* образование осмиофильных везикул вокруг секреторных гранул, их слияние и начало растворения содержимого секреторной гранулы (указано стрелкой), единичные гидропические вакуоли (указано звездочкой);

*б)* образование осмиофильных везикул вокруг секреторных гранул (указано стрелкой), растворение содержимого гранул не наблюдается;

*в)* – широкая зона просветления вокруг секреторных гранул, диспергирование содержимого секреторной гранулы (указано стрелкой);

*з)* зона просветления вокруг гранул меньше выражена, диспергирование содержимого секреторной гранулы (указано стрелкой);

*д)* растворение содержимого многих секреторных гранул, образование на их месте гидропических вакуолей (указано черными звездочками), в некоторых гранулах видны остатки нерастворившегося содержимого (указано белой звездочкой); плазматическая мембрана без изменений;

*е)* широкая зона просветления вокруг секреторных гранул, осмиофильные везикулы вокруг гранул, растворение содержимого единичных секреторных гранул, образование гидропических вакуолей (указано стрелкой)

и 24 часа в цитоплазме ТК выявлялись значительные изменения. Во многих ТК обнаруживалось большое количество гидропических вакуолей, в некоторых из них присутствовали остатки содержимого секреторных гранул (рис. 2). Через 48 часов после введения ТТГ количество секреторных гранул в ТК было повышено. Осмиофильное содержимое секреторных гранул имело как высокую, так и среднюю электронную плотность. У одних гранул контуры были нечеткими. У других наблюдались просветления периферической части по контуру гранулы. Отмечались растворение содержимого единичных секреторных гранул и образование на их месте гидропических вакуолей.

Введение ТТГ приводило к увеличению количества выявляемых ТК в щитовидной железе на 30% в течение следующих 24 часов. Наиболее вероятным механизмом увеличения численности ТК было усиление миграции ТК в ЩЖ под влиянием ТТГ. ТТГ обладает не только тиреотропным, но и иммуномодулирующим действием, заключающимся в способности активировать и усиливать пролиферацию и дифференцировку клеток костномозгового происхождения, в том числе ТК, являющихся активными участниками реакций врожденного и адаптивного иммунитета [4, 14]. Введение ТТГ не изменяло суточные ритмы СГК и ИД, но влияло на количественные показатели цитофизиологии ТК. Насыщенность ТК секреторным материалом снижалась, но усиления процессов дегрануляции не наблюдалось. Таким образом, после введения ТТГ усиливалось выделение биологически активных веществ из ТК молекулярным способом. Ультраструктурные изменения ТК соответствовали динамике СГК. По данным Jahn R. et al., основными механизмами постепенной дегрануляции являются изменение кризисных гранул и отрыв отпочковывающихся везикул с помощью комплекса белковых молекул [13]. Динамика ультраструктурных изменений ТК показала, что молекулярный способ выделения секреторного материала проходит ряд стадий, первой из которых является оводнение секреторных гранул, а не изменение их формы. Такое явление наблюдается также при дегрануляции ТК у некоторых видов животных, гранулы ТК которых имеют кристаллическое содержимое [1]. Целью его является растворение кристаллических структур перед выделением гранулы. ТК крыс не содержат кристаллических образований в секреторных гранулах. Следовательно, солибилизация гранул необходима для выделения определенных классов биологически активных веществ молекулярным способом. Это означает, что способ универсален как для секреторных продуктов, не оформляющихся в секреторные гранулы, так и депонированных в гранулах веществ. Выделение молекулярным способом проявляется сначала как появление осмиофобных везикул, разделенных филаментами вокруг гранул, затем как зона просветления вокруг гранул. Растворение содержимого секреторных гранул проявляется как диспергирование их содержи-

мого и выделение осмиофильного содержимого в цитоплазму. По мере выделения содержимого гранул их осмиофильность снижается. При полном выделении содержимого гранулы молекулярным способом она превращается в гидропическую вакуоль, в отличие от дегрануляции, при которой в месте нахождения гранулы остается рыхлое хлопьевидное содержимое [16]. Аналогичный механизм был описан на примере выделения катехоламинов из хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечника [2], что свидетельствует об общности секреторных механизмов тучных клеток и эндокриноцитов, синтезирующих биогенные амины. Гидролиз преформированных соединений, а не отщепление частей секреторных гранул способствует высвобождению различных классов биологически активных веществ из секреторных гранул, что дает возможность их сегрегации в различные транспортные каналы, описанные R. Melo et al. [12].

Сравнение ультраструктурных изменений ТК крыс опытной и контрольной, находящейся под постоянным воздействием ТТГ, групп показало, что изменения, выявленные после введения супрафизиологической дозы ТТГ, аналогичны и отличаются только большей степенью выраженности. Таким образом, наблюдался дозозависимый эффект ТТГ на морфологические проявления выделения секреторного материала из ТК. Это подтверждает данные L. Ericson et al. [19], что основным механизмом выделения биологически активных веществ из ТК щитовидной железы при воздействии ТТГ является молекулярный способ, а не экзоцитоз гранул. Воздействие ТТГ на ТК активирует гидратацию секреторных гранул и гидролиз их содержимого.

## Выводы

Введение ТТГ стимулирует выделение биологически активных веществ из тучных клеток молекулярным способом, не изменяя суточных ритмов функционирования тучных клеток щитовидной железы.

В основе молекулярного способа выделения биологически активных веществ тучными клетками лежат растворение содержимого их секреторных гранул и выделение его в цитоплазму.

Морфологически молекулярный способ выделения секреторных продуктов характеризуется появлением мелких везикул с осмиофобным содержимым вокруг секреторной гранулы с последующим их слиянием, оводнением гиалоплазмы и растворением осмиофильного содержимого с образованием гидропических вакуолей на месте растворившейся гранулы.

## Литература

1. Проценко В.А. Тканевые базофилы и базофильные гранулоциты крови / В.А. Проценко, С.И. Шпак, С.М. Доценко. М.: Медицина, 1987. 128 с.
2. Яглов В.В. Цитофизиология хромоаффинной клетки мозгового вещества надпочечника / В.В. Яглов // Железы, их гистофизиология и нервная регуляция: Сб. трудов Московского

- общества испытателей природы / Под ред. О.В. Волковой М.: Наука, 1971. С. 130–138.
3. Яглова Н.В. Цитофизиологические особенности популяции тучных клеток щитовидной железы при воздействии липополисахарида / Н.В. Яглова // Морфологические ведомости. 2008. № 3–4. С. 94–98.
  4. Яглова Н.В. Тучные клетки и врожденный иммунитет / Н.В. Яглова // Иммунология. 2009. Т. 30. № 2. С. 139–143.
  5. Яглова Н.В. Ультраструктурные изменения в фолликулярных клетках щитовидной железы при воздействии липополисахарида / Н.В. Яглова, В.В. Яглов // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 1.
  6. Balboni G. Role of the mastocytes during functional activation of the thyroid / G. Balboni, C. Catini, G. Gheri // Bull. Assoc. Anat. 1980. V. 84. P. 55–8.
  7. Crivellato E. Cell secretion mediated by granule-associated vesicle transport: a glimpse at evolution / E. Crivellato, B. Nico, V. Gallo, D. Ribatti // Anat. Rec. 2010. V. 293. P. 1115–24.
  8. De Forteza R. Effect of mast cell chymase on the morphology of thyroid cells in vitro / R. De Forteza, K. Banovac, E. Koren // Int. Arch. Allergy Immunol. 1992. V. 99. N. 1. P. 133–40.
  9. Dvorak A. Human mast cells / A. Dvorak // Advances in anatomy, embryology and cell biology. 1989. V. 114. P. 1–107.
  10. Dvorak A. Ultrastructural studies of human basophils and mast cells / A. Dvorak // J. Histochem. Cytochem. 2005. V. 53. P. 1043–70.
  11. Gurish M. The diverse roles of mast cells / M. Gurish, K. Austen // J. Exp. Med. 2001. V. 194. P. F1–F5.
  12. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartment / R. Melo et al. // Traffic. 2005. N. 11. P. 1047–57.
  13. Jahn R. Membrane fusion / R. Jahn, T. Lang, T. Sudhof // Cell. 2003. V. 112. P. 519–33.
  14. Klein J. Characterization a novel set of resident intrathyroidal bone marrow-derived hematopoietic cells: potential for immune-endocrine interactions in thyroid homeostasis / J. Klein, H. Wang // J. Exp. Biol. 2004. V. 207. P. 55–65.
  15. Melo R. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses / R. Melo, P. Weller // Histol. Histopathol. 2010. N. 10. P. 1341–54.
  16. Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge / J. Caulfield et al. // J. Cell. Biology. 1980. V. 85. P. 299–311.
  17. The interdependence of the follicular, parafollicular, and mast cells in the mammalian thyroid gland: a review and a synthesis / M. Kalisnik et al. // Am. J. Anat. 1988. V. 183. N. 2. P. 148–57.
  18. Toll-like receptor-MyD88 and Fc receptor pathways of mast cells mediate the thyroid dysfunctions observed during nonthyroidal illness / R. Rocchi et al. // PNAS. 2007. V. 104. N. 14. P. 6019–24.
  19. TSH-induced release of 5-hydroxytryptamine and histamine from rat thyroid mast cells / L. Ericson et al. // Endocrinology. 1972. V. 90. N. 3. P. 795–801.

## SECRETION OF THYROID MAST CELLS INDUCED BY THYROID-STIMULATING HORMONE

*N.V. Yaglova, V.V. Yaglov*

Thyroid mast cells regulate folliculogenesis and thyroid hormone production due to expression of receptors binding thyroid-stimulating hormone (TSH). Release of mediators from thyroid mast cells is thought to occur via piecemeal degranulation. However, mechanism of hormone-stimulated secretion as well as its morphology is still poorly understood. The aim of the research was to study secretion of rat thyroid mast cells after single intraperitoneal injection of TSH at 0.01 IU/kg bw. Histological examination of the thyroid 1,3,6,12,24, and 48hh after injection revealed increased number of mast cells, decrease in secretory granules and reduced degranulation of mast cells. Transmission electron microscopy of the thyroid mast cells found consequent appearance and fusion of vesicles surrounding secretory granules, lysis of preformed secretory products and transformation of the secretory granules into large vacuoles. The data obtained show that TSH-induced release of preformed secretory products from thyroid mast cells is based on local hydration of the hyaloplasm and dissolution of secretory granules contents.

*Key words:* mast cells, thyroid gland, ultrastructure, secretion, thyroid-stimulating hormone

### Информация об авторах

Яглова Н.В. – докт. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон/факс: 8 (499) 120-8065, моб. 8 910 404 2101. E-mail: yaglova@mail.ru

Яглов В.В. – докт. мед. наук, профессор заведующий лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон/факс (499) 120-8065.



# УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИОКАРДА ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ КРЫС В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭФФЕКТОВ НЕВЕСОМОСТИ И ИСКУССТВЕННОЙ СИЛЫ ТЯЖЕСТИ

*Е.Н. Вареник<sup>1</sup>, Т.В. Липина<sup>2</sup>, Л.С. Погодина<sup>2</sup>, М.В. Шорникова<sup>2</sup>, Ю.С. Ченцов<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

<sup>2</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

В работе исследованы миокард и кардиомиоциты правого предсердия крыс при прерывистом действии искусственной силы тяжести величиной 2G и моделировании эффектов невесомости методом антиортостатического вывешивания, а также изучено совмещение этих воздействий. Представлен количественный анализ таких показателей, как площадь поперечного сечения кардиомиоцитов, относительное число капилляров в миокарде, объемные плотности митохондрий и миофибрилл в кардиомиоцитах. Показано, что наибольшее изменение этих параметров наблюдается при совмещении действия 2G и вывешивания.

*Ключевые слова:* сердце, правое предсердие, антиортостатическое вывешивание, искусственная сила тяжести, моделирование, ультраструктура, кардиомиоциты

В настоящее время в космической медицине и биологии ведется поиск мер, направленных на противодействие адаптации организма человека к невесомости, которые помогли бы увеличить возможное время пребывания в условиях невесомости. Проведение медико-биологических экспериментов на животных предоставляет возможность более детального исследования. Для создания некоторых физиологических эффектов невесомости в течение длительного периода времени на крысах используют антиортостатическое вывешивание, при котором происходит перераспределение жидких сред организма в краниальном направлении, характерное для невесомости [2, 16].

Активно изучаются воздействие искусственной силы тяжести на сердце млекопитающих и возможность ее использования для предотвращения негативных изменений, связанных с адаптацией к невесомости. Так, в полете биоспутника «Космос-936» впервые были получены данные, что непрерывная круглосуточная искусственная гравитация, создаваемая бортовой центрифугой, может предупредить развитие многих неблагоприятных эффектов, вызываемых невесомостью в сердце крыс [7].

В литературе имеется мало работ, посвященных исследованиям предсердных кардиомиоцитов (КМЦ) при моделировании эффектов невесомости [6]. В связи с тем, что помимо функции сокращения они выпол-

няют еще и секреторную – синтезируют натрийуретический пептид [12, 15], предсердные кардиомиоциты отличаются от рабочих КМЦ желудочков, поэтому и реакция этих клеток на те же воздействия может отличаться.

Целью данного исследования было выявление реакции секреторных КМЦ правого предсердия на совместное действие на крыс антиортостатического вывешивания и искусственной силы тяжести.

## Материалы и методы

В эксперименте использовали самцов крыс линии Вистар с исходной средней массой тела  $186 \pm 1$  г, подразделенных на 5 групп по 4 животных в каждой. Группа «контроль» включала животных, которые в течение всего эксперимента содержались в помещении центрифуги, включая время ее вращения. Животных 1-й экспериментальной группы с 5-х по 23-и сутки эксперимента на 1 час в день помещали в пеналы, используемые для размещения крыс на центрифуге, но более не подвергали никаким воздействиям (прерывистая гиподинамия). Животные 2-й группы в течение 19 суток (с 5-х по 23-и) подвергались 1 час в день воздействию 2G. Крысы 3-й экспериментальной группы находились в течение 24 суток в антиортостатическом положении (вывешенные за хвост). Крысы 4-й группы в течение их 24-суточного вывешивания с 5-х по 23-и сутки экс-

перимента также подвергались вращению на центрифуге в условиях 2G 1 час ежедневно. Для создания 2G с вектором гравитации в направлении «спина–грудь» крыс размещали в ограничивавших их подвижность пеналах, установленных на периферической платформе центрифуги ЦФ-4 (радиус 3,6 м; скорость вращения 22 об/мин). Перед вращением на центрифуге находившихся в антиортостатическом положении крыс извлекали из устройств для вывешивания, помещали в пеналы центрифуги и вновь вывешивали после вращения. Вращение крыс 2-й и 4-й групп осуществляли в одно и то же время суток. Постановка эксперимента проводилась в Институте медико-биологических проблем РАН его сотрудниками под руководством кандидата медицинских наук И.Б. Краснова с соблюдением биоэтических норм обращения с животными при поддержке гранта ИНТАС-ЕКА № 99-1191.

После окончания эксперимента крыс декапитировали с помощью гильотины. Кусочки миокарда правого предсердия фиксировали 4%-ным глутаровым альдегидом на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,4) и обрабатывали по стандартной методике для электронномикроскопического анализа. На полутонких срезах определяли площади поперечных сечений КМЦ (с помощью программы ImageScore и Image J) и относительное число кровеносных капилляров, приходящихся на 100 КМЦ. На электронных микрофотографиях продольно ориентированных КМЦ определяли с помощью точечной тестовой системы [5] объемные плотности митохондрий (МТХ) и миофибрилл (МФ). Статистический анализ данных проводили по непараметрическому критерию Манна–Уитни в программе Statistica 5.5. Различия признавались достоверными при  $p < 0,05$ , приведены только достоверно значимые отличия. На графиках данные представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

**Результаты и обсуждение**

Светооптическое исследование не выявило изменений в морфологии миокарда правого предсердия во всех опытных группах по сравнению с контролем. Отсутствие изменений при исследовании на светооптическом уровне отмечено нами ранее и для миокарда левого желудочка сердца этих же животных [8].

В 1-й группе средняя площадь поперечного сечения КМЦ увеличена на 13% (рис. 1), что не сопровождается увеличением относительного числа капилляров (рис. 2). Объемные плотности МТХ и МФ в КМЦ, по сравнению с контрольной группой, тоже не изменены (рис. 3).

Во 2-й группе не обнаружено отличий по исследуемым параметрам от контроля: площадь поперечного сечения, относительное количество капилляров и объемные плотности МТХ и МФ неизменны.

В 3-й группе у крыс отмечено увеличение площади поперечного сечения КМЦ на 8% (рис. 1), сопровождавшееся ростом количества капилляров на 15%

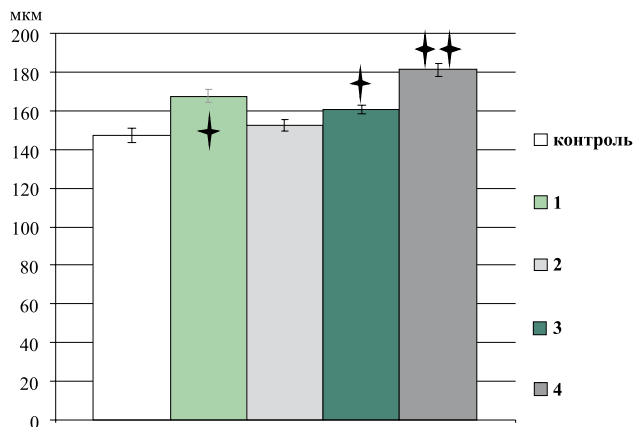


Рис. 1. Площадь поперечного сечения кардиомиоцитов правого предсердия крыс

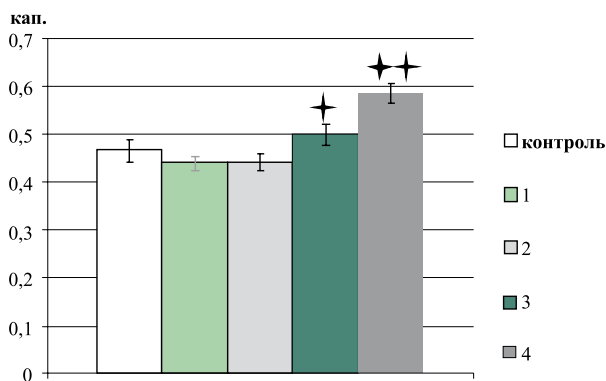


Рис. 2. Относительное число капилляров в миокарде правого предсердия крыс

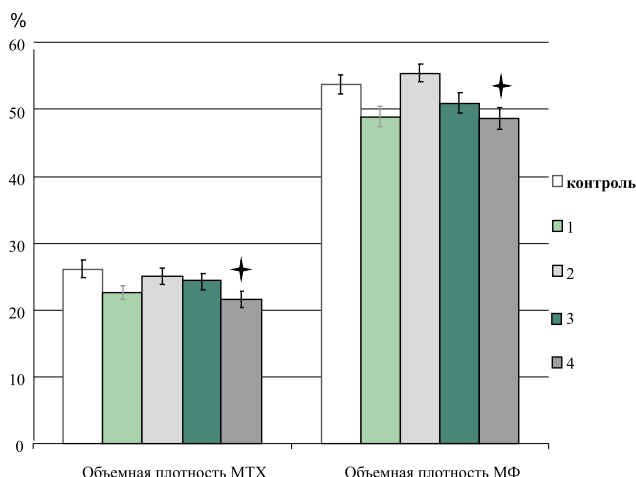


Рис. 3. Объемные плотности митохондрий и миофибрилл в кардиомиоцитах правого предсердия сердца крыс

(рис. 2). Объемные плотности МТХ и МФ в КМЦ не изменялись по сравнению с группой контроля (рис. 3).

Площадь поперечного сечения КМЦ крыс из 4-й группы увеличена относительно контрольной группы на 23% и превышает величины аналогичного параметра у крыс остальных экспериментальных групп (рис. 1). Количество капилляров в миокарде крыс 4-й группы также имеет максимальное значение по сравнению с данным параметром у крыс остальных групп: выше на 17–35% (рис. 2). При этом в КМЦ крыс 4-й группы объемные плотности МТХ и МФ снижены по сравнению с аналогичными параметрами у интактных животных на 18 и 9%, соответственно (рис. 3).

Как видно из полученных результатов, в КМЦ крыс 1-й группы при воздействии прерывистой гиподинамии увеличилась площадь поперечного сечения, сохранилось объемное содержание в клетках МФ и МТХ, однако рост числа капилляров, который характерен для функциональной гипертрофии КМЦ, не отмечен [11]. Таким образом, при данном воздействии не происходит функциональной гипертрофии КМЦ. Такие же изменения обнаружены и в КМЦ левого желудочка у этих же животных [8].

Скорее всего, данное воздействие можно отнести к стрессорным, при которых, как известно, включается симпатическая регуляция сердечно-сосудистой системы [4]. При усилении симпатического влияния наблюдается повышение частоты сердечных сокращений, что, как правило, усиливает сократительную активность миокарда, то есть следует ожидать гипертрофию КМЦ, которой не происходит. Можно заключить, что само по себе пребывание крыс в пеналах в указанные сроки не приводит к значимым нарушениям структуры миокарда правого предсердия и левого желудочка, вероятно, вследствие небольшой длительности ограничения подвижности животных.

У животных 2-й группы (прерывистое 2G) не наблюдается изменение анализируемых параметров в предсердных КМЦ. Это объясняется возможностью тренировки сердечно-сосудистой системы к гипергравитации [3, 9]. Кроме того, отсутствие изменений может быть обусловлено недостаточностью продолжительности данного воздействия. Однако в КМЦ левого желудочка нами ранее выявлена функциональная гипертрофия [8]. Можно предположить, что адаптивные изменения КМЦ правого предсердия происходят в более короткие сроки, чем КМЦ левого желудочка.

В правом предсердии крыс из 3-й группы (вывешивание) обнаружено увеличение площади поперечного сечения КМЦ с сохранением доли МТХ и МФ в клетках и сопровождающееся увеличением количества капилляров. Это указывает на развитие функциональной гипертрофии КМЦ правого отдела сердца. Эти данные согласуются с полученными на других сроках вывешивания – через 14 и 30 суток, когда показано возрастание функциональной активности секреторных КМЦ крыс [6]. Выявленные в данной группе изменения также

хорошо соотносятся с тем фактом, что при антиортостатическом положении происходят перераспределение жидких сред организма в краниальном направлении [13, 14] и усиление венозного возврата, а также повышение давления в полостях сердца и легочной артерии [1, 10]. Таким образом, в антиортостазе, также как в невесомости, повышается нагрузка на «правое сердце», поэтому усиление функциональной активности КМЦ правого предсердия вполне объяснимо.

В КМЦ правого предсердия у животных из 4-й группы (совмещение воздействий) наблюдаются наиболее выраженные изменения по сравнению с остальными опытными группами: максимальное увеличение площади поперечного сечения и числа капилляров, но при этом уменьшение объемного содержания МФ и МТХ в клетках. Таким образом, происходит рост объема клетки, но объем МТХ и МФ при этом увеличивается не пропорционально росту клетки, а отстает от него. Следовательно, выявленное увеличение площадей клеток нельзя рассматривать как их функциональную гипертрофию, которая обнаружена в левом желудочке у этих же животных [8]. Кроме того, объем МФ в секреторных миоцитах по сравнению с контролем снижен меньше, чем МТХ, то есть предсердные КМЦ, вероятно, функционируют в условиях развивающегося энергодефицита, что, безусловно, может иметь драматические последствия при более длительном сроке воздействий для сократительной и секреторной функции этих клеток.

## Заключение

Таким образом, каждое из исследованных воздействий в отдельности (прерывистая гиподинамия, прерывистое 2G и длительное круглосуточное вывешивание) не вызывает дизадаптивных изменений в правом предсердии крыс, тогда как совмещение воздействий приводит к дизадаптивным изменениям в КМЦ правого предсердия, а в КМЦ левого желудочка крыс наблюдаются признаки адаптивных изменений.

## Литература

1. Влияние кратковременной антиортостатической гипокинезии на давление в различных отделах сердечно-сосудистой системы здорового человека / Катков В.Е. и др. // Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1979. Т. 13. № 3. С. 62–67.
2. Коваленко Е.А. Основные методы моделирования биологических эффектов невесомости // Космическая биология и медицина. 1977. Т. 11. № 4. С. 3–9.
3. Куприянов В.В. Влияние гравитационных перегрузок на систему микроциркуляции / Петрухин В.Г. // Архив анат. гист. и эмбр. 1971. Т. 61. № 11. С. 17–30.
4. Меерсон Ф.З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Пшенникова М.Г. М.: Медицина, 1988. 253 с.
5. Непомнящих Л.М. Морфология важнейших общепатологических процессов в сердце. Новосибирск: Наука, 1991. 352 с.

6. *Погодина Л.С.* Адаптивные реакции секреторных кардиомиоцитов / Шорникова М.В., Ченцов Ю.С. // Известия РАН. Серия «Биология». 2004. № 1. С. 8–20.
7. *Рохленко К.Д.* Ультраструктура миокарда крыс, экспонированных на биоспутнике «Космос-936» / Мульдияров П.Я. // Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1981. Т. 15. № 1. С. 77–81.
8. Структура миокарда левого желудочка крыс в условиях моделирования эффектов невесомости и искусственной силы тяжести / Вареник Е.Н. и др. // Доклады АН. 2010. Т. 433. № 3. С. 423–425.
9. *Серова Л.В.* Изменение уровня гравитации как стрессор // Космическая биология и медицина. 1977. № 5. С. 25–32.
10. Функция левого желудочка сердца и легочное кровообращение у здорового человека во время орто- и антиортостатической пробы / Честухин В.В. и др. // Кардиология. 1985. Т. 21. № 5. С. 68–72.
11. *Шорникова М.В.* Межмитохондриальные контакты в системе митохондрия кардиомиоцитов в норме, при физиологических нагрузках и в патологии // Онтогенез. 2000. № 6. С. 470–475.
12. *Cantin M.* The heart and The atrial natriuretic factor / Genest J. // Endocr. Rev. 1985. Vol. 6. N. 2. P. 107–27.
13. Cardiovascular dynamics during the initial period of head-down tilt / Tomaselli C.M. et al. // Aviat. Space Environ. Med. 1987. Vol. 58. N. 1. P. 3–8.
14. *Gauer O.H.* Postural changes in the circulation / Thron H.L. // Handbook of Physiology. 1965. Sec. 2. Circulation. Vol. 3. P. 2409–40.
15. *Gharb C.* Volume regular hormones during simulated weightlessness / Gauquelin G., Geelen G. // Physiologist. 1985. Vol. 28. N. 6. P. 30–3.
16. *Morey-Holton E.R.* Animal models for simulating weightlessness / Wronski T.J. // Physiologist. 1981. Vol. 24. P. 45–8.

## MYOCARDIAL ULTRASTRUCTURE IN RAT RIGHT ATRIUM UNDER SIMULATION OF WEIGHTLESSNESS EFFECTS AND ARTIFICIAL GRAVITY

*E.N. Varenik, T.V. Lipina, L.S. Pogodina, M.V. Shornikova, Yu.S. Chentsov*

Electron and light microscopic studies of right atrium myocardium and cardiomyocytes were performed in rats exposed to intermittent artificial gravity at 2G and modeling the effects of weightlessness by antiorthostatic suspension. The combined effects of these effects was also studied. The following quantitative indicators were estimated: cross-sectional area of cardiomyocytes; relative number of myocardial capillaries; volume density of mitochondria and myofibrils in cardiomyocytes. The most significant changes in these parameters were revealed under combined impact of tail suspension and intermittent artificial gravity at 2G.

*Key words:* heart, right atrium, antiorthostatic suspension, artificial gravity, modeling, ultrastructure, cardiomyocytes

### Сведения об авторах

Вареник Е.Н. – старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека РАМН. Телефон: +7 916 38-38-128. E-mail: evgenijavarenik@rambler.ru

Липина Т.В. – канд. биол. наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. E-mail: tlipina@mail.ru

Погодина Л.С. – канд. биол. наук, старший научный сотрудник кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Шорникова М.В. – канд. биол. наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ченцов Ю.С. – докт. биол. наук, профессор кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

© Коллектив авторов, 2012

УДК: 616-001.18/19-092.9+591.4

# МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

*И.В. Арутюнян, А.В. Макаров, Т.Х. Фатхудинов, Г.Б. Большакова*

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

Представлено подробное описание основных современных методов моделирования цирроза печени на лабораторных животных.

*Ключевые слова:* цирроз печени, экспериментальная модель, холестаз, токсическое поражение печени

Цирроз печени – хроническое полиэтиологическое прогрессирующее заболевание, протекающее с поражением паренхиматозной и интерстициальной ткани органа, некрозом и дистрофией гепатоцитов, узловой регенерацией и диффузным разрастанием соединительной ткани, нарушением архитектоники органа и развитием той или иной степени недостаточности функции печени. В экономически развитых странах цирроз печени входит в число шести основных причин смерти лиц в возрасте 35–60 лет. В странах СНГ цирроз печени встречается у 1% населения [1].

Изучение механизмов развития цирроза печени, оценка гепатотоксичности различных веществ, исследование действия гепатопротекторов и применение современных клеточных технологий невозможны без адекватной модели цирроза печени на лабораторных животных. В современных исследовательских работах используются общепринятые методики индукции цирроза, однако большинство авторов не уделяют внимания динамике морфологических изменений печени. Целью настоящей работы был анализ морфологических изменений печени в экспериментальных моделях цирроза, за исключением вирусных и аутоиммунных, заслуживающих отдельного рассмотрения.

В качестве лабораторного животного исследователи обычно выбирают мышь или крысу, и лишь небольшая часть работ выполнена на других животных: свиньи [12], кролики [31], собаки [36], хомяки [20] и т.д.

В самых ранних моделях, появившихся еще в 30-е годы XX века, ключевым фактором развития цирроза был алиментарный. Так, при замене полноценного белка смесью L-аминокислот цирроз печени у крыс развивался через 4 месяца при более жесткой диете или через 12 месяцев при более мягкой [34]. Морфологические изменения печени, характерные для цирроза, наблюдали у крыс, длительное время (6–12 месяцев) находившихся на диете, дефицитной по холину, метионину, витаминам B<sub>9</sub> и B<sub>12</sub> [32]. Несмотря на значительные временные затраты и высокую смертность лабораторных животных, алиментарную модель цирроза печени,

обычно вызванную дефицитом холина и метионина, используют и в настоящее время [6].

В работах 70-х годов прошлого столетия было выявлено, что уже через 2–4 недели после ограничения содержания холина в корме крыс в гепатоцитах появляется значительное количество липидных капель (рис. 1) [7], развивается так называемый неалкогольный стеатогепатит, при котором жировая дистрофия постепенно переходит в фиброз и цирроз печени. Позже было предложено использовать холинодефицитную диету в качестве модели неалкогольного стеатогепатита на крысах [27]. Таким образом, цирроз печени, развивающийся при длительном (около 1 года) ограничении холина (или холина и метионина) в рационе, является следствием прогрессирования стеатогепатита.

Хотя интрагастральное введение алкоголя достаточно широко применяется для моделирования жировой дистрофии, фиброза и некроза печени [4, 21], развитие цирроза печени у крыс при подобном воздействии получиться не удалось.

Ко второй группе относятся модели цирроза печени, основанные на многократном введении различных гепатотоксических агентов: четыреххлористого углерода (тетрахлорметана), тиоацетамида, нитрозаминов.

Первые работы по изучению повреждений печени, вызываемых четыреххлористым углеродом, были опубликованы в 30–40-е годы XX века [16]. Можно утверждать, что в настоящее время эта модель цирроза печени является наиболее распространенной и хорошо изученной. Четыреххлористый углерод вводят подкожно [2], интрагастрально [35] или интраперитонеально [12] 1–3 раза в неделю, при этом доза колеблется от 0,05 до 0,30 мл/кг. При введении тетрачлорметан растворяют в минеральном [16] или оливковом масле [37]. Длительность введения может значительно колебаться (от 9 до 30 недель), однако обычно картину, типичную для цирроза (микро- или макронодулярного), фиксируют через 12–15 недель индукции [10, 31, 37].

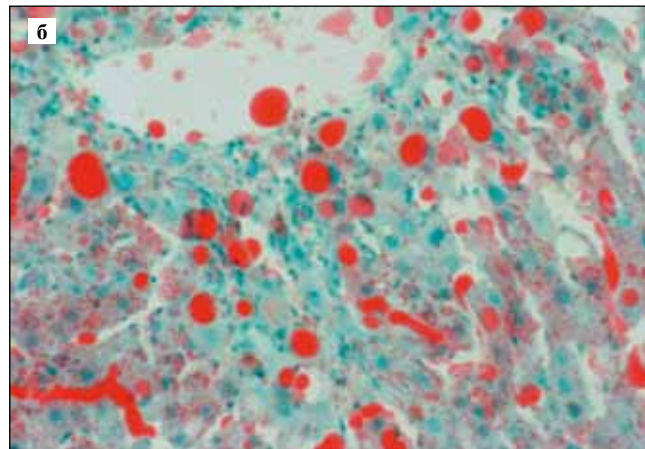
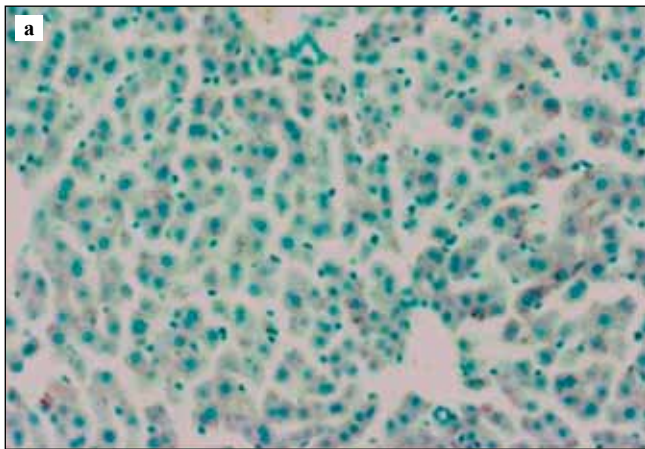


Рис. 1. Накопление липидных капель в печени мыши после 2 недель диеты, дефицитной по холину. *а* – контроль, *б* – опыт. Окрашивание масляным красным. По Tomito K. et al., Gut, 2006

Достаточно высокая смертность лабораторных животных (до 70%), характерная для этой модели, при некоторых модификациях может быть снижена до приемлемой. Прежде всего, уменьшают дозу и кратность введения гепатотоксического агента либо постепенно изменяют их в процессе индукции цирроза, ориентируясь на колебания массы тела животного [11, 31]. В некоторых работах предложено использовать только самок мышей, так как летальность среди самцов очень велика даже на ранних сроках [26]. Значительное увеличение выживаемости (до 90–100%) было получено при изменении способа введения тетрахлорметана: на протяжении 15 недель мышам проводили короткие ингаляции вещества. Цирроз печени развивался у животных через 11–15 недель, при этом повреждения других органов не наблюдали [3].

Распространенным индуктором цирроза является и тиаоацетамид. Гепатотоксический эффект тиаоацетамида начали исследовать в конце 40-х годов прошлого столетия, при этом основной акцент делали на изучение его канцерогенных свойств. В конце 60-х годов тиаоацетамид стали применять для моделирования цирроза печени [33]. Кристаллы обычно добавляют в корм или питьевую воду 2 раза в неделю из расчета 50 мг/кг массы [18, 24]. В других работах водный раствор тиаоацетамида вводили интраперитонеально 3 раза в неделю из расчета 100–200 мг/кг массы [26, 33]. Воспроизводимость модели достаточно высока: у 93% крыс обнаруживается микронодулярная форма цирроза печени через 8 недель [24] и у 100% – через 12 недель [40]. Летальность животных при использовании данной модели относительно невысока – не более 10% [18, 40]. При этом тиаоацетамид не вызывает цирроза печени у крыс с генетически обусловленной альбуминемией даже при длительном (до 10 месяцев) введении [19].

Эффективность двух описанных выше моделей можно увеличить за счет дополнительного введения в рацион подопытных животных этанола [12, 37] или ча-

стичного ограничения питания [35]. Морфологические изменения печени, характерные для цирроза, выражены в этом случае значительно.

Гепатотоксическое действие диэтилнитрозамина и диметилнитрозамина начали изучать в 60-е годы XX века. Уже тогда были обнаружены их канцерогенные свойства, и нитрозамины стали применять для моделирования гепатокарциномы на крысах или других лабораторных животных. Чаще всего водный раствор диэтилнитрозамина вводят интрагастрально или интраперитонеально из расчета 50–100 мг/кг массы животного 1 раз в неделю на протяжении 2–3 месяцев, при этом исследование печени обычно проводят через 2 недели после последнего введения [8, 17, 23]. Тактика введения диметилнитрозамина немного отличается: водный раствор вводят интраперитонеально каждую неделю 3 дня подряд с последующим 4-дневным перерывом [9, 30]. Гистологические изменения печени, индуцированные нитрозаминами, можно разделить на три стадии: неспецифический некроз, воспаление, инфильтрация, пролиферация гепатоцитов на сроках 2–8 недель, микронодулярный цирроз на сроках 12–14 недель и появление неопластических узелков на сроках 14–20 недель [8]. Данная модель цирроза печени является менее распространенной из-за высокой токсичности индуктора и неопластических изменений печени, регистрируемых исследователями на разных сроках.

Общей для моделей цирроза печени, вызванного действием гепатотоксических агентов, является определенная стадийность морфологических изменений. В первые недели действия повреждающего агента отмечают жировую дистрофию и некроз гепатоцитов, циркуляторные нарушения с резко выраженным портальным застоем.

На следующей стадии происходит активация звездчатых клеток печени, которые начинают синтезировать фибриллярный коллаген и другие элементы внекле-

точного матрикса, что приводит к фиброзу печени. Цитоплазма клеток в центре долек, «замурованных» в соединительную ткань, вакуолизирована. Местами среди соединительной ткани отмечается пролиферация желчных протоков (рис. 2а). На заключительной стадии активно пролиферирующие гепатоциты начинают образовывать узлы регенерации, которые, однако, не имеют нормальной структуры дольки (отсутствует типичное радиальное расположение печеночных балок вокруг центральных вен, пространства Диссе расширены) и окружены фиброзной тканью (рис. 2б) [2].

Важно отметить, что при отмене введения гепатотоксинов на стадии фиброза возможно восстановление нормальной морфологии и функций печени за счет апоптоза звездчатых клеток и активации матриксных металлопротеиназ. Отмена гепатотоксинов после формирования цирроза может приводить к частичному ремоделированию печени, но восстановления нормальной архитектоники органа при этом не происходит [25].

К третьему типу моделирования цирроза печени относится наложение лигатуры на общий желчный проток подопытных животных. Данный тип операции был предложен в начале 80-х годов XX столетия, причем эксперименты часто проводились не только на крысах [28], но и на собаках [38]. Эта модель позволяет воспроизводить картину, характерную для вторичного билиарного цирроза: стойкая обструкция желчных путей вызывает повреждение междольковых желчных протоков и скопление желчи и некрозы в перипортальных зонах. Проллиферация эпителия желчных протоков начинается с периферии долек в области триад и постепенно распространяется вглубь (рис. 3). Наряду с дистрофическими изменениями паренхимы (жировая и белковая дистрофия) происходит разрастание соединительной ткани, что приводит к дезорганизации

структуры долек [2]. Микронодулярный цирроз печени, часто сопровождающийся асцитом [22], развивается через 4–5 недель после оперативного вмешательства [5, 14, 28]. Значительным недостатком данной модели является ухудшение общего состояния животного: развиваются гепатопульмональный [14] и гепаторенальный синдромы [13], кардиомиопатия [15], наблюдается значительная потеря веса [5]. Основной причиной высокой смертности, доходящей к 32-му дню после оперативного вмешательства до 90%, считается большая потеря крови вследствие появления множественных очагов геморрагии. Добавление в рацион оперированных крыс витаминов К и D<sub>3</sub>, а также увеличение содержания белка и витаминов в корме позволяют увеличить 32-дневную выживаемость крыс до 100% [39].

Основные свойства трех наиболее распространенных типов моделей цирроза печени приведены в таблице.

Помимо основных существуют некоторые другие, так называемые спонтанные, модели цирроза. Так, недавно была опубликована работа, проведенная на мышах, нокаутных по гену Gclc [29]. У этих мышей отсутствует фермент, необходимый для синтеза глутатиона – одного из важнейших клеточных антиоксидантов, что приводит к гибели животных на 30-е сутки. Добавление в питьевую воду L-N-ацетилцистеина увеличивало продолжительность жизни до 120 дней, при этом состояние животных оставалось удовлетворительным. После вскрытия было обнаружено, что у 100% мышей развился микронодулярный цирроз печени. Подобные модели являются достаточно сложными для воспроизведения, однако позволяют исследовать влияние отдельных факторов (например, оксидативного стресса) на развитие заболевания.

Этиология цирроза печени разнообразна, поэтому в современных работах акцент делают на изучение дей-

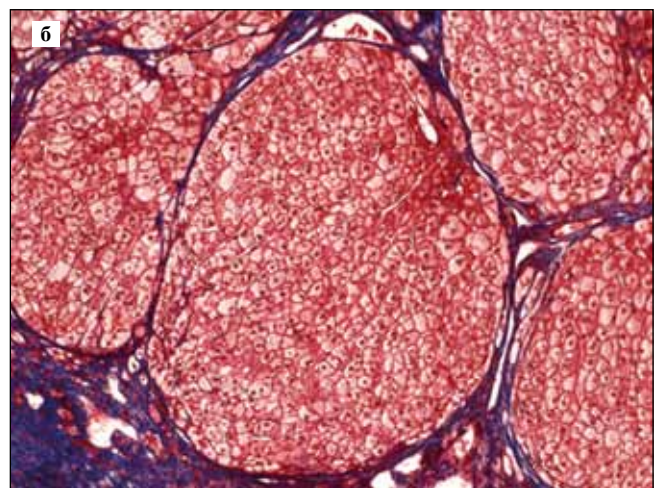
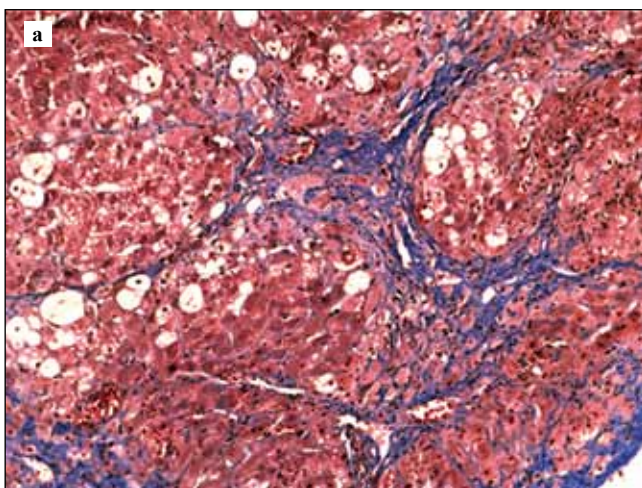


Рис. 2. Развитие цирроза печени, индуцированного тетрахлорметаном.

а – фиброз, б – цирроз печени.

Окрашивание трихромом по Массону. По Jin B. et al., Laboratory Investigation, 2005

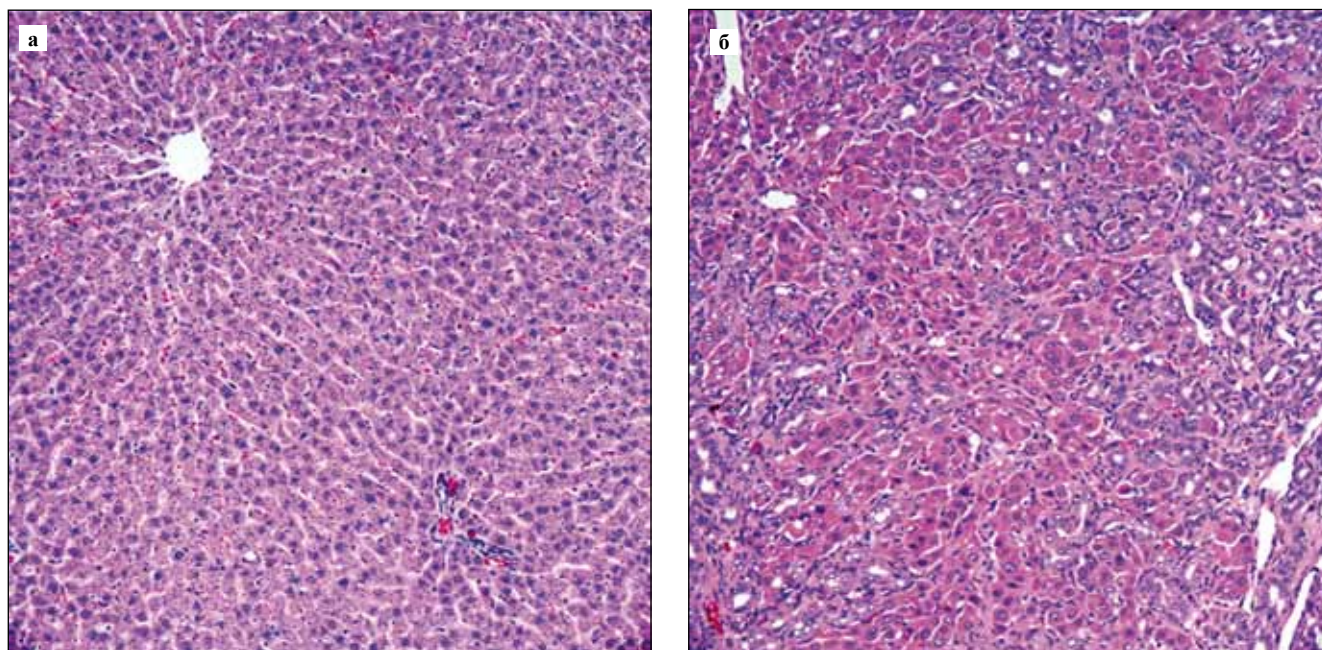


Рис. 3. Разрастание эпителия желчных протоков при циррозе печени, индуцированном наложением лигатуры на общий желчный проток. *а* – контроль, *б* – опыт. Окрашивание гематоксилином–эозином. По Lin S.-Y. et al., Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005

Таблица

**Характеристика основных моделей цирроза печени**

Тип модели	Срок развития цирроза	Этапы, предшествующие циррозу	Соответствие модели типу цирроза печени у человека
Диета, дефицитная по холину или холину и метионину	Около 12 месяцев	Неалкогольный стеатогепатит	Обменно-алиментарный цирроз
Действие четыреххлористого углерода, тиаоацетамида, нитрозоаминов	12–15 недель	Токсическое поражение печени	Токсический и лекарственный цирроз
Наложение лигатуры на общий желчный проток	4–5 недель	Холестаз	Вторичный билиарный цирроз

ствия самых разных молекулярных механизмов (оксидантов, регуляторов клеточного цикла, индукторов апоптоза, белков внеклеточного матрикса и т.д.). Исследователь выбирает конкретную модель, ориентируясь на следующие показатели: вид животного, уровень смертности при моделировании, длительность развития заболевания и его этиологическое соответствие, допустимость использования экзотоксинов, возможное влияние на другие системы органов и т.д.

Моделирование заболеваний на лабораторных животных позволяет исследователю максимально подробно изучить этапы развития повреждений тканей и органов, определить механизмы, лежащие в их основе, помогает найти путь к стимуляции репаративной регенерации.

**Литература**

1. Садовникова И.И. Циррозы печени. Вопросы этиологии, патогенеза, клиники, диагностики, лечения / И.И. Садовникова // Русский медицинский журнал. 2003. Т. 5. № 2. С. 88–98.
2. Солопаев Б.П. Регенерация нормальной и патологически измененной печени / Б.П. Солопаев. Волго-Вятское кн. изд-во, 1980. 240 с.
3. A novel model of CCl4-induced cirrhosis with ascites in the mouse / M. Domenicali et al. // J Hepatol. 2009. Т. 51. N. 6. P. 991–9.
4. A voluntary oral ethanol-feeding rat model associated with necroinflammatory liver injury / GL Tipoe et al. // Alcohol ClinExp Res. 2008. V. 32. N. 4. P. 669–82.
5. Activation of ubiquitin-proteasome pathway is involved in skeletal muscle wasting in a rat model with biliary cirrhosis: potential



- role of TNF-alpha / S.Y. Lin et al. // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005. V. 288. N. 3. P. 493–501.
6. Angiotensin II type 1 receptor antagonist improves the prognosis in rats displaying liver cirrhosis induced by a choline-deficient diet / K. Iwata et al. // *J Gastrointest Liver Dis.* 2008. V. 17. N. 1. P. 21–5.
  7. Bruni C. Effects of choline-deficient diets on the rat hepatocyte. Electron microscopic observations / C. Bruni, D.M. Hegsted // *Am J Pathol.* 1970. T. 61. N. 3. P. 413–36.
  8. Characteristic gene expression profiles in the progression from liver cirrhosis to carcinoma induced by diethylnitrosamine in a rat model / Y.F. Liu et al. // *J Exp Clin Cancer Res.* 2009. V. 28. N. 3. P. 107–17.
  9. Comparison of liver regeneration after a splenectomy and splenic artery ligation in a dimethylnitrosamine-induced cirrhotic rat model / A. Morinaga et al. // *HPB (Oxford).* 2010. V. 12. N. 1. P. 22–30.
  10. Constandinou C. Modeling liver fibrosis in rodents / C. Constandinou, N. Henderson, J.P. Iredale // *Methods Mol Med.* 2005. V. 117. P. 237–50.
  11. Controlled production of cirrhosis in the rat liver / H. Rosa et al. // *Arq Gastroenterol.* 1991. V. 28. N. 1. P. 39–43.
  12. Development of a new animal model of liver cirrhosis in swine / J.J. Zhang et al. // *Eur Surg Res.* 2009. V. 42. N. 1. P. 35–9.
  13. Development of hepatorenal syndrome in bile duct ligated rats / R.M. Pereira et al. // *World J Gastroenterol.* 2008. V. 14. N. 28. P. 4505–11.
  14. Effects of heme oxygenase-1 on pulmonary function and structure in rats with liver cirrhosis / S.B. Guo et al. // *Chin Med J (Engl).* 2011. V. 124. N. 6. P. 918–22.
  15. Effects of the neutral endopeptidase inhibitor thiorphan on cardiovascular and renal function in cirrhotic rats / K.S. Park et al. // *Br J Pharmacol.* 2003. V. 139. N. 1. P. 81–8.
  16. Effects of Yeast and Food Intake on Experimental carbon Tetrachloride Cirrhosis of the Liver in the Rat / J. Post et al. // *Am J Pathol.* 1942. V. 18. N. 4. P. 661–73.
  17. Elpek GO. Thrombospondin-1 expression correlates with angiogenesis in experimental cirrhosis / G.O. Elpek, G.A. Gokhan, S. Bozova // *World J Gastroenterol.* 2008. V. 14. N. 14. P. 2213–7.
  18. Experimental thioacetamide-induced cirrhosis of the liver / E. Muñoz Torres et al. // *Histopathol.* 1991. V. 6. N. 1. P. 95–100.
  19. Failure of liver cirrhosis induction by thioacetamide in Nagase albuminaemic rats / P. David et al. // *Lab Anim.* 2002. V. 36. N. 2. P. 158–64.
  20. Formation of black pigment gallstone in a hamster model of experimental cirrhosis / R. Sakata et al. // *Eur J Clin Invest.* 1997. V. 27. N. 10. P. 840–5.
  21. French SW. Intra-gastric ethanol infusion model for cellular and molecular studies of alcoholic liver disease / S.W. French // *J Biomed Sci.* 2001. V. 8. N. 1. P. 20–7.
  22. Hepatic and HSC-specific sorafenib effects in rats with established secondary biliary cirrhosis / M. Hennenberg et al. // *Lab Invest.* 2011. T. 91. N. 2. P. 241–51.
  23. Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis / C. Corpechot et al. // *Am J Pathol.* 2002. V. 160. N. 2. P. 613–20.
  24. Hepatogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Thioacetamide-induced Liver Cirrhosis / S. Hwang et al. // *Cell Biol Int.* 2012. V. 36. N. 3. P. 279–88.
  25. Iredale J.P. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments / J.P. Iredale // *BMJ.* 2003. V. 327. P. 143–7.
  26. Keratin mutation predisposes to mouse liver fibrosis and unmasks differential effects of the carbon tetrachloride and thioacetamide models / P. Strnad et al. // *Gastroenterology.* 2008. V. 34. N. 4. P. 1169–79.
  27. Koteish A. Animal models of steatohepatitis / A. Koteish, A. Mae // *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002. V. 16. N. 5. P. 679–90.
  28. Kountouras J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat / J. Kountouras, B.H. Billing, P.J. Scheuer // *Br J Exp Pathol.* 1984. V. 65. N. 3. P. 305–11.
  29. Oral N-acetylcysteine rescues lethality of hepatocyte-specific Gclc-knockout mice, providing a model for hepatic cirrhosis / Y. Chen et al. // *J Hepatol.* 2010. V. 53. N. 6. P. 1085–94.
  30. Pharmacokinetics of oltipraz in diabetic rats with liver cirrhosis / C.Y. Ahn et al. // *Br J Pharmacol.* 2009. V. 156. N. 6. P. 1019–28.
  31. Reversibility of experimental rabbit liver cirrhosis by portal collagenase administration / B. Jin et al. // *Lab Invest.* 2005. V. 85. N. 8. P. 992–1002.
  32. Rogers A.E. Animal model: fatty liver and cirrhosis in lipotrope-deficient male rats. / A.E. Rogers, P.M. Newberne // *Am J Pathol.* 1973. V. 73. N. 3. P. 817–20.
  33. Shea S.M. Experimental toxic cirrhosis in the rat. II. Kinetics of hepatocyte proliferation during intermittent thioacetamide intoxication / S.M. Shea, E.J. Manseau // *Am J Pathol.* 1968. V. 52. N. 1. P. 55–68.
  34. The induction of liver cirrhosis in rats by purified amino acid diets. / P.M. Newberne et al. // *Cancer Res.* 1969. V. 29. N. 1. P. 230–5.
  35. The role of food restriction on CCl4-induced cirrhosis model in rats / H.A. Goldani et al. // *Exp Toxicol Pathol.* 2007. V. 58. N. 5. P. 331–7.
  36. Ultrasonography, biochemical and hematological profiles in liver disease caused by intravenous administration of dimethylnitrosamine in dogs / T. Mwanza et al. // *Jpn J Vet Res.* 1997. V. 45. N. 3. P. 153–61.
  37. Ultrasound imaging in an experimental model of fatty liver disease and cirrhosis in rats / A.S. Lessa et al. // *BMC Vet Res.* 2010. V. 6. N. 6. P. 6–13.
  38. Unikowsky B. Dogs with experimental cirrhosis of the liver but without intrahepatic hypertension do not retain sodium or form ascites / B. Unikowsky, M.J. Wexler, M. Levy // *J Clin Invest.* 1983. V. 72. N. 5. P. 1594–604.
  39. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. / T. Akimoto et al. // *Exp Anim.* 2005. V. 54. N. 2. P. 155–61.
  40. Zimmermann T. Studies on lipid and lipoprotein metabolism in rat liver cirrhosis induced by different regimens of thioacetamide administration / T. Zimmermann, H. Franke, R. Dargel // *Exp Pathol.* 1986. V. 30. N. 2. P. 109.

## LIVER CIRRHOSIS MODELS IN LABORATORY ANIMALS

*I.V. Arutyunyan, A.V. Makarov, T.H. Fathudinov, G.B. Bolshakova*

We present a detailed review of current animal models of liver cirrhosis.

*Key words:* liver cirrhosis, experimental model, fatty liver, cholestasis, toxic liver damage

### **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

© Коллектив авторов, 2012

УДК: 616.8:616.329

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕЙРОПАТОМОРФОЛОГИИ

*Л.И. Кондакова, Б.В. Рубцов, А.С. Халанский*

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

В статье ретроспективно изложены результаты научных исследований, проведенных на глиальных клеточных линиях из коллекции опухолей мозга НИИ морфологии человека РАМН. Представленные данные свидетельствуют о перспективности использования нейрогенных клеточных линий в различных областях экспериментальной биологии и медицины.

*Ключевые слова:* клеточные линии, глиальные опухоли, нервная система

В настоящее время перевиваемые клеточные линии как экспериментальные модели широко используются для решения многих научных и прикладных задач биологии и медицины. Единственную в нашей стране уникальную коллекцию штаммов опухолей мозга, начало которой было положено профессором Л.Я. Яблоновской и академиком РАМН А.П. Авцыным более 30 лет назад, удалось пополнить полученными нами нейральными клеточными линиями: глиобластомой мыши ЭПНТ-5 (рис. 1), глиобластомой крысы 101/8 (рис. 2) и невриномами гассерова узла крысы НГУК-1 (рис. 3) и НГУК-2 (рис. 4). При изучении их биологических свойств было выявлено, что каждая культура обладает определенными метаболическими и структурными характеристиками. Эти свойства глиом *in vitro* позволили использовать данные клеточные модели для

широкого спектра исследований не только в экспериментальной нейроонкологии, но и в других областях научной и практической медицины. Коротко перечислим наиболее интересные результаты, полученные в исследованиях на перманентных линиях опухолей нервной системы из нашей коллекции.

Постоянные клеточные линии, способные к неограниченному размножению вне организма, в большинстве случаев состоят из недифференцированных клеток, поэтому особенно интересны те из них, которые, несмотря на злокачественность, сохранили способность к синтезу специфических белков и ферментов, свойственных исходной ткани. Так, в глиобластоме мыши ЭПНТ-5, длительно существующей вне организма и прошедшей почти 350 пассажей, как и в клетках нормальной глии, под влиянием гидрокортизона наблюдалась индукция

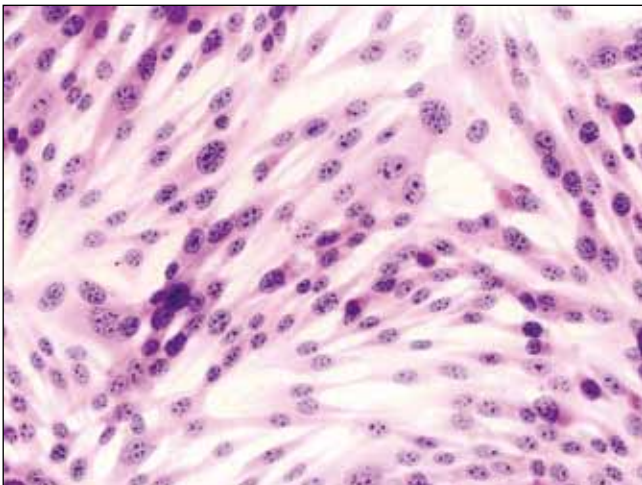


Рис. 1. Глиобластома мыши ЭПНТ-5

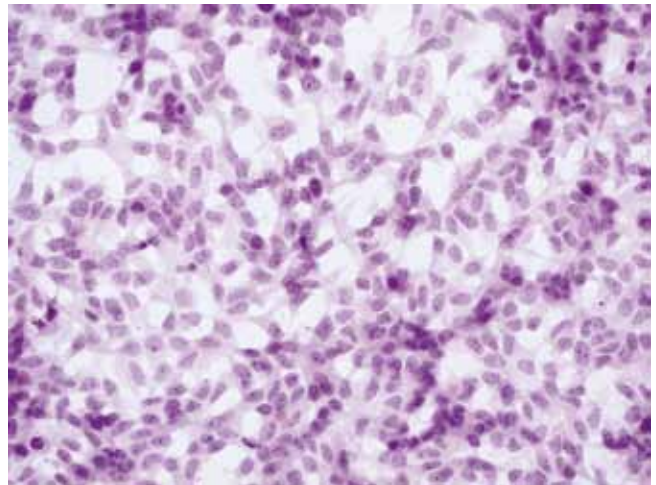


Рис. 2. Глиобластома крысы 101/8

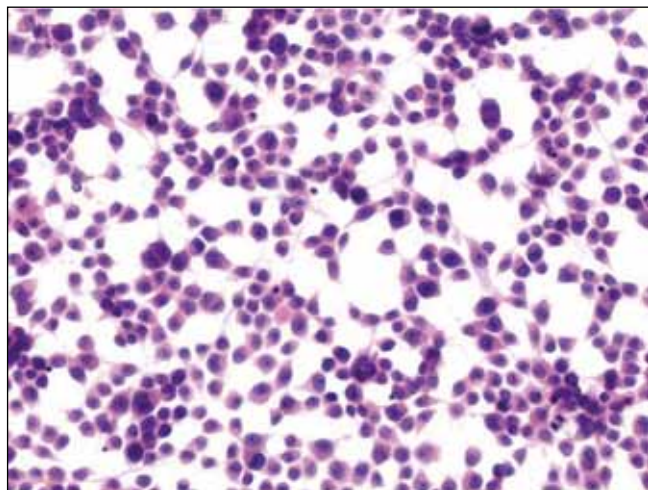


Рис. 3. Невринома гассерова узла крысы НГУК-1

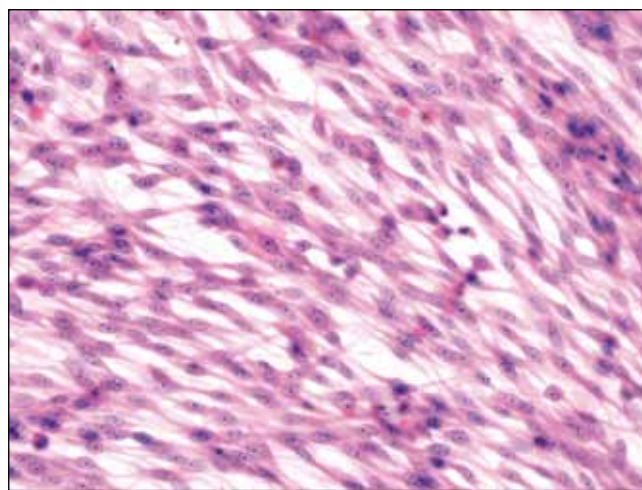


Рис. 4. Невринома гассерова узла крысы НГУК-2

активности фермента  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы, а клетки нейрональной линии невриномы гассерова узла крысы НГУК-1 экспрессировали белок S-100, являющийся маркером нервной ткани [14].

По мере роста глиобластомы мышцы ЭПНТ-5 вне организма заметно усилился ее клеточный полиморфизм и существенно возросли пределы вариаций содержания ДНК в клетках. Произошло также смещение двух модальных классов в сторону более высоких значений плоидности. Такое четкое бимодальное распределение содержания ДНК и длинный, растянутый «полиплоидный шлейф» сохранились в клетках и при дальнейшем пассировании [31]. Вполне возможно, что подобная морфологическая и генетическая пластичность опухоли способствовала более высокой жизнеспособности клеток при изменении условий ее существования.

Цитофотометрия и анализ содержания ДНК выявили интересный факт, не отмеченный прежде исследователями. В клеточных культурах опухолей мозга, на которых апробировали антибластические вещества с различным механизмом действия (нитрозометилмочевина и вариамицин), из всей высокогетерогенной по содержанию ДНК популяции опухолевых клеток полиплоидный компонент оказался наиболее чувствительным к воздействию противоопухолевых препаратов, и именно эти клетки погибали в первую очередь под действием противоопухолевых препаратов. В то же время клетки с содержанием ДНК, близким к диплоидному, наоборот, были более резистентными и жизнеспособными [15].

Авторадиографические исследования, с помощью которых определяли пролиферативную активность клеток линии ЭПНТ-5, подтвердили результаты цитофотометрии.  $^3\text{H}$ -тимидин активно включался в клетки небольшого размера с околодиплоидным содержанием ДНК, но ни в одном случае не было обнаружено меченых гигантских одно- или многоядерных клеток с высоким содержанием ДНК, несмотря на длительную

инкубацию культуры с изотопом. По мнению А.П. Авцына, гигантские клетки хотя и определяют степень злокачественности опухолей, являются тупиковым, нежизнеспособным элементом опухолевой популяции [13].

Возможно, именно высокая генетическая гетерогенность новообразований позволяет опухолевым клеткам лучше адаптироваться к условиям существования вне организма. Например, многократные попытки культивирования глиомы кролика (штамм 103), состоящей из клеток с содержанием ДНК, близким к диплоидному, не привели к получению перманентной клеточной линии. Более того, не удалось получить жизнеспособные даже первичные коротко растущие культуры этого штамма опухоли, в то время как из других интрацеребрально перевиваемых штаммов опухолей мозга, состоящих из высокоплоидных клеток и имеющих большой разброс содержания ДНК, были получены 3 перевиваемые клеточные линии.

Клеточная линия глиобластомы мышцы ЭПНТ-5 стала удобным и незаменимым объектом для биохимиков, изучающих на клетках нервной системы рецепторы к препаратам психотропного ряда, в частности бензодиазепаму и регулятору мозгового кровообращения –  $\gamma$ -аминомасляной кислоте (ГАМК). Ранее считалось, что такие рецепторы свойственны лишь нервным клеткам. В культуре глиобластомы ЭПНТ-5 были выявлены участки специфического связывания  $\text{H}^3$ -диазепама и ГАМК, то есть впервые было показано, что не только нервные, но и глиальные клетки принимают участие в реализации фармакологического действия бензодиазепинов на организм. Эти данные существенно расширяют представление о функциональных особенностях глии, также как и сведения, полученные на материале той же клеточной линии, свидетельствующие о присутствии в клетках культуры ЭПНТ-5 никотиновых и мускариновых рецепторов к ацетилхолину, что ранее считалось характерным только для нейронов [8, 9, 36]. Из этих исследований следует, что перевиваемые линии опухолей

мозга, несмотря на неопластическую трансформацию, являются простым и удобным объектом для изучения биологических и функциональных свойств глии.

Клеточная линия глиобластомы мыши ЭПНТ-5 часто использовалась как тест-объект по отбору антибластических и дифференцирующих агентов различной химической природы с изучением механизма их действия на клеточном уровне. С использованием линии ЭПНТ-5 проводились также исследования цитогенетических особенностей клеток опухолей мозга и экспрессии ретровирусов. На клетках этой линии разрабатывались новые подходы к лечению опухолей нервной системы, такие, например, как СВЧ-гипертермия с оценкой эффективности действия апробируемого метода по величине внутриклеточного pH, и т.д. [5]. Наиболее интересными из исследований последних лет представляются результаты изучения пролиферативной реакции глиальных опухолевых клеток на действие фактора старения млекопитающих. Проведению данных экспериментов на клеточной линии глиобластомы мыши ЭПНТ-5 предшествовали более ранние исследования по искусственному старению животных. Было показано, что введение молодым мышам экстрактов головного мозга старых животных не только приводило к появлению внешних признаков старения и изменению поведенческих реакций, но и сопровождалось почти двукратным уменьшением количества нейронов на фоне интенсивного глиоза [11]. Возникло предположение, что гибель нейронов может быть вызвана чрезмерным размножением глиальных клеток. Действительно, добавление таких экстрактов к диссоциированным нормальным глиальным клеткам и культурам глиом оказывало стимулирующее действие на их пролиферацию [10].

Для проверки этой гипотезы сравнили влияние экстрактов головного мозга и сыворотки крови молодых и старых животных на параметры митотической активности клеточной линии глиобластомы ЭПНТ-5. Не вдаваясь в детали этого исследования, отметим главное. По сравнению с материалом от молодых мышей экстракт и сыворотка крови старых животных повышали митотический индекс клеток глиальных опухолевых клеток более чем вдвое, увеличивая при этом процент патологических митозов, то есть предположение, сделанное профессором В.А. Зуевым о накоплении с возрастом в ткани млекопитающих фактора, активирующего пролиферацию клеток глии, получило доказательное подтверждение на материале клеточной линии глиобластомы мыши ЭПНТ-5 из нашей коллекции. На основе этих сведений вполне обоснованным кажется предположение В.А. Зуева, что гибель нейронов при старении в отсутствие инфекционного агента может быть вызвана усиленным размножением глии и нарушением в связи с этим контактов нервных клеток с питающими их капиллярами. Эти выводы важны не только для понимания причин старения, но и для предупреждения возможных опасностей при использовании донорской крови пожилых людей [18].

Нейрогенные клеточные линии из нашей коллекции стали также ценными и незаменимыми объектами для изучения трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (ТГЭ) – инфекционных заболеваний ЦНС человека и животных с медленно прогрессирующим развитием, тяжелым поражением мозга и неизменным летальным исходом. Возбудители этих болезней – низкомолекулярные белки, названные прионами, представляют собой относительно новый класс инфекционных агентов, приобретающих патогенные свойства в результате конформационных изменений нормальных белков. Ранняя диагностика заболеваний, вызываемых прионами, чрезвычайно сложна по многим причинам: в связи с длительным инкубационным периодом (от нескольких месяцев до нескольких десятилетий), сложностью верификации возбудителя, интактностью иммунной системы организма в ответ на заражение и отсутствием цитопатического эффекта в инфицированных клетках. Еще недавно прионные болезни были присущи только людям пожилого возраста. В последнее время появились новые формы ТГЭ, поражающие лиц молодого возраста, употреблявших в пищу зараженные мясные продукты. В связи с перечисленным выше становятся очевидными важность и актуальность разработки способов прижизненной диагностики этих опасных заболеваний.

Совместно с НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН нами была поставлена задача выбора экспериментальной клеточной модели для воспроизведения инфекционного процесса в системе *in vitro*. Метод был апробирован на нескольких клеточных линиях из нашей коллекции: невриномах гассерова узла крыс НГУК-1 и НГУК-2, феохромоцитоме крысы РС-12 и глиобластоме крысы С6. Наиболее информативные результаты были получены на клетках НГУК-1. На этой клеточной линии удалось воспроизвести длительную персистенцию возбудителя скрепи (штамм С-506, Институт национального здоровья США) – прионного заболевания овец, являющегося классической моделью для всей группы ТГЭ.

В инфицированных глиальных опухолевых клетках наблюдался выраженный цитопролиферативный эффект, характеризующийся повышенным митотическим индексом (МИ), а в отдельных случаях и индексом патологических митозов (ИПМ), а также увеличением плотности культурального монослоя. МИ клеток НГУК-1 увеличивался по мере длительного культивирования с инфекционным агентом и превышал контрольные значения в 1,7 раза на 32-м пассаже и в 4,8 раза на 99-м [35]. Электронная микроскопия зараженных культур выявила патологию мембранных элементов – образование миелиноподобных слоистых мембран и вакуолизацию цитоплазмы [35]. Постоянная воспроизводимость полученных результатов указывала на возможность разработки на основе клеточных линий опухолей мозга метода прижизненной диагностики этих нейродегенеративных заболеваний прионной природы.

В качестве источника инфекционного агента для заражения культур использовали клинический материал (диагностический биоптат головного мозга или сыворотку крови) от пациентов с предварительно поставленным диагнозом «болезнь Крейтцфельдта–Якоба» (БКЯ) и «синдром Герстманна–Штреусслера–Шейнкера» (СГШШ).

Из анализа полученных в эксперименте результатов следовало, что усиление пролиферации клеток культуры НГУК-1 наблюдалось в шести случаях из семи. МИ превышал не только контрольные значения (в пределах 1,5–4,5 раза), но иногда и значения МИ в культурах с агентом скрепи. ИПМ в опытных культурах повышался в той же степени, что и в культурах, инфицированных возбудителем скрепи, причем за счет тех типов патологии деления, которые чаще всего встречались в контроле. На электронно-микроскопическом материале отмечали очаговое расщепление миелиновых оболочек и вакуолизацию клеток, то есть изменения, характерные для глии при спорадических формах БКЯ и СГШШ [26]. Полученные результаты свидетельствовали о достаточно стабильном пролиферативном эффекте, вызываемом сывороткой крови пациентов с ТГЭ.

Использование клеточной линии НГУК-1 помогло прояснить некоторые патогенетические аспекты прионных болезней. В частности, получение четких и сопоставимых данных по митотическому режиму НГУК-1 при инокулировании в культуру сыворотки крови пациентов с ТГЭ (клинический материал, намного более доступный, чем биоптаты мозга) не только упростило работу, но и позволило сделать важный вывод о гематогенном пути распространения инфекции [25, 26, 30]. В то же время проведенные эксперименты обозначили ряд новых вопросов, ответ на которые могут дать только дальнейшие исследования. В частности, это касается общности процессов старения и ТГЭ, возможности заражения от людей, страдающих прионными заболеваниями, через кровь, связь митотического режима с предрасположенностью организма к прионным болезням. Требуется решения вопрос, означает ли отсутствие пролиферативного эффекта (единственный отрицательный результат в наших исследованиях) отсутствие у больного прионной инфекции.

Учитывая активную роль глиальных клеток в патогенезе другой нейроинфекции – клещевого энцефалита, на клеточных линиях опухолей мозга (глиобластоме крысы С6, глиобластоме мыши ЭПНТ-5, невриноме гассерова узла крысы НГУК-1 и феохромоцитоме крысы РС-12) было проанализировано влияние вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ) на пролиферативную активность клеток опухолей мозга в условиях *in vitro*. Оказалось, что ВКЭ (штаммы Васильченко и Заусаев), вызывающие хронически текущее заболевание, также усиливают пролиферацию клеток глиальных культур приблизительно в той же степени, что и другие нейротропные агенты (возбудители прионных болезней, фактор старения), апробируемые на наших моделях.

Интересно, что опухолевые клетки, происходящие из центральной глии (глиобластомы С6 и ЭПНТ-5), отвечали на инокуляцию ВКЭ несколько более высокой степенью пролиферации (их МИ был в 2 раза выше, чем в контроле), нежели клетки из периферической глии (линия НГУК-1), МИ которых превышал контрольные значения только в 1,6 раза. В экспериментах отметили также ярко выраженную специфичность пролиферативного ответа на инфицирование культур ВКЭ. Заражение ВКЭ феохромоцитомы РС-12 (клеток периферической нервной системы) сопровождалось не повышением, а наоборот, двукратным снижением их митотической активности, что не приводило, однако, к полной гибели нейрональных опухолевых клеток [20].

Таким образом, клеточные линии опухолей мозга оказались адекватными модельными системами для исследования нейротропных агентов различного происхождения.

Клеточные линии опухолей нервной системы из нашей коллекции стали удобным объектом для изучения токсического действия ионов алюминия на клеточном уровне. О важности исследований свидетельствуют данные литературы. Как известно, избыток  $Al^{+3}$  в организме отрицательно сказывается на здоровье человека. Отложения ионов алюминия обнаружены в тканях мозга пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера. Этот элемент является конкурентом  $Ca^{+2}$  и  $Mg^{+2}$ , крайне необходимых организму. Накопление алюминия в костной ткани приводит к развитию остеопороза, в головном мозге – к нарушению внимания, потере памяти и ускоренному наступлению старческого слабоумия. Избыточное накопление алюминия в организме приводит также к снижению обоняния, зрения, слуха, ослаблению тонических рефлексов, снижению порога болевой чувствительности, повышению тонуса мышц и судорожной готовности.

По инициативе А.П. Авцына, изучавшего алюминозы человека на линии невриномы гассерова узла крысы НГУК-1, было проведено исследование цитоморфологии, ультраструктуры и пролиферативной активности клеток в присутствии хлористого алюминия (100 мкг/мл). Полученные результаты не выявили на светооптическом уровне каких-либо цитоморфологических изменений в клетках линии НГУК-1 на протяжении всего времени культивирования (14 суток), однако пролиферативная активность ее клеток снижалась в 3 раза уже через 24 часа контакта с ионами алюминия. При этом резко возрастал индекс патологических митозов (на 77,8% от общего количества митозов), 70% из которых были представлены колхициноподобными формами. Известно, что возникновение К-митозов индуцируется солями тяжелых металлов, при этом образуются комплексы этих металлов с сульфгидрильными группами растворимых белков, в частности тубулинами, что приводит к нарушению сборки веретена деления и цитоплазматического комплекса микротрубочек. Вероятно, алюминий, подобно солям тяжелых метал-

лов, нарушает процесс образования микротрубочек из димеров тубулина и препятствует сборке веретена деления, что и приводит в конечном счете к возрастанию числа К-митозов и остановке клеточного деления. Исследование ультраструктуры невриномы НГУК-1 выявило очаги деформированных и инкрустированных  $Al^{+3}$  мембран вблизи ядерного матрикса и внутри ядер отдельных клеток, что свидетельствует о так называемом эффекте коагуляции мембран. Хромосомный анализ клеток НГУК-1, проведенный с помощью R- и G-техники, не выявил в присутствии алюминия ни структурных аномалий хромосом, ни их фрагментации – нарушений, которые обычно наблюдаются при воздействии солей тяжелых металлов. Анализ результатов наших исследований и данных литературы позволяет полагать, что алюминий, подобно солям тяжелых металлов (таких, например, как никель и кадмий), индуцирует образование колхициноподобных митозов и вызывает эффект коагуляции мембран, но не обладает мутагенным действием и не затрагивает наследственный материал клеток [1]. Таким образом, клеточные линии оказались простым и удобным объектом для получения фундаментальных сведений по клеточной фармакологии токсичных микроэлементов.

Данные литературы свидетельствуют о большом значении микроокружения для модулирования морфологии и индукции дифференцировки опухолей *in vitro*. Получены убедительные доказательства дифференцировки злокачественных клеток молочной железы при их культивировании с эмбриональными мезенхимными тканями. Культивирование злокачественной саркомы с хордой зародыша цыпленка приводит к образованию в саркоматозной ткани участков гиалинового и волокнистого хряща. Таких примеров много. Ингибирующее влияние на рост опухолей оказывают разные клетки – лимфоциты, моноциты, клетки соединительной ткани, почек, сердца и легкого. Более того, отмечается органоспецифичность их противоопухолевого действия. Например, нормальные клетки печени интенсивнее подавляют рост именно опухолей печени, а белки внеклеточного лептоменингального матрикса вызывают торможение роста злокачественных глиом в большей степени, чем соматических опухолей. С нашей точки зрения, изучение возможностей лечения опухолей методами биотерапии является особенно актуальным в нейроонкологии. Продолженный рост злокачественных вариантов диффузно растущих глиальных опухолей после первичной операции, лекарственная токсичность и резистентность, радиационный и лекарственный канцерогенез, сопровождающие терапию опухолей нервной системы, подтверждают данное мнение. Нейрональные клеточные линии могут стать простыми, удобными и адекватными моделями для проверки концепции, согласно которой злокачественным клеткам можно вернуть статус нормальных, поместив их в специфические условия.

В плане изучения этой проблемы на клеточной линии НГУК-1 исследовали влияние эмбрионального микроокружения на индукцию дифференцировки опу-

холевых клеток. При совместном культивировании клеток невриномы с сингенными эмбриональными фибробластами (в соотношении 1:5) наблюдали выраженную супрессию опухолевого фенотипа. Клетки невриномы НГУК-1 в контакте с эмбриональными фибробластами проявляли признаки морфологической дифференцировки, изменяя свою цитоморфологию, они образовывали тонкие длинные отростки при существенном разрежении плотного опухолевого монослоя. В культуре наблюдали разобщение и даже изоляцию отдельных участков роста опухолевых клеток, уменьшение количества митозов [16].

Способность эмбриональных фибробластов ингибировать рост опухолей мозга проверили также в условиях *in vivo* на беспородных крысах. Предварительно выращенные в культуре клетки глиобластомы С6 и сингенные эмбриональные фибробласты (в том же соотношении 1:5), введенные внутримышечно, образовывали опухоли только у 8,3% животных, в то время как соответствующее количество инъецированных опухолевых клеток С6, но без эмбриональных фибробластов вызывало образование опухолей у 50% животных, то есть онкогенность клеток глиобластомы при их совместном введении с нормальными эмбриональными клетками снижалась в 6 раз. За динамикой роста внутримышечной модели глиобластомы С6 наблюдали также после ее однократного локального облучения (850 Р) и последующей инокуляции сингенных эмбриональных фибробластов непосредственно в ткань опухоли. При таких условиях эксперимента происходило постлучевое торможение роста глиобластомы как в опыте, так и в контроле, но у животных, получивших инъекцию культуры эмбриональных фибробластов, наблюдали почти четырехкратное снижение темпов роста опухолей.

Таким образом, в биотерапевтических экспериментах на опухолях мозга в условиях *in vitro* при непосредственном контакте опухолевых клеток с сингенными эмбриональными фибробластами можно было наблюдать модулирование морфологии, фенотипическую дифференцировку и ограничение роста клеток невриномы, а в условиях *in vivo* – существенное угнетение роста и развития глиобластомы С6 [2, 17]. Результаты наших исследований дают основания полагать, что клеточные линии опухолей нервной системы при разработке новых способов биотерапии могут стать незаменимыми тест-объектами экспериментальной нейроонкологии.

Клеточные линии из нашей коллекции в течение многих лет и в настоящее время используются для научных исследований в разных областях биологии и медицины многими учреждениями нашей страны и ближнего зарубежья.

Во ВНИИ ветеринарной медицины разработана и внедрена во многих регионах Российской Федерации система эпизоотологического и иммунологического мониторинга при классической чуме свиней (КЧС) и болезни Ауески (псевдобешенство). Включение клеточной линии невриномы гассерова узла крысы НГУК-1

в систему индикации инфекционных заболеваний значительно повысило чувствительность разработанных тестов и обеспечило прижизненное выявление возбудителей КЧС и болезни Ауески в организме зараженных животных, патологоанатомическом материале и объектах внешней среды при минимальном содержании возбудителя в исследуемых пробах. На основе полученных специфических сывороток стало возможным изготовление эффективных высокоточных диагностических наборов для выявления у животных этих опасных инфекционных заболеваний [33].

Разработанный А.П. Авцыным с соавторами способ экспресс-диагностики бешенства (авторское свидетельство № 1139166) [32] апробирован в широких масштабах в Республике Башкортостан. Подтвердилась высокая чувствительность клеточной линии НГУК-1 к возбудителю бешенства и оценено преимущество применяемого иммуноферментного анализа и способа выделения рабического вируса по сравнению с классической биопробой на белых мышках. Метод рекомендован для широкого внедрения в ветеринарную практику на территории Российской Федерации [3]. Аналогичные экспериментальные разработки проводятся в Национальном аграрном университете по биотехнологии, диагностике и профилактике бешенства (Сумы, Украина) [22].

В Казанском федеральном центре токсикологической и радиационной безопасности животных выявлены очевидные преимущества и перспективность использования клеточной линии невриномы НГУК-1 по сравнению с другими культурами для репликации и накопления вируса псевдобешенства рода герпес-вирусов с высоким выходом вирусной биомассы. На этой основе разработан метод изготовления эффективных и экологически безопасных вакцин против болезни Ауески [12].

Научным сотрудникам Казанской государственной медицинской академии удалось установить, что наиболее выраженной антигенной активностью обладает вакцина, для изготовления которой использовались вирусы, реплицированные на клеточной линии НГУК-1 [23].

В НИИ биохимии РАМН на клеточных линиях из нашей коллекции в течение длительного времени проводятся отбор и апробация лекарственных препаратов для терапии опухолей различного генеза [6, 7, 27].

В Институте биохимии Национальной академии наук Армении в экспериментах на клеточной линии НГУК-1 на световом и электронно-микроскопическом уровне было выявлено, что насыщенный пролином пептид, выделенный из гипоталамуса, оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки и индуцирует апоптоз [4].

Не так давно сотрудникам Киевского института гематологии и трансфузиологии удалось установить нейротропность вирусов гепатита С (ВГС). Клеточная линия невриномы НГУК-1 оказалась высокочувствительной к этому возбудителю. Его репликация и накопление в культуре, зараженной сывороткой крови больных гепатитом С, не оказывали цитопатического

эффекта, поэтому линия НГУК-1 может быть использована для моделирования хронического инфекционного процесса, выделения вируса и оценки антивирусной активности препаратов [28, 34].

Сотрудники лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН использовали сокультивирование нейрогенных клеточных линий из нашей коллекции со спленоцитами как модельную систему *in vitro* для выяснения закономерностей ранней реакции клеток иммунной системы на опухоли различного генеза [19].

В современных экспериментальных исследованиях нашей лаборатории было установлено, что противоопухолевый антибиотик доксорубин (ДР), обычно не проникающий через гематоэнцефалический барьер, в составе модифицированных полибутилцианоакрилатных наночастиц может с успехом использоваться в химиотерапии опухолей мозга. У крыс с интрацеребрально трансплантированной глиобластомой (штамм 101/8) при внутривенном введении препарата отмечается существенное (на 80–150%) увеличение продолжительности жизни и выживаемости (на 20–30%). Эти исследования доказали высокую перспективность изучения новых подходов к лечению новообразований мозга на наших экспериментальных моделях [21].

Нами совместно с профессором J.J. Chinatl (Институт вирусологии Университета им. И.В. Гёте, Франкфурт-на-Майне, ФРГ) из штамма 101/8 глиобластомы крысы удалось получить новую клеточную линию, перевиваемую *in vitro*. В настоящее время на этой клеточной линии с помощью МТТ-теста начаты исследования цитотоксичности противоопухолевых препаратов. В результате была выявлена бимодальная зависимость выживания клеток опухоли от концентрации ДР. Препарат проявлял высокую цитотоксичность как в максимальных ( $10^{-3}$  моль/л), так и в минимальных ( $10^{-7}$  моль/л) дозах. Чувствительность клеток глиобластомы к промежуточным концентрациям ДР оказалась существенно снижена. Выявленная нелинейная зависимость цитотоксического эффекта от концентрации препарата требует дополнительных исследований на других клеточных линиях, однако обнаруженный эффект равноценного цитотоксического действия ДР в гомеопатических и стандартных (на несколько порядков выше) терапевтических концентрациях позволяет предположить возможность использования этого высокотоксичного препарата в минимальных дозах, не обладающих сильным побочным действием [29].

Ретроспективное изложение результатов многолетних исследований опухолей мозга, культивируемых вне организма, можно рассматривать, с одной стороны, как биологическую характеристику перевиваемых линий и возможность их использования в разных областях биологии и медицины, а с другой – как предложение к сотрудничеству на уникальном материале – клеточных линиях опухолей нервной системы из единственной в нашей стране коллекции экспериментальных опухолей мозга.



## Клеточные линии, имеющиеся в лабораторной коллекции экспериментальных опухолей нервной системы

1.	Глиобластома мышцы ЭПНТ-5	НИИ морфологии человека РАМН, Россия
2.	Глиобластома крысы 101/8	Там же
3.	Невринома гассерова узла крысы НГУК-1	Там же
4.	Невринома гассерова узла крысы НГУК-2	Там же
5.	Глиобластома крысы С6	Flow Lab., Великобритания
6.	Нейробластома мышцы С-1300	Там же
7.	Феохромоцитома крысы РС-12	Коллекция типовых культур, США
8.	14-4-5 глиома крысы	НИИ морфологии человека РАМН, Россия
9.	11-9-2	Там же
10.	RG-2	Национальная бактериологическая лаборатория, Швеция
11.	U-251 MG (GL-6) глиома человека	Там же
12.	U-373 MG мультиформная глиобластома человека	Там же
13.	9 L глиосаркома крысы	University of Southampton, США
14.	35 глиома крысы	Институт нейрохирургии, Киев, Украина
15.	2211	Там же
16.	223	Там же

## Литература

1. *Авцын А.П.* Реактивные изменения опухолевых клеток невриномы гассерова узла крысы при кратковременном и длительном воздействии алюминия / А.П. Авцын, Л.И. Кондакова, Г.П. Полякова // Сборник научных трудов НИИ морфологии человека РАМН «Актуальные вопросы современной гистопатологии». М., 1990. С. 63–67.
2. *Авцын А.П.* Биологические основы нейроонкологии / А.П. Авцын, Л.И. Кондакова, А.С. Халанский // Вестник РАМН. 1993. № 7. С. 51–54.
3. Адаптация вируса болезни Ауески на новой культуре клеток / Р.Х. Юсупов и др. // Ветеринария. 2003. № 11. С. 22–25.
4. Анализ влияния нового нейросекреторного пролинбогатого полипептида гипоталамуса на морфологию и митотическую активность опухолевых клеток невриномы гассерова узла / А.А. Галаян и др. // Доклады Национальной академии наук Армении. Биохимия. 2001. Т. 101. № 3. С. 279–286.
5. *Бауманис Э.А.* Сравнительное изучение механизма антиканцерогенного действия модуляторов распада биогенных моноаминов и аналогов 5-фторурацила / Э.А. Бауманис, М.Я. Саука, Л.И. Кондакова // Материалы симпозиума «Неспецифические стимуляторы противоопухолевого иммунитета». Юрмала, 29–31 марта 1983 года. С. 61–62.
6. Влияние гидролизатов тканей мозга крупного рогатого скота на синтез белка в различных органах мышей и клетках опухолей нервной системы / О.Ю. Абакумова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1988. Т. 126. № 8. С. 171–174.
7. Влияние оксиванадиевых соединений на рост нормальных и трансформированных клеток в культуре / О.Ю. Абакумова и др. // Биомедхимия. 2005. № 2. С. 25–28.
8. *Джалишвили Т.А.* Никотиновые и мускариновые рецепторы ацетилхолина в клетках глии животных и человека / Т.А. Джалишвили, Ю.Т. Плешкевич, Л.И. Кондакова // Доклады АН СССР. 1984. № 3. С. 641–644.
9. *Злобина Г.П.* Бензодиазепиновые рецепторы клеточной линии глиобластомы мышцы: аномальное влияние  $\gamma$ -аминоасляной кислоты на связывание диазепам / Г.П. Злобина, А.Г. Мухин, Л.И. Кондакова // Доклады АН СССР. 1982. Т. 267. № 6. С. 77–81.
10. *Зуев В.А.* Накопление в стареющем мозге млекопитающих фактора, резко стимулирующего пролиферативную активность глии / В.А. Зуев, И.В. Викторов, А.С. Халанский // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Т. 129. № 3. С. 317–320.
11. *Зуев В.А.* Искусственное старение мышей / В.А. Зуев, А.А. Автандилов, С.И. Быковская // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 135. № 9. С. 325–327.
12. Использование ионизирующего излучения и иммуностимуляторов для усовершенствования средств профилактики болезни Ауески (псевдобешенства) / А.В. Иванов и др. // Материалы международного симпозиума «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклеидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний». Казань, 28–30 октября 2005 года. С. 161–168.
13. *Кондакова Л.И.* Новая клеточная линия эпендимобластомы мышцы / Л.И. Кондакова, Н.В. Чудиновская, А.С. Халанский // Цитология. 1976. № 3. С. 996–1002.
14. *Кондакова Л.И.* Влияние гидрокортизона на активность  $\alpha$ -глицерофосфатдегидрогеназы в клетках глиобластомы мышцы ЭПНТ-5 / Л.И. Кондакова, Н.В. Чудиновская, В.И. Брусованик // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. 1981. Т. 80. № 5. С. 86–90.
15. *Кондакова Л.И.* Биологические свойства клеточной линии глиобластомы в различных условиях эксперимента: Автореф. дис. ... канд. биол. наук // Л.И. Кондакова. М., 1982. 20 с.
16. *Кондакова Л.И.* Влияние эмбриональных фибробластов на рост клеточной линии невриномы гассерова узла крысы НГУК-1 / Л.И. Кондакова, А.С. Халанский // Сборник научных трудов НИИ морфологии человека РАМН «Актуальные вопросы современной гистопатологии» // М., 1989. С. 41–43.

17. Кондакова Л.И. Ростстимулирующее действие нормальных фибробластов на клетки опухолей мозга / Л.И. Кондакова, М.Х. Левитман, А.С. Халанский // Сборник научных трудов НИИ морфологии человека РАМН «Актуальные проблемы общей и частной патологии». М., 1993. С. 179–182.
18. Кондакова Л.И. Пролиферативная реакция глиальных опухолевых клеток на действие фактора старения млекопитающих / Л.И. Кондакова, В.А. Зуев, Б.В. Рубцов // Вестник РАЕН. 2008. Т. 8. № 3. С. 57–59.
19. Малайцев В.В. Активация клеток иммунной системы при первичной экспозиции с клетками опухолевых линий *in vitro*. / В.В. Малайцев, И.М. Богданова // Сборник научных трудов НИИ морфологии человека РАМН. М., 2010. С. 135–137.
20. Митогенный ответ клеточных линий опухолей мозга на нейротропные агенты различной природы / Л.И. Кондакова и др. // Сборник научных трудов НИИ морфологии человека РАМН «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». М., 2008. С. 72–74.
21. Морфологические проявления действия наносомальной формы доксорубина на экспериментальную глиобластому / А.С. Халанский и др. // Биофармацевтический журнал. 2011. Т. 3. № 2. С. 41–50.
22. Новицкая О.В. Разработка тест-систем на основе иммуноферментного анализа для определения антител к вирусу бешенства в сыворотке крови животных: Автореф. дис. ... канд. ветерин. наук. Киев, 2004. 21 с.
23. Получение и испытание иммуногенности сухой культуральной инактивированной  $\gamma$ -лучами вакцины «Гаммавак–ВНИВИ» против болезни Ауески (псевдобешенства) / Г.Ф. Ильясова и др. // Ветеринарный врач. 2003. № 4 (16). С. 37–42.
24. Полякова Г.П. Обнаружение вирусных частиц в клеточной линии опухоли мозга мыши / Г.П. Полякова, Л.И. Кондакова, Н.В. Чудиновская // Экспериментальная онкология. 1983. № 5. С. 35–38.
25. Прижизненная диагностика прионных губкообразных трансмиссивных энцефалопатий / В.М. Ройхель и др. // Вопросы вирусологии. 1997. № 5. С. 203–205.
26. Прионные болезни на современном этапе. Исследования, проводимые в НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.И. Чумакова РАМН / В.М. Ройхель и др. // Вопросы вирусологии. 2005. № 3. С. 23–26.
27. Противоопухолевая активность L-аспарагиназы из *Versinia Pseudotuberculosis* / О.Ю. Абакумова и др. // Биомедхимия. 2008. Т. 54. Вып. 6. С. 712–719.
28. Размножение и выделение вируса гепатита С в нейральной клеточной линии невриномы крысы / Л.Ю. Вергун и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 148. № 12. С. 713–719.
29. Рубцов Б.В. Бимодальность цитотоксического действия доксорубина / Б.В. Рубцов, Л.И. Кондакова, А.С. Халанский // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. Т. 1. № 1. С. 44–46.
30. Синдром Герстмана–Штреусслера: новые возможности диагностики / И.А. Завалишин и др. // Неврология и психиатрия. 1995. Т. 95. № 1. С. 58–63.
31. Халанский А.С. Цитофотометрическое содержание ДНК в клетках экспериментальных опухолей мозга / А.С. Халанский, Л.Я. Яблоновская, Л.И. Кондакова // Цитология. 1976. № 2. С. 996–1002.
32. Штамм перевиваемых клеток невриномы гассерова узла крысы НГУК-1, используемый для изоляции полевых штаммов рабического вируса, экспресс-диагностики бешенства, определения глиотоксичности сывороток крови и титрования интерферона / А.П. Авцын и др. // Авторское свидетельство № 1139166. 1984. С. 1–7.
33. Юсупов Р.Х. Мониторинг при классической чуме и болезни Ауески свиней / Р.Х. Юсупов, Г.Х. Ильясова // Ветеринарный врач. 2000. № 1. С. 47–50.
34. Isolation of HCV in NGUK-1 rat neuroinoma neural cells / L.V. Vergun et al. EPS' naujing international Medical Medical development forum. 8–10 June 2011. P. 157.
35. Persistence of the scrapie agent in glial cells from rat gasserian ganglion / V.M. Rojkhel et al. // Acta viral. 1987. T. 31. N. 1. P. 36–42.
36. Zlobina G.P. Specific binding of [3H]diazepam in mouse glioblastoma: The influence of clonazepam and RO 5-4864 on [3H]diazepam binding / G.P. Zlobina, L.I. Kondakova, A.S. Kholansky // Neuroscience Letters. 1984. V. 52. P. 259–62.

## THE APPROACH FOR USING THE TRANSPLATABLE TUMOROUS BRAIN CELL LINES IN EXPERIMENTAL NEUROMORPHOLOGY

*L.I. Kondakova, B.V. Rubtsov, A.S. Khalansky*

This paper presents the retrospective review of the research on glial cell lines from the brain tumor collection of Research Institute of Human Morphology of the Russian Academy of Medical Sciences. These data suggest the potential use of neurogenic cell lines in experimental biology and medicine.

*Key words:* cell lines, glial tumors, nervous system.

### Информация об авторах

Кондакова Л.И. – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека РАМН.

Рубцов Б.В. – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы молекулярной диагностики НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E.mail: rubbor.ru-52 @ ail.ru

Халанский А.С. – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека РАМН.

# ОСОБЕННОСТИ ВТОРОЙ ВОЛНЫ ЦИТОТРОФОБЛАСТИЧЕСКОЙ ИНВАЗИИ: РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЦИТОТРОФОБЛАСТА, РОЛЬ ЭНДОВАСКУЛЯРНОГО ФЕНОТИПА И МНОГОЯДЕРНЫХ ГИГАНТСКИХ КЛЕТОК

*И.М. Расстригина, А.П. Милованов, Т.В. Фокина*

ФГБУ «НИИ морфологии человека РАМН», Москва

Процесс плацентации имеет определяющее влияние на благоприятный исход беременности. Ключевым механизмом ее является цитотрофобластическая инвазия. В обзоре обобщены характерные особенности дифференцировки инвазирующего цитотрофобласта по трем вариантам: интерстициальный трофобласт, возникающий из ворсинчатого цитотрофобласта оснований якорных ворсин, эндоваккулярный цитотрофобласт, разрушающий эндотелиальный покров маточных артерий, и многоядерные гигантские клетки, образующиеся путем слияния интерстициального цитотрофобласта. Проанализированы факторы регуляции этой инвазии во II и III триместрах беременности, в том числе роль генетических факторов, системы TIMP-1, противодействующей активности металлопротеаз, синтезируемых цитотрофобластом. Особо отмечены роль недостатка кислорода как стимулятора разных вариантов инвазивного цитотрофобласта и неблагоприятное действие его супероксида – оксидативный стресс. Подчеркивается необходимость дальнейших иммуногистохимических исследований этих клеток, осуществляющих гестационную перестройку вначале спиральных, а затем радиальных артерий матки для поддержания необходимого притока материнской крови в плаценту и полноценного развития плода.

*Ключевые слова:* цитотрофобласт, инвазия, беременность

Факт, что плацента – важнейший орган, играющий значительную роль во внутриутробном развитии человека и во многом предопределяющий его дальнейшую судьбу, известен давно. Вместе с тем многие важные детали функциональной активности плаценты, особенности строения и влияния на организм матери и плода до сих пор не ясны. Детали ключевого механизма плацентации – инвазия цитотрофобласта (ЦТИ) в стенку матки человека – изучены недостаточно.

Цитотрофобластическая инвазия представляет собой процесс миграции клеток цитотрофобласта из плаценты в эндометрий и миометрий, где они выборочно внедряются в артерии матки и модифицируют их в расширенные сосудистые каналы, приносящие намного больший объем крови к плаценте. Благодаря этому устанавливается маточно-плацентарное кровообращение, от которого зависят рост эмбриона и плода,

то есть успешное завершение беременности или ее потеря на разных этапах [1].

Большинство исследований в этой области ведется в основном на материале ранних стадий беременности, между тем как процесс на этом этапе не завершается, во II–III триместре инвазия продолжается [1, 2]. Дальнейшая перестройка радиальных артерий матки обеспечивает прирост объема материнской крови в межворсинчатое пространство плаценты, что во многом предопределяет удачный или неудачный исход беременности. В нашем обзоре предпринята попытка объединить данные, касающиеся цитотрофобластической инвазии во второй половине беременности.

## Новые технологии

В настоящее время для изучения строения и функций инвазирующих клеток используются разные методы.

Традиционный метод окраски гематоксилин-эозином успешно дополняется иммуногистохимическим методом [25] с использованием маркеров – цитокератина 7 и 8 с последующей морфометрией [40]. Для изучения динамики процесса инвазии, обнаружения клеток цитотрофобласта, синцитиотрофобласта, изучения состава экстрацеллюлярного матрикса (межклеточного вещества) этот метод незаменим. Он используется как в культуре цитотрофобласта с добавлением различных факторов роста, интерлейкинов, цитокинов, так и в биоптатах матки, взятых из плацентарного ложа во время кесарева сечения или из ампутированных маток [23, 49].

### Характер дифференцировки и динамика инвазии цитотрофобласта

На ранних сроках гестации процесс ЦТИ подробно изучен. На поздних стадиях беременности перестройка радиальных артерий миометрия видоизменяется для обеспечения быстрого роста плода [36]. Каково же направление дифференцировки задействованных в нем клеток? Вневорсинчатый цитотрофобласт традиционно подразделяют на интерстициальный (ИЦ), многоядерные гигантские клетки (МГК) и эндovasкулярный цитотрофобласт (ЭЦ) [34]. Известно, что по пути ЦТИ из оснований якорных ворсин в миометрий цитотрофобласт изменяет экспрессию факторов и структуру рецепторов, которые играют важную роль в васкуло-, ангио- и лимфангиогенезе [36], в частности это VEGFR 1-3, растворимый VEGFR-1, VEGF-A, VEGF-G и плацентарный ростовой фактор PIGF [36]. При дифференцировке цитотрофобласта редуцируются рецепторы, специфичные для поляризованного цитотрофобласта в составе эпителия ворсин, например интегрин  $\alpha 1 \beta 1$  [36]. В лизисе экстрацеллюлярного матрикса, стромы, эндотелия участвуют специфичные металлопротеиназы (MMPs), синтезируемые инвазирующим цитотрофобластом. Изменения экстрацеллюлярного матрикса цитотрофобластных клеток, его состав, изменения и нарушения дифференцировки можно зафиксировать и оценить с помощью иммуногистохимического метода.

### Интерстициальный инвазивный цитотрофобласт

В результате действия инвазивных интерстициальных клеток цитотрофобласта на спиральные, а затем и радиальные артерии они превращаются в широкие эндо- и миометриальные сегменты маточно-плацентарных артерий. Использование антител против цитокератина-8 позволяет иммуновизуализировать ИЦ по четкому венчику этого маркера в цитоплазме (рис. 1). При отсутствии необходимой перестройки радиальных артерий высокая интенсивность и турбулентность потока крови вызывает повреждение архитектоники ворсин, в том числе якорных [14]. К концу беременности маточно-плацентарные артерии становятся более

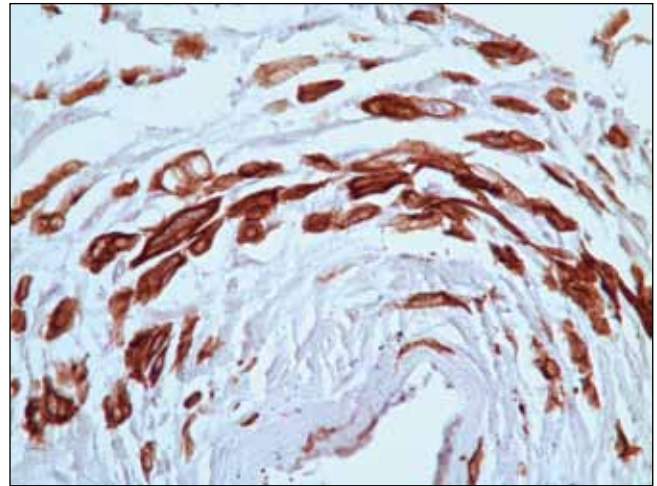


Рис. 1. Интерстициальный инвазивный цитотрофобласт вокруг радиальной артерии с лизисом элементов стенки, иммунопероксидазная визуализация с антителами против цитокератина-8.  $\times 200$

короткими и менее извитыми, мешковидными, диаметр их резко увеличивается [40]. Есть данные, что инвазивный трофобласт стимулирует продукцию ангиогенных факторов [37, 38, 49, 50].

### Эндovasкулярный инвазивный цитотрофобласт

Этот тип инвазирующего цитотрофобласта необходим для ремоделирования более крупных радиальных артерий, так как цель и уникальная способность эндovasкулярных цитотрофобластных клеток – имитировать фенотип эндотелиальных клеток и встраиваться изнутри в стенки радиальных артерий для дальнейшей их перестройки с лизисом эластичной и мышечной ткани и замещением ее фибрином (рис. 2). ЭЦ отличается не только своим местоположением, но

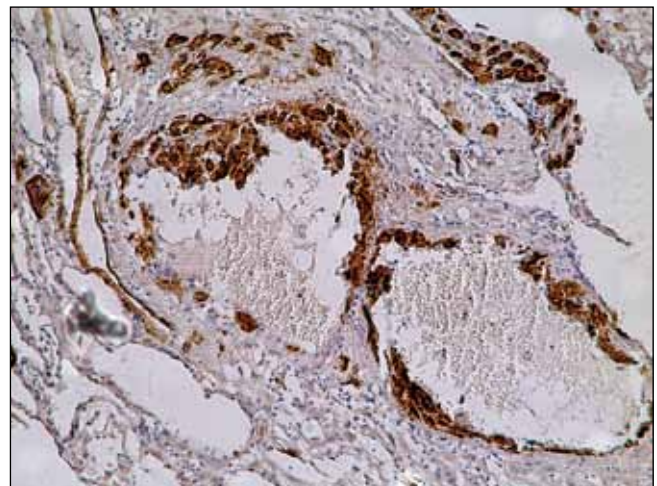


Рис. 2. Экстраvаскулярный инвазивный цитотрофобласт с проникновением в эндотелиальную выстилку и внутрь радиальной артерии, иммунопероксидазная визуализация с антителами против цитокератина-8.  $\times 50$

и некоторыми свойствами [40, 45]. Механизм встраивания этого цитотрофобласта в эндотелий сложный, он опосредован через кадгерин и Fas-лиганд/Fas-сигнальную систему [5, 11]. Есть данные, что он включает фагоцитоз эндovasкулярным цитотрофобластом эндотелиальных клеток [4]. Однако не все клетки, инвазирующие сосуды, встраиваются в их стенку и эндотелий. Многие из них остаются в миометрии и объединяются в весьма необычные и во многом загадочные структуры.

### Многоядерные гигантские клетки

В течение второй волны ЦТИ, распространяясь в центральных участках маточно-плацентарной области на границе с миометрием, как будто встретив препятствие, ИЦ образует большие скопления в межмышечных прослойках, часть клеток сливается, образуя МГК. С 33-й недели инвазия ИЦ затихает, но на ее границе в миометрии всегда определяются МГК. В 37–40 недель во многих участках миометрия в центральной зоне плацентарной площадки они преобладают [2]. Как уже было сказано, МГК имеют трофобластную природу [35]. Существует два вида МГК. По классификации al-Lamki [3], во-первых, это агрегаты из одноядерных клеток, соединенных между собой различными контактами (рис. 3), во-вторых – собственно многоядерные крупные клетки, содержащие в цитоплазме два ядра и более. В агрегатах трофобластных клеток, причисляемых к МГК, существуют специальные соединительные каналы (щелевые контакты) и десмосомы [17]. В структуру таких щелевых контактов входят белки коннексины [20]. Через них возможен обмен ионами и небольшими молекулами [47]. Щелевые контакты участвуют в процессе протеолиза. Возможно, с их помощью из агрегатов образуются МГК [19].

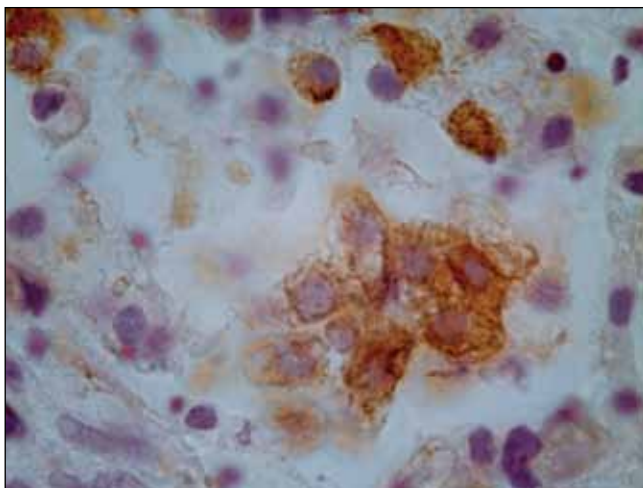


Рис. 3. Агрегаты из одноядерного цитотрофобласта (↑). Иммуноэкспрессия цитокератина-8 вокруг каждой клетки, иммунопероксидазная визуализация с антителами против цитокератина-8, иммерсия.  $\times 1000$

Структура собственно МГК имеет характерные особенности: высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, хорошо развитый комплекс Гольджи, вокруг него много цистерн эндоплазматической сети, в цитоплазме определяются кластеры гликогена, липидные капли и четкая экспрессия цитокератина-8 в их цитоплазме (рис. 4). Митотических фигур нет [3]. Это может свидетельствовать о синтезе белков, ферментов и гормонов для аутокринной стимуляции инвазии [8], например с помощью  $\beta$ -ХГЧ и плацентарного лактогена [3]. Доказано, что МГК экспрессируют белок комплекса гистосовместимости HLA-G класса I [31]. Перестройка радиальных артерий продолжается и после II триместра [9]. Вместе с тем остается неясным главный вопрос: МГК – тупик ЦТИ, поскольку эти клетки располагаются на крайних рубежах инвазивного процесса в миометрии, или это агрегация активных клеток для усиления их протеолитической функции? От этого процесса напрямую зависит благоприятный исход беременности, жизнь будущего ребенка, а иногда и матери. Рассмотрим известные механизмы регуляции ЦТИ в III триместре.

### Факторы регуляции цитотрофобластической инвазии

#### Ауто- и паракринные влияния

Нужно отметить, что изначальный ворсинчатый цитотрофобласт, вступая на путь миграции и формируя пролифераты в основаниях якорных ворсин, принципиально меняет не только внешнюю рецепторную структуру, но и многие внутренние механизмы. Это разделение и сам процесс регулируются во многом за счет специальных транскрипционных факторов. На экспрессию необходимых генов влияют многие белки и

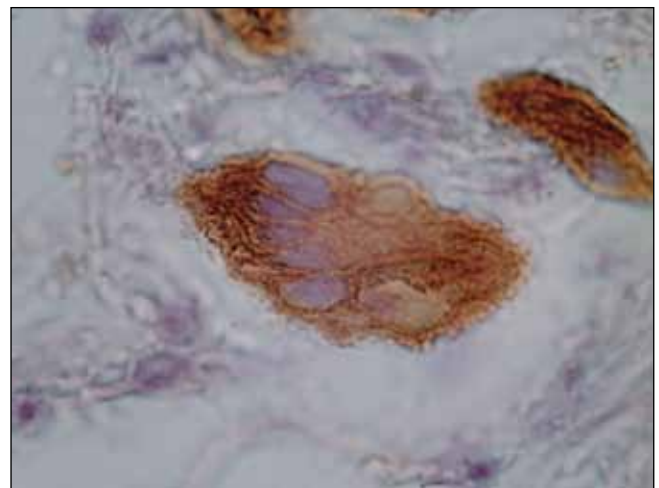


Рис. 4. Типичная многоядерная гигантская клетка с общей цитоплазмой и иммуноэкспрессией в ней цитокератина-8, иммунопероксидазная визуализация с антителами против цитокератина-8, иммерсия  $\times 1000$

ферменты. Так, усиливают инвазию плацентарный протеин-13 (PP 13) [25], он запускает инвазию [20], а также плацентарный протеин А (PAPP-A), он повышается в сыворотке крови матери в процессе беременности и снижается после родов, доказано, что он способствует инвазии [7].

### *TIMP*

Столь необходимый лизис экстрацеллюлярного матрикса на пути ИЦ и МГК регулируется аутокринно, с помощью тканевых ингибиторов TIMPs, которые экспрессируются в трофобластных клетках *in vivo* [27]. TIMP-1 действует на все металлопротеиназы в активной форме и на металлопротеиназу типа 9 (ММР-9) в латентной форме [23]. TIMP-2 специфичен для металлопротеиназы типа 2 (ММР-2), TIMP-3 действует на все типы металлопротеиназ у человека [4]. В инвазивном цитотрофобласте доношенной плаценты после родов наблюдается высокая активность TIMPs [10, 25]. TIMPs может локализоваться в экстрацеллюлярном матриксе и фибриноиде матриксного типа в области фибронектинпозитивных фибрилл, погруженных в гепаран-сульфат и витронектин [25].

### *Кислород*

Кислород – важнейший регулятор процесса ЦТИ. Низкая концентрация кислорода влияет на транскрипционные факторы на биохимическом уровне, изменяя процесс дифференцировки трофобласта и экспрессию генов [36]. Васкуляризация матки напрямую зависит от содержания кислорода в атмосфере, это обнаружено в экспериментах на крысах [39]. Влияние кислорода неоднородно. Чрезмерно низкое парциальное давление его снижает у крыс долю ИЦ и повышает объем ЭЦ [39]. По-видимому, это адаптивный механизм. Гипоксия матери активирует цитотрофобласт для распространения не только в зону спиральных артерий эндометрия, но и на более длинную дистанцию и встраивание в радиальные артерии матки [39, 48]. Гипоксия влияет на инициацию цитотрофобласта не весь срок гестации, а в определенный промежуток времени, так называемое гестационное окно [39]. В норме насыщение кислородом материнской плазмы, омывающей плацентарные ворсины, в течение 10–12 недель гестации не превышает 20 мм рт. ст., повышаясь до 40–80 мм рт. ст. во II и III триместрах [43]. Раннее плацентарное и эмбриональное развитие проходит при низком содержании кислорода с транспортом питательных веществ из материнской плазмы и секрецией материнских эндометриальных желез, называемых гистiotрофными [12]. Первоначальная излишняя перфузия межворсинчатого пространства (МВП) в течение этих первых 10 недель повышает риск потери беременности [43] из-за повреждающего эффекта реактивных производных кислорода. В период установления межворсинчатого кровотока (11–12 недель после оплодотворения)

отмечается значительное повышение ферментной активности антиоксидантных ферментов: каталазы, глутатион-пероксидазы, Mn, Zn- супероксиддисмутазы в плацентарной ткани [13]. Подъем содержания кислорода в МВП в значительной мере происходит в II–III триместрах, достигая 40 мм рт. ст. в III триместре [42]. Среди транскрипционных факторов, контролируемых кислородом, особое место занимает HIF – гипоксийно-индуцибельный фактор-1: промоутер транскрипции в период гипоксии [44]. Он поддерживает нормальную плацентарную функцию в этот период [16]. HIF-1 $\alpha$  может регулировать клеточную пролиферацию и апоптоз посредством регуляции генов, таких как p53, p21, и Bcl-2 [15, 32]. Имеются данные, что в состояниях, сопровождающихся гипоксией материнского организма, в частности при анемии матери, наблюдаются повышенная ЦТИ и большая дилатация просвета спиральных артерий. Она может быть адаптивной реакцией для усиления газообмена кислорода между плацентой и плодом. Повышается пролиферация клеток в плацентарных ворсинах [29] и изменяются структура и интенсивность периферического газообмена в сторону его улучшения. Показано, что адаптивный процесс в плаценте женщин, страдающих анемией, не ограничивается плацентарными ворсинами, но включает улучшение материнской оксигенации на уровне спиральных артерий с более глубокой инвазией [30] и дилатацией маточных радиальных артерий [30]. Поток крови в этом случае гораздо больше, поэтому газообмен между плацентой и плодом интенсивнее [30].

Вместе с тем более выраженная гипоксия (культивирование клеток при 1% оксигенации) связана со снижением пролиферации клеток в I триместре и редукцией дифференцировки цитотрофобласта в плацентах [6, 28, 41]. В цитотрофобласте при такой гипоксии наблюдается усиление апоптотической гибели клеток [22, 24].

### **Влияние различной патологии на процесс инвазии**

В 1999 г. А.П. Миловановым и коллегами была создана классификация патологических процессов в маточно-плацентарной области [1], согласно которой разнообразные патологические состояния вызывают определенные нарушения ЦТИ. Так, бластопатии часто сопровождаются недостаточностью начальной и первой волн инвазии. Недостаточность второй волны инвазии, в свою очередь, может служить причиной гестозов, атероза маточно-плацентарных артерий, внутриутробной задержки развития плода. Гипертоническая болезнь и сахарный диабет у матери могут стать причиной системной патологии – недостаточной гестационной перестройки спиральных и радиальных артерий. Приращение, отслойка плаценты, миомы, склероз плацентарного ложа часто сочетаются с нарушениями тканевых и клеточных соотно-

шений в маточно-плацентарной области. Эндометриты, начавшиеся до наступления беременности, как правило, влекут за собой воспаление плацентарного ложа: отмечено, что цитомегаловирус и бактериальные инфекции могут тормозить дифференцировку и/или миграцию клеток цитотрофобласта [33, 46]. Никотин также негативно влияет на указанные процессы [33, 46]. Имеются данные, что при преэклампсии инвазивный цитотрофобласт сохраняет экспрессию адгезивных рецепторов, характерных для популяции-предшественника, и недостаточно изменяет рецепторы, обеспечивающие инвазию и/или имитирующие эндотелиальный фенотип. Уровни VEGF и VEGFR-1 остаются сниженными. Вместе с тем уровень PlGF не меняется [36].

### Заключение

В последние годы большое научно-практическое значение получила идентификация факторов, которые регулируют процесс дифференцировки инвазирующего цитотрофобласта и, следовательно, имплантации и формирования материнско-плодных гемодинамических взаимоотношений. Эти исследования могут дать исключительно важную информацию о нормальных функциях плаценты и ее влияния на развитие эмбриона. Некоторые заболевания взрослых людей берут начало во внутриутробном периоде. Изучение развития нормальной цитотрофобластической инвазии человека необходимо для лучшего понимания дефектов, связанных с осложнениями беременности. В этом контексте дальнейшие исследования должны быть направлены на перевод базовых знаний о факторах, которые регулируют дифференцировку трофобласта, в диагностические методы и, возможно, тесты для раннего выявления различных акушерских осложнений.

### Литература

1. *Милованов А.П.* Цитотрофобластическая инвазия – ключевой механизм развития нормальной и осложненной беременности: монография / Милованов А.П., Кириченко А.К. // Красноярск: ГОУ ВПО КГМУ, 2009. 161 с.
2. *Милованов А.П.* Морфологическая характеристика второй волны цитотрофобластической инвазии / Милованов А.П., Кириченко А.К. // Архив патологии. 2010. Т. 72. № 1. С. 3–6.
3. *al-Lamki R.S.* Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study / al-Lamki R.S., Skepper J.N., Burton G.J. // Hum Reprod. 1999. Feb;14(2). P. 496–504.
4. *Apte S.S.* Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22 / Apte S.S., Mattei M.G., Olsen B.R. // Genomics. 1994. 19(1), Jan 1. P. 86–90.
5. *Ashton S.V.* Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions / Ashton S.V., Whitley G.S., Dash P.R. et al. // J Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 2005. 25(1), Jan. P. 102–8.
6. *Biron-Shental T.* Hypoxia enhances the expression of follistatin-like 3 in term human trophoblasts/ Biron-Shental T., Schaiff W.T., Rimon E. et al. // Placenta. 2008. 29(1), Jan. P. 51–7.
7. *Bishhof P.* Amniotic fluid and plasma concentrations of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) throughout pregnancy: comparison with other fetoplacental products./ Bishhof P., Duberg S., Hermann W., Sizonenko P.C. // Br J Obstet Gynaecol. 1982. 89 (5). P. 358–63.
8. *Boyd J.D.* The giant cells of the pregnant human uterus / Boyd J.D., Hamilton W.J. // J Obstet Gynaecol Br Emp. 1960. Apr; 67. P. 208–18.
9. *Brosens I.* The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy/ Robertson W.B., Dixon H.G. // J Pathol Bacteriol. 1967. Apr;93(2). P. 569–79.
10. *Bryant-Greenwood G.D.* Control of peripartal collagenolysis in the human chorion-decidua. / Bryant-Greenwood G.D., Yamamoto S.Y. // Am J Obstet Gynecol. 1995. Jan;172(1 Pt 1). P. 63–70.
11. *Bulla R.* VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries / Bulla R., Villa A., Bossi F. et al. // J Exp Cell Res. 2005. Feb 1;303(1). P. 101–13.
12. *Burton G.J.* Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy / Burton G.J., Watson A.L., Hempstock J. et al. // J Clin Endocrinol Metab. 2002. Jun;87(6). P. 2954–9.
13. *Burton G.J.* Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function/ Burton G.J. // J Anat. 2009. Jul;215(1). P. 27–35.
14. *Burton G.J.* Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy / Burton G.J., Woods A.W., Jau-niaux E. // Placenta. 2009. Jul;30(6). P. 473–82.
15. *Carmeliet P.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis / Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M. et al. // Nature. 1998. Jul 30;394(6692). P. 485–90.
16. *Carter A.M.* Placental oxygen consumption. Part I: in vivo studies-a review / Carter A.M. // Placenta. 2000. Mar–Apr;21. Suppl A. P. 31–7.
17. *Cavicchia J.C.* Junctional complexes in the trophoblast of the human full term placenta / Cavicchia J.C. // J Anat. 1971. Feb;108(Pt 2). P. 339–46.
18. *Chen Q.* Interaction of Jar choriocarcinoma cells with endothelial cell monolayers / Chen Q., Stone P.R., McCowan L.M. et al. // Placenta. 2005. Sep–Oct;26(8–9). P. 617–25.
19. *Cronier L.* Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin / Cronier L., Bastide B., Hervy J.C. // Endocrinology. 1994. Jul;135(1). P. 402–8.
20. *de Virgiliis G.* The junctional pattern of the human villous trophoblast. A freeze-fracture study / de Virgiliis G., Sideri M., Fumagalli G. // Gynecol Obstet Invest. 1982. 14(4). P. 263–72.
21. *Galliano M.F.* Binding of ADAM12, a marker of skeletal muscle regeneration, to the muscle-specific actin-binding protein, alpha-actinin-2, is required for myoblast fusion / Galliano M.F., Huet C., Frygelius J. et al. // J Biol Chem. 2000. May 5;275(18). P. 13933–9.

22. *Green D.R.* Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53 / *Green D.R., Kroemer G.* // *Nature*. 2009. Apr 30;458(7242). P. 1127–30.
23. *Goldberg G.I.* Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin / *Goldberg G.I., Strongin A., Collier I.E.* et al. // *J Biol Chem*. 1992. Mar 5;267(7). P. 4583–91.
24. *Hu C.* Enhanced basal apoptosis in cultured term human cytotrophoblasts is associated with a higher expression and physical interaction of p53 and Bak / *Hu C., Smith S.D., Pang L.* // *Placenta*. 2006. Sep–Oct;27(9-10). P. 978–83.
25. *Huppertz B.* Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. / *Huppertz B., Kertschanska S., Demir A.Y.* et al. // *Cell Tissue Res*. 1998. Jan;291(1). P. 133–48.
26. *Huppertz B.* Longitudinal determination of serum placental protein 13 during development of preeclampsia / *Huppertz B., Sammar M., Chefetz I.* et al. // *Fetal Diagn Ther*. 2008. 24(3). P. 230–6.
27. *Hurskainen T.* mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization / *Hurskainen T., Нццхтуд М., Tuutila A.* et al. // *J Histochem Cytochem*. 1996. Dec;44(12). P. 1379–88.
28. *James J.L.* The effects of oxygen concentration and gestational age on extravillous trophoblast outgrowth in a human first trimester villous explant model / *James J.L., Stone P.R., Chamley L.W.* // *Hum. Reprod*. 2006. Oct;21(10). P. 2699–705.
29. *Kadyrov M.* Increased fetoplacental angiogenesis during first trimester in anaemic women / *Kadyrov M., Kosanke G., Kingdom J.* et al. // *Lancet*. 1998. Nov 28;352(9142). P. 1747–9.
30. *Kadyrov M.* Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction / *Kadyrov M., Kingdom J.C., Huppertz B.* // *Am J Obstet Gynecol*. 2006. Feb;194(2). P. 557–63.
31. *Loke Y.W.* Evaluation of trophoblast HLA-G antigen with a specific monoclonal antibody / *Loke Y.W., King A., Burrows T.* et al. // *Tissue Antigens*. 1997. Aug;50(2). P. 135–46.
32. *Majmundar A.J.* Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress / *Majmundar A.J., Wong W.J., Simon M.C.* // *Mol Cell*. 2010. Oct 22;40(2). P. 294–309.
33. *Pereira L.* Human cytomegalovirus transmission from the uterus to the placenta correlates with the presence of pathogenic bacteria and maternal immunity/ *Pereira L., Maidji E., McDonagh S.* // *J Virol*. 2003. Dec;77(24). P. 13301–14.
34. *Pijnenborg R.* Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy / *Pijnenborg R., Dixon G., Robertson W.B.* et al. // *Placenta*. 1980. Jan–Mar;1(1). P. 3–19.
35. *Pijnenborg R.* The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy / *Pijnenborg R., Bland J.M., Robertson W.B.* // *Placenta*. 1981. Oct–Dec;2(4). P. 303–16.
36. *Red-Horse K.* Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface / *Red-Horse K., Zhou Y., Genbacev O.* et al. // *Clin Invest*. 2004. Sep;114(6). P. 744–54.
37. *Red-Horse K.* EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation / *Red-Horse K., Kapidzic M., Zhou Y.* // *Development*. 2005. Sep;132(18). P. 4097–106.
38. *Red-Horse K.* Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation / *Red-Horse K., Rivera J., Schanz A.* et al. // *Lymphat Res Biol*. 2006. 4(4). P. 229–42.
39. *Rosario G.X.* Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion / *Rosario G.X., Konno T., Soares M.J.* // *Dev Biol*. 2008. Feb 15;314(2). P. 362–75.
40. *Salafia C.M.* Morphometry of the basal plate superficial uteroplacental vasculature in normal midtrimester and at term / *Salafia C.M., Pezzullo J.C., Charles A.K.* // *Pediatr Dev Pathol*. 2005. Nov–Dec;8(6). P. 639–46.
41. *Seeho S.K.* Villous explant culture using early gestation tissue from ongoing pregnancies with known normal outcomes: the effect of oxygen on trophoblast outgrowth and migration/ *Seeho S.K., Park J.H., Rowe J.* // *Hum Reprod*. 2008. May; 23(5). P. 1170–9.
42. *Soothill P.W.* Effect of gestational age on fetal and intervillous blood gas and acid-base values in human pregnancy / *Soothill P.W., Nicolaides K.H., Rodeck C.H.* // *Fetal Ther*. 1986. 1(4). P. 168–75.
43. *Tuuli M.G.* Review: Oxygen and trophoblast biology--a source of controversy / *Tuuli M.G., Longtine M.S., Nelson D.M.* // *Placenta*. 2011. Mar;32 Suppl 2. P. 109–18.
44. *Wang G.L.* General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia / *Wang G.L., Semenza G.L.* // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993. May 1;90(9). P. 4304–8.
45. *Wang Y.* Placental trophoblast-derived factors diminish endothelial barrier function / *Wang Y., Lewis D.F., Gu Y.* et al. // *J Clin Endocrinol Metab*. 2004. May;89(5). P. 2421–8.
46. *Yamamoto-Tabata T.* Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro / *Yamamoto-Tabata T., McDonagh S., Chang H.T.* et al. // *J Virol*. 2004. Mar;78(6). P. 2831–40.
47. *Yeh I.T.* Functional and morphological expression of trophoblast / *Yeh I.T., Kurman R.J.* // *Lab. Invest*. 1989. 61. P. 1–4.
48. *Zhou Y.* Increased depth of trophoblast invasion after chronic constriction of the lower aorta in rhesus monkeys / *Zhou Y., Chiu K., Brescia R.J.* et al. // *Am J Obstet Gynecol*. 1993. Jul; 169(1). P. 224–9.
49. *Zhou Y.* Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome / *Zhou Y., McMaster M., Woo K.* et al. // *Am J Pathol*. 2002. Apr;160(4). P. 1405–23.
50. *Zhou Y.* Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C / *Zhou Y., Bellingard V., Feng K.T.* et al. // *J Dev Biol*. 2003. Nov 1;263(1). P. 114–25.



## SECOND STAGE OF CYTOTROPHOBLASTIC INVASION: REGULATION OF CYTOTROPHOBLAST DIFFERENTIATION WITH SPECIAL REFERENCE TO THE ROLE OF ENDOVASCULAR PHENOTYPE AND MULTINUCLEATED GIANT CELLS

*I.M. Rasstrigina, A.P. Milovanov, T. V. Fokina*

Placentation has a decisive influence on successful pregnancy and delivery. A key underlying mechanism is cytotrophoblastic invasion. Here, we reviewed three variants of invasive cytotrophoblast cells differentiation: (1) interstitial trophoblast arising from villous cytotrophoblast at the base of the anchoring villi, (2) endovascular cytotrophoblast, which destroys the endothelial lining of uterine arteries and (3) megacariocyte giant cells formed by fusion of interstitial cytotrophoblast. We analyzed the factors regulating invasion during II and III trimester of pregnancy including the role of genetic factors and TIMP-1 inhibiting the activity of cytotrophoblast metalloproteinases. The contribution of oxygen deficiency to cytotrophoblast invasiveness as well as adverse effects of superoxide, i.e. oxidative stress, are highlighted. Cytotrophoblast is engaged in gestational remodeling of spiral and radial uterine arteries aimed to maintain adequate maternal blood flow to the placenta and provide full development of the fetus. Further immunohistochemical studies on these cells are extremely needed.

*Key words:* cytotrophoblast, invasion, pregnancy.

### Информация об авторах

Милованов А.П. – докт. мед. наук, профессор, заведующий лабораторией патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: 8 (499) 129-5501. E-mail: a\_p\_milovanov@mail.ru

Расстригина И.М. – научный сотрудник лаборатории патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: 8 962 933-0270. E-mail: rupa.77@mail.ru

Фокина Т.В. – старший научный сотрудник лаборатории патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: 8 (499) 129-2501.

# МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ АДЕНОГИПОФИЗА И МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ ЖЕЛЕЗ ПРИ АЛКОГОЛИЗМЕ

*М.В. Кондашевская, В.А. Мхитаров*

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

В обзоре обобщены данные литературы о механизмах развития алкоголизма, описаны типы алкоголизма. Представлены пути метаболизма этанола, механизмы цитотоксического действия этанола на организм животных и человека при длительном употреблении. Рассмотрено воздействие этанола на состояние эндокринной и мужской репродуктивной системы.

*Ключевые слова:* алкоголизм, этанол, эндокринная система, мужская половая система

Традиция употребления спиртного имеет глубокие корни – уже в древности многим племенам были известны способы получения алкоголя. В те времена прием спиртного был коллективным, символизирующим родство и приурочивался к внутриплеменным либо другим событиям (например, полнолунию или новолунию, удачной охоте). Нередко алкоголь использовался с медицинскими целями, так как он обладает умеренным анальгетическим действием, уменьшает остроту восприятия стрессовых факторов, снижает чувство страха [8]. Законы общины строго регламентировали потребление алкоголя. Алкоголизм как заболевание развивался и прогрессировал одновременно с естественноисторической сменой общественно-исторических формаций.

Впервые алкоголизм (синдром алкогольной зависимости) как болезнь подробно описал в середине XIX века шведский врач Магнус Гусе. Согласно Международной классификации болезней Всемирной организации здравоохранения, алкоголизм – это прогрессирующее заболевание, характеризующееся патологическим влечением к алкоголю (психическая и физическая зависимость), развитием абстинентного синдрома при прекращении употребления алкоголя и, в далеко зашедших случаях, стойкими соматическими и неврологическими расстройствами и психической деградацией.

По данным официальной статистики, в России около 2% мужчин и 1% женщин в возрасте от 18 до 60 лет страдают алкоголизмом (данные на январь 2011 г.). При этом около 33% мужчин трудоспособного возраста систематически употребляют алкоголь в опасных для здоровья дозах. Сложная природа алкоголизма как заболевания ставит на первое место решение задач ран-

ней диагностики, лечения и профилактики в рамках действующей Концепции реализации государственной политики по снижению масштабов злоупотребления алкогольной продукцией и профилактике алкоголизма среди населения Российской Федерации на период до 2020 года [9].

## Патогенетические механизмы формирования алкогольной зависимости

В настоящее время различают алкоголизм I и II типов, различающихся по механизмам формирования алкогольной зависимости и, следовательно, методам подбора лекарственных средств и социально-психологического воздействия. Алкоголизм I типа развивается под влиянием внешних и внутренних (генетических) факторов. Этот тип заболевания протекает тяжело, характеризуется ранним началом (молодой или подростковый возраст), наследуется по отцовской линии, развивается только у мужчин, связан с дефицитом дофамина – нейромедиатора центральной нервной системы (ЦНС). Алкоголизм II типа развивается в силу генетической предрасположенности к данному типу заболевания и, в отличие от алкоголизма I типа, начинается в более позднем возрасте. Этим типом алкоголизма страдают и мужчины, и женщины [18, 31].

В данное время сформировалось представление, что алкоголизм, также как и наркомания, является заболеванием мозга, формирующимся на основе взаимодействия генетических, биологических, психосоциальных факторов и влияния внешней среды. Влияние последнего фактора определено в исследованиях на людях и в экспериментах на животных. Установлено, что алкогольную мотивацию стимулируют такие экс-

тремальные факторы как изоляция социальных животных, продолжительное содержание в перенаселенных клетках, иммобилизация, воздействие электрического тока, резкие колебания температуры окружающего воздуха, болевое раздражение, ограничение доступа к пище и воде и т.д. [11, 30, 33].

Многолетние мультидисциплинарные исследования привели И.П. Анохину к заключению о принципиальном единстве патогенетических механизмов зависимости от разных психоактивных веществ [2]. В экспериментах на животных и в исследованиях на больных алкоголизмом и наркоманиями было показано, что стержневым механизмом зависимости от психоактивных веществ является нарушение функций моноаминовых, в первую очередь дофаминергических нейромедиаторных систем как в мезолимбических структурах мозга, так и на периферии [2]. Выраженность этих изменений у мужчин и женщин различна [16].

Yang A.R. et al. показано, что в вентральном паллидуме (бледное ядро) предпочитают этанол крысы, по сравнению с не предпочитающими (в условиях свободного выбора), отмечают сверхэкспрессию и повышение плотности  $\alpha 1$  субъединиц рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК<sub>A</sub>) [41]. Уменьшение потребления алкоголя такими животными, происходящее в результате снижения экспрессии и плотности  $\alpha 1$  субъединиц рецепторов ГАМК<sub>A</sub>, наблюдалось в случае применения специфичных малых интерферирующих РНК (siРНК) вируса *Herpes simplex*. Обнаруженный этими исследователями эффект siРНК может изменить фармакологические методы лечения пьянства и алкоголизма [41].

Установлено, что эффекты серотонина и дофамина (ДА) на алкогольное подкрепление противоположны: повышение уровня ДА в мозге стимулирует механизмы алкогольной награды (увеличивает потребление этанола), а повышение уровня серотонина, напротив, уменьшает ее проявление (снижает потребление этанола). Кроме того, известно, что уровень ДА выше, а серотонина ниже в мозге крысы, предпочитающих этанол. Крысы, предпочитающие этанол или воду, различаются по реакциям ДА-, серотонин- и ГАМКергической систем. ГАМК-бензодиазепиновые рецепторы, в свою очередь, участвуют в анксиолитическом и депрессантном эффектах этанола. В механизмах алкогольного подкрепления могут участвовать и другие нейромедиаторные системы, в частности холинергическая [8, 26, 41, 43].

Хроническое употребление алкоголя (в пересчете на этанол) характеризуется двумя главными процессами – развитием толерантности к этанолу и алкогольной зависимостью. Традиционно для изучения толерантности выделяют механизмы, связанные с обменом нейромедиаторов, рецепторами и системой вторичных посредников [2, 8, 26, 41, 43]. Так, показано, что серотонин и норадреналин играют модулирующую роль в развитии толерантности к алкоголю. Определенные типы

кальциевых каналов также участвуют в поддержании толерантности к этанолу [8, 9].

Установлено, что под влиянием тестостерона происходит значительное повышение толерантности к токсическому действию этанола и, соответственно, медленнее развивается алкогольная зависимость. У линий крыс, предпочитающих алкоголь (АА), исходно отмечен более высокий уровень тестостерона, чем у линий крыс, отвергающих алкоголь (АНА). При хронической алкоголизации у обеих линий животных уровень тестостерона снижается [11]. У кастрированных самцов крыс, получавших тестостерон, быстро формируется пристрастие к 8%-му раствору этанола и на шестой неделе эксперимента объем этанола, выпиваемого этими животными, превышает объем выпиваемой воды в 45 раз. В то же время у контрольной группы животных и особей, получавших женские половые гормоны, пристрастие к алкоголю формируется медленнее. Вызываемое тестостероном повышение толерантности к алкоголю предположительно объясняется увеличением активности микросомальной 5 $\alpha$ -тестостерон-редуктазы печени, снижающей концентрацию в крови токсического ацетальдегида [11, 12, 20, 35].

### Механизмы токсического действия алкоголя

Экзогенный этанол легко всасывается в желудочно-кишечном тракте и проникает из кровяного русла в разные органы и ткани. Этанол обладает выраженной органотропностью – наибольшая часть поглощаемого этанола концентрируется в головном мозге и печени, меньшая – в других органах [4, 9]. Этанол концентрируется также в секрете простаты, яичках и сперме, оказывая токсическое влияние на половые клетки [8, 9, 34].

Действие этанола на организм определяется тем, что он является естественным метаболитом, который постоянно обнаруживается во всех тканях. Концентрация эндогенного этанола в крови не превышает 0,1–0,3 г/л. Для метаболизма этанола в клетках существуют специальные ферментные системы, ответственные за его образование и дальнейшее превращение [4, 9].

Биотрансформация этанола протекает в основном в печени (75%) и включает три этапа [8, 9]. Первый путь метаболизма алкоголя – превращение этилового спирта в ацетальдегид под действием алкогольдегидрогеназы (АДГ), для действия которой необходим никотинамид-аденин-динуклеотид (НАД). Ацетальдегид при участии ацетальдегидрогеназы (АлДГ) и в присутствии НАД окисляется в молочную кислоту, которая включается в гликолиз. Второй путь метаболизма алкоголя – окисление при участии микросомальной этанол-окислительной системы печени. Третий путь метаболизма алкоголя – окисление последнего в ацетальдегид под влиянием каталазы (пероксида водорода). Ацетальдегид, который образуется в результате биотрансформации этанола, превращается в ацетат при участии ряда ферментов, более активных по сравнению с АДГ, поэтому метаболизм ацетальдегида происходит

намного быстрее, чем этанола. Печень – основной орган, где образуется и окисляется ацетальдегид. Конечными продуктами введенного алкоголя являются углекислый газ и вода, при этом выделяется сравнительно много энергии.

Этанол подвергается метаболизму с постоянной скоростью, не зависящей от его концентрации в крови, но пропорциональной массе печени и массе тела. В течение 1 часа у человека со средней массой тела метаболизируется около 10 г абсолютного алкоголя [4, 9]. При потреблении большого количества алкоголя ацетальдегид, химически очень активное и токсичное соединение, не успевает превращаться в ацетат, поэтому влияние алкоголя на биохимические и функциональные процессы в организме, структуру клеток и тканей складывается по существу из эффектов двух токсических веществ – этилового спирта и образующегося из него ацетальдегида. Ацетальдегид, обладая высокой реакционной способностью, нарушает практически все стороны обмена веществ в организме и, что очень важно, медиаторов ЦНС – моноаминов. Токсическое действие ацетальдегида во много раз превышает соответствующий эффект алкоголя. Полагают, что состояние абстиненции (синдром похмелья) во многом обусловлено высокой концентрацией ацетальдегида [8, 9].

Примерно 90–95% принятого алкоголя окисляется, незначительная часть удаляется с мочой (2–4%) и через легкие (3–7%). Скорость окисления алкоголя составляет 4–14 г/ч и зависит от индивидуальных генетически детерминированных особенностей организма. Экзогенный алкоголь полностью исчезает из организма приблизительно через 5–15 часов после приема [4, 8].

Небольшие количества эндогенного этанола не опасны, так как быстро обезвреживаются ферментными системами, тогда как острое воздействие больших доз экзогенного этанола оказывает двухфазное действие на плазматические мембраны – снижает молекулярную упорядоченность и вызывает флюидизацию (повышение текучести) биологических мембран [4, 8, 9]. В результате наблюдаются нарушения функции мембран – изменяется активность ферментов, транспортных носителей и рецепторов нейромедиаторов. Прямое цитотоксическое действие этанола на митохондрии обусловлено его способностью метаболизироваться в тканях, прежде всего в миокарде, с образованием эфиров жирных кислот. D.B. Goldstein и J.H. Chin сформулировали в 1981 г. концепцию, согласно которой мембранотропные эффекты алкоголя являются его истинным первичным цитотоксическим эффектом, тогда как все остальные – производными от действия на мембраны [23].

Изменения структуры мембран в области ионных каналов и мест фиксации белковых молекул сопровождаются нарушением транспорта электролитов, среди которых наибольшее значение имеет нарушение обмена кальция. Применительно к возбудимым мембранам нервных клеток это выражается в снижении

их возбудимости, индуцировании провоспалительных медиаторов и повышении вероятности апоптоза [10]. По мнению ряда исследователей, повышенная проницаемость мембран для ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ) является ключевым моментом всего патологического процесса, лежащего в основе хронического алкоголизма [10, 15, 21, 40]. Возможно, с повышением концентрации кальция в клетке, возникающим при алкогольном эксцессе или в период его отмены, связано появление таких симптомов как аритмия и гипертония. Это также способствует повышению выброса катехоламинов и простагландинов, приводит к активации протеаз и фосфолипаз. Такой широкий спектр биохимических и клинических изменений, возникающих при увеличении внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , обусловлен тем, что он является вторичным посредником в передаче регуляторного сигнала, который запускается медиаторами, гормонами, нервным импульсом и другими сигнальными молекулами. Кроме того, этанол оказывает капилляротоксический эффект, повышает агрегацию тромбоцитов [4, 8, 9].

Один из метаболических эффектов этанола – повышение перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне подавления антиоксидантной системы клетки. Главная роль при этом принадлежит избыточному образованию кислородсодержащих свободных радикалов при окислении этанола, сочетающемуся с прямой индукцией НАДФН-оксидазы, что во многом и определяет структурно-функциональную перестройку биологических мембран под действием этанола [4]. Кроме того, токсическое действие этанола, вводимого в больших количествах, объясняется увеличением соотношения НАДН/НАД за счет интенсивного окисления этанола в НАД-зависимой системе, окисляющей этанол. Несмотря на наличие приспособительных механизмов, направленных на окисление НАДН, образовавшегося при распаде этанола, он накапливается в таких жизненно важных органах как миокард, печень, головной мозг. Интенсивное окисление этанола ведет к накоплению НАДН, НАДФН, которые могут изменить обмен моноаминов при образовании тетрагидроизохинолинов (ТГИХ), накапливающихся в нейронах мозга и действующих по типу «ложных медиаторов», заменяющих моноамины. Показано, что ТГИХ влияют на синтез опиоидных пептидов, способствуют высвобождению эндорфинов и могут активировать опиатные рецепторы [8, 24, 36].

При каждом последующем введении алкоголя нарастает активность этанол- и ацетальдегид-окисляющих систем. Так, после приема этанола концентрация ацетальдегида в крови у здоровых лиц составляет менее 10 мкМ, тогда как у больных алкоголизмом она может достигать 80 мкМ [4, 8].

При острой интоксикации этанолом изменение функций ЦНС и разных органов человека является следствием воздействия на организм не столько самого алкоголя, сколько его основного метаболита – аце-

гальдегида. Ацетальдегид увеличивает высвобождение из адренергических окончаний катехоламинов, которые повышают тонус резистивных сосудов (артерий мышечного типа, артериол), вызывают тахикардию, повышают потребность миокарда и других тканей в кислороде. Показано, что ацетальдегид способен конденсироваться с некоторыми моноаминами, в частности с ДА, с образованием ТГИХ. Один из ТГИХ – сальсолинол – вызывает галлюцинации, провоцирует абстиненцию. Образование сальсолинола и подобных ему непептидных морфиноподобных соединений при алкоголизме указывает на вероятную связь опиоидной системы с механизмами формирования алкогольной зависимости. К этой же мысли приводит тот факт, что классический блокатор опиатных рецепторов налоксон используется для лечения алкоголизма. Конденсация ацетальдегида с серотонином приводит к образованию ингибитора моноаминоксидазы (МАО) – гармалина, также являющегося сильным галлюциногеном [8, 9].

Ацетальдегид нарушает функции печени, тормозя элиминацию продуктов метаболизма этанола. Кроме того, ацетальдегид тормозит окислительно-восстановительные реакции, угнетая этим окисление других веществ. В плазме крови накапливаются жирные кислоты, глицерин, пировиноградная кислота. Все это способствует накоплению кислых метаболитов, развитию метаболического ацидоза, отека легких. Часто отмечают гипокальциемию и гипогликемию, которые могут стать причиной судорог [8, 9].

При систематическом употреблении этанол является универсальным ядом, разрушающе действующим на все системы и органы человека. Страдающие алкоголизмом умирают, как правило, не от алкогольной болезни, а от сопутствующих заболеваний. Наиболее частыми причинами смерти при алкоголизме являются сердечно-сосудистые заболевания [4, 8, 9, 34].

Если проблемы, связанные с превращением этанола и ацетальдегида в клетке, в настоящее время не вызывают сомнений, то механизм действия этанола до конца не исследован, а имеющиеся сведения часто носят противоречивый характер. Установление правильных взглядов на морфофункциональные изменения эндокринной и половой систем является одним из важнейших условий понимания взаимоотношений строения и функции данных систем в различных физиологических и патологических условиях, в том числе при хронической алкоголизации.

### **Морфофункциональные нарушения эндокринной и мужской репродуктивной системы при алкоголизме**

*Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система* представляет собой высший нейроэндокринный трансмиссивер организма, координирующий эндокринную регуляцию обмена веществ с работой вегетативной нервной системы и интегральными эмоционально-поведенческими реакциями лимби-

ческой системы. Это звено, без мобилизации которого стресс не может состояться. Одним из стрессоров является этанол. С другой стороны, стресс часто инициирует дополнительное потребление алкоголя. Активация этанолом гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси в значительной степени модулирует выделение адренокортикотропного гормона (АКТГ) и повышает уровень кортикостерона. Последний, как известно, оказывает супрессирующее влияние на иммунную систему [14].

Уровни воздействия этанола на гипоталамо-гипофизарно-адреналовую ось весьма разнообразны – это влияние на секрецию рилизинг-факторов (РФ, воздействие на гипоталамус), изменение гормонпродуцирующей деятельности клеток гипофиза, поражение биосинтетических систем клеток периферических эндокринных желез, количественные и качественные изменения метаболизма гормонов со специфическими рецепторами и транспортными белками [4, 8, 29, 34].

Нарушение функции гипофизарной системы при алкогольной интоксикации объясняется дисбалансом моноаминергических систем головного мозга (ускорение синтеза ДА и НА, снижение уровня серотонина). Все это имеет большое значение в формировании алкогольной зависимости и развитии заболеваний эндокринных органов, находящихся под контролем действия гормонов гипофиза [2, 25, 26].

В экспериментах на животных доказано, что даже однократное введение этанола снижает уровень гормона роста (соматотропный гормон) в плазме крови, который восстанавливается лишь спустя 6 часов после воздействия этанола. Механизм этого снижения, по-видимому, связан с активацией системы циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в клетках аденогипофиза. В условиях свободного выбора (в течение 2 месяцев) и при принудительном введении 15% этанола половозрелым самцам крыс (3 г/кг в течение 10 суток) наблюдалось значительное снижение уровней лютеинизирующего гормона (ЛГ), тиреотропного гормона (ТТГ), тестостерона [6, 29]. Схожие данные получены и в отношении секреции гонадотропинов и АКТГ [8].

АКТГ-РФ является ключевым звеном в регуляторной цепи, управляющей выбросами глюкокортикоидов (гормоны стресса), участвующих в адаптации к внезапно изменившимся условиям внешней среды. Отмечено, что если в геноме человека отсутствует или ослаблен кодирующий его ген, организм не сможет адекватно отреагировать на стресс и потребует «лекарственного воздействия» в виде алкоголя. Ученые предполагают, что обнаруженная ими цепочка патологических реакций, связывающая дефект гена АКТГ-РФ и алкоголизм, может найти применение в практической медицине. Теоретически на ее основе можно создать тест-систему, которая позволит наркологами прогнозировать вероятность рецидивов алкоголизма у пациентов, прошедших соответствующие курсы лечения [42].

В.А. Мхитаровым показано, что в результате длительного употребления алкоголя в передней доле гипофиза появлялись признаки угнетения функциональной активности, о чем свидетельствовало снижение концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и ЛГ, а также уменьшение относительного количества и размеров базофилов, ацидофилов и их ядер [6]. Кроме того, о нарушении гормонопозитивной функции клеток свидетельствовало появление базофилов, содержащих в центре (так называемые кольца Крука и вакуоли) [6].

*Влияние этанола на надпочечники:* в небольших количествах этанол стимулирует систему АКТГ–кора надпочечников у лиц, эпизодически употребляющих этанол. Из-за своих умеренно транквилизирующих и седативных свойств этанол является регулятором адаптации у здоровых лиц. В то же время злоупотребление алкоголем существенно нарушает адаптацию из-за снижения секреции АКТГ и глюкокортикоидных гормонов. При синдроме отмены алкоголя активируется весь каскад запуска гормонов стресса. Уровень кортизола резко повышается, что может вызывать нейротоксические эффекты, свойственные этому острому состоянию. Доказано, что степень активации системы АКТГ–кора надпочечников (по уровню кортизола и кортикостерона) прямо пропорциональна степени тяжести синдрома отмены [8].

В экспериментах на животных, в условиях свободного выбора воды или 9–15%-ного этанола, установлено наличие предпочитающих этанол, непредпочитающих и промежуточных особей внутри одной линии экспериментальных животных [6, 7, 37]. Как известно, изменение функционального состояния надпочечных желез морфологически характеризуется изменением размеров железы [5]. По данным литературы, увеличение массы надпочечников в условиях стресса происходит за счет их гипертрофии, характеризующейся увеличением объема адреноцитов, в основном, в корковом слое [1, 28].

В.А. Мхитаровым показано, что у крыс, предпочитающих алкоголь, наблюдается достоверное увеличение массы надпочечников, тогда как у животных, не предпочитающих алкоголь, и промежуточных особей масса надпочечников не отличается от таковой в контрольной группе животных [7]. В надпочечниках всех крыс, потреблявших алкоголь в условиях свободного выбора, происходило увеличение размеров зон коры надпочечников, тогда как радиус мозгового вещества был достоверно меньше нормы [7]. Кариометрический анализ коры надпочечников крыс выявил статистически значимое увеличение площади ядер клеток пучковой зоны у крыс во всех группах. Увеличение размеров ядер в сетчатой зоне происходило только в группах, не предпочитающих этанол, и у крыс с промежуточным уровнем потребления алкоголя, тогда как размеры ядер клеток у крыс, предпочитающих алкоголь, не отличались от значений контрольной группы. Уровень

вакуолизации адреноцитов оказался достоверно повышен только в группе крыс с максимальным потреблением алкоголя, в остальных группах он не отличался от нормы. Выявленные морфологические изменения в сочетании со снижением концентрации кортикостерона свидетельствуют о понижении функции коры надпочечников, развивающейся вследствие длительного (2 месяца) приема этанола [7].

*Влияние этанола на щитовидную железу:* этанол оказывает прямое и опосредованное действие на щитовидную железу. Нормальное функционирование щитовидной железы необходимо для регуляции возбудимости нейронов головного мозга, терморегуляции, а также экспрессии гена важнейшего рецептора ДА D4 [13, 29, 38]. Последствия нарушения метаболизма ДА описаны выше [2, 26, 43]. О прямом токсическом действии этанола на щитовидную железу свидетельствует снижение уровня тироксина и трийодтиронина в сыворотке крови больных хроническим алкоголизмом. В результате таких изменений возможно развитие гипотиреоза, который сопровождается такими психическими компонентами как депрессия и ухудшение когнитивных способностей [27, 39].

Нарушение функции гипоталамо-гипофизарно-адренальной системы при алкогольной интоксикации опосредованно отражается на деятельности щитовидной железы. У животных, предрасположенных к добровольному употреблению алкоголя, отмечаются высокая реактивность щитовидной железы и быстрая ее истощаемость. На морфофункциональном уровне показано, что этанол приводит к апоптозу тироцитов, нарушению ионного баланса коллоида. Эти нарушения исчезают при стимуляции супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса [3].

*Влияние этанола на половую функцию:* хронический алкоголизм, как правило, ведет к глубоким стойким нарушениям половой функции, основными причинами которых являются ингибирование этанолом гипоталамо-гипофизарно-тестикулярных функций и снижение уровня тестостерона в крови. При злоупотреблении алкоголем нарушается также половая потенция, что связано со снижением условных и безусловных половых рефлексов. Кроме того, наблюдается уменьшение числа мышечных клеток, а также NO-синтазы и холинтрансферазы в пенисе [22]. Снижение половой функции выявляется у трети мужчин, злоупотребляющих алкоголем. Вследствие «алкогольной импотенции» у мужчин легко возникают различные функциональные нарушения ЦНС (неврозы, реактивные депрессии и т.д.) [8, 9, 17].

У мужчин, длительно злоупотребляющих алкоголем, в крови существенно снижается уровень таких половых стероидов как тестостерон и 5-альфа-дигидротестостерон, повышается содержание женских половых гормонов (эстрадиола и эстрогена) и белков-транспортёров, связывающих половые гормоны. Такие изменения могут наблюдаться не толь-

ко у лиц, страдающих алкоголизмом, но и у тех, кто в течение некоторого времени употреблял алкоголь в значительных количествах. При этом установлено, что данный эффект не связан с изменением активности ЛГ, а является следствием прямого влияния этанола на ткань яичек. Наряду с непосредственным токсическим действием алкоголя на яички известное значение имеет развивающееся у людей, страдающих алкогольной зависимостью, нарушение функции печени и ее способности метаболизировать эстроген. Известно, что при циррозе печени значительно повышается количество эстрогена как у мужчин, так и у женщин, что приводит к торможению гонадотропной функции гипофиза и последующей атрофии половых желез.

В экспериментальных исследованиях большинство авторов связывают низкий уровень тестостерона в крови животных, длительно употреблявших алкоголь, с повреждающим действием этанола, однако во многих случаях используется статистическая обработка показателей, игнорирующая индивидуальные различия. Применяя метод свободного выбора этанола или воды, выявляющий индивидуальные различия, В.А. Мхитаров зарегистрировал у крыс Вистар повышение уровня тестостерона в результате длительного употребления алкоголя [6]. Кроме того, у этих животных отмечено снижение массы семенников. В семенниках таких крыс диаметр семенных канальцев был достоверно меньше контрольных значений. В извитых семенных канальцах при гистологическом исследовании выявлены дистрофические и атрофические процессы. В стенке канальцев отмечены уменьшение числа клеток герминативного эпителия на единицу площади и расширение межклеточных промежутков вследствие отека. Зафиксировано существенное снижение сперматогенной функции, о чем свидетельствовали снижение индекса сперматогенеза, уменьшение относительного числа канальцев, соответствующих VII стадии цикла сперматогенного эпителия, и увеличение количества канальцев с десквамацией дегенерирующих половых клеток. Кроме того, увеличивалось количество пикнотизированных интерстициальных glanduloцитов с признаками снижения функциональной активности – уменьшение площади их ядер. Анализ двигательной активности сперматозоидов выявил снижение количества активных сперматозоидов с прямолинейным поступательным движением и увеличение числа малоподвижных и неподвижных форм [6].

Аналогичные результаты получены другими исследователями на различных линиях крыс (UChA и UChB), предпочитающих алкоголь. У таких животных при длительном употреблении алкоголя (30 суток) отмечены уменьшение размеров тестикул и эпидидимуса, а также дегенеративные изменения семенников, характеризующиеся снижением пролиферативной активности сперматогония, морфофункциональными изменениями

герминативных клеток, клеток Лейдига, клеток Сертоли и т.д. [19, 32].

### Заключение

Таким образом, при алкоголизме наблюдается ингибирование функции гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, выражающееся в нарушении секреции рилизинг-факторов гипоталамуса, гормонпродуцирующей деятельности клеток гипофиза. Все это имеет большое значение в формировании алкогольной зависимости и развитии заболеваний эндокринных органов и органов мужской половой системы, находящихся под контролем действия гормонов гипоталамуса и гипофиза. При алкоголизме наблюдается снижение функции щитовидной железы, надпочечников, мужских половых желез. Последнее выражается в уменьшении размеров тестикул и эпидидимуса, снижении количества активных сперматозоидов и т.д.

Решение любой медицинской проблемы начинается с получения исходных фундаментальных данных морфологии и физиологии. В связи с изложенным выше лечение больных алкоголизмом должно быть направлено как на снижение влечения к алкоголю, так и на терапию сопутствующих болезней – заболеваний эндокринной и половой систем.

### Литература

1. *Алябьев Ф.В.* Морфометрические показатели надпочечников крыс в динамике острой алкогольной интоксикации / А.А. Климачевский, С.В. Логвинов, А.В. Маркова // Медицинский журнал. 2008. Т. 23. № 1. С. 30–33.
2. *Анохина И.П.* Дизрегуляторные расстройства дофаминовой нейромедиаторной системы при алкоголизме и наркоманиях и их коррекция антидепрессантами / И.П. Анохина // В кн.: Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов / Под ред. Г.Н. Крыжановского. М.: Медицина, 2002. 632 с.
3. *Воронцова З.А.* Морфофункциональный статус щитовидной железы и крупных клеток ядер гипоталамуса при ионизирующем облучении и введении этанола / Д.А. Атякшин, И.Б. Ушаков // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2001. Т. 35. № 3. С. 66–69.
4. *Епхивев А.А.* Патоморфологическая оценка стрессорных и алкогольиндуцированных повреждений и влияния милдроната на семенники и щитовидную железу (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.А. Епхивев. М., 2002. 134 с.
5. *Лушников У.Л.* Надпочечники, ультраструктурная реорганизация при экстремальных воздействиях и старении / Л.М. Непомнящих, У.В. Колдышева // М.: Изд-во РАМН, 2009. 336 с.
6. *Мхитаров В.А.* Морфофункциональные изменения системы гипофиз–надпочечники–гонады самцов крыс Вистар при длительном употреблении этанола в условиях свободного выбора / В.А. Мхитаров // Архив патологии. 2008. Т. 70. № 6. С. 38–41.

7. Мхитаров В.А. Морфофункциональное состояние коры надпочечников при потреблении алкоголя в условиях свободного выбора / В.А. Мхитаров // Морфол. ведомости. 2010. № 4. С. 97–100.
8. Шабанов П.Д. Наркология: Практическое руководство для врачей / П.Д. Шабанов. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. 560 с.
9. Ягудина Р.И. Фармакоэкономика алкоголизма / Куликов А.Ю., Арина Е.Е., Усенко К.Ю. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2010. 184 с.
10. Alfonso-Loeches S. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage / Pascual-Lucas M., Blanco A.M. et al. // J. Neurosci. 2010. V. 30. N. 24. P. 8285–95.
11. Apter S.J. The role of social isolation in the effects of alcohol on corticosterone and testosterone levels of alcohol-preferring and non-preferring rats / P. Eriksson // Alcohol & Alcoholism (Oxford, Oxfordshire). 2006. V. 41. N. 1. P. 33–8.
12. Begg D.P. The role of adrenal or testicular hormones in voluntary ethanol and NaCl intake of crowded and individually housed rats / R.S. Weisinger // Physiol. Behav. 2008. V. 93. N. 1–2. P. 408–13.
13. Caria M.A. Thyroid hormone action: nongenomic modulation of neuronal excitability in the hippocampus / M.B. Dratman, L.M. Kow et al. // J. Neuroendocrinol. 2009. V. 21. N. 2. P. 98–107.
14. Choudhry M.A., A role for corticosterone in impaired intestinal immunity and barrier function in a rodent model of acute alcohol intoxication and burn injury / X. Li, I.H. Chaudry // J. Neuroimmune. Pharmacol. 2006. V. 1. N. 4. P. 428–34.
15. Del Castillo-Vaquero A. Increased calcium influx in the presence of ethanol in mouse pancreatic acinar cells / G.M. Salido, A. González // Int. J. Exp. Pathol. 2010. V. 91. N. 2. P. 114–24.
16. Devaud L.L. Impact of the hormonal milieu on the neurobiology of alcohol dependence and withdrawal / F.O. Risinger, D. Selva // J. Gen. Psychol. 2006. V. 133. N. 4. P. 337–56.
17. Dmitrieva O.A. Morphological changes in genetal system of men: medico-legal aspects / O.A. Dmitrieva // Leg. Med. (Tokyo). 2003. N. 5. Suppl 1. P. S228–32.
18. Driessen M. Axis I and axis II comorbidity in alcohol dependence and the two types of alcoholism / C. Veltrup, T. Wetterling, U. John, H. Dilling // Alcohol. Clin. Exp. Res. 1998. V. 22. N. 1. P. 77–86.
19. El-Sokkary G.H. Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat / G.H. El-Sokkary // Neuro. Endocrinol. Lett. 2001. V. 22. N. 2. P. 93–9.
20. Enoch M.A. The role of GABA(A) receptors in the development of alcoholism / M.A. Enoch // Pharmacol Biochem Behav. 2008. V. 3. N. 15. P. 95–104.
21. Fernández-Sánchez M., Ethanol exerts dual effects on calcium homeostasis in CCK-8-stimulated mouse pancreatic acinar cells / A. del Castillo-Vaquero, G.M. Salido, A. González // BMC. Cell. Biol. 2009. N. 10. P. 77–82.
22. Gan X.G. The effect of ethanol on sexual function of males and its mechanism / R.H. An, D.B. Zhong // Zhonghua. Nan. Ke. Xue. 2006. V. 12. N. 2. P. 175–177.
23. Goldstein D.B. Interaction of ethanol with biological membranes / J.H. Chin // Fed. Proc. 1981. V. 40. N. 7. P. 2073–6.
24. Gustafsson L. Ethanol-induced effects on opioid peptides in adult male Wistar rats are dependent on early environmental factors / Q. Zhou, I. Nylander // Neuroscience. 2007. V. 146. N. 3. P. 1137–49.
25. Haddad J.J. Alcoholism and neuro-immune-endocrine interactions: physiochemical aspects / J.J. Haddad // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. V. 323. N. 2. P. 361–71.
26. Hein J. Alcohol-related disorders: etiopathology and therapeutic considerations / J. Wrase, A. Heinz // Fortschr. Neurol. Psychiatr. 2007. V. 75. N. 1. P. 10–7.
27. Hermann D. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in alcoholism / A. Heinz, K. Mann // Addiction. 2002. V. 97. N. 11. P. 1369–81.
28. Hoeflich A. Mechanisms of adrenal gland growth: signal integration by extracellular signal regulated kinases 1/2 / M. Bielohuby // J. of Molecular Endocrinol. 2009. V. 42. N. 3. P. 191–203.
29. Kim J.S. Thyroid hormone and adrenergic signaling interact to control pineal expression of the dopamine receptor D4 gene (Drd4) / M.J. Bailey, J.L. Weller et al. // Mol. Cell. Endocrinol. 2010. V. 314. N. 1. P. 128–35.
30. Lancaster F.E. Sex differences in alcohol preference and drinking patterns emerge during the early postpubertal period in Sprague-Dawley rats / T.D. Brown., K.L. Coker et al. // Alcoholism: Clin. and Exp. Res. 1996. V. 20. N. 6. P. 1043–9.
31. Lykouras L., Examination of type I/type II alcoholism typology in a Greek hospital treatment population / G. Moussas, A. Botsis // Eur. Psychiatry. 2004. V. 19. N. 4. P. 214–8.
32. Martinez F.E. Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB) / M. Martinez, C.R. Padovani, E. Bustos-Obregón // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. 2000. V. 32. N. 2. P. 175–84.
33. Nagaraja H.S. Effect of acute and chronic conditions of over-crowding on free choice ethanol intake in rats / P.S. Jeganathan // Indian. J. Physiol. Pharmacol. 2003. V. 47. N. 3. P. 325–31.
34. Pach D., Evaluation of pituitary-gonadal axis in alcohol dependent males / M. Szurkowska, D. Targosz et al. // Przegl. Lek. 2007. V. 64. N. 4–5. P. 238–42.
35. Rasmussen D.D. Chronic daily ethanol and withdrawal: Long-term changes in plasma testosterone regulation, but no effect on GnRH gene expression or plasma LH concentrations / D.K. Sarkar, J.L. Roberts, A.C. Gore // Endocrine. 2003. V. 22. N. 2. P. 143–50.
36. Rettori V. Alcohol and endocannabinoids: neuroendocrine interactions in the reproductive axis / A. De Laurentiis, J. Fernandez-Solari // Exp. Neurol. 2010. V. 224. N. 1. P. 15–22.
37. Rok-Bujko P. Operant self-administration of ethanol in Warsaw High-Preferring (WHP) and Warsaw Low-Preferring (WLP) lines of rats / W. Dyr, W. Kostowski // Pharmacol. Reports. 2006. V. 58. N. 6. P. 931–5.
38. Sprague J.E. Roles of norepinephrine, free Fatty acids, thyroid status, and skeletal muscle uncoupling protein 3 expression in sympathomimetic-induced thermogenesis / X. Yang, J. Sommers, et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007. V. 320. N. 1. P. 274–80.
39. Stipcević T. Thyroid activity in patients with major depression / N. Pivac, D. Kozarić-Kovacic, D. Mück-Seler // Coll. Antropol. 2008. V. 32. N. 3. P. 973–6.



40. Yan M. Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease / P. Zhu, H.M. Liu et al. // *World. J. Gastroenterol.* 2007. V. 13. N. 16. P. 2352–6.
41. Yang A.R. Binge Drinking: In Search of its Molecular Target via the GABA(A) Receptor / J. Liu, H.S. Yi et al. // *Front Neurosci.* 2011. N. 5. – 000123-000125.
42. Yoshida N. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. / Y. Maejima, U. Sedbazar et al. // *Aging (Albany NY)*. 2010. V. 2. N. 11. P. 775–84.
43. Zhou Y. Drug-induced and genetic alterations in stress-responsive systems: Implications for specific addictive diseases / D. Proudnikov, V. Yuferov, M.J. Kreek // *Brain. Res.* 2010. V. 16. N. 1314. P. 235–52.

## IMPAIRED STRUCTURE AND FUNCTION OF ADENOHYPHYSIS AND MALE GONADS UNDER THE CONDITIONS OF ALCOHOLISM

*M.V. Kondashevskaya, V.A. Mkhitarov*

The paper summarizes the literature on the mechanisms of alcoholism; different types of alcoholism are described. Metabolic pathways of ethanol transformation as well as mechanisms of cytotoxic effects of ethanol on the animal and human body with long-term use are presented. The influence of ethanol on the function of endocrine and male reproductive systems is discussed.

*Key words:* alcoholism, ethanol, endocrine system, male reproductive system

### Информация об авторах

Кондашевская М.В. – докт. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления, руководитель группы функциональной морфологии стресса НИИ морфологии человека РАМН.  
Телефон: 8 (499)129-5333. E-mail: mariluka@mail.ru

Мхитаров В.А. – канд. биол. наук, руководитель группы информатики и морфометрии НИИ морфологии человека РАМН.  
E-mail: morfolhum\_patol\_cell@mail.ru

© Коллектив авторов, 2012

УДК:618.2-071

# РОЛЬ УТОЧНЕННОГО ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОГО КЛИНИЧЕСКОГО И ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОГО ДИАГНОЗА В ФОРМИРОВАНИИ НОЗОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МАТЕРИНСКОЙ СМЕРТНОСТИ

*А.П. Милованов<sup>1</sup>, Е.Ю. Лебеденко<sup>2</sup>, А.Ф. Михельсон<sup>2</sup>, М.П. Курочка<sup>2</sup>, А.А. Михельсон<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ФБГУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону

В работе представлен анализ принципов формулировки и сопоставления заключительного клинического (ЗКД) и патологоанатомического диагноза случаев материнских смертей в Ростовской области. Показана роль соблюдения правил оформления ЗКД в получении достоверной информации о фактической структуре материнских смертей, повышении квалификации акушерских кадров, оптимизации качества медицинской помощи, снижении частоты врачебных ошибок.

*Ключевые слова:* заключительный клинический диагноз, материнские потери, структура материнской смертности

Соблюдение правил формулировки и кодирования заключительного клинического диагноза (ЗКД) и патологоанатомического диагноза (ПАД) определяет достоверность данных о заболеваемости и причинах смерти населения [2]. Правила формулировки диагнозов основаны на принципах медицинской информатики и требованиях Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, в настоящее время – десятого пересмотра (МКБ-10), принятой 43-й Всемирной ассамблеей здравоохранения в 1989 г. и введенной в действие на территории Российской Федерации с 1 января 1998 г. приказом Минздрава России от 27.05.97 № 170 «О переходе органов и учреждений здравоохранения Российской Федерации на МКБ-10» [2, 3].

Диагноз – результат и показатель работы клинициста или патологоанатома, документальное свидетельство уровня его профессиональной квалификации, на основании которого формируется заключение о качестве оказания медицинской помощи, решаются юридические вопросы, формируется статистика заболеваемости и смертности [3].

При анализе материнских смертей весомое место занимает именно ЗКД, четко демонстрирующий представление клинициста об основной причине гибели пациентки. При этом единые правила формулировки ПАД, заполнения медицинского свидетельства о смерти и последующего кодирования основного заболевания также обеспечивают достоверность данных о структуре материнских потерь [1, 2, 3, 4].

Цель работы – оценить роль формулировки, рубрикации и сопоставления заключительного клинического и патологоанатомического диагноза в формировании структуры материнских потерь на примере Ростовской области.

## Материалы и методы

Проведен анализ принципов формулировки и сопоставления ЗКД и ПАД 74 случаев смерти беременных, рожениц и родильниц (БРР), зарегистрированных в учреждениях родовспоможения Ростовской области (РО) за 8 лет (с 2000 по 2007 г.). В эти годы абсолютное число материнских смертей, а также показатель материнской смертности (МС), существенно отличались, что позволило выделить для анализа два временных периода. В каждом из них оценены принципы построения ЗКД случаев летальных исходов за четыре года: с высокими показателями МС (с 2000 по 2003 г., 55 случаев) и с устойчиво низкими (с 2004 по 2007 г., 19 случаев) (рис. 1).

Углубленному анализу подвергались случаи расхождений ЗКД и ПАД, выявленные при их сопоставлении в обоих периодах (n = 11 в 2000–2003 гг., n = 1 в 2004–2007 гг.). Анализ медицинской документации случаев материнских смертей, зарегистрированных в РО за период с 2000 по 2007 г., проводился в соответствии с приказом № 500 «О совершенствовании учета и анализа случаев материнской смерти в Российской Федерации», по утвержденным формам, протоколам областных комиссий по родовспоможению с разборами

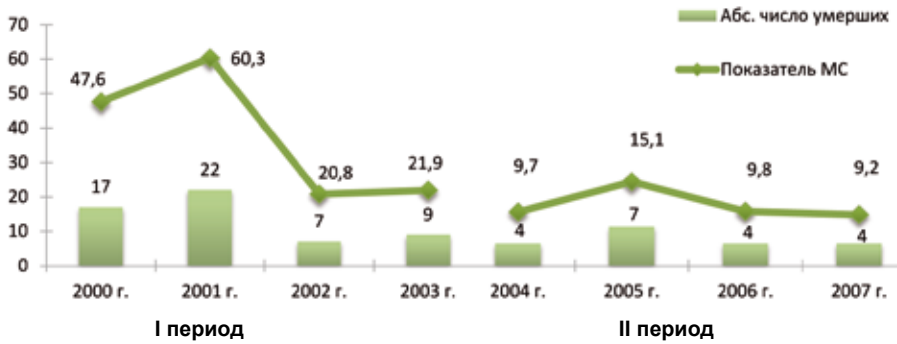


Рис. 1. Динамика показателя МС (на 100 тыс. живорожденных детей) и абсолютное число умерших женщин в РО в анализируемые периоды

случаев материнских смертей, зарегистрированных в исследуемый период в РО.

Уточнение патологоанатомических диагнозов умерших родильниц осуществлялось с использованием подходов, утвержденных в стандартах «Организационные аспекты, особенности проведения патологоанатомических вскрытий, правила формулировки диагноза и его кодирования по МКБ-10 при материнской смерти» [3].

**Результаты и обсуждение**

В Ростовской области при сопоставимом с Российской Федерацией уровне рождаемости показатель МС за все изучаемое время с 2001 по 2007 г. сократился в 6,5 раза (с 60,3 до 9,2 на 100 тыс. живорожденных (ж. р.) и оказался в 2,4 раза ниже среднероссийского (22,1 на 100 тыс. ж. р.). Этому способствовали разработка и внедрение индивидуального плана организационно-методических и клинико-диагностических мероприятий. Однако соотношение основных причин смерти в периодах с высоким и низким уровнем показателей МС достоверно не отличалось. Лидирующие позиции занимали акушерские кровотечения, сепсис, гестоз и экстрагенитальные заболевания (табл. 1).

В соответствии с целью работы был проведен сравнительный анализ принципов формулировки ЗКД случаев материнских смертей в анализируемых периодах. Установлено, что наиболее распространенными ошибками в периоде с высокими показателями МС в РО (2000–2003 гг.) являлись представление ЗКД в виде хронологии событий (74,5%), указание первоначальной причины смерти в рубрике «осложнения основного заболевания» (45,5%). Достаточно часто выявлялось отсутствие подразубрик «патология плода» (50,9%), «оперативные вмешательства» (18,2%). При этом в рубрике «основное заболевание» несмертельные осложнения были помещены в 36,4% случаев, а оперативные вмешательства в 27,3%. В конечном

счете это определило в 2000–2003 гг. расхождения ЗКД с ПАД по второй категории в 92,7% случаев материнских смертей.

В 2004–2007 гг. (в периоде с устойчиво низкими показателями МС) число ошибок при формировании ЗКД несколько уменьшилось, хотя их структура практически не изменилась. В 2,8 раза сократилась доля ЗКД, представленных в виде хронологии событий, в 2 раза реже встречались ошибки в рубрике «основное заболевание». По-прежнему высокой оставалась доля ЗКД с отсутствием подразубрики «патология плода» (68,4%), рубрик «осложнения», «фоновые заболевания» и «оперативные вмешательства» (15,8%). При этом достоверно возросла частота верно составленных, то есть рубрифицированных диагнозов (с 7,3% в 2000–2003 гг. до 31,6% в 2004–2007 гг.,  $p < 0,05$ ). Частота расхождений ЗКД и

Таблица 1  
Структура причин и интенсивные показатели МС в РО за период 2000–2007 гг.

	2000–2003 гг. (n=55)			2004–2007 гг. (n=19)		
	Абс.	%	Интенсивный показатель (на 100 тыс. ж. р.)	Абс.	%	Интенсивный показатель (на 100 тыс. ж. р.)
Акушерские кровотечения	17	30,9	11,2	7	36,8	4,2
Гестоз	10	18,2	6,6	2	10,5	1,2
Сепсис	9	16,4	5,9	4	21,1	2,4
Акушерские эмболии	3	5,5	1,9	3	15,8	1,8
Экстрагенитальные заболевания	7	12,7	4,6	1	5,3	0,6
Осложнения анестезии	4	7,3	2,6	1	5,3	0,6
Аборт	2	3,6	1,3	–	–	–
Внематочная беременность	3	5,5	1,9	1	5,3	0,6
<b>Всего:</b>	<b>55</b>	<b>100,0</b>		<b>19</b>	<b>100,0</b>	

ПАД случаев материнских смертей в 2004–2007 гг. по сравнению с 2000–2003 гг. снизилась в 2,8 раза.

Клинико-патологоанатомические конференции в рамках областных комиссий по родовспоможению, проводя анализ случаев материнских смертей в РО, изменили ЗКД в 11 из 55 случаев в периоде с наиболее неблагоприятными показателями МС (2000–2003 гг.) и в одном случае в 2004–2007 гг. (табл. 2).

В конечном счете это изменило структуру причин МС, а в последующем позволило представить достоверные интенсивные показатели по отдельным нозологиям.

Так, за счет сокращения основных нозологических форм, входящих в структуру блока МКБ-10, – О10-О16 «Отеки, протеинурия и гипертензивные расстройства во время беременности, родов и в послеродовом периоде», в 2000–2003 гг. снизились доля материнских потерь по причине гестоза (с 18,2% до 10,5%), а также интенсивный показатель МС в 1,4 раза (с 6,6 до 4,6 на 100 тыс. ж. р.) (табл. 2).

В двух случаях материнских смертей, первоначально входивших в группу умерших по причине гестоза, основным заболеванием по уточненным данным являлись различные формы акушерского сепсиса, а существовавшая до беременности эссенциальная гипертензия – сопутствующим заболеванием.

В третьем случае основным заболеванием являлось атоническое маточное кровотечение, развившееся в результате нарушения сократительной способности матки в раннем послеродовом периоде. Коллективным решением комиссии родовспоможения был уточнен ЗКД и определена нозологическая форма фонового заболевания – ею являлась существовавшая ранее гипертензия (кардиоваскулярная), а не вызванная беременностью гипертензия, как было первоначально указано в медицинской документации.

В четвертом случае ошибки в составлении ЗКД привели к неверному кодированию основного заболевания.

Самопроизвольный аборт у пациентки произошел не по причине нарушений в маточно-плацентарной

Таблица 2

**Изменение кодов (МКБ-10) причин материнских смертей по результатам областных комиссий родовспоможения**

Структура причин МС	Первоначальный код МКБ-10	Уточненный код МКБ-10	Структура причин МС
<i>2000–2003 гг. (n=11)</i>			
Акушерские кровотечения (n=2)	О 72.1 – другие кровотечения в раннем послеродовом периоде	О 71.7 – акушерская гематома таза	Технические дефекты операций
	О 72.1 – другие кровотечения в раннем послеродовом периоде	О99.4 – болезни системы кровообращения	Экстрагенитальные заболевания
Внематочная беременность (n=1)	О 00 – внематочная беременность с разрывом	О07 – неудачная попытка искусственного аборта	Технические дефекты операций
Гестоз (n=4)	О 13 – вызванная беременностью гипертензия	О72.1 – атоническое маточное кровотечение	Кровотечения
	О 03.6 – самопроизвольный аборт	О 26.6 – поражения печени во время беременности, родов и в послеродовом периоде	Экстрагенитальные заболевания
	О 14.0 – преэклампсия средней степени	О 85 – послеродовый сепсис	Сепсис
	О 15.1 – эклампсия в родах	О 75.3 – другие инфекции (септицемия) во время родов	Сепсис
Анестезиологические осложнения (n=2)	О74 – аспирационный пневмонит	О 710 – разрыв матки	Разрыв матки в родах
	О74 – аспирационный пневмонит	О15.1 – эклампсия в родах	Гестоз
Экстрагенитальные заболевания (n=2)	О99.5 – болезни органов дыхания	О 85 – послеродовый сепсис	Сепсис
	О 87.1 – глубокий флелотромбоз	О 85 – послеродовый сепсис	Сепсис
<i>2004–2007 гг. (n=1)</i>			
Акушерские кровотечения (n=1)	О 75.4 – другие осложнения, вызванные акушерским оперативным вмешательством	О 71.7 – акушерская гематома таза	Технические дефекты операций

области, характерных для гестоза, а в результате патологии печени, определившей тяжелые расстройства в системе гемостаза и явившейся первоначальной причиной летального исхода.

Уточнение ЗКД случаев гибели родильниц привело к росту частоты такой составляющей МС как сепсис (увеличение в 1,4 раза – с 16,4% до 23,6%) и повышению соответствующего интенсивного показателя МС в 1,5 раза (с 5,9 до 8,6 на 100 тыс. ж. р.). Следует отметить, что существенные трудности отмечались в клинко-морфологической дифференциации септицемии в родах, для которой первичным триггером воспаления является послед. При этом высока доля антенатальной гибели плода и смертей родильниц в ближайшие сроки после родоразрешения.

В то же время для послеродового сепсиса характерны запуск синдрома системного воспалительного ответа на уровне эндо- и миометрия, исход беременности для плода, как правило, благоприятный, более длительное течение заболевания и поздние сроки гибели пациентки.

В результате уточнения ЗКД в 2 раза снизились частота и интенсивный показатель МС от осложнений анестезии (с 7,3% до 3,6% и с 2,6 до 1,3 на 100 тыс. ж. р.). Анализ правил формулировки ЗКД данных случаев также представлял особую значимость, так как выявлял ошибки в тактике ведения родов и способов родоразрешения, а не дефекты в анестезиологическом обеспечении экстренной акушерской ситуации. В частности, у двух пациенток первично развились приступ эклампсии, разрыв матки в родах, внутрибрюшное кровотечение и геморрагический шок, определявшие отсутствие необходимого времени и условий для профилактики синдрома аспирации желудочного содержимого. Таким образом, синдром Мендельсона в данных случаях необходимо было включить в рубрику «осложнение основного заболевания», а первоначальной причиной трагических исходов следовало считать в одном случае разрыв матки в родах, а в другом – эклампсию в родах.

Углубленный анализ ЗКД случаев материнских смертей по причине внематочной беременности также способствовал сокращению интенсивных показателей МС по данной нозологии (с 5,5% до 3,6% и с 1,9 до 1,3 на 100 тыс. ж. р.). Так, в одном из анализируемых случаев причиной фатального исхода было нераспознанное внутрибрюшное кровотечение из зоны перфорации матки во время диагностического выскабливания, развившийся острый синдром ДВС, геморрагический шок. При этом имеющаяся трубная беременность была прогрессирующей. В данном случае эктопическую беременность необходимо было включить в рубрику «сопутствующие заболевания», а первоначальной причиной летального исхода следует считать неудачную попытку искусственного аборта.

Уточнение ЗКД и первоначальных причин гибели родильниц не привело к существенному сокращению

частоты акушерских кровотечений (с 30,9% до 27,3%) в структуре МС и интенсивного показателя по данной нозологии (с 11,2 до 9,9 на 100 тыс. ж. р.).

При анализе летальных исходов за 2000–2003 гг. было установлено, что два случая произошли по причине разрыва матки в родах и в результате технических дефектов оперативных вмешательств. Примечательно, что данные материнские ятрогенные потери были ошибочно отнесены в группу умерших родильниц по причине акушерских кровотечений. Углубленный анализ показал, что массивная кровопотеря возникла в результате акушерского травматизма. Это принципиально отличало данные случаи от истинно акушерских кровотечений и послужило основанием для формирования двух дополнительных составляющих в структуре летальных исходов – разрыв матки в родах и технические дефекты операции (табл. 2).

Доля летальных исходов беременности и родов, обусловленных ятрогией, является индикатором профессиональных знаний и клинического опыта акушеров и анестезиологов, а их строгий учет в родовспомогательных учреждениях представляет определенный резерв в снижении числа материнских смертей.

Достоверных изменений в частоте встречаемости основных причин летальных исходов, а также величине интенсивных показателей МС в РО за период 2004–2007 гг. не было. Только в одном случае уточнение первоначальной причины летального исхода (акушерская гематома таза – О71.7) сократило число умерших женщин по причине акушерских кровотечений (табл. 2). Полученные данные были учтены при оформлении карт донесения о случаях МС, разработку плана мероприятий по ее дальнейшему снижению в РО.

Таким образом, по данным исследования, строгое соблюдение принципов формулировки и сопоставления ЗКД и ПАД материнских летальных исходов, определение категорий и причин их расхождения предоставляет возможность получения достоверной информации о фактической структуре МС. Ее анализ необходим для выявления ошибок оформления документации, совершенствования профессиональных навыков и повышения квалификации акушерских кадров, что является основой высокого качества оказываемой помощи и снижения частоты врачебных ошибок. В связи с этим грамотное оформление и кодирование ЗКД – не только объективный маркер высокой квалификации специалиста и качества организации лечебно-диагностического процесса, но и существенный резерв снижения уровня материнских смертей и показателя МС – важнейшего компонента государственной медицинской статистики.

## Литература

1. Бурдули Г.М., Фролова О.Г. Причины и технология анализа репродуктивных потерь / Г.М. Бурдули, О.Г. Фролова. М.: Триада-Х, 2008. 128 с.

2. *Зайратьянц О.В., Кактурский Л.В., Автандилов Г.Г.* Формулировка и сопоставление заключительного клинического и патологоанатомического диагнозов: Методические рекомендации. М., 2003. 45 с.
3. *Милованов А.П.* Анализ причин материнской смертности: Руководство для врачей / Под ред. А.П. Милованова. М.: МДВ, 2008. 228 с.
4. *Фролова О.Г., Гусева Е.В., Шувалова М.П., Долгушина Н.В.* Региональные аспекты материнской смертности в Российской Федерации (2010 г.). Методическое письмо. М., 2011. 32 с.

## ROLE OF SPECIFIED FINAL CLINICAL AND PATHOLOGIC DIAGNOSIS IN THE FORMATION OF NOSOLOGICAL STRUCTURE OF MATERNAL MORTALITY

*A.P. Milovanov, E.Yu. Lebedenko, A.F. Mikhelson, M.P. Kurochka, A.A. Mikhelson*

This paper presents an analysis of fundamental rules of formulation and matching final clinical (FCD) and pathologic diagnoses (PD) of maternal deaths in the Rostov region. The importance of compliance with the rules of registration of FCD is shown for obtaining reliable information on the actual number of maternal deaths; advanced training of midwives; optimizing the quality of medical care; reducing the frequency of medical errors.

*Key words:* final clinical diagnosis, maternal loss, structure of maternal mortality

### Информация об авторах

Милованов А.П. – профессор, руководитель лаборатории патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Михельсон А.Ф. – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии № 3 ФПК и ППС ГБОУ ВПО РостГМУ. Телефон: +7 918 558 4024. E-mail: mikhelson@mail.ru

Лебеденко Е.Ю. – докт. мед. наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии № 3 ФПК и ППС ГБОУ ВПО РостГМУ. Телефон: +7 918 554 0178. E-mail: lebedenko08@mail.ru

Михельсон А.А. – очный аспирант кафедры акушерства и гинекологии № 1 ГБОУ ВПО РостГМУ. Телефон: +7 918 558 9871. E-mail: mikhelson\_aa@mail.ru

Курочка М.П. – канд. мед. наук ассистент кафедры акушерства и гинекологии № 3 ФПК и ППС ГБОУ ВПО РостГМУ. Телефон: +7 928 905 4418. E-mail: marina-kurochka@yandex.ru

## 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 глянцевой 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 пристатейным 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 черт 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. – 560с.

*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)