

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2226-5988

№ 1 (29) / 2019

**«Клиническая  
и экспериментальная  
морфология»**  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке  
Российского общества  
патологоанатомов

Выходит 4 раза в год

Основан в 2011 году

**Включен в перечень ВАК**

Журнал представлен  
в информационной базе данных  
РИНЦ (Российский индекс  
научного цитирования)

**Учредитель**

ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт морфологии человека»  
117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

**Адрес редакции**

117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

**Телефон** +7 (499) 120-43-03

e-mail: [sem.journal@mail.ru](mailto:sem.journal@mail.ru)  
[www.morfolhum.ru](http://www.morfolhum.ru)

Тираж 500 экземпляров

Издательство

«Группа МДВ»

[www.mdv-group.ru](http://www.mdv-group.ru)

**Подписные индексы:**

**70045** по каталогу агентства «Роспечать»

**70045** по каталогу «Урал-Пресс»

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

© ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт морфологии человека»

**Главный редактор**

член-корреспондент РАН, профессор *Л.В. Кактурский*

**Заместители главного редактора**

профессор *О.В. Зайратьянц*

профессор *О.В. Макарова*

**Ответственный секретарь**

профессор *М.Н. Болтовская*

**Редакционная коллегия**

Член-корр. РАН *В.В. Банин*

Д.б.н. *Г.Б. Большакова*

Д.м.н. *С.В. Буравков*

Профессор *А.М. Ковригина*

Профессор *И.А. Казанцева*

Профессор *И.И. Марков*

Профессор *А.П. Милованов*

Профессор *Л.М. Михалева*

Член-корр. РАН *Д.Б. Никитюк*

Профессор *Ю.Г. Пархоменко*

Профессор *В.С. Пауков*

Профессор *С.В. Савельев*

Профессор *А.Л. Черняев*

Профессор *В.В. Яглов*

Д.м.н. *Н.В. Яглова*

**Редакционный совет**

Профессор *И.Н. Волощук*

Профессор *А.Е. Доросевич*

Профессор *Л.М. Ерофеева*

Д.б.н. *М.В. Кондашевская*

Профессор *А.В. Кононов*

Доктор медицины *М.Ю. Кочуков*

К.м.н. *В.Г. Кравцов*

Профессор *О.Д. Мишнев*

К.б.н. *В.А. Мхитаров*

Профессор *В.В. Новочадов*

Профессор *М.Г. Рыбакова*

Профессор *Н.М. Хмельницкая*

К.м.н. *В.П. Черников*

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции. Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

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

## КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ CLINICAL MORPHOLOGY

- Ю.В. Козьмина, Б.Р. Джаналиев,  
С.Д. Джолдубаев, М.Г. Козьмин  
Частота и особенности острого  
милиарного туберкулеза легких  
по данным аутопсийного материала  
Республиканского патологоанатомического бюро  
Кыргызской Республики
- 4 Y.V. Kozmina, B.R. Dzhanaliev,  
S.D. Dzholdubayev, M.G. Kozmin  
Frequency and features of acute millary lung  
tuberculosis according to autopsy material of the  
Kyrgyz Republican Pathological anatomy department
- А.П. Милованов, В.А. Аксененко, А.А. Лукашевич,  
Т.В. Фокина, И.И. Степанова, Н.Б. Тихонова  
Ведущая роль рубцов после кесарева сечения  
в патогенезе предлежания плаценты  
с вросшими ворсинами
- 10 A.P. Milovanov, V.A. Aksenenko, A.A. Lukashevich,  
T.V. Fokina, I.I. Stepanova, N.B. Tikhonova  
The leading role of scars after the caesarian section  
in the pathogenesis of placenta previa accreta
- Л.А. Рудюк, О.С. Решетникова  
Макроскопические изменения плаценты  
при беременности, осложненной врожденными  
пораками сердца
- 19 L.A. Rudiuk, O.S. Reshetnikova  
Macroscopic changes of placenta in pregnancy  
complicated by congenital heart defects
- С.Е. Соловьева, Е.М. Пальцева,  
М.М. Морозова, А.К. Зокоев  
Полиомавирусная нефропатия в сочетании  
с острым отторжением почечного трансплантата
- 27 S.E. Solovyeva, E.M. Paltseva,  
M.M. Morozova, A.K. Zokoev  
Polyomavirus nephropathy in combination with acute  
rejection of renal transplant
- А.Е. Прощина, Ю.С. Кривова, Д.А. Отлыга,  
Н.В. Бесова, Л.Е. Гуревич, С.В. Савельев  
Особенности распределения транскрипционного  
фактора Pdx1 в клетках поджелудочной железы  
в пренатальном развитии человека
- 32 A.E. Proshchina, Yu.S. Krivova, D.A. Otlyga,  
N.V. Besova, L.E. Gurevich, S.V. Saveliyev  
Distribution of the transcription factor Pdx  
in pancreatic cells during human prenatal development

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

- Д.Н. Воронков, В.Н. Сальков, О.В. Сальникова,  
В.Б. Соболев, Р.М. Худоерков  
Иммуногистохимическая локализация  
альфа-синуклеина в нервной системе  
интактных животных, при болезни Паркинсона  
и моделировании паркинсонизма
- 39 D.N. Voronkov, V.N. Salkov, O.V. Salnikova,  
V.B. Sobolev, R.M. Khudoerkov  
Immunohistochemical localization of  $\alpha$ -synuclein  
in the nervous system of intact animals, in Parkinson's  
disease and parkinsonism modeling

Д.Ш. Джалилова, А.М. Косырева,  
М.Е. Диатроптов, М.А. Макарова, О.В. Макарова  
Морфология печени и легких и фагоцитарная  
активность клеток периферической крови  
при системной воспалительной реакции у самцов  
крыс с разной устойчивостью к гипоксии

47

*D.Sh. Dzhaliлова, A.M. Kosyreva, M.E. Diatroptov,  
M.A. Makarova, O.V. Makarova*  
Liver and lung morphology and phagocytic activity  
of peripheral blood cells during systemic inflammatory  
response in male rats with different resistance  
to hypoxia

Н.А. Наволокин, Г.Н. Маслякова, Д.А. Мудрак,  
Н.В. Полуконова, Е.С. Воронина, А.В. Бучарская  
Экспрессия маркеров апоптоза и аутофагии  
в перевитой саркоме-45 у крыс при введении  
флавоноидсодержащего экстракта аврана  
лекарственного (*Gratiola officinalis* L.)

56

*N.A. Navolokin, G.N. Maslyakova, D.A. Mudrak,  
N.V. Polukonova, E.S. Voronina, A.V. Bucharskaya*  
Expression of markers of apoptosis and autophagia  
in transplanted sarcoma-45 in rats in case of  
administration of flavonoid-containing extract  
of *Gratiola officinalis* l.

С.В. Савельев, Н.В. Бесова,  
Е.С. Савельева, В.И. Гулимова  
Миграция нейробластов и формирование  
паттерна первичных нервных связей  
у *Xenopus laevis*

63

*S.V. Saveliev, N.V. Besova,  
E.S. Savelieva, V.I. Gulimova*  
Neuroblasts migration  
and pattern formation during development  
of the *Xenopus laevis*

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

М.Ю. Соболева  
Морфофункциональные особенности  
восстановления целостности кожи  
при термической травме

71

*M.Yu. Soboleva*  
Morphofunctional features of the restoration  
of the integrity of the skin after thermal injury

## ХРОНИКА

I Всероссийская  
научно-практическая конференция  
памяти Александра Эдуардовича Мациониса  
«Современные аспекты патологоанатомической  
диагностики опухолей гемопоэтической  
и лимфоидной тканей»

70

## НЕКРОЛОГ

Памяти Ирины Александровны Казанцевой  
(2.09.1938 – 27.02.2019)

79

# ЧАСТОТА И ОСОБЕННОСТИ ОСТРОГО МИЛИАРНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ ПО ДАННЫМ АУТОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА РЕСПУБЛИКАНСКОГО ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОГО БЮРО КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

*Ю.В. Козьмина<sup>1</sup>, Б.Р. Джаналиев<sup>1</sup>, С.Д. Джолдубаев<sup>2, 3</sup>, М.Г. Козьмин<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Кыргызская государственная медицинская академия имени И.К. Ахунбаева, Бишкек, Кыргызская Республика

<sup>2</sup> Ошский государственный университет, Ош, Кыргызская Республика

<sup>3</sup> Международный университет Кыргызстана, Международная школа медицины, Бишкек, Кыргызская Республика

Цель исследования – на аутопсийном материале изучить частоту и морфологические особенности острого милиарного туберкулеза легких. Проведен ретроспективный анализ архивного материала Республиканского патологоанатомического бюро Министерства здравоохранения Кыргызской Республики – протоколов патологоанатомических вскрытий умерших взрослых за 25 лет (1984–2008 годы), разделенных на периоды: 1984–1988, 1989–1993, 1994–1998, 1999–2003 и 2004–2008 годы. Формы туберкулеза легких диагностировали по анатомо-клинической схеме, предложенной А.И. Струковым (1964), и Российской национальной клинической классификации (2016). Для статистической обработки материала использовали стандартную методику с определением достоверности по *t* критерию. Доля острого милиарного туберкулеза легких составила 8,6%. Чаще умирали мужчины работоспособного возраста и социально неблагополучных категорий. Непосредственной причиной смерти явились прогрессирование специфического процесса с тотальным поражением легких, с внутри- и внелегочной диссеминацией с преимущественным поражением центральной нервной системы (31,8%). Развитие специфического плеврита отмечается у 20% умерших. Для острого милиарного туберкулеза легких характерно преобладание некротической тканевой реакции, у 12,9% умерших встречаются сливные очаги деструкции легочной ткани.

*Ключевые слова:* острый милиарный туберкулез легких, морфология, аутопсийный материал

В Кыргызской Республике эпидемиологическая ситуация по туберкулезу остается напряженной (показатель заболеваемости за 2016 год составил 94,3, показатель смертности – 7,0 на 100 тыс. населения) [4]. Одной из особенностей современного туберкулеза является возрастание до 16–42% удельного веса остро прогрессирующих форм, в частности острого милиарного туберкулеза с преимущественным поражением легких [1, 10, 14, 16]. Среди основных причин смерти от такого гематогенного туберкулеза отмечают рост наблюдений с прогрессированием туберкулезного процесса [1, 14]. При этом многие авторы описывают при милиарном туберкулезе легких как преобладание экссудативно-некротических реакций с минимальной тенденцией к отграничению милиарных очагов, так и, напротив, фибропластических процессов с адекватной

клеточной реакцией [6, 2, 14]. Наиболее полную картину распространенности и особенностей морфологических проявлений туберкулезного воспаления можно получить путем анализа аутопсийного материала.

Цель исследования – на аутопсийном материале изучить частоту и морфологические особенности острого милиарного туберкулеза легких.

## Материалы и методы

Изучены протоколы патологоанатомических вскрытий из архива Республиканского патологоанатомического бюро за 25 лет (с 1984 по 2008 год). Весь период исследования разделили на пять равнозначных временных отрезков. При установлении морфологических форм туберкулеза использовали анатомо-клиническую схему, предложенную А.И. Струковым (1964) [13], и

клиническую классификацию, вошедшую в Российские национальные клинические рекомендации «Фтизиатрия» [15]. Согласно морфологической классификации А.И. Струкова, острый милиарный туберкулез наряду с хроническим рассматривают как разновидность гематогенного туберкулеза с преимущественным поражением легких (гематогенно-диссеминированный туберкулез). В клинической классификации выделяют следующие варианты гематогенного туберкулеза с преимущественным поражением легких: острый милиарный, крупноочаговый и хронический (с кодом А19.0 по МКБ-10).

Для статистической обработки материала использовали стандартную методику с определением достоверности по критерию  $t$  (Стьюдента).

### Результаты

За 25 лет было выявлено 989 случаев смерти больных от туберкулеза легких и его осложнений. Среди них острый милиарный туберкулез легких (ОМТЛ) был отмечен в 85 случаях (8,6%), что значительно меньше подобных показателей, приводимых другими исследователями [6, 7, 9, 11, 14] (табл. 1).

Как видно, отмечается существенный рост числа летальных исходов от ОМТЛ среди всех изученных аутопсий с диагнозом «туберкулез легких» – с 5,3% в 1984–1988 годы до 10,5% в 2004–2008 годы.

Анализ медико-социальных данных умерших от ОМТЛ показал, что больные чаще умирали в возрасте 35–54 лет (45 человек, 53,0%), средний возраст  $44 \pm 1,5$  года. Преобладали лица мужского пола (75,3%), соотношение мужчин и женщин составило 3:1. Доля женщин снижалась со 100% (две) в 1984–1988 годы до 19,1% (девять) в 2004–2008 годы ( $p=99,9\%$ ). Пик смертности у мужчин пришелся на возраст 45–54 года (37,5%), у женщин – на 25–44 года (52,4%).

Известно, что на уровень смертности населения от туберкулеза влияют социальные факторы, такие как отсутствие постоянного заработка, предыдущее нахождение в местах лишения свободы, злоупотребление алкоголем и т.д. [3, 5]. Из 85 умерших от ОМТЛ в местах лишения свободы ранее находились восемь больных (9,4%, все – мужского пола), 17 больных (20,0%) злоупотребляли алкоголем и принимали наркотиче-

ские вещества (хронический алкоголизм и наркомания фигурировали в качестве фонового заболевания). Указанные категории лиц стали фиксироваться только с 1994 года. 19 умерших (22,4%) относились к социальной категории, обозначаемой в обществе как лица «без определенного места жительства» (бомж), причем данные случаи отмечены лишь в последние десять лет исследуемого периода. В 2004–2008 годы отмечается статистически значимое увеличение доли этой категории больных (34,0%,  $p=95\%$ ), что может косвенно указывать на растущий скрытый резервуар инфекции. На диспансерном учете состояли всего 27,1% умерших. Наблюдения ВИЧ-инфекции среди умерших от ОМТЛ не встретились.

Как отмечают Р.Г. Буйко с соавт. (1999) и Д.М. Флигиль (2006), актуальной является проблема впервые выявленного туберкулеза на аутопсии, так как прижизненно невыявленный туберкулез – источник распространения инфекции [3, 14]. В нашем исследовании ОМТЛ был впервые диагностирован на вскрытии в восьми наблюдениях (9,4%) со статистически значимым уменьшением этой доли с 66,7% (два случая) в 1989–1993 годы до 6,4% (три случая) в 2004–2008 годы ( $p=99,9\%$ ). В 62,5% из них смерть наступила в первые десять суток пребывания в стационаре. Оставшиеся 37,5% умерших находились в стационаре от 24 до 118 суток с разными клиническими диагнозами без упоминания о туберкулезной инфекции.

Изучение сроков последнего пребывания пациентов в стационаре показало, что смерть от ОМТЛ в 62 случаях (72,9%) наступила в первые десять дней пребывания в лечебном учреждении, что выше подобных показателей, представленных другими авторами [14].

В нашем исследовании во всех случаях непосредственной причиной смерти стало прогрессирование туберкулеза. В 17 наблюдениях (20,0%) развивался туберкулезный плеврит, в 27 случаях (31,8%) – туберкулезный менингит или менингоэнцефалит. У одного умершего отмечен разлитой перитонит после перфорации туберкулезной язвы тонкой кишки.

Изучен объем туберкулезного поражения легких. Обе верхние доли были поражены в четырех случаях (4,7%), поражение нижних долей не выявлялось, что подтверждалось при гистологическом исследовании.

Таблица 1

Частота летальных исходов от острого милиарного туберкулеза легких (ОМТЛ) на аутопсийном материале за 1984–2008 годы

Показатель		1984–1988	1989–1993	1994–1998	1999–2003	2004–2008
Общее число умерших от туберкулеза легких (n)		38	40	109	353	449
Число умерших от ОМТЛ	n	2	3	6	27	47
	%	5,3	7,5	5,5	7,6	10,5

В оставшихся случаях отмечалось тотальное поражение легких – 81 наблюдение (95,3%).

В легких во всех исследованных случаях обнаруживали диффузно расположенные мелкие туберкулезные бугорки, которые микроскопически были представлены туберкулезными гранулемами некротического типа, но начиная с 1989 года стали выявляться также единичные более крупные фокусы казеозного некроза, которые образовались в результате слияния отдельных мелких бугорков – таких случаев было 20 (23,5%). Микроскопически в данных наблюдениях в центре отмечался казеозный некроз, который был окружен слабо или умеренно выраженной воспалительной клеточной инфильтрацией. При этом состав клеточного инфильтрата был представлен лимфоцитами с единичными плазмочитами и нейтрофилами, эпителиоидными клетками. Непостоянными были гигантские клетки Пирогова–Лангханса (рис. 1 А, Б). В 11 наблюдениях из этих 20 (55,0%) в центре таких слившихся бугорков наблюдали деструкцию легочной ткани с начальными признаками образования полостей распада. Эмфизема легких, перифокальная или субтотальная, встречалась всего в 12 наблюдениях (14,1%), что противоречит данным отдельных авторов [13].

В 60 наблюдениях (70,6%) выявлено наличие очагов склероза и петрификатов как признаков ранее протекавшего туберкулезного процесса в легких, а также присутствие фиброзных спаек в плевральных полостях. Отмечали разрастание соединительной ткани в паренхиме легких в виде мелких и крупных участков, микроскопически представленных как бесклеточной грубоволокнистой массой, так и рыхлой волокнистой клеточной тканью вокруг сосудов, бронхиол, бронхов и в межальвеолярных перегородках. Отмечалось ста-

тистически значимое уменьшение доли обнаружения пневмофиброза в легких со 100% (два случая) в 1984–1988 годы до 87,2% (41 случай) в 2004–2008 годы ( $p=99\%$ ). Кальцинаты (петрификаты) были представлены не только очагами Гопа, Симона, но и отдельными фокусами в толще паренхимы прикорневой зоны легких. Всего таких случаев было семь (8,2%), со статистически значимым уменьшением их доли со 100% (два наблюдения) в 1984–1988 годы до 6,4% (три наблюдения) в 2004–2008 годы ( $p=99,9\%$ ). Спаечный процесс в плевральных полостях был представлен спектром изменений от полной двусторонней облитерации до единичных спаек в области верхушек легких. Таких случаев всего было 66 (77,6%). Они встретились с частотой от 50,0% (одно наблюдение) в 1984–1988 годы до 80,9% (38 наблюдений) в 2004–2008 годы.

Изучены пути диссеминации и генерализации туберкулезной инфекции. Интраналикулярная диссеминация процесса с поражением крупных бронхов и его генерализация, спутагенная или гематогенная, с формированием милиарных гранул в слизистой оболочке тонкой кишки выявлена в четырех случаях (4,7%), поражение слизистой оболочки гортани – в двух (2,4%). Последнее обычно более характерно для диссеминированного туберкулеза легких и гематогенной генерализации. Поражение гортани отмечено только в 2004–2008 годы, а кишечника – в последние 15 лет. Лимфогенный путь распространения инфекции выявлен в 37 наблюдениях, что составило 43,5%. Из них наибольшая доля приходится на вовлечение серозных листков плевральных полостей с развитием туберкулезного плеврита (17 случаев, 20,0%), и подобные случаи стали фиксироваться лишь в последние 15 лет. При этом макроскопически в плевральных полостях

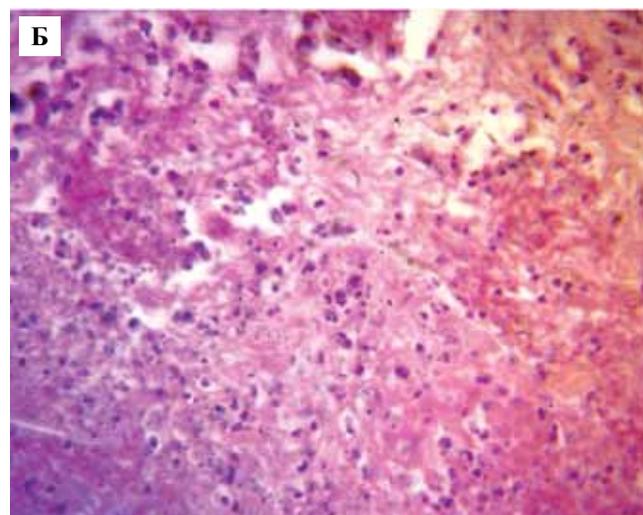
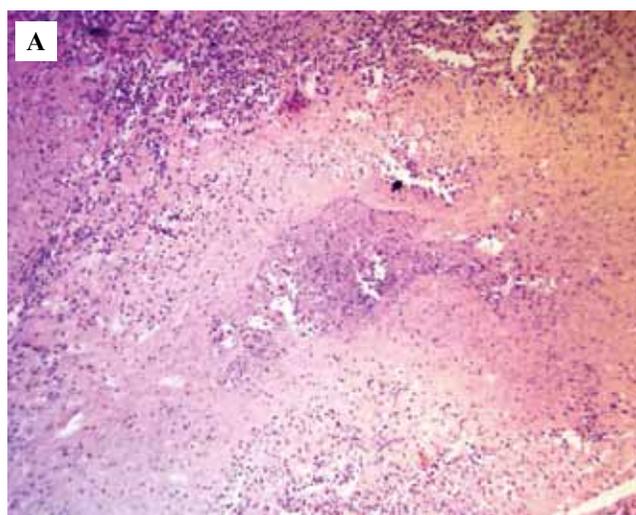


Рис. 1. Крупный фокус казеозного некроза в результате слияния мелких бугорков при остром милиарном туберкулезе легких. Состав перифокального клеточного инфильтрата представлен лимфоцитами с единичными эпителиоидными клетками, плазмочитами и нейтрофильными лейкоцитами (некротическая тканевая реакция).  
Окраска гематоксилином и эозином, А –  $\times 60$ , Б –  $\times 250$

выявлялся мутный выпот; серозные листки были тусклыми и шероховатыми. Микроскопически в плевре преобладали туберкулезные гранулемы некротического типа. Клеточный состав инфильтрата чаще содержал лимфоидные клетки, эпителиоидные и в единичных гранулемах гигантские клетки Пирогова–Лангханса. Вовлечение интраплевральных лимфатических узлов отмечено в 15 наблюдениях, что составило 15,3%. Туберкулезные гранулемы преимущественно продуктивного типа были обнаружены при гистологическом исследовании в перибронхиальных, бифуркационных, паратрахеальных и медиастинальных лимфатических узлах. Развитие туберкулеза серозных оболочек брюшной полости встретилось в пяти наблюдениях (5,9%). Макроскопически выявлялся, как правило, небольшой выпот (объем до 50,0 мл) в брюшной полости. Жидкость была мутной, с желтоватым оттенком. Микроскопически в листках брюшины обнаруживались туберкулезные эпителиоидноклеточные гранулемы с перифокальной выраженной лимфоцитарной инфильтрацией. На гематогенный путь распространения инфекции пришлось 39 наблюдений (45,9%). Из них 27 случаев (31,8%) составили умершие с поражением структур центральной нервной системы. При этом мягкая мозговая оболочка основания головного мозга на ограниченном участке была утолщена, тусклая и мутная. Гистологически здесь выявлялся обильный воспалительный инфильтрат, среди клеток которого преобладали лимфоциты и нейтрофилы. В единичном количестве выявлялись туберкулезные гранулемы моноцитарного типа. Были обнаружены гемодинамические изменения в виде гиперемии, стазов и периваскулярных кровоизлияний. В восьми наблюдениях из 27 (29,6%) в ткани головного мозга определялись васкулиты по типу панваскулитов и очаги лимфоидной инфильтрации с единичными гранулемами моноцитарного типа. Кроме того, был выражен отек головного мозга. В пяти случаях из всех 85 изученных (5,9%) обнаружено вовлечение в процесс селезенки. Макроскопически туберкулезные бугорки не определялись. Лишь при гистологическом исследовании были выявлены в небольшом количестве эпителиоидноклеточные туберкулезные гранулемы. Вовлечение печени отмечено в четырех наблюдениях (4,7%). Туберкулезные гранулемы эпителиоидноклеточного типа в скудном количестве также были выявлены только при микроскопическом исследовании аутопсийного материала. Еще в трех наблюдениях (3,5%) при гистологическом исследовании обнаружены единичные туберкулезные гранулемы эпителиоидноклеточного строения в почках.

## Выводы

1. Острый милиарный туберкулез легких, по данным аутопсийного материала Республиканского патологоанатомического бюро Кыргызской Республики за

25 лет (1984–2008 годы), составляет 8,6% от общего числа всех умерших от туберкулеза легких.

2. От острого милиарного туберкулеза легких чаще умирают мужчины работоспособного возраста и социально неблагополучных категорий.

3. Непосредственной причиной смерти больных при остром милиарном туберкулезе легких является прогрессирование специфического процесса с тотальным поражением легких, внутри- и внелегочной диссеминацией с преимущественным поражением центральной нервной системы (31,8%). Развитие специфического плеврита отмечается у 20% умерших. Для острого милиарного туберкулеза легких характерно преобладание некротической тканевой реакции. У 12,9% умерших встречаются сливные очаги деструкции легочной ткани.

## Литература/ References

1. Баласаниянц Г.С. Остро прогрессирующий туберкулез легких // Большой целевой журнал. 1999. № 6. С. 34–36 [Balasanyants G.S. Acute lung tuberculosis // Bol'shoy tselevoy zhurnal. 1999. V. 6. P. 34–36 (In Russ.)].
2. Башарин К.Г. Итоги изучения патоморфоза туберкулеза легких в Якутии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2003. № 3. С. 40–41 [Basharin K.G. The results of the study pathomorphism of pulmonary tuberculosis in Yakutia // Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh. 2003. V. 3. P. 40–41 (In Russ.)].
3. Буйко Р.Г., Молгачева Т.А. Туберкулез в Красноярском крае остается непобежденным на пороге XXI века // Современная фтизиатрия и проблемы туберкулеза XXI века: тезисы доклада юбилейной научно-практической конференции фтизиатров с международным участием. Томск, 1999. С. 10. [Buyko R.G., Molgacheva T.A. Tuberculosis in Krasnoyarsk region remains undefeated at the threshold of the XXI century // Modern phthisiology and problems of tuberculosis of the XXI century: abstracts of the report of the anniversary scientific-practical conference of phthisiatricians with international participation. Tomsk, 1999. 10 p. (In Russ.)].
4. Демографический ежегодник Кыргызской Республики 2012–2016 гг. Нацстатком Кыргызской Республики. Годовая публикация. 2017; 322. URL: <http://www.stat.kg> (дата обращения: 5.06.2018). [Demographic Yearbook of the Kyrgyz Republic 2012–2016]. 2017; 322. Available at: <http://www.stat.kg> (accessed: 5.06.2018) (In Russ.)].
5. Искакова Ф.А. Совершенствование эпидемиологического надзора хронического туберкулеза в современных условиях: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Бишкек, 2011. 46 с. [Iskakova F.A. Improvement of epidemiological surveillance of chronic tuberculosis in modern conditions: Avtoref. dis. ... dokt. med. nauk. Bishkek, 2011. 46 p. (In Russ.)].
6. Казак Т.И. Морфологические различия очагов туберкулезного воспаления, отражающие иммунную реактивность организма // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2003. № 3. С. 36–40 [Kazak T.I. Morphological differences of the foci of tuberculous inflammation, reflecting immune reactivity // Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh. 2003. V. 3. P. 36–40 (In Russ.)].

7. *Корецкая Н.М., Гринь Е.Н.* Анализ случаев смерти от туберкулеза в закрытом административном образовании. VII Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием: материалы конференции М., 2015. 165 с. [*Koretskaya N.M., Grin' E.N.* Analysis of deaths from tuberculosis in closed administrative education // VII annual all-Russian congress on infectious diseases with international participation: materials of the conference. M., 2015. 165 p. (In Russ.)].
8. *Корецкая Н.М., Амельчукова А.В.* Особенности клинико-социальной характеристики больных диссеминированным туберкулезом легких в Красноярском крае // Медицина в Кузбассе. 2011. № 2. С. 33–36 [*Koretskaya N.M., Amel'chukova A.V.* Features of clinical and social characteristics of patients with disseminated pulmonary tuberculosis in the Krasnoyarsk Region // *Meditina v Kuzbasse*. 2011. V. 2. P. 33–36 (In Russ.)].
9. *Кузьмина Н.В.* Течение и эффективность лечения больных диссеминированным туберкулезом легких в период напряженности эпидемической ситуации: Дис. ... докт. мед. наук. М., 2003. 242 с. [*Kuz'mina N.V.* The course and effectiveness of treatment of patients with disseminated pulmonary tuberculosis in the period of the epidemic situation: Dis. ... dokt. med. nauk. M., 2003. 242 p. (In Russ.)].
10. *Михайловский А.М., Лепеха Л.Н.* Патоморфология туберкулеза у больных с ВИЧ-инфекцией. VII ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием: материалы конференции. М., 2015. 228 с. [*Mikhaylovskiy A.M., Lepexha L.N.* Pathomorphology of tuberculosis in patients with HIV infection // VII annual all-Russian congress on infectious diseases with international participation: materials of the conference. M., 2015. 228 p. (In Russ.)].
11. *Мусатова Н.В.* Течение и эффективность лечения диссеминированного туберкулеза легких в условиях Северного региона: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2009. 170 с. [*Musatova N.V.* The course and effectiveness of treatment of disseminated pulmonary tuberculosis in the Northern region: Dis. ... kand. med. nauk. M., 2009. 170 p. (In Russ.)].
12. *Стадникова А.В., Синенко Т.А., Ширапова О.В.* Диссеминированный туберкулез легких в современных условиях. Есть ли смысл разделять его на острый, подострый, хронический? Украинский пульмонологический журнал. 2007. № 4. С. 17–20 [*Stadnikova A.V., Sinenko T.A., Shirapova O.V.* Disseminated pulmonary tuberculosis in modern conditions. Does it make sense to divide it into acute, subacute, chronic? // *Ukrainskiy pul'monologicheskii zhurnal*. 2007. V. 4. P. 17–20 (In Russ.)].
13. *Струков А.И., Соловьева И.П.* Морфология туберкулеза в современных условиях: 2-е изд., перераб. и доп. М.; Медицина, 1986. 224 с. [*Strukov A.I., Solov'eva I.P.* Morphology of tuberculosis in modern conditions: 2nd ed., re-developed and additional. M.: Meditsina, 1986. 224 s. (In Russ.)].
14. *Флигиль Д.М.* Патоморфоз и морфологическая характеристика диссеминированного туберкулеза по материалам фтизиатрического центра Москвы (1999–2003 гг.): Дис. ... канд. мед. наук. М., 2006. 95 с. [*Fligil' D.M.* Pathomorphosis and morphological characteristics of disseminated tuberculosis based on the materials of the phthisiological center of Moscow (1999–2003): Dis. ... kand. med. nauk. M., 2006. 95 p. (In Russ.)].
15. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / Под ред. П.К. Яблонского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 240 с. [Phthisiatry. National clinical guidelines / Ed. P.K. Jablonsky. M.: GEOTAR-Media, 2016. 240 p. (In Russ.)].
16. *Целищева П.В.* Морфологическая характеристика и патоморфоз казеозной пневмонии: Дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2010. 102 с. [*Tselishcheva P.V.* Morphological characteristics and pathomorphosis of caseous pneumonia: Dis. ... kand. med. nauk. Chelyabinsk, 2010. 102 p. (In Russ.)].

## FREQUENCY AND FEATURES OF ACUTE MILIARY LUNG TUBERCULOSIS ACCORDING TO AUTOPSY MATERIAL OF THE KYRGYZ REPUBLICAN PATHOLOGICAL ANATOMY DEPARTMENT

*Y.V. Kozmina<sup>1</sup>, B.R. Dzhanaliev<sup>1</sup>, S.D. Dzholdubayev<sup>2</sup>, M.G. Kozmin<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Kyrgyz State Medical Academy I.K. Akhunbaeva, Bishkek, Kyrgyz Republic

<sup>2</sup> Osh State University, Osh, Kyrgyz Republic

<sup>3</sup> International University of Kyrgyzstan, International School of Medicine, Bishkek, Kyrgyz Republic

The aim of the study was to study the frequency and morphological characteristics of acute miliary pulmonary tuberculosis on autopsies.

Archival material of the Republican Pathoanatomical Bureau of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic was retrospectively analyzed according to the records of adult autopsies from 1984 to 2008 years divided into periods: 1984–1988, 1989–1993, 1994–1998, 1999–2003, and 2004–2008. Pulmonary tuberculosis forms were diagnosed according to the anatomical and clinical scheme proposed by A.I. Strukov (1964), and the Russian National Clinical Classification (2016). The significance of the differences was determined using *t*-test.

The proportion of acute miliary pulmonary tuberculosis was 8,6%. Socially disadvantaged men of working age died more often. The proximate cause of death was the progression of a specific process with a total lesion of the lungs, with intra- and extrapulmonary dissemination with a primary lesion of the central nervous system (31.8%). The development of specific pleurisy was noted in 20% of the dead. For acute miliary

pulmonary tuberculosis, the prevalence of necrotic tissue reaction was characteristic, in 12.9% of the dead the confluent foci of destruction of the lung tissue were revealed.

*Key words:* acute miliary pulmonary tuberculosis, morphology, autopsy material

### **Информация об авторах**

Козьмина Юлия Владимировна – ассистент кафедры патологической анатомии Кыргызской государственной медицинской академии имени И.К. Ахунбаева.

Адрес: 720020, Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Ахунбаева, д. 92. E-mail: kozmiyuliya@yandex.ru

Джаналиев Болотбек Рахманович – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии Кыргызской государственной медицинской академии имени И.К. Ахунбаева.

Адрес: 720020, Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Ахунбаева, д. 92.

Джолдубаев Сагын Джаркынбаевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной и патологической анатомии Ошского государственного университета.

Адрес: 723500, Кыргызская Республика, Ош, ул. Ленина, д. 331. E-mail: b8514x@mail.ru

Козьмин Михаил Геннадьевич – ассистент кафедры патологии Международной высшей школы медицины Международного университета Кыргызстана.

Адрес: 720007, Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Л. Толстого, д. 17А/1. E-mail: kozminmike@yandex.ru

*Материал поступил в редакцию 31 октября 2018 года*

# ВЕДУЩАЯ РОЛЬ РУБЦОВ ПОСЛЕ КЕСАРЕВА СЕЧЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРЕДЛЕЖАНИЯ ПЛАЦЕНТЫ С ВРОШИМИ ВОРСИНАМИ

*А.П. Милованов<sup>1</sup>, В.А. Аксененко<sup>2</sup>, А.А. Лукашевич<sup>2</sup>, Т.В. Фокина<sup>1</sup>,  
И.И. Степанова<sup>1</sup>, Н.Б. Тихонова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь

В последние годы в мире увеличилось число атипичных плацентаций, в том числе полного предлежания плаценты с врастанием ворсин (*placenta previa + accreta*), связанных с рубцами после кесарева сечения, но детали их патогенеза не ясны. Цель работы – определить значение рубцов после кесарева сечения при полном предлежании плаценты с врастанием ворсинами.

В Ставропольском краевом клиническом перинатальном центре № 1 собран операционный материал: в группе сравнения – восемь пациенток, у которых во время первого кесарева сечения по акушерским показаниям взяты стенка миометрия и базальная оболочка плацент, в основной группе – 12 женщин с полным предлежанием плацент и врастанием ворсин. Во время операции у них иссечены пораженные участки нижнего сегмента матки (метропластика). Этот материал исследован морфологическим (окраска гематоксилином и эозином, анилиновым синим по Маллори) и иммуногистохимическим (маркеры – виментин и цитокератин 8) методами. В основной группе пациенток первоначальное массивное распространение рубцовой ткани в эндометрии и во всех слоях миометрия привело к необратимым вторичным изменениям пограничного слоя фибриноида, образованию глубоких бухт с проникновением ворсин, уменьшению числа виментин-положительных децидуальных клеток, слабой инвазивности цитотрофобласта, выраженной атрофии, дистрофии и некрозу мышечных пучков, включая редукцию сосудистого слоя при максимальном истончении стенки матки. С учетом объема и тяжести выявленных изменений при *placenta previa + accreta* обоснована органосохраняющая операция – метропластика с наложением швов на сохранный миометрий.

*Ключевые слова:* рубец после кесарева сечения, предлежание плаценты, врастание ворсины, иммуногистохимия, патоморфология, метропластика

В современном акушерстве актуальной проблемой стали атипичные плацентации, которые многими авторами расценивались как всемирная «эпидемия» ятрогенного характера, обусловленная быстрым ростом числа кесаревых сечений (КС) в развитых странах [6, 12, 13, 15]. Среди них наиболее тяжелой клинической формой являлось полное предлежание плаценты с перекрытием внутреннего зева шейки и врастанием ворсин в стенку нижнего сегмента матки (*placenta previa + accreta*). Во многих публикациях представлена четкая причинная связь полного предлежания плаценты с числом КС [8]: из 104 пациенток у 51 (49%) выявлен рубец после одной операции, у 36 (34,7%) – после двух, у 15 (14,4%) – после трех, у двух (1,9%) – после четырех оперативных родов.

При высокой чувствительности пренатальной ультразвуковой диагностики предлежания плаценты (90,9%) системный анализ публикаций в мире между 1982 и 2016 годами [12] показал, что после первого КС частота данной атипичной плацентации составила 4,1%, после второго достигла 13,3% (в 3 раза больше). До настоящего времени преобладающим способом лечения в разных странах осталась гистерэктомия – у 89,7% женщин.

Главной угрозой для жизни пациенток явились массивные кровотечения во время КС, поэтому основополагающий подход к сохранению матки – это профилактика и борьба с большой кровопотерей. В данной клинической ситуации представлено несколько вариантов органосохраняющих операций, в частности так

называемое консервативное лечение – оставление плаценты в полости матки с последующим назначением утеротоников, мизопростола в надежде на ее отсроченное самостоятельное отделение. Однако оставленная плацентарная ткань не дает матке сократиться, возможны тяжелые осложнения – эндометриты, сепсис, маточные разрывы при следующей беременности [14].

Хирургическое лечение заключалось в предварительном гемостазе матки, удалении участка врастания ворсин (метропластика) и наложении компрессионных швов на стенку. Отечественные акушеры [3, 10] предпочитали двустороннее перевязывание внутренних подвздошных артерий и наложение швов на матку при использовании реинфузии аутологичной крови либо сочетание двустороннего перевязывания маточных артерий с баллонной тампонадой полости матки и метропластикой стенки с приросшей плацентой. По мнению О.Р. Баева [1], поиски методов профилактики кровотечения и оптимальной органосохраняющей тактики ведения беременных с аномалиями плацентации актуальны для современного акушерства.

Патоморфология полного предлежания плаценты представлена в нескольких публикациях [5, 6, 8, 11, 15, 20]; все авторы констатировали истончение стенки нижнего сегмента матки, редукцию или отсутствие децидуальной оболочки, децидуальных клеток, наличие вросших ворсин. В отношении степени цитотрофобластической инвазии показана избыточная продукция интерстициального цитотрофобласта в основаниях якорных ворсин при слабой его инвазивности в зоне рубца [5]. У акушеров и морфологов остались важные вопросы. Что является первоначальным механизмом атипичной плацентации и вросших ворсин: дефекты децидуализации, инвазии цитотрофобласта или присутствие рубцовой ткани? Какую оперативную тактику считать оптимальной?

Цель исследования – определить значение, характер и объем рубцов после КС в патогенезе полного предлежания плаценты с вросшими ворсинами.

## Материалы и методы

В Ставропольском краевом клиническом перинатальном центре № 1 собран операционный материал маток в двух группах женщин (2015–2017 годы). Первая, группа сравнения – это восемь плановых первых КС при крупном плоде (три), миопии (три) и тазовом предлежании (две); возраст женщин 25–37 лет, срок беременности 38–40 недель. По ходу разреза матки взят фрагмент миометрия через всю толщу нижнего сегмента матки. У этих же пациенток после отделения плаценты со стороны материнской поверхности вырезано по пять кусочков базальной пластины. Вторая, основная группа представлена 12 женщинами (25–35 лет) с ранним ультразвуковым выявлением полного предлежания плаценты (на 17–30-й неделе). Они обследованы и оперированы в 37–40 недель на кафедре акушерства и гинекологии Ставропольского государственного

медицинского университета. Среди этих женщин после первого КС было семь, после второго – три, после третьего – две пациентки. С момента последнего КС вместе с течением настоящей беременности прошло 2–3 года. У всех выполнено корпоральное КС, на 3–4 см выше видимой зоны врастания с последующим извлечением плода. До отделения плаценты проведено перевязывание маточных артерий (у всех женщин), в 50% – перевязывание внутренних подвздошных артерий. Из 12 пациенток у двух обнаружено врастание ворсин плаценты в стенку мочевого пузыря. Следующим этапом проведено иссечение участка врастания ворсин с захватом 1 см визуально неизмененного нижнего сегмента матки. Разрезы ушивали в два ряда отдельными мышечно-мышечными и серозно-мышечными швами. Общая кровопотеря составила от 800 до 3200 мл с реинфузией аутокрови аппаратом Cell-Saver (Haemonetics, США) в объеме 700–1800 мл. Кроме постгеморрагической анемии послеоперационный период у десяти родильниц протекал без осложнений, выписаны на 6–7-е сутки. Две пациентки с ушиванием стенки мочевого пузыря выписаны после удаления мочевого катетера. Все новорожденные при рождении были живы, оценка состояния по шкале Апгар составила 8/9 баллов.

В первой группе женщин взято восемь иссеченных фрагментов миометрия через всю стенку матки и по пять частей базальной оболочки, в основном из центра плаценты у тех же пациенток, в основной группе из удаленной взбухающей стенки матки вырезали полоску длиной 3–5 см и шириной 1,5–2 см вместе с подлежащей плацентарной тканью. Эти полоски прикрепляли нитками к плотной бумаге с обязательным обозначением эндо- и миометрия и целиком фиксировали в нейтральном формалине. Весь материал был доставлен в НИИ морфологии человека. Полоски укладывали и заливали в парафин так, чтобы в микропрепаратах были видны ворсины и переход эндометрия в миометрий. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, азокармином по Маллори. После просмотра их в микроскопе Leica DM 2500 (Германия) из отобранных блоков готовили срезы для иммуногистохимического исследования со следующими антителами: 1) против цитокератина 8 (Novocastra, клон TS1) – маркер инвазивного цитотрофобласта; 2) против виментина (Novocastra, клон SRL33) – маркер клеток мезенхимальной природы, в том числе децидуальных клеток и эндотелиоцитов микрососудов. Для демаскировки антигенов использовали высокую температуру (печь СВЧ, 20 минут) и единую систему выявления (Thermo Scientific UltraVision Detection), а также соответствующие контроли. Проведена выборочная морфометрия виментин-положительных децидуальных клеток в пределах маточно-плацентарной области. При  $\times 200$  через равные промежутки в стандартных полях зрения определяли количество сохранных крупных, средних по калибру и явно дистрофичных (измененных) децидуальных клеток в обеих группах операционного материала с

последующей статистической обработкой данных по непараметрическому критерию Манна–Уитни.

### Результаты

В первой группе женщин со стороны межворсинчатого пространства эндометрий был представлен слоем фибриноида, сочетанием атрофических желез, децидуальных клеток и инвазивного цитотрофобласта. Одновременно изучен миометрий у тех же женщин. Все перечисленные компоненты наиболее демонстративно выявлены при окраске по Маллори. Пограничный слой фибриноида Рора обнаружен в 100% частей базальной оболочки плаценты (рис. 1 А) и представлен сплошной неравномерной полосой ярко-красного или бордового цвета с волнообразным рельефом. В отдельных случаях (25%) виден внутренний слой фибриноида Нитабух, в остальных он отсутствовал. Сразу под слоем фибриноида визуализированы единичные атрофические железы с десквамированными эпителиоцитами и остатками

секрета, а также децидуальные виментин-положительные клетки разной величины: от малых, продолговатых (промежуточные формы) до крупных, эпителиоидного типа с выраженной иммуноэкспрессией виментина (рис. 1 Б). В конце беременности железы и децидуальные клетки проявляли признаки частичной структурной инволюции. Морфометрия на стандартных участках маточно-плацентарной области подтвердила сочетание крупных эпителиоидных клеток и средних по калибру промежуточных децидуальных вариантов при наличии существенного количества дистрофических форм (рис. 2).

В целом разные децидуальные клетки составляли отдельный, неравномерный по толщине пласт, более компактный под слоем фибриноида и рассеянный вблизи миометрия (рис. 1 Б). Важным компонентом базальной оболочки явились инвазивные клетки, представленные небольшим числом интерстициального цитотрофобласта и единичными многоядерными

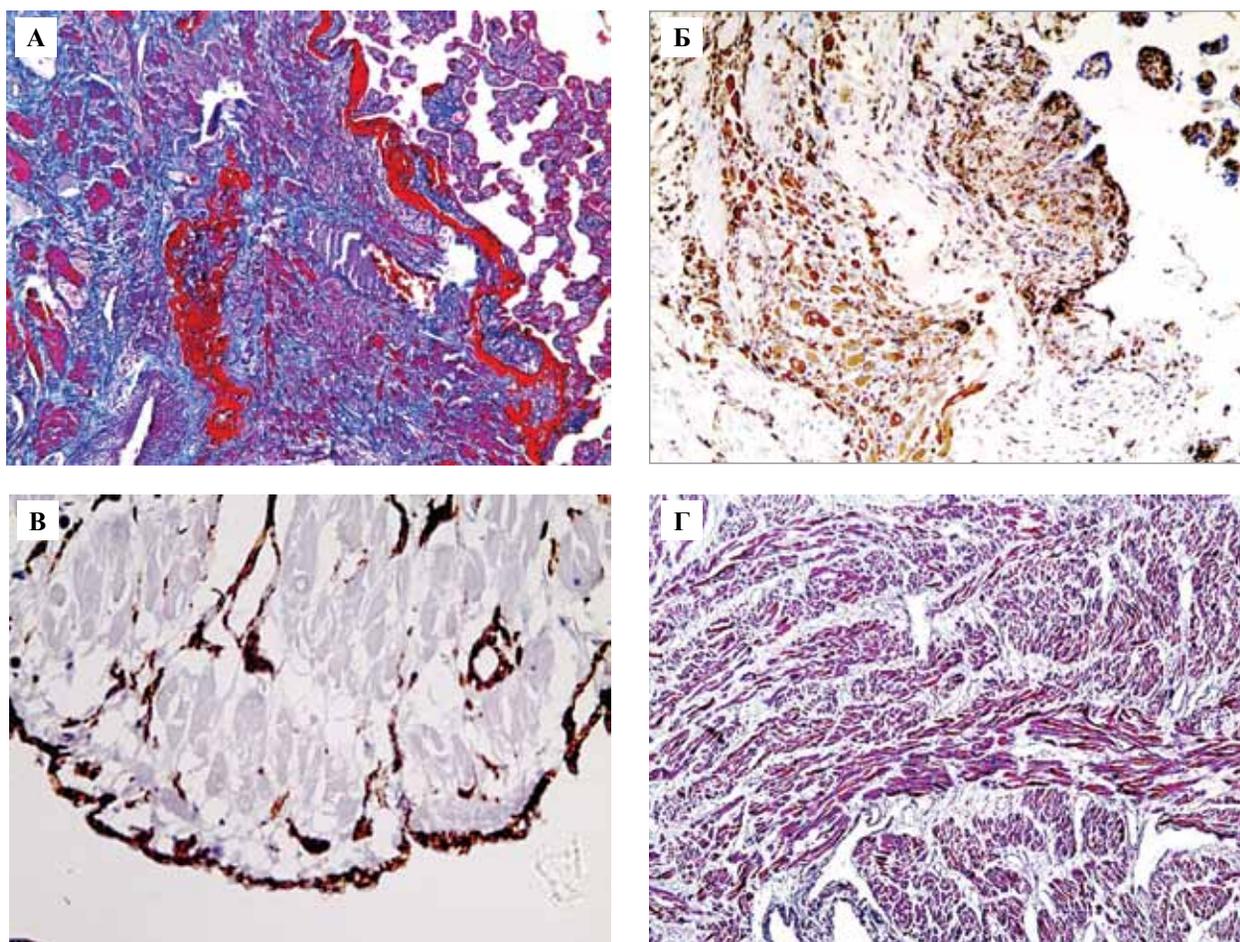


Рис. 1. Компоненты стенки матки у женщин из группы сравнения.

А – фрагменты слоев фибриноида Рора (справа) и Нитабух (слева) в маточно-плацентарной области. Окраска по Маллори,  $\times 200$

Б – децидуальная оболочка из виментин-положительных клеток в маточно-плацентарной области.

ИГХ реакция с антителами к виментину,  $\times 100$

В – эндотелий (внизу) сосудистой лакуны, переходящий в миоциты среднего слоя миометрия.

ИГХ реакция с антителами к виментину,  $\times 400$

Г – тонкие соединительнотканнные прослойки между переплетающимися пучками миоцитов. Окраска по Маллори,  $\times 50$

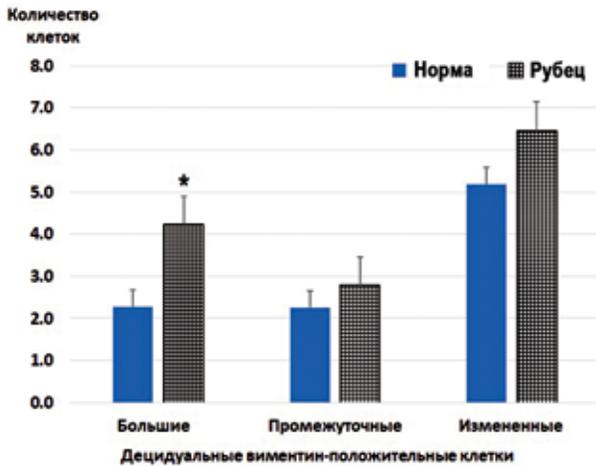


Рис. 2. Количество децидуальных клеток разных типов в стандартном поле зрения маточно-плацентарной области  
\* – достоверность различий  $p < 0,05$  по критерию Манна–Уитни

клетками. Они хорошо различимы при использовании маркера цитокератина 8; их достаточная инвазивная активность подтверждена наличием в базальной оболочке широких сечений спиральных артерий с полной гестационной перестройкой стенок.

Миометрий – самый объемный компонент стенки матки. В нижнем сегменте матки он представлен тремя слоями: 1) наружным, соединенным с серозной оболочкой и содержащим маточные сосуды; 2) средним, толстым, из переплетающихся пучков гипертрофированных миоцитов, пронизанных множеством разнокалиберных сосудов, то есть это сосудистый слой из мелких артерий и тонкостенных венозных лакун (стенки этих сосудов весьма характерны; они представлены единственным слоем эндотелиоцитов при непосредственном структурном взаимодействии с ближайшими миоцитами, рис. 1 В) и 3) внутренним слоем из поперечных и продольных мышечных пучков, переходящих без четкой границы в базальную оболочку.

Неотъемлемой частью миометрия служит тонкий соединительнотканый каркас между мышечными пучками и вокруг сосудов. При окраске по Маллори мышечные пучки и составляющие их миоциты окрашивались в ярко-красный цвет, а рыхлые соединительнотканые прослойки и периваскулярные зоны – в голубые тона с выявлением сети тонких коллагеновых нитей (рис. 1 Г).

Таким образом, объединяя структуру миометрия с базальной оболочкой плаценты у женщин группы сравнения, следует констатировать оптимальные соотношения всех компонентов стенки матки, сохранность мышечных пучков и своеобразие сосудистого среднего слоя миометрия, что соответствовало доношенному сроку беременности и готовности матки к сократительной деятельности при четком взаимодействии с кровенаполнением сосудистого слоя.

В основной группе пациенток с полным предлежанием и врастанием ворсин по ходу операции выявлено тотальное истончение передней стенки нижнего сегмента матки в зоне предлежания плаценты, с обеих сторон от внутреннего зева шейки. Пораженный сегмент по толщине достигал от тонкого (3–5 мм) до истонченного выпячивания (1–2 мм) с возможностью обзора структуры подлежащей плаценты. При гистологическом исследовании материала метропластики обнаружена тотальная дезорганизация маточно-плацентарной области и миометрия в результате присутствия обширного рубцового компонента. В отличие от тонких соединительнотканых прослоек в группе сравнения в основной группе женщин при окраске по Маллори рубцовая ткань окрашивалась преимущественно в темно-синие или фиолетовые цвета, пронизывая все слои стенки. Отмечено чередование участков рыхлой, ячеистой соединительной ткани с выраженным отеком (рис. 3 А) и явного фиброзирования, гиалиноза рубцов (рис. 3 Б). Разные по плотности поля склероза занимали всю тонкую базальную оболочку, разобцали пучки миоцитов, концентрировались вокруг оставшихся элементов среднего сосудистого слоя и в адвентиции крупных сосудов наружной оболочки. При механическом растяжении истонченной стенки матки миоциты «вытягивались» параллельно слою фибриноида (рис. 3 В), подвергались выраженной атрофии, дистрофии и некрозу. Даже в отдалении от грыжевидного выпячивания стенки матки мышечные пучки меняли цвет на лиловые оттенки или совсем не окрашивались по Маллори (рис. 3 Г).

Максимальным изменениям подвергались венозные лакуны и мелкие артерии в составе сосудистого слоя миометрия. Их просветы уменьшались за счет внешнего сдавливания и периваскулярного склероза. В самых тонких удаленных сегментах сосудистый слой отсутствовал (рис. 3 В), что кардинальным образом меняло ангиоархитектонику стенки матки. Столь же выраженным изменениям подверглись и другие ее компоненты.

Пограничный слой фибриноида был фрагментирован (рис. 4 А) либо совсем отсутствовал. Чаще всего он повторял контуры глубоких, разветвленных бухт в базальной оболочке с проникающими туда ворсинами плаценты (placenta increta). Сразу под фибриноидом располагался пласт соединительной ткани с единичными децидуальными клетками. При иммуногистохимическом исследовании компонентов истонченной базальной оболочки зафиксированы иные соотношения абсолютного количества децидуальных виментин-положительных клеток в стандартной площади срезов (рис. 2). Среди них достоверно увеличилось количество крупных, порой гипертрофированных децидуальных клеток, расположенных преимущественно под слоем фибриноида; они тонким контуром окружали бухты с вросшими ворсинами (рис. 4 Б). Промежуточных форм клеток было чуть больше, чем в группе сравнения. Децидуальные клетки с вакуольной дистрофией имели

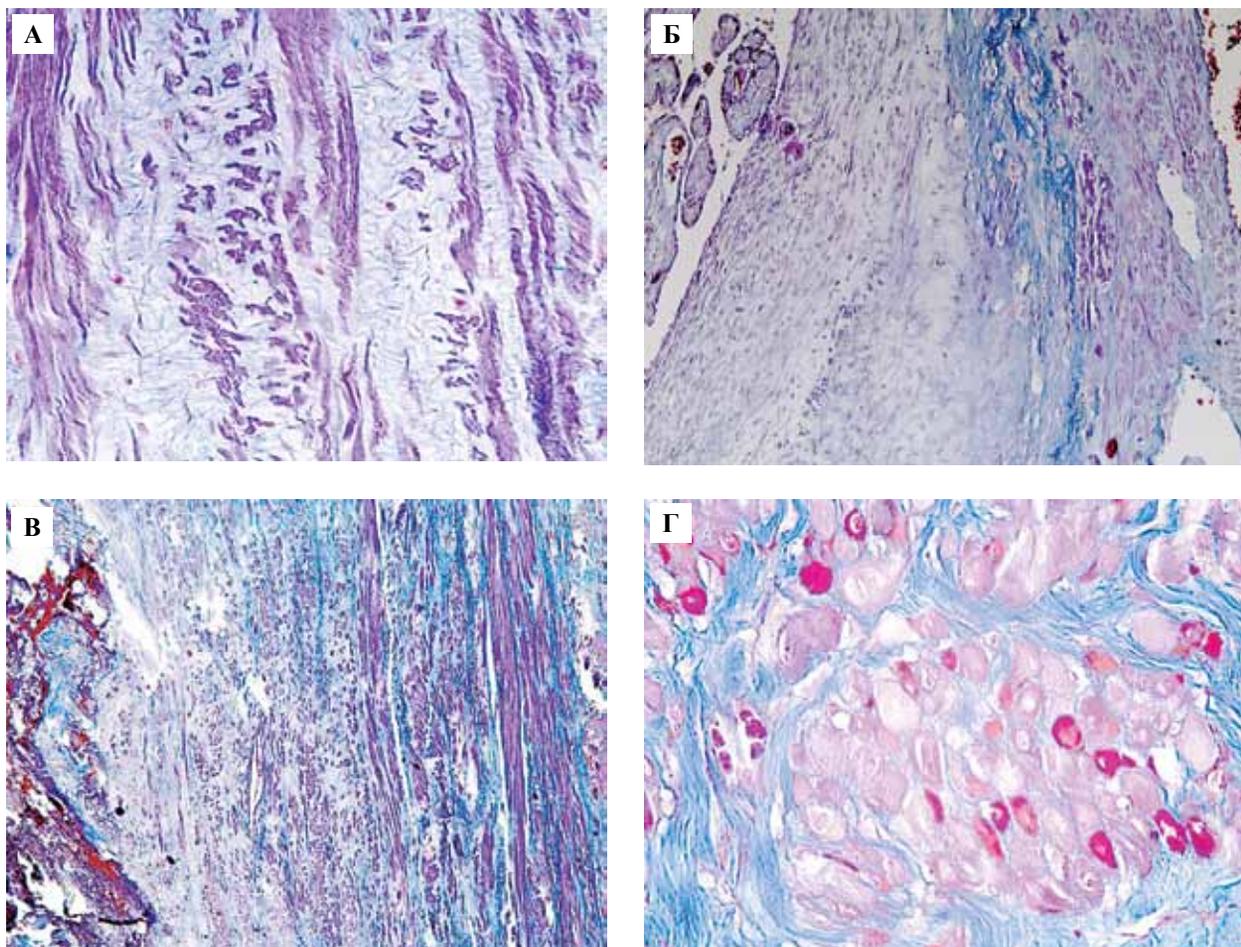


Рис. 3. Особенности рубцовой ткани в удаленном нижнем сегменте матки при полном предлежании плаценты и вросших ворсинах. Окраска по Маллори.

- А – зоны резкого отека и разобщения миоцитов рыхлой соединительной тканью,  $\times 200$   
 Б – участок склероза с гиалинозом в маточно-плацентарной области,  $\times 100$   
 В – тонкий фрагмент стенки матки с атрофией растянутых миоцитов при отсутствии сосудистого слоя,  $\times 50$   
 Г – некроз большинства миоцитов в составе пучка, замурованного соединительной тканью,  $\times 400$

явную тенденцию к увеличению в зонах, близких к рубцам. Выявленные иные соотношения виментин-положительных децидуальных клеток свидетельствовали, с одной стороны, о функциональном напряжении сохранившихся децидуальных клеток эпителиоидного типа (пример компенсации), а с другой – о доминировании промежуточных и дистрофичных вариантов на участках соединительной ткани (декомпенсация).

Интерстициальный цитотрофобласт выявлен возле оснований бухт с вросшими ворсинами (рис. 4 В), но при дальнейшей инвазии клетки теряли иммуноэкспрессию цитокератина и «останавливались» перед рубцовой тканью в миометрии. Явные свидетельства недостаточной функции цитотрофобласта подтверждены неполной гестационной перестройкой радиальных артерий при сохранении в них мышечных фрагментов стенки.

Важно подчеркнуть наличие сопутствующей патологии в исследованном операционном материале при полном предлежании плаценты. Так, у трети пациенток

обнаружены расширенные эндометриальные железы (рис. 4 Г) с атрофичными эпителиоцитами и остатками секрета (аденомиоз), а у половины – ретроплацентарные гематомы разного объема и давности, в том числе с гемолизом материнских эритроцитов и нитями фибрина. Изредка отмечались скопления лимфоцитов в пределах децидуальной оболочки, но без явных признаков эндометрита.

### Обсуждение

Сопоставление нормального строения миометрия и базальной оболочки плацент у женщин группы сравнения с полной дезорганизацией всех компонентов нижнего сегмента матки после КС убеждает в том, что наличие обширного рубца или разных по давности рубцов явилось первоначальной и доминирующей причиной данной тяжелой формы атипичной плацентации. Можно ли представить сейчас ранний этап патогенеза предлежания плаценты с вросшими ворсинами? Да, возможно. Если использовать клинические данные

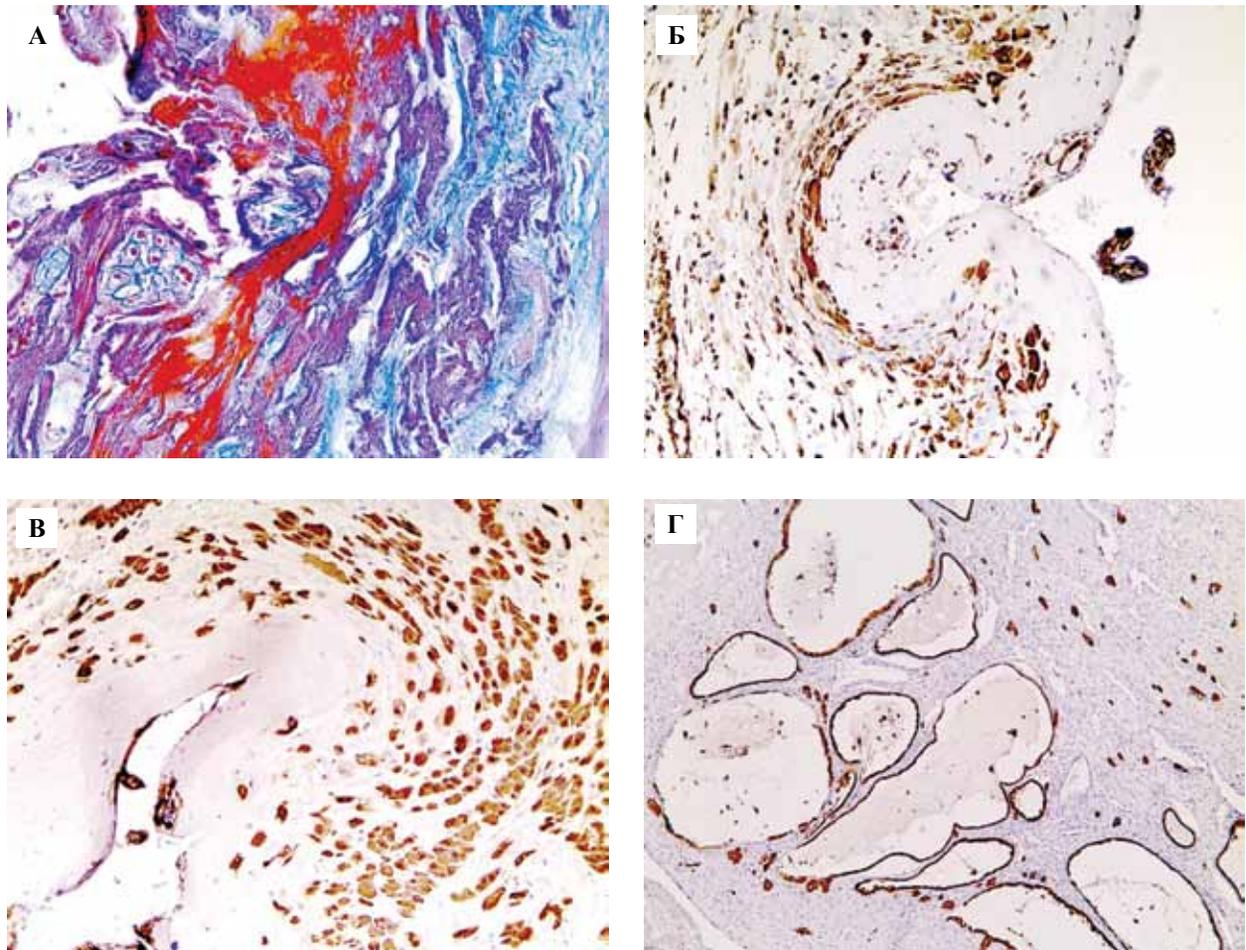


Рис. 4. Вторичные изменения компонентов стенки матки у женщин при полном предлежании плаценты и вросшими ворсинами.

А – расщепление фибриноида Рора за счет проникновения рубца. Окраска по Маллори,  $\times 200$

Б – уменьшение числа виментин-положительных децидуальных клеток вокруг бухты с проникающими ворсинами.

ИГХ реакция с антителами к виментину,  $\times 100$

В – снижение иммуноэкспрессии цитокератина 8 в части интерстициального цитотрофобласта вокруг бухты с ворсинами.

ИГХ реакция с антителами к цитокератину 8,  $\times 200$

Г – скопление расширенных эндометриальных желез (аденомиоз) в маточно-плацентарной области.

ИГХ реакция с антителами к цитокератину 8,  $\times 50$

гистерографии и ультразвукового исследования матки в ближайшие 4–6 месяцев после КС [16–18], то у 50–60% таких пациенток обнаружены дефекты швов, особенно после двух, трех и более оперативных родоразрешений. У женщин наблюдали частичное расхождение швов, кровоизлияния, накопление жидкости (истмоцеле), истончение стенки нижнего сегмента за счет эндо- и миометриального компонентов. В клиническом плане отмечены дисменорея, кровоточивость, тазовые боли и бесплодие. В последних публикациях эти проявления обозначены как синдром рубца после КС – cesarean scar syndrome [19]. В связи с этим предлагаются разные способы гистероскопической хирургии для ликвидации дефектов рубцов в ранних сроках репарации матки.

Дальнейшим промежуточным этапом патогенеза можно считать ультразвуковое обнаружение предлежания плаценты во II триместре беременности у на-

ших пациенток. В отдельных публикациях [2] описаны редкие наблюдения ампутации матки на 9-й и 18-й неделе по поводу предлежания плаценты с рубцом в виде истонченного «мешка» в нижнем сегменте матки после КС.

Завершающий этап патоморфологической динамики рубца зафиксирован в наших 12 наблюдениях предлежания плаценты с вросшими ворсинами, где доминировало обширное разрастание рубцовой ткани. Разнородный характер структуры рубцов отражает, вероятно, наложение участков формирования соединительной ткани разной давности. Тем не менее подтвердить эти особенности рубцов при сопоставлении их с количеством КС и промежутками между ними нам не удалось. С первоначальным накоплением рубцовой ткани связана дезорганизация всех остальных компонентов стенки нижнего сегмента матки. Так, расщепление слоя фибриноида обусловлено проникновением

в его состав вросших ворсин и соединительной ткани. Патология пограничного фибриноида и прилегающих децидуальных клеток, продуцирующих в норме тканевой фактор [4, 7], объяснила местные нарушения гемостаза; это подтверждено выявлением ретроплацентарных гематом у половины пациенток основной группы. Обнаружение рубцов в пределах тонкого децидуального слоя предполагало редукцию виментин-положительных децидуальных клеток и увеличение числа их дистрофических форм. Вполне возможны также изменения местной ауто- и паракриной регуляции в маточно-плацентарной области у таких женщин, о чем свидетельствовало обнаружение аденомиоза в пределах миометрия. Ограничение инвазивной активности цитотрофобласта обусловлено трудностью его миграции в рубцовой ткани, что отмечено нами ранее при этой патологии [5] и подтверждено в данном исследовании.

Наиболее тяжелые структурные изменения обнаружены в миометрии. Нарастающее растяжение нижнего сегмента приводит к выраженной атрофии вытянутых мышечных пучков, дистрофии и некрозу составляющих миоцитов. Этот же фактор обусловил впервые констатированные нарушения сосудистого слоя миометрия. По мнению А.Г. Савицкого, Г.А. Савицкого [9], этот лакунарно-венулярный слой играет важную роль в гестационной перестройке миометрия и в родовом акте. Отсутствие сосудистого слоя в истонченном нижнем сегменте приводит к дополнительному ишемическому повреждению окружающих структур. При столь объемной патологии всех компонентов миометрия трудно предполагать его необходимую сократительную функцию для самостоятельного отделения плацента accreta, а также даже частичное восстановление стенки матки в послеоперационном периоде. В целом тяжелые структурные изменения в нижнем сегменте матки подтвердили их необратимый характер, исключили перспективы консервативной тактики у женщин с полным предлежанием и врастанием плаценты и, напротив, обосновали необходимость и успешность метропластики.

### Заключение

В патогенезе наиболее тяжелой анатомической формы атипичной плацентации – полном предлежании плаценты с вросшими ворсинами – первоначальное и определяющее значение имеют обширные рубцы после кесарева сечения с предполагаемыми неустраненными дефектами операционного разреза в нижнем сегменте матки. Соединительная ткань разной плотности и интенсивности окраски по Маллори выявлена во всех компонентах истонченной стенки матки. Это приводит к необратимым вторичным изменениям пограничного слоя фибриноида, образованию глубоких бухт с проникающими ворсинами плаценты, уменьшению количества виментин-положительных децидуальных клеток, слабой инвазивности цитотрофобласта, выраженной атрофии и некроза мышечных пучков, включая

редукцию сосудистого слоя в миометрии. Механическое растяжение нижнего сегмента матки, регистрируемое у наших пациенток при УЗИ во II триместре, формируется при отсутствии необходимой пластичности миометрия в зоне рубцов. В этих необычных условиях единственной оптимальной тактикой представляется удаление истонченного сегмента (метропластика) с наложением швов в пределах сохранного миометрия. Кроме того, необходимо тщательно контролировать при УЗИ состояние швов и рубцов в ближайшем периоде после кесарева сечения, особенно при клинических признаках их дефектного заживления. Высокий риск массивного акушерского кровотечения при родоразрешении беременных с врастанием плаценты диктует необходимость более строгого подхода к оперативному вмешательству.

### Литература/References

1. *Баев О.Р.* Аномалии прикрепления плаценты // Акушерство и гинекология. 2009. № 5. С. 3–6 [*Baev O.R.* Anomalies of placenta attachment // *Akusherstvo i ginekologiya*. 2009. V. 5. P. 3–6 (In Russ.)].
2. *Барينو И.В., Кондриков Н.И., Волощук И.Н., Чечнева Н.А., Щукина Н.А., Петрухин В.А.* Особенности патогенеза врастания плаценты в рубец после кесарева сечения // Архив патологии. 2018. Т. 80, № 2. С. 18–23 [*Barinova I.V., Kondrikov N.I., Voloshchuk I.N., Chechneva N.A., Schukina N.A., Petrukhin V.A.* Features of the pathogenesis of ingrowth of the placenta into the scar after cesarean section // *Arkhiv patologii*. 2018. V. 80, No 2. P. 18–23 (In Russ.)].
3. *Курцер М.А., Лукашина М.В., Панин А.В., Штабницкий А.П.* Истинное врастание плаценты. Органосохраняющие операции // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2009. Т. 8, № 5. С. 31–35 [*Kurtser M.A., Lukashina M.V., Panin A.V., Shtabnitsky A.P.* True placenta ingrowth. Organ-saving operations // *Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii*. 2009. V. 8, No 5. P. 31–35 (In Russ.)].
4. *Милованов А.П.* Патология системы мать–плацента–плод. М.: Медицина, 1999. 448 с. [*Milovanov A.P.* Pathology of the mother–placenta–fetus system. M.: Medicine, 1999. 448 p. (In Russ.)].
5. *Милованов А.П., Буштырев А.В., Фокина Т.В.* Особенности цитотрофобластической инвазии при полном предлежании и врастании плаценты // Архив патологии. 2017. Т. 79, № 6. С. 30–35 [*Milovanov A.P., Bushyrev A.V., Fokina T.V.* Features of cytotrophoblastic invasion with full presentation and placenta invasion // *Arkhiv patologii*. 2017. V. 79, No 6. P. 30–35 (In Russ.)].
6. *Милованов А.П., Димова Е. А.* Спорные проблемы патогенеза имплантации плаценты внутрь стенки матки // Архив патологии. 2011. Т. 73, № 2. С. 54–57 [*Milovanov A.P., Dimova E.A.* Controversial problems of the pathogenesis of implantation of the placenta inside the uterine wall // *Arkhiv patologii*. 2011. V. 73, No 2. P. 54–57 (In Russ.)].
7. *Милованов А.П., Кузнецова Н.Б., Фокина Т.В.* Роль иммунораспределения тканевого фактора в становлении гемостаза в I триместре физиологической беременности // Бюллетень

- экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т. 166, № 10. С. 502–506. [Milovanov A.P., Kuznetsova N.B., Fokina T.V. The role of tissue immunoreparation in the development of hemostasis in the first trimester of physiological pregnancy // *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2018. V. 166, No 10. P. 502–506 (In Russ.)].
8. Савельева Г.М., Курцер М.А., Бреслав И.Ю., Панина О.Б., Андреев А.И., Барыкина О.П., Латышкевич О.А. Вростание предлежащей плаценты у пациенток с рубцом на матке после кесарева сечения // *Акушерство и гинекология*. 2015. № 11. С. 41–45 [Savelieva G.M., Kurtser M.A., Breslav I.Yu., Panina O.B., Andreev A.I., Barykina O.P., Latyshkevich O.A. The ingrowth of the presenting placenta in patients with a scar on the uterus after cesarean section // *Akusherstvo i ginekologiya*. 2015. V. 11. P. 41–45 (In Russ.)].
  9. Савицкий А.Г., Савицкий Г.А. Родовая схватка человека. СПб.: ЭЛБИ, 2011. 240 с. [Savitsky A.G., Savitsky G.A. Gender scramble man. SPb.: ELBI, 2011. 240 p. (In Russ.)].
  10. Barinov S., Tirskaia Y., Medyanikova I., Shamina J. A new approach to fertility – preserving surgery in patients with placenta accrete // *J Matern Fetal Neonat Med*. 2017;5:1–5.
  11. Biswas R., Sawhney H., Dass R., Saran R.K. Histopathological study of placental bed biopsy in placenta // *Acta Obstet Gynec*. 1999;78(3):173–9.
  12. Jauniaux E., Bhide A. Prenatal ultrasound diagnosis and outcome of placenta previa accrete after cesarean delivery // *Amer J Obstet Gynecol*. 2017;217(1):27–36.
  13. Jauniaux E., Jurkovic D. Placenta accrete: pathogenesis of a 20 century iatrogenic uterine disease // *Placenta*. 2012;33(4):244–51.
  14. Khan M., Sachdeva P., Arora R., Bhasin S. Conservative management of morbidly adherent placenta // *Placenta*. 2013;34(10):963–6.
  15. Khong T.Y., Robertson W.B. Placenta accrete and placenta previa accrete // *Placenta*. 1987;8(4):399–409.
  16. Melo-Cerda I. Cesarean scar defect // *Ginecol Obstet Mex*. 2014;82(8):530–4.
  17. Roberge S., Boutin A., Challet N., Moore L. et al. Systematic review of cesarean scar assessment in the nonpregnant state // *Amer J Perinatol*. 2012;29(6):465–71.
  18. Schepker N., Garcia-Rocha G.J., Versen-Hoynck F., Hillemanns P. Clinical diagnosis and therapy of uterine scar defects after caesarean section // *Arch Gynecol Obstet*. 2015;291(6):1417–23.
  19. Tsuyi S., Kimura F., Yamanaka A., Hanada T. et al. Impact of hysteroscopic surgery for isthmocele associated with cesarean scar syndrome // *J Obstet. Gynaecol Res*. 2018;44(1):43–8.
  20. Wehrum M.J., Buhimschi I.A., Thung S., Bahtiyar M.O. Accreta complicating placenta previa // *Amer J Obstet Gynecol*. 2011;204(5):411–25.

## THE LEADING ROLE OF SCARS AFTER THE CAESARIAN SECTION IN THE PATHOGENESIS OF PLACENTA PREVIA ACCRETA

A.P. Milovanov<sup>1</sup>, V.A. Aksenenko<sup>2</sup>, A.A. Lukashevich<sup>2</sup>, T.V. Fokina<sup>1</sup>, I.I. Stepanova<sup>1</sup>, N.B. Tikhonova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow

<sup>2</sup> Stavropol State Medical University, Stavropol

In recent years, the incidence of atypical placentation associated with cesarean section scar has increased worldwide including placenta previa accreta but the details of the pathogenesis are still obscure. The purpose of the work was to determine the role of scars after cesarean section during placenta accreta delivery. The material was sampled in Stavropol Regional Clinical Perinatal Center No.1. The main group comprised 12 pregnant women with placenta previa accrete. During the operation, the affected areas of the lower uterine segment were excised (metroplasty). In the second group, the pieces of myometrial wall and placental basal membrane were taken during the first cesarean section by other obstetrics' indications from 8 patients with normal placentation. The material was studied by routine histological methods (staining with hematoxylin and eosin, Mallory aniline blue) and immunohistochemically (using vimentin and cytokeratin 8 markers). In the main group, massive expansion of scar tissue into the endometrium and all the layers of the myometrium resulted in the irreversible secondary changes in the fibrinoid boundary layer, formation of deep invaginations with villus penetration, decreased number of vimentin-positive decidual cells, weak invasive activity of the cytotrophoblast, pronounced atrophy, dystrophy and necrosis of muscle bundles including reduction and even disappearance of the vascular layer with maximum dilatation of the uterine wall. Taking into account the volume and severity of the identified changes with placenta previa + accrete, we recommend organ-saving surgery with suturing healthy myometrium after metroplasty.

*Key words:* uterine scar after cesarean section, placenta previa accreta, immunohistochemistry, pathomorphology, metroplasty

### Информация об авторах

Милованов Андрей Петрович – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 129 5501. E-mail: a\_p\_milovanov@mail.ru

Аксененко Виктор Алексеевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии Ставропольского государственного медицинского университета.

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, д. 310. Телефон 8 962 402 68 99. E-mail: aksentko@mail.ru

Лукашевич Артем Алексеевич – аспирант кафедры акушерства и гинекологии Ставропольского государственного медицинского университета.

Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Мира, д. 310. Телефон 8 906 477 24 84. E-mail: kshatriy1991@gmail.com

Фокина Татьяна Васильевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 129 5501.

Степанова Ирина Ильдаровна – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 128 8701.

Тихонова Наталья Борисовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 129 55 22. E-mail: morfolhum@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 14 декабря 2018 года*

© Рудюк Л.А., Решетникова О.С., 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-19-26

УДК: 616.12-007-053.1:618.3

# МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЛАЦЕНТЫ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ, ОСЛОЖНЕННОЙ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

*Л.А. Рудюк<sup>1,2</sup>, О.С. Решетникова<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», Калининград

<sup>2</sup> ГБУЗ «Областная клиническая больница Калининградской области», Калининград

В работе изучены особенности роста плода и плаценты, патоморфологическая характеристика, органомерические показатели последов женщин при беременности, осложненной врожденными пороками сердца, а также при их хирургической коррекции. Показано, что диспропорции в развитии плода и плаценты в случаях гестации на фоне некорригированного врожденного порока сердца свидетельствуют об истощении компенсаторных реакций, превалировании инволютивно-дистрофических процессов в плаценте. Установлено, что в случаях корригированного врожденного порока сердца матери в последах развиваются адаптивные реакции, способствующие благоприятному развитию беременности, рождению живого, доношенного ребенка.

*Ключевые слова:* врожденные пороки сердца, плацента, органомерия, патоморфология, адаптация

Развитие службы охраны материнства и детства – одно из приоритетных направлений деятельности Министерства здравоохранения Российской Федерации [2]. В 2016 году достигнуты исторические минимумы в показателях материнской, младенческой и детской смертности. Так, материнская смертность снизилась с 47,4 на 100 тыс. родившихся в 1990 году до 8,3 за 12 месяцев 2016 года (по оперативным данным, без учета окончательных медицинских свидетельств за 12 месяцев 2016 года, умерли на 17,8% меньше женщин, чем за 2015 год) [8]. Тем не менее, несмотря на наметившуюся тенденцию, данные показатели остаются достаточно высокими. Это обусловлено тем, что дети и беременные женщины – наиболее уязвимая часть населения.

Здоровье ребенка начинается с физиологического развития зародыша в антенатальном периоде. В материнском организме при беременности формируется биологическая система мать–плацента–плод [6]. Нарушение гомеостаза у матери негативным образом отражается на компенсаторно-приспособительных процессах фетоплацентарного комплекса [6,7, 11].

Сердечно-сосудистые заболевания относятся к наиболее частой экстрагенитальной патологии и, по данным разных авторов, диагностируются у 51,7% беременных [5].

Современная научная литература указывает на рост удельного веса числа беременных с врожденной пато-

логией, которая составляет от 5 до 25,5% в структуре заболеваний сердца [1, 7, 13].

Как известно, беременность, протекающая в условиях нормы, сопровождается увеличением нагрузки на сердечно-сосудистую систему. Тем не менее при ее физиологическом развитии компенсаторные возможности внутренних органов и систем адаптируют материнский организм к меняющимся условиям гемодинамики [6, 11].

В течение гестации с врожденной патологией сердца у женщин зачастую развивается дезадаптация кровообращения. Это, в свою очередь, приводит к негативным последствиям как для беременных, так и для плода [3, 7, 11].

Во время беременности у женщин с пороками сердца развивается ряд осложнений, которые отягощают ее, нередко приводя к угрозе прерывания. Среди нозологических форм осложнений в первую очередь регистрируются анемия, ранний и поздний гестоз, ранний токсикоз, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, маловодие, крупный и гигантский плод, многоводие, гестационный пиелонефрит, угроза преждевременных родов [15, 16].

Роды у таких женщин часто сопровождаются дискоординацией родовой деятельности, вторичной слабостью родовых сил, несвоевременным излитием околоплодных вод, кровотечениями. Зачастую у рожениц с

врожденными пороками сердца наблюдаются быстрые, стремительные и запоздалые роды [10, 12, 15, 16].

Структура послеродового периода нередко представлена гипогалактией, субинволюцией матки, гематометрой и гипотоническими кровотечениями [4].

Важно отметить, что гестация может влиять и на течение основного заболевания сердца, способствуя развитию тромбозов, сердечной недостаточности, отека легких, нарушению ритма и проводимости [1, 7, 12].

Хроническая гипоксия материнского организма, обусловленная расстройством гемодинамики, является основной причиной гипоксических состояний плода [4]. Внутриутробная гипоксия и задержка внутриутробного развития плода нередко наблюдаются у беременных с врожденными пороками сердца [14]. У новорожденных часто регистрируются церебральная ишемия, неонатальные аспирационные синдромы, дыхательные расстройства (дистресс), бронхолегочная дисплазия, гипотрофия, повышается риск перинатальной смертности [4, 9, 14].

В последние десятилетия значительно увеличилось число женщин с врожденным пороком сердца, достигающих репродуктивного возраста и желающих родить ребенка, несмотря на медицинские ограничения. Это обусловлено усовершенствованием кардиохирургии, которая продлевает и в значительной степени улучшает качество жизни пациентов с данной сердечно-сосудистой патологией [11].

Современные научные исследования свидетельствуют о более благоприятном течении и исходе беременности женщин, у которых в анамнезе есть хирургическая коррекция врожденного порока сердца [3, 15].

Имеются достаточные основания полагать, что сохранение гомеостаза в фетоплацентарном комплексе на фоне беременности, осложненной врожденным пороком сердца, во многом определяется уровнем адаптационных резервов плаценты [6]. В связи с этим внимание клиницистов и морфологов обращено на морфофункциональные особенности фетоплацентарного комплекса у женщин с врожденным пороком сердца. Вместе с тем данные об особенностях патоморфологии плаценты женщин, гестация у которых протекала на фоне врожденного порока сердца, в том числе при наличии хирургической коррекции, до сих пор остаются мало изученными и требуют дальнейшего уточнения.

Целью нашего исследования было установление патоморфологических особенностей последов женщин, беременность которых протекала на фоне врожденных пороков сердца и в случаях их хирургической коррекции.

Ставились следующие задачи.

1. Провести органомерию плаценты и определить показатели длины и веса детей, рожденных от женщин, страдающих врожденными пороками сердца, без оперативной коррекции в анамнезе.

2. Выявить органомерические особенности плацент и антропометрических данных новорожденных при корригированном врожденном пороке сердца у матери.

3. Оценить корреляционную взаимосвязь между параметрами фетоплацентарного комплекса.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили 54 плаценты женщин, беременность которых завершилась рождением живого ребенка на сроке гестации 37–40 недель. Основную группу составили 39 плацент женщин, у которых беременность протекала на фоне врожденного порока сердца (ВПС): 20 плацент женщин, беременность которых протекала с некорригированным врожденным пороком (группа I), и 19 плацент женщин, у которых имела место хирургическая коррекция врожденного порока сердца (группа II). Группу контроля составили 15 плацент женщин с физиологическим течением беременности и родов.

Проведен ретроспективный анализ 54 обменных карт (форма № 113/о), историй родов (форма № 096/о) и историй развития новорожденного (форма № 097/о) как в основной группе женщин, так и в группе контроля. Изучение документации лечебных учреждений показало, что в группе с неоперированным ВПС наиболее часто встречались дефекты межжелудочковой и межпредсердной перегородок, которые, соответственно, составили 30% и 15% случаев. Значительно реже, с частотой 10% каждый, обнаруживались незарращение артериального протока, коарктация аорты, бicuspidальный аортальный клапан, стеноз легочной артерии. Аномалия Эбштейна и комбинированный аортальный порок с пролапсом митрального клапана зарегистрированы в 5% наблюдений каждый. У рожениц группы II в 26% наблюдений установлено наличие коррекции тетрады Фалло в анамнезе, а также в равных пропорциях (по 16%) до наступления беременности проведено оперативное лечение дефекта межпредсердной перегородки, артериовенозного соустья и стеноза дуги аорты. Стеноз легочной артерии выявлен в 11% наблюдений. Тетрада Фалло после хирургической коррекции с остаточным стенозом легочной артерии и аномалия Эбштейна после оперативного лечения встречались с частотой по 5%.

Информацию о длине тела (росте) и весе ребенка анализировали в каждой из групп наблюдений на основе сведений, полученных из историй развития новорожденных.

Макроскопическое исследование последа начиналось с описания пупочного канатика, где отмечали его отхождение, характеризовали сосуды, извитость, регистрировали наличие или отсутствие патологических очагов. Описание плодных оболочек проводили с оценкой цвета и прозрачности, наличия или отсутствия ободка и валика. Для оценки макроскопических изменений плацентарного диска определяли форму,

состояние плодной и материнской поверхности, вид плаценты на разрезе.

Проводили органомерметрические исследования: взвешивание плаценты, определение ее объема, площади, длины, ширины и толщины. Максимальная толщина плаценты измерялась в центральной зоне, для выявления минимального значения данной величины в учет брались краевые отделы плацентарного диска. Объем плаценты определяли по объему вытесненной воды в мерном цилиндре. Площадь материнской поверхности плаценты определяли по отпечатку свежей плаценты на миллиметровой бумаге. При изучении пупочного канатика оценивали его длину, диаметр. Вычисляли плацентарно-плодный коэффициент (ППК) – отношение массы плаценты к массе плода.

Полученные результаты обрабатывали при помощи интегрированного пакета STATISTICA V 10.0. Анализ данных на нормальность распределения выполнялся с применением W-критерия согласия Шапиро–Уилки. Во время исследования W-критерий установил невыполнение данного условия для большинства выборок, что соответствовало асимметричному характеру распределения. Различия между группами оценивали с помощью непараметрического рангового критерия различий Манна–Уитни для независимых выборок. В каждой из групп определяли показатели  $M \pm (m)$ , где  $M$  – среднее арифметическое значение, а  $(m)$  – ошибка среднего арифметического. Показателем согласованности между значениями двух переменных служил коэффициент непараметрической корреляции  $r$  Спирмена, где  $r=1$  обозначает максимально сильную положительную линейную взаимосвязь.

## Результаты и обсуждение

Во время исследования данных веса и длины новорожденных выявлено, что дети, рожденные от матерей с некорригированным ВПС, отличались заметным снижением антропометрических показателей (соответ-

ственно,  $3212,50 \pm 57,96$  г,  $51,38 \pm 0,41$  см при  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем ( $3482,67 \pm 58,67$  г,  $54,3 \pm 0,59$  см). Новорожденные от матерей с хирургической коррекцией порока сердца имели более высокие значения веса и длины, в отличие от рожденных в группе I (соответственно,  $3311,58 \pm 114,44$  г,  $53,08 \pm 1,19$  см,  $p < 0,05$ ) (рис. 1 и 2). Стоит подчеркнуть, что в своих значениях новорожденные из группы II не достигали контрольных параметров.

При макроскопическом исследовании плаценты группы I характеризовались неправильной формой (45%), зачастую этот факт был обусловлен присутствием у них добавочных долей. Значительно реже в данной группе отмечалась овальная (35%) и округлая (20%) форма. Плацентарный диск в группе II чаще регистрировался овальной (53%) и округлой (26%) конфигурации. Неправильная форма в группе с некорригированным ВПС отмечалась в меньшей степени (21%). Последы контрольной группы, как правило, отличались правильной округлой формой.

Пупочный канатик в плацентах женщин с гестацией, осложненной некорригированным пороком сердца, чаще прикреплялся эксцентрично (95%). Его длина и диаметр были в значительной степени меньше (соответственно,  $31,37 \pm 1,43$  см,  $1,01 \pm 0,11$  см при  $p < 0,05$ ), чем при физиологическом течении беременности ( $34,40 \pm 1,76$  см,  $1,55 \pm 0,22$  см). В группе плацент от родильниц с хирургической коррекцией ВПС, как и в контрольной, чаще регистрировалось парацентральное (47%) и центральное прикрепление пуповины (53%). Показатели длины и диаметра пупочного канатика в последах II группы отличались более высокими параметрами по сравнению с плацентами группы I, однако данные показатели были ниже, чем в контроле (соответственно,  $33,84 \pm 2,61$  см,  $1,38 \pm 0,20$  см при  $p < 0,05$ ) (рис. 3 и 4).

Во время осмотра плодная поверхность плацент как основной группы исследования, так и контрольной

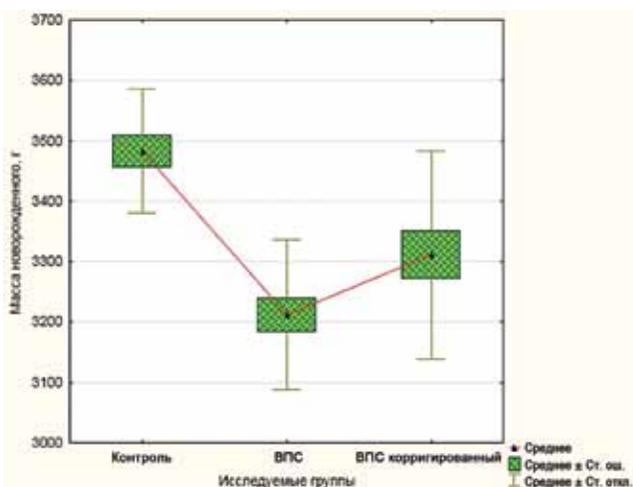


Рис. 1. Диаграмма диапазона массы новорожденных в исследуемых группах

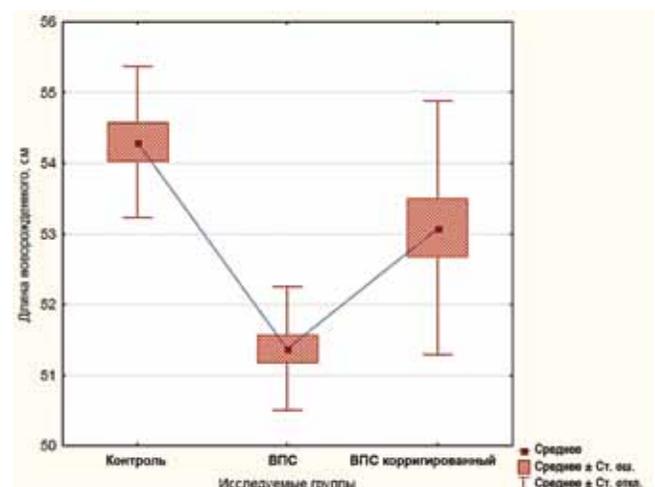


Рис. 2. Диаграмма диапазона длины новорожденных в исследуемых группах

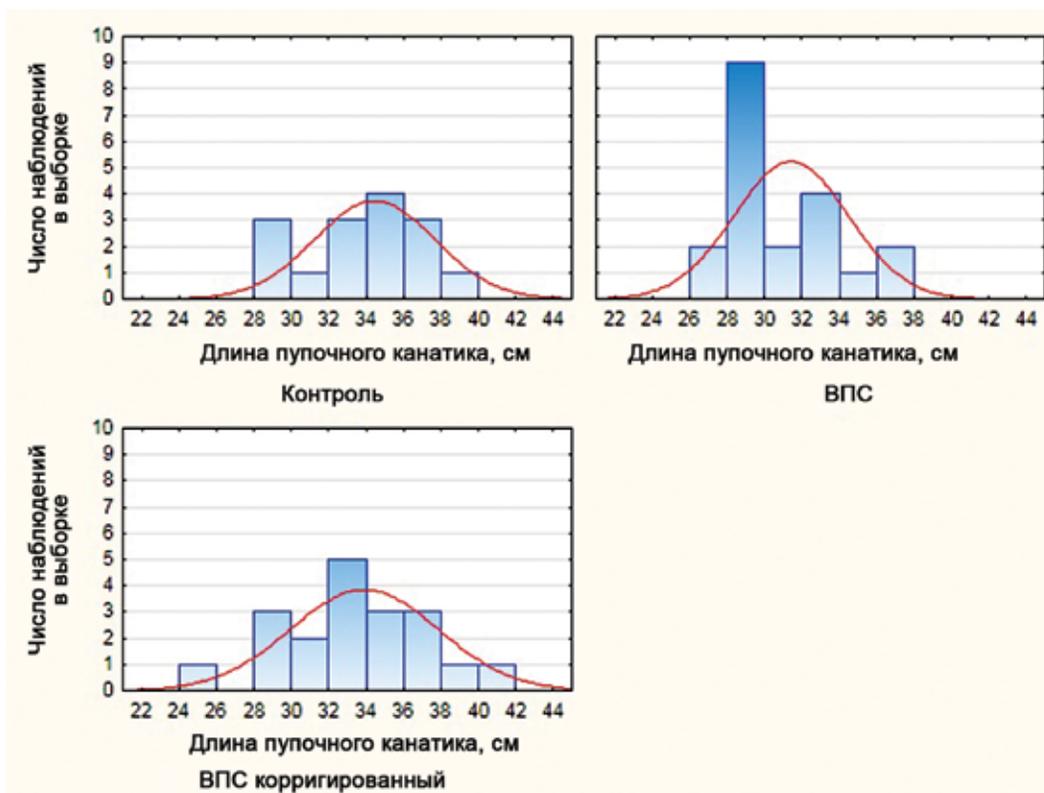


Рис. 3. Категоризованная гистограмма распределения показателей длины пупочного канатика

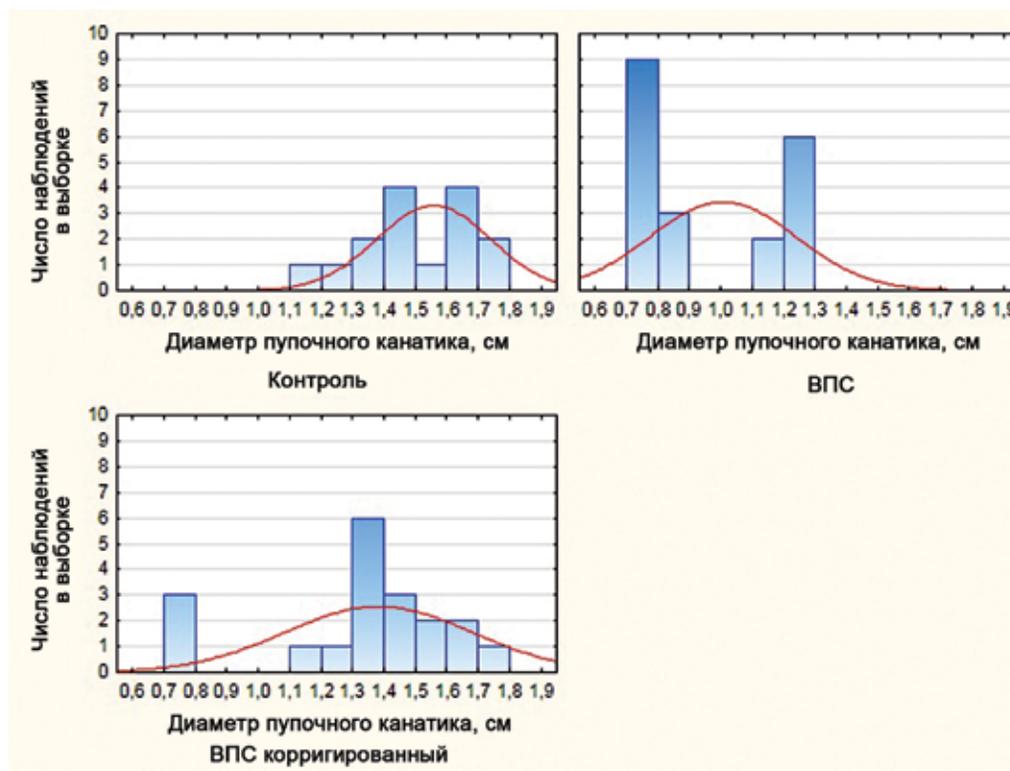


Рис. 4. Категоризованная гистограмма распределения показателей диаметра пупочного канатика

характеризовалась серо-голубоватой окраской, была гладкая, блестящая. В последах групп I и II нередко регистрировался ободок (соответственно, восемь случаев и пять случаев), а в группе, где беременность проходила на фоне некорригированного врожденного порока сердца у матери, в трех случаях был зарегистрирован валик.

При анализе плодных оболочек в основных группах исследования выявлены сходные черты патоморфологических изменений. В них часто определялись умеренный отек и наслоения свертков крови, за счет которых плодные оболочки выглядели утолщенными. В контроле оболочки, как правило, были тонкими, полупрозрачными.

Диаметр материнской поверхности плацент женщин с некорригированным пороком сердца характеризовался более низкими показателями (соответственно,  $18,66 \pm 2,10$  см при  $p < 0,05$ ) в сравнении с контролем ( $20,69 \pm 0,82$  см). Рельеф поверхности последних выглядел бугристым, с диффузными отложениями солей кальция и многочисленными ишемическими инфарктами в краевой и парацентральной области. Последы от женщин с хирургической коррекцией ВПС зачастую имели показатели диаметров, приближенных к контрольным величинам (соответственно,  $20,38 \pm 1,57$  см). Материнская поверхность плацент группы II чаще имела борозды разной глубины и единичные мелкие ишемические инфаркты в краевых областях, пылевидные очажки налета солей кальция. Поверхность плацент контрольной группы была ровной, без дистрофического кальциноза и ишемических инфарктов.

Средние значения максимальной и минимальной толщины среза ткани плацент группы I составили  $2,28 \pm 0,18$  см и  $1,33 \pm 0,13$  см, что с достоверной вероятностью ниже показателей контроля (соответственно,  $3,16 \pm 0,13$  см,  $1,59 \pm 0,07$  см). На разрезе ворсинчатый хорион зачастую имел расстройство кровообращения

и выглядел бледным. В группе II отмечены наиболее низкие параметры толщины ткани плаценты (соответственно,  $1,94 \pm 0,32$  см,  $1,16 \pm 0,35$  см,  $p < 0,05$ ). В свою очередь, поверхность среза плаценты женщин с хирургической коррекцией ВПС, как и в контроле, значительно чаще была умеренного кровенаполнения.

Органометрические показатели объема, площади и массы плацент в ряду контроль – некорригированный ВПС – ВПС с хирургической коррекцией (табл. 1) убывали.

Плацентарно-плодный коэффициент является объективным морфометрическим показателем циркуляторно-метаболического равновесия фетоплацентарной системы [6]. Его значения при гестации, протекающей в условиях нормы, колеблются в широких пределах и составляют от 0,14 до 0,16. При расчете ППК (табл. 1) обращало на себя внимание то, что в группе I наблюдались более низкие показатели по сравнению с группой контроля ( $p < 0,05$ ). Уменьшение массы плаценты может быть результатом гипоксического состояния материнского организма, что обуславливает уменьшение размера органа. В группе II отмечалось незначительное снижение среднего ППК без достоверных различий по сравнению с контролем и достоверное ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой родильниц, где беременность протекала с некорригированным врожденным пороком сердца у матери. Наличие более высоких значений коэффициента в группе с хирургической коррекцией ВПС может свидетельствовать об относительной компенсации гемодинамических нарушений и более благоприятном течении беременности.

В ходе исследования корреляционных взаимосвязей выявлены положительные линейные связи между значениями ППК – массой и объемом плацент основной группы (рис. 5 А–Г). Этот факт подтверждает прямую зависимость данного показателя от низких параметров

Таблица 1

Средние показатели органометрии плацент

Показатели	Группы		
	Основная группа I (n=20)	Основная группа II (n=19)	Контроль (n=15)
Масса новорожденного, г	$3212,50 \pm 57,96$ #*	$3311,58 \pm 114,44$ *	$3482,67 \pm 58,67$
Длина новорожденного, см	$51,38 \pm 0,41$ #*	$53,08 \pm 1,19$ *	$54,3 \pm 0,59$
Объем плаценты, мл	$390,75 \pm 12,69$ #*	$430,79 \pm 23,83$ *	$479,00 \pm 8,62$
Площадь материнской поверхности, см	$266,21 \pm 15,39$ *	$283,87 \pm 18,32$ *	$309,91 \pm 11,19$
Масса плаценты, г	$413,50 \pm 16,88$ #*	$457,89 \pm 25,48$ *	$494,00 \pm 8,52$
<b>Плацентарно-плодный коэффициент</b>	$0,1286 \pm 0,0040$ #*	$0,1385 \pm 0,0084$	$0,1419 \pm 0,0031$

\* различия достоверны по сравнению с ГС  $p < 0,05$

# различия достоверны по сравнению с плацентами женщин, у которых имела место хирургическая коррекция врожденного порока сердца,  $p < 0,05$

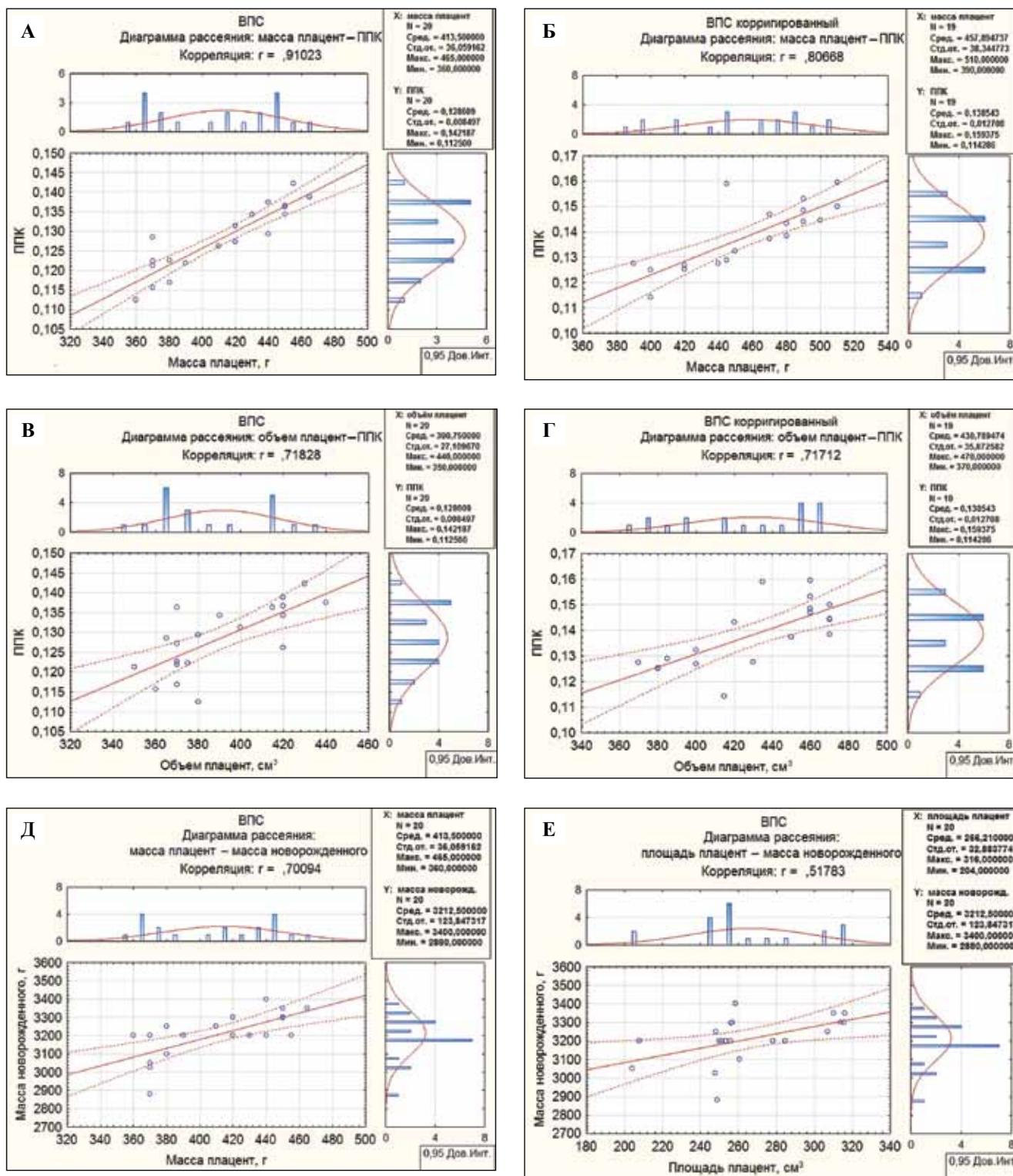


Рис. 5. Матричные диаграммы корреляции.

А – положительные корреляционные взаимосвязи между показателями ППК и массой плацент в группе исследования женщин с некорректированным ВПС; Б – положительные корреляционные взаимосвязи между показателями ППК и массой плацент в группе исследования женщин с хирургической коррекцией ВПС; В – положительные корреляционные взаимосвязи между показателями ППК и объемом плацент в группе исследования женщин с некорректированным ВПС; Г – положительные корреляционные взаимосвязи между показателями ППК и объемом плацент в группе исследования женщин с хирургической коррекцией ВПС; Д – положительные корреляционные взаимосвязи между массой плацент и массой новорожденных в группе исследования женщин с некорректированным ВПС; Е – положительные корреляционные взаимосвязи между массой новорожденных и площадью плацент в группе исследования женщин с некорректированным ВПС

органометрии плацент женщин как при ВПС, так и в случаях их хирургической коррекции. Тем не менее в группе последов женщин с некорригированным ВПС также установлена положительная корреляция между массой новорожденного – массой и площадью плацент. Полученные данные свидетельствуют, что гипотрофия детей, рожденных в группе I, напрямую связана с неполноценным развитием плаценты (рис. 5 Д, Е).

Резюмируя описанный выше анализ патоморфологических данных, необходимо сказать, что при беременности на фоне некорригированных врожденных пороков сердца развивается гипоплазия плаценты и пупочного канатика. Циркуляторная и обменная функции последа в данной группе ограничены за счет выраженных некротических и дистрофических изменений в краевой и парацентральной зонах. Новорожденные от матерей данной группы характеризуются снижением массы и длины тела по сравнению с новорожденными матерей с физиологической гестацией. В последах женщин, у которых до наступления беременности была проведена хирургическая коррекция врожденного порока сердца с частичным восстановлением гемодинамики, органометрические и фетометрические показатели были значительно выше параметров группы I, что, вероятно, явилось результатом структурно-функциональной перестройки плаценты в условиях относительно компенсированной гипоксии на фоне хирургической коррекции нарушения кровообращения.

## Выводы

1. Сравнительный анализ полученных данных показал наличие диспропорций в развитии плода и плаценты в случаях гестации на фоне некорригированного врожденного порока сердца. Установлено превалирование инволютивно-дистрофических процессов в плаценте над компенсаторно-приспособительными реакциями, вплоть до полного их истощения.

2. В случаях корригированного врожденного порока сердца матери в последах отмечается адаптивная структурная перестройка, способствующая благоприятному развитию беременности, рождению живого, доношенного ребенка.

3. В ходе настоящего исследования установлены положительные корреляционные линейные связи, подтверждающие дезадаптацию в развитии фетоплацентарного комплекса в системе мать–плацента–плод при гестации с некорригированным врожденным пороком сердца.

## Литература/References

1. Бухонкина Ю.В., Стрюк Р.И., Чижова Г.В., Немировский В.Б. Течение беременности и перинатальные исходы у женщин с врожденными пороками сердца // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009. № 8. С. 44–48 [Bukhonkina Yu.V., Stryuk R.I., Chizhova G.V., Nemirovskii V.B. Pregnancy course and perinatal outcomes in women with congenital heart valve

- disease // Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika. 2009. V. 8. P. 44–48 (In Russ.).]
2. Здравоохранение в России 2017. Статистический сборник. М.: Росстат, 2017. 170 с. [Zdravookhranenie v Rossii 2017. Statisticheskiy sbornik. M.: Rosstat, 2017. 170 p. (In Russ.).]
3. Казачков Е.Л., Казачкова Э.А., Воробьев И.В., Паширова Н.В. Структурные особенности плацентарного ангиогенеза у женщин с кардиоваскулярной патологией: гистологическая и иммуногистохимическая характеристика плацент // Уральский медицинский журнал. 2016. № 3. С. 101–106 [Kazachkov E.L., Kazachkova E.A., Vorob'ev I.V., Pashirova N.V. Structural features angiogenesis of placenta in women with cardiovascular disease: histological and immunohistochemical characteristics of placenta // Ural'skii meditsinskii zhurnal. 2016. V. 3. P. 101–106 (In Russ.).]
4. Казачкова Э.А., Казачков Е.Л., Воробьев И.В. Проявления патоморфоза у беременных с пороками сердца // Саратовский научно-медицинский журнал. 2017. № 13 (2). P. 233–238 [Kazachkova E.A., Kazachkov E.L., Vorobiev I.V. Manifestations of pathomorphosis at pregnant women with heart diseases // Saratovskii nauchno-meditsinskii zhurnal. 2017. V. 13 (2). P. 233–238 (In Russ.).]
5. Милованов А.П., Добряков А.В. Возрастающее значение экстрагенитальной патологии в структуре материнской смертности в России // Архив патологии. 2018. № 2. С. 3–6 [Milovanov A.P., Dobryakov A.V. The increasing importance of extragenital pathology in the structure of maternal mortality in Russia // Arkhiv patologii. 2018. V. 2. P. 3–6 (In Russ.). doi.org/10.17116/patol20188023-6]
6. Милованов А.П. Патология системы мать–плацента–плод. М., 1999. 448 с. [Milovanov A.P. Patologiya sistemy mat'–platsenta–plod. M., 1999. 448 p. (In Russ.).]
7. Мравян С.Р. Пороки сердца у беременных. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 160 с. [Mravyan S.R. Heart defects in pregnant women. M.: GEOTAR-Media, 2010. 160 p. (In Russ.).]
8. Об итогах работы Министерства здравоохранения Российской Федерации в 2016 году и задачах на 2017 год. Статистический сборник. М., 2017. 89 с. [Ob itogakh raboty Ministerstva zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii v 2016 godu i zadachakh na 2017 god. Statisticheskiy sbornik. M., 2017. 89 p. (In Russ.).]
9. Паширова Н.В. Перинатальные исходы у женщин с «оперированным сердцем»: Сборник научно-практических работ, посвященных 70-летию городской клинической больницы № 6. Челябинск, 2013. С. 28–29 [Pashirova N.V. Perinatal'nye iskhody u zhenshchin s «operirovannym serdtsem»: Sbornik nauchno-prakticheskikh rabot, posvyashchennykh 70-letiyu gorodskoi klinicheskoi bol'nitsy № 6. Chelyabinsk, 2013. P. 28–29. (In Russ.).]
10. Соснова Е.А., Бершвили М.В. Беременность и роды у больных с пороками сердца // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. 2015. № 2 (4). С. 4–9 [Sosnova E.A., Berishvili M.V. Pregnancy and labor in patients with heart disease // Arkhiv akusherstva i ginekologii im. V.F. Snegiryova. 2015. V. 2 (4). P. 4–9 (In Russ.).]
11. Datta S., Kodali B. S., Segal S. Obstetric Anesthesia Handbook. 5th ed. New York: Springer, 2010. 480 p.

12. Kim S.Y., Wolfe D.S., Taub C.C. Cardiovascular outcomes of pregnancy in Marfan's syndrome patients: A literature review // *Congenit Heart Dis.* 2018;13(2):203–9. doi: 10.1111/chd.12546.
13. Phillips S., Pirics M. Congenital Heart Disease and Reproductive Risk: An Overview for Obstetricians, Cardiologists, and Primary Care Providers // *Methodist Debaque Cardiovasc J.* 2017;13(4):238–42. doi: 10.14797/mdcj-13-4-238.
14. Rodríguez-Rodríguez P., Ramiro-Cortijo D., Reyes-Hernández C.G., López de Pablo A.L. et al. Implication of Oxidative Stress in Fetal Programming of Cardiovascular Disease // *Front Physiol.* 2018;23;9:602. doi: 10.3389/fphys.2018.00602.
15. Romeo J.L.R., Takkenberg J.J.M., Roos-Hesselink J.W., Hanif M. et al. Outcomes of Pregnancy After Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction With an Allograft Conduit // *J. Am Coll Cardiol.* 2018;71(23):2656–65. doi: 10.1016/j.jacc.2018.03.522.
16. Silversides C. K., Grewal J., Mason J., Sermer M. et al. Pregnancy Outcomes in Women With Heart Disease: The CARPREG II Study // *J. Am Coll Cardiol.* 2018;71(21): 2419–30. doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.076.

## MACROSCOPIC CHANGES OF PLACENTA IN PREGNANCY COMPLICATED BY CONGENITAL HEART DEFECTS

L.A. Rudiuk, O.S. Reshetnikova

<sup>1</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

<sup>2</sup> Regional State Clinical Hospital of the Kaliningrad Region, Kaliningrad

We studied features of the fetal and placental growth, pathomorphological characteristics and organometric placental parameters in women with complications, congenital heart defects, as well as their surgical correction. It was shown that disproportions in the fetal and placental development in cases of gestation in women with uncorrected congenital heart disease indicate the exhaustion of compensatory reactions and the prevalence of involutinal and dystrophic processes in the placenta. It has been found that in cases of operated maternal congenital heart defects, placental adaptive reactions promote the favorable development of pregnancy, successful labors and birth of alive, full-term baby.

*Key words:* congenital heart defects, placenta, organometry, pathomorphology, adaptation

### Информация об авторах

Рудюк Людмила Александровна – преподаватель среднего профессионального образования Медицинского института Балтийского федерального университета имени И. Канта, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения областной клинической больницы Калининградской области.

Адрес: 236016, Калининград, ул. А. Невского, д. 14. Телефон 8 952 054 7040. E-mail: syuzuayeve-lyudmila@mail.ru

Решетникова Ольга Сергеевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры фундаментальной медицины Медицинского института Балтийского федерального университета имени И. Канта, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения областной клинической больницы Калининградской области.

Адрес: 236016, Калининград, ул. А. Невского, д. 14. Телефон 8 952 792 4369. E-mail: olgasr2006@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 21 декабря 2018 года*

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-27-31

УДК: 616.61-008.64

# ПОЛИОМАВИРУСНАЯ НЕФРОПАТИЯ В СОЧЕТАНИИ С ОСТРЫМ ОТТОРЖЕНИЕМ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

*С.Е. Соловьева, Е.М. Пальцева, М.М. Морозова, А.К. Зокоев*

ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва

Описание случая полиомавирусной нефропатии в сочетании с острым клеточным отторжением в динамике. Подтверждение диагноза потребовало анализа не только морфологической картины, но и результатов иммуногистохимического исследования, клинических и лабораторных данных.

*Ключевые слова:* трансплантация почки, полиомавирусная нефропатия, ВК-вирус, отторжение трансплантата почки

Полиомавирусная нефропатия – поражение трансплантата, вызванное активацией ВК-вируса (*Human polyomavirus 1* семейства *Polyomaviridae*), персистирующего в клетках эпителия и В-лимфоцитах 60–100% взрослого населения. Реактивация латентной инфекции происходит при снижении Т-клеточного иммунитета при иммунодефицитных состояниях, в том числе из-за применения иммуносупрессивной терапии: при трансплантации почки встречается в течение первого года с распространенностью 45–50%. Тем не менее морфологическая картина полиомавирусной нефропатии отмечается лишь в 1–5% почечных трансплантатов [2, 4–6, 8]. Кроме того, есть данные об активации ВК-вирусной инфекции при сахарном диабете и диабетической нефропатии [2, 4]. Особую сложность представляет дифференциальная диагностика с отторжением трансплантата и случаями сочетанного течения клеточного отторжения и полиомавирусной нефропатии [6, 7].

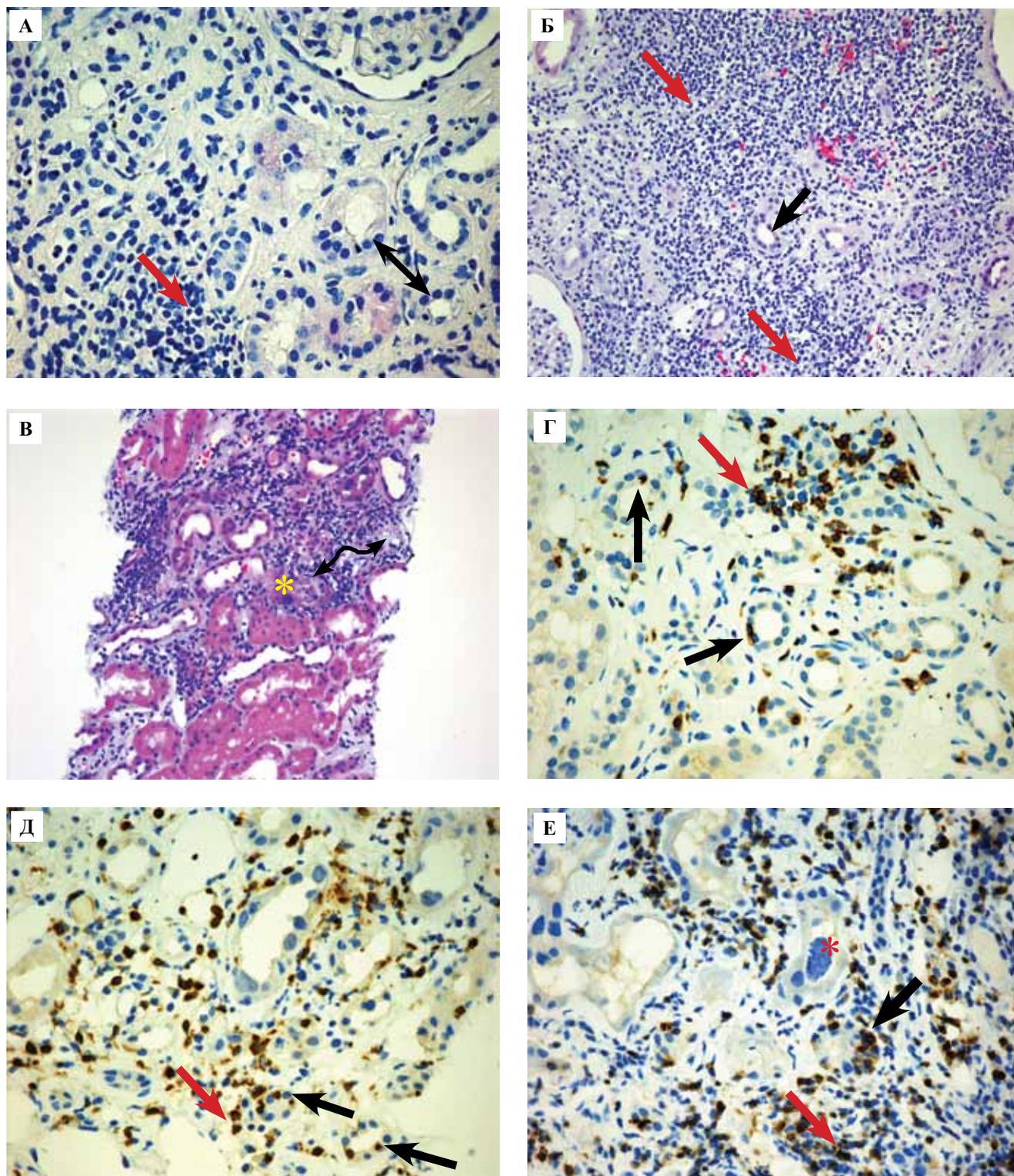
Мы приводим собственные наблюдения полиомавирусной нефропатии в сочетании с острым клеточным отторжением в динамике.

Пациентка 36 лет, страдавшая хронической почечной недостаточностью на фоне сахарного диабета 1-го типа, с 2013 года находилась на гемодиализе и в листе ожидания комбинированной трансплантации поджелудочно-дуоденального комплекса (ПДК) и почки. В связи с необходимостью проведения операции на глазах, в которой отказывали по причине терминальной ХПН, было принято решение о проведении родственной трансплантации почки с продолжением ожидания трансплантации ПДК. 16 января 2017 года в Российском научном центре хирургии имени академика Б.В. Петровского проведена аллотрансплантация почки от родственного донора. Через 10 месяцев, 27 ноября 2017 года, была выполнена аллотрансплантация поджелудочной железы от умершего донора. После операций пациентке

проводилась иммуносупрессивная терапия препаратами адваграф, микофенолат-ТЛ, мердол. Регулярно выполнялись исследования крови и мочи при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Проведены три плановые пункционные биопсии трансплантата почки, показавшие разную морфологическую картину. Биоптаты, окрашенные гематоксилином и эозином, по ван Гизону и с помощью Pas-реакции, исследовались при световой микроскопии и оценивались в соответствии с Banff-классификацией. Ретроспективно было проведено иммуногистохимическое (ИГХ) исследование.

В биоптате № 1 (через 7 месяцев после трансплантации почки) наблюдалась картина пограничных изменений. В пунктатах почки все клубочки были с тонкими капиллярными петлями без расщепления базальных мембран. Склероз стромы занимал суммарно 5% площади. Участки лимфоидной инфильтрации – 7% площади стромы, с небольшими очагами тубулит (до двух лимфоцитов на профиль канальца). Просветы перитубулярных капилляров (ПТК) свободны. В одной из артерий отмечалась гипертрофия мышечного слоя, имелись участки склероза интимы без существенного сужения просвета. Pas+ депозиты в артериолах отсутствовали (рис. 1 А).

В биоптате № 2 (через 10 месяцев после трансплантации почки и 2 месяца после трансплантации ПДК) выявлено хроническое активное клеточное отторжение, grade 1A (по BANFF 2017). В пунктатах почки из 13 клубочков один был гиалинизирован, капиллярные петли остальных были преимущественно тонкие, с участками сегментарного расщепления базальных мембран. Отмечался неравномерный склероз стромы с тубулярной атрофией 25–40% площади, лимфоцитарная инфильтрация до 30% площади. Тубулит от слабого до умеренного (в единичных канальцах до пяти лимфоцитов на профиль канальца). В просветах



*Рис. 1. Динамика изменений в трансплантате почки.*

- А – пограничные изменения: слабая интерстициальная инфильтрация (↗), тубулит (↘), ×400
- Б – острое клеточное отторжение: интерстициальная инфильтрация, тубулит, ×200
- В – полиомавирусная нефропатия: изменения ядер (\*), некроз канальцевого эпителия, ×200
- Г, Д, Е – тубулит и интерстициальная инфильтрация в биоптатах № 1, 2, 3 ИГХ исследование с антителами к антигенам Т-лимфоцитов (CD3), ×400

ПТК встречалось до 6 мононуклеаров. В единичных мелких артериях сужение просвета не обнаружено, одна крупная артерия с фиброзом интимы и сужением просвета до 50%. Pas+ депозиты в артериолах отсутствовали (рис. 1 Б).

В биоптате № 3 (через 1 год и 9 месяцев после трансплантации почки и 11 месяцев после трансплантации ПДК) отмечались наиболее выраженные изменения. Морфологическая картина больше всего соответствовала полиомавирусной нефропатии, однако неспецифический характер тубулит и интерстициальной инфильтрации не позволял исключить сочетание полиомавирусной инфекции с пограничными изменениями. В пунктатах почки из 13 клубочков пять гиалинизированы, капиллярные петли остальных клубочков с участками сегментарного склероза. Наблюдались неравномерно выраженный склероз стромы с тубулярной атрофией до 40–60% площади, лимфоплазматическая инфильтрация до 60% площади. Тубулит вне зон склероза редкий, на участках склероза и атрофии преимущественно слабый (в единичных канальцах до четырех лимфоцитов на профиль канальца). В эпителиоцитах многих канальцев присутствовали крупные ядра, в части из которых отмечались внутриядерные включения, что больше всего характерно для полиомавирусной нефропатии. Часть канальцев была расширена, содержала гомогенные эозинофильные массы. В просветах ПТК лейкоциты не выявлены. Просвет мелких артерий сужен не был, одна крупная артерия с фиброзом интимы и сужением просвета более 60%. Pas+ депозиты в артериолах не обнаружены (рис. 1 В).

Типичная морфологическая картина полиомавирусной нефропатии представляет собой внутриядерные включения вирусных частиц, поражение эпителия канальцев с сохранением базальных мембран, интерстициальное воспаление смешанного характера и склероз стромы, выраженность которых определяет степень тяжести нефропатии. В ряде случаев могут наблюдаться тубулит выраженностью до t1–t3 стадии по Vanff-классификации и интерстициальные гранулемоподобные структуры [1]. Отдельную сложность в диагностике полиомавирусной нефропатии, в особенности на ранних стадиях, представляет неравномерный характер поражения с чередованием зон склероза и инфильтрации с участками неизменной паренхимы [6] (рис. 2 А–Г).

После обнаружения развернутой картины полиомавирусной нефропатии в сочетании с пограничными изменениями было проведено ретроспективное исследование с изготовлением дополнительных срезов предшествовавших биопсий. В биоптате № 2 отмечены специфические морфологические признаки полиомавирусной нефропатии: обнаружены три канальца с частичным некрозом эпителия без повреждения базальных мембран, ядра сохранных клеток были крупными, содержали нечеткие внутриядерные включения, в некоторых эпителиоцитах встречались также гиперхромные

ядра. В эпителии поврежденных канальцев наряду с характерными для ВК-вируса изменениями присутствовал тубулит, максимально до пяти лимфоцитов на профиль канальца (рис. 2 А, Г).

Чтобы уточнить распространение тубулита и интерстициальной инфильтрации, проведено ИГХ исследование с использованием антител к Т-лимфоцитам (CD3) и В-лимфоцитам (CD20): для исключения гуморального компонента отторжения – с антителами к С4d компоненту комплемента, для исключения сочетанного течения распространенных оппортунистических инфекций – с антителами к антигенам вирусов (цитомегаловирус, аденовирус, вирусы герпеса типа 1 и 2).

В биоптате № 1 диагноз пограничных изменений был подтвержден наличием тубулита и лимфоцитарной инфильтрации в интерстиции почки: выявлены Т-лимфоциты (CD3<sup>++</sup>), В-лимфоциты (CD20<sup>+</sup>), антигены вирусов и С4d депозиты отсутствовали (рис. 1 Г).

В биоптате № 2 тубулит и интерстициальная инфильтрация более выражены по сравнению с биоптатом № 1: (CD3<sup>+++</sup>, CD20<sup>++</sup>). С4d депозиты в ПТК и капиллярных петлях клубочков не определялись. Сочетанная вирусная инфекция не выявлена (рис. 1 Д).

В биоптате № 3 экспрессия антигенов Т- (CD3<sup>+++</sup>) и В- (CD20<sup>++</sup>) лимфоцитов выражена в той же степени, что и в биоптате № 2, однако Т-лимфоциты располагались преимущественно в интерстиции, в то время как в биоптате № 2 явления тубулита преобладали над интерстициальной инфильтрацией. С4d депозиты отсутствовали. Отмечалась крайне слабая экспрессия антител к антигенам цитомегаловируса и аденовируса, что делало маловероятным влияние коинфекции на развитие интерстициального нефрита (рис. 1 Е).

## Обсуждение

Из-за сочетанного течения полиомавирусной нефропатии и клеточного отторжения трансплантата выявление ведущего звена патологического процесса имело принципиальное значение для дальнейшего лечения. Ставя на первое место диагноз полиомавирусной нефропатии, мы руководствовались сочетанием клинических и морфологических признаков.

Реактивация ВК-вируса чаще происходит в ранние сроки после трансплантации (от 3 месяцев до 1,5 года, средний срок выявления – 9,5 месяца) [2, 4–6], что и отмечалось в данном наблюдении: первые признаки поражения эпителия возникли через 10 месяцев после трансплантации почки, развитию вирусной инфекции могла способствовать предшествовавшая трансплантация ПДК. Ключевую роль сыграло выявление ВК-вируса методом ПЦР в крови и моче пациентки. В крови ДНК полиомавируса впервые определена через 10 месяцев после трансплантации почки, незадолго до трансплантации ПДК. Вирусная нагрузка несколько снизилась в течение 2 месяцев после трансплантации ПДК и продолжила рост, достигла больших значений ко времени биопсии № 3. В моче ДНК вируса была

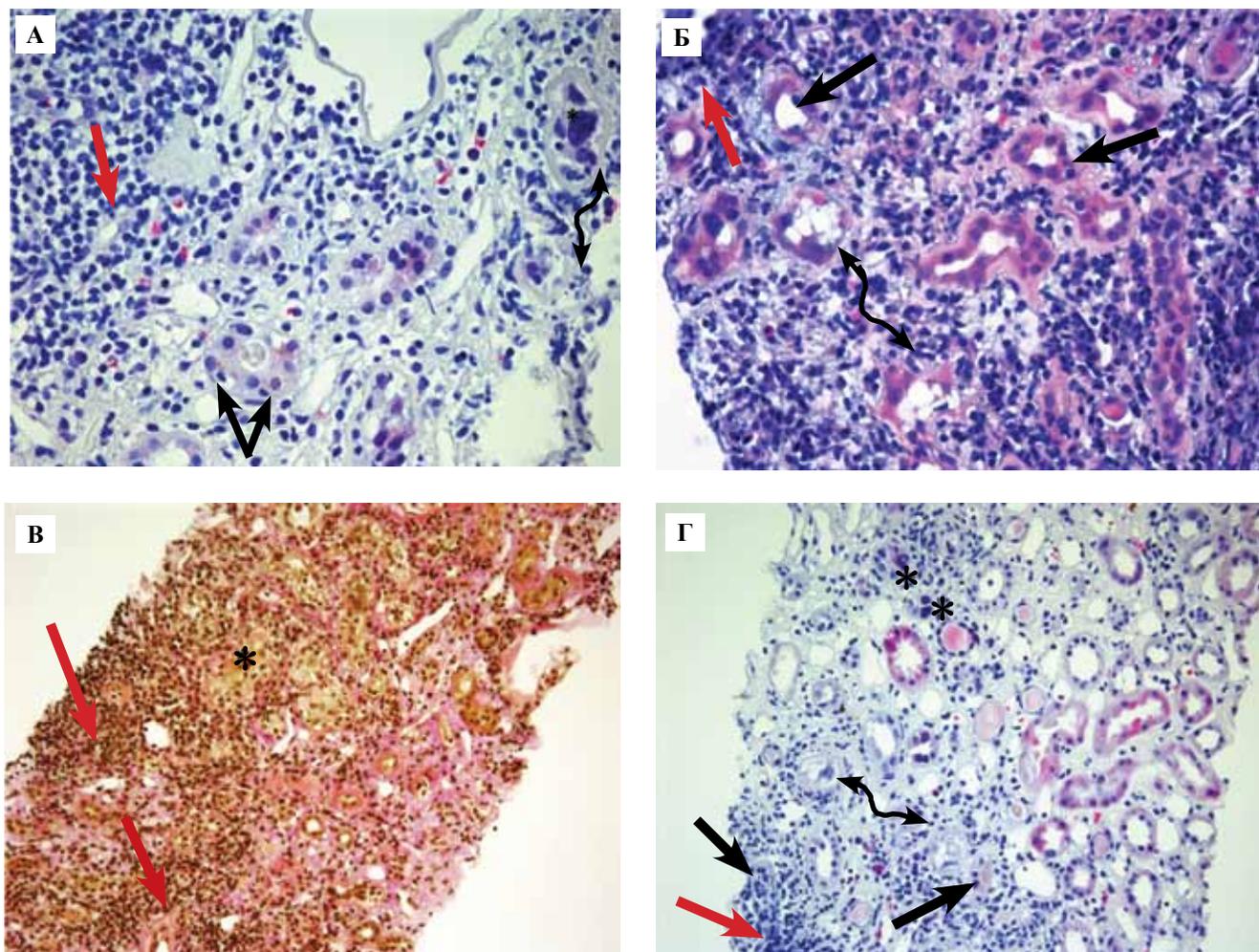


Рис. 2. Морфологическая картина полиомавирусной нефропатии.

А, Б – крупные ядра и внутриядерные включения вирусных частиц (\*), поражение эпителия канальцев с сохранением базальных мембран (↔), тубулит (↘). Окрашивание гематоксилином и эозином, ×400

В, Г – зоны интерстициального воспаления и склероза стромы неравномерного характера (↘), чередующиеся с участками неизменной паренхимы (\*)

В – окрашивание по ван Гизону, Г – гематоксилином и эозином; ×200

выявлена к моменту биопсии № 1, когда морфологические признаки полиомавирусной нефропатии отсутствовали – на 3 месяца раньше, чем в крови, что объясняется тропизмом ВК-вируса к уротелию и может свидетельствовать о прогрессировании поражения эпителия тубул с последующим выходом вируса в кровь при лизисе клеток [3, 5, 6]. Кроме ВК-вируса при ПЦР в крови пациентки периодически обнаруживался цитомегаловирус, не определявшийся, однако, при последнем анализе и выявленный в незначительном количестве в эпителии единичных канальцев при ИГХ исследовании биоптата № 3. Характерные морфологические изменения эпителия, свойственные цитомегаловирусу (внутриядерные включения по типу «совиных глаз»), не отмечались, но полностью исключить его вклад в развитие нефрита нельзя – латентно персистирующая, широко распространенная в популяции инфекция склонна к реактивации при иммуносупрессии, способна влиять на течение вос-

палительного процесса в трансплантате и может протекать сочетанно с ВК-вирусом [1].

Для лечения клеточного отторжения, диагностированного при биопсии № 2, применялась пульс-терапия иммуносупрессивными препаратами, что также является фактором риска полиомавирусной нефропатии [1, 4–7]: снижение Т-клеточного иммунитета могло способствовать активации ВК-вируса, при этом подавив клеточное отторжение, остаточные проявления которого наблюдались в биоптате № 3 в виде пограничных изменений с неравномерно выраженным тубулитом.

Дифференциальную диагностику полиомавирусной нефропатии усложняет то, что на ранней стадии заболевания интерстициальное воспаление может быть минимальным, а изменения ядер не носить специфического характера. Неравномерное поражение паренхимы затрудняет оценку распространенности процесса и выявление участков с диагностически значимыми изменениями. При полиомавирусной нефропатии

возможно наличие тубулитов до t1–t3 стадии по Banff-классификации, что особенно затрудняет дифференциальную диагностику с острым клеточным отторжением трансплантата [1, 2, 6], выявление которого основывается в первую очередь на обнаружении тубулитов в сочетании с интерстициальным воспалением. Клеточный состав инфильтрата также не позволяет различить воспаление, обусловленное отторжением и полиомавирусной нефропатией, особенно в случае сочетанного течения этих осложнений.

Подтверждение диагноза полиомавирусной нефропатии потребовало анализа не только морфологической картины, но и результатов иммуногистохимического исследования, клинических и лабораторных данных.

### Литература/References

1. Соловьева С.Е., Пальцева Е.М., Морозова М.М. Морфологическая диагностика вирусного поражения почечного трансплантата // Архив патологии. 2016. № 78 (3). С. 57–63. doi: 10.17116/patol201678357-63 [Solov'eva S.E., Pal'tseva E.M., Morozova M.M. Morfologicheskaya diagnostika virusnogo porazheniya pochechnogo transplantata // Arkhiv patologii. 2016. V. 78 (3). P. 57–63 (In Russ.)].
2. Суханов А.В. Полиомавирусная нефропатия трансплантата // Нефрология и диализ. 2001. № 3 (4). С. 411–414 [Sukhanov A.V. Poliomasvirusnaya nefropatiya transplantata // Nefrologiya i dializ. 2001. V. 3 (4). P. 411–414 (In Russ.)].
3. Чухловин А.Б., Эйсмонт Ю.А., Доброзравов В.А., Буш М.В., Эмануэль В.Л., Смирнов А.В. Частота и динамика полиомавирусной инфекции после трансплантации почек // Нефрология. 2014. № 18 (4). С. 51–56 [Chukhlovina A.B., Ehimont Yu.A., Dobronravov V.A., Bush M.V., Ehmauehl' V.L., Smirnov A.V. Chastota i dinamika poliomasvirusnoi infektsii posle transplantatsii pochek // Nefrologiya. 2014. V. 18 (4). P. 51–56 (In Russ.)].
4. Bonvoisin C., Weekers L., Xhignesse P., Grosch S. et al. Polyomavirus in Renal Transplantation: A Hot Problem // Transplantation. 2008;85:S42–S48. DOI: 10.1097/TP.0b013e318169c794.
5. Leboeuf C., Wilk S., Achermann R., Binet I. et al. BK Polyomavirus-Specific 9mer CD8 T Cell Responses Correlate With Clearance of BK Viremia in Kidney Transplant Recipients: First Report From the Swiss Transplant Cohort Study // Am. J. Transplant. 2017; 17(10):2591–600. doi: 10.1111/ajt.14282.
6. Menter T., Mayr M., Schaub S., Mihatsch M.J. et al. Pathology of Resolving Polyomavirus-Associated Nephropathy // Am. J. Transplant. 2013;13(6):1474–83. doi: 10.1111/ajt.12218.
7. Seifert M.E., Gunasekaran M., Horwedel T.A., Daloul R. et al. Polyomavirus Reactivation and Immune Responses to Kidney-Specific Self-Antigens in Transplantation // JASN. 2017;28(4):1314–25. doi: 10.1681/ASN.2016030285.
8. Solis M., Velay A., Porcher R., Domingo-Calap P. et al. Neutralizing Antibody-Mediated Response and Risk of BK Virus-Associated Nephropathy // JASN. 2018;29(1):326–34. doi: 10.1681/ASN.2017050532.

## POLYOMAVIRUS NEPHROPATHY IN COMBINATION WITH ACUTE REJECTION OF RENAL TRANSPLANT

S.E. Solovyeva, E.M. Paltseva, M.M. Morozova, A.K. Zokoev

Academician B.V. Petrovsky Russian Surgery Research Center, Moscow

Case report of polyomavirus nephropathy in combination with acute cellular rejection in the dynamics during follow-up period is presented. Not only morphological survey but also immunohistochemical research and analysis of clinical and laboratory data were required to confirm the diagnosis.

*Key words:* kidney transplantation, polyomavirus nephropathy, BK virus, rejection of kidney transplant

### Информация об авторах

Соловьева Светлана Евгеньевна – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения I Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В. Петровского.

Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Абрикосовский пер., д. 2. Телефон 8 916 419 6071. E-mail: 4085324@mail.ru

Пальцева Екатерина Михайловна – профессор РАН, доктор медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением II (иммуногистохимическим) РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Абрикосовский пер., д. 2. E-mail: paltseva-k@yandex.ru

Морозова Маргарита Мироновна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник патологоанатомического отделения I РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Абрикосовский пер., д. 2. Телефон 8 963 640 4977.

Зокоев Алан Кимович – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения трансплантации почки РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского

Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Абрикосовский пер., д. 2. E-mail: zokoev@yahoo.com

Материал поступил в редакцию 28 декабря 2018 года

# ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА PDX1 В КЛЕТКАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРЕНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ ЧЕЛОВЕКА

*А.Е. Прощина<sup>1</sup>, Ю.С. Кривова<sup>1</sup>, Д.А. Отлыга<sup>1</sup>, Н.В. Бесова<sup>1</sup>,  
Л.Е. Гуревич<sup>2</sup>, С.В. Савельев<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

<sup>2</sup> ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва

Одним из самых ранних маркеров формирующихся клеток поджелудочной железы (ПЖ) является транскрипционный фактор Pdx1 – pancreatic and duodenal homeobox 1. Целью нашей работы было изучение особенностей его распределения в ходе пренатального и раннего постнатального развития ПЖ человека. Работа выполнена на 14 аутопсиях ПЖ плодов (гестационный возраст 12–40 недель) и четырех детей (3 и 7 месяцев) при помощи метода множественного иммуногистохимического маркирования антителами к Pdx1 и к гормонам – инсулину и глюкагону.

В результате исследования установлено, что в раннефетальном периоде развития интенсивная ядерная реакция с Pdx1 выявлялась в подавляющем большинстве клеток сформированных и формирующихся первичных протоков ПЖ, а также в эндокринных клетках (как инсулин-, так и глюкагонсодержащих). В дальнейшем в пренатальном развитии реакция с антителами к Pdx1 была выявлена как в клетках экзо-, так и эндокринной части ПЖ, однако в позднем фетальном периоде наиболее выраженная реакция обнаружена в ядрах инсулинсодержащих В-клеток. Схожая картина наблюдалась в течение первых 7 месяцев жизни. Во всех исследованных образцах ПЖ мы обнаружили два вида клеток, содержащих инсулин: Pdx1-положительные В-клетки и популяцию В-клеток с Pdx1-иммунонегативными ядрами. При этом часть глюкагонсодержащих А-клеток имела Pdx1-позитивные ядра. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о пластичности ПЖ и, в том числе, возможной трансдифференцировке инсулин- и глюкагонсодержащих клеток.

*Ключевые слова:* поджелудочная железа, панкреатические островки, факторы транскрипции, Pdx1, пренатальное развитие человека

Поджелудочная железа (ПЖ) совмещает одновременно экзокринные и эндокринные функции, которые осуществляются при помощи специализированных клеток. Как экзокринные, так и эндокринные клетки ПЖ имеют энтеродермальное происхождение и дифференцируются в пренатальном развитии из эпителиальных клеток первичных протоков [4, 5, 10, 16]. Считается, что судьбу прогениторных клеток определяет специфическая программа экспрессии генов транскрипционных факторов [3]. Исследование факторов транскрипции позволяет оценить направление и особенности дифференцировки клеточных популяций. Так, в генетических исследованиях, выполненных на экспериментальных животных и клеточных культурах, были описаны разные транскрипционные факторы, регулирующие дифференцировку эндо-

кринных клеток ПЖ. Показано, что четыре основных вида эндокринных клеток ПЖ (В (бета)-, А (альфа)-, D (дельта)- и РР-клетки) дифференцируются из предшественников, экспрессирующих гены таких транскрипционных факторов как Pdx1, Ngn3, NeuroD1 и целый ряд других [6, 9, 12, 15, 17]. Одним из самых ранних маркеров формирующихся клеток ПЖ является Pdx1 – pancreatic and duodenal homeobox 1 (панкреато-дуоденальный гомеобокс 1). У мышей Pdx1 маркирует энтодерму закладки ПЖ еще до того, как она заметно утолщается (E8.5–E9.0), поэтому ранняя экспрессия Pdx1 является важным маркером для определения закладки ПЖ. Этот фактор необходим также для нормального развития тканей поджелудочной железы. У мышей отсутствие экспрессии Pdx1 в ходе пренатального развития приводит к аплазии ПЖ с нарушением роста

спинного дивертикула [9, 17]. Экспрессия тех же генов факторов транскрипции, что и у мышей и крыс, была обнаружена в образцах ПЖ человека методами иммуногистохимии (ИГХ), *in situ* гибридизации и методами молекулярной биологии (RT-qPCR, microarray). Для некоторых факторов транскрипции выявлена динамика уровня их экспрессии при развитии ПЖ [2, 7, 8, 11, 13], однако в большинстве последних исследований роль Pdx1 в дифференцировке эндокринных клеток оценивалась в основном у генетически мутантных животных, у которых определяли сверхэкспрессию или отсутствие экспрессии этого гена. Информации о локализации клеток, экспрессирующих *Pdx1* в развивающейся ПЖ человека, немного. В настоящее время в международных базах данных можно найти лишь пять статей (указаны выше). Исследования развития поджелудочной железы человека малочисленны вследствие труднодоступности материала, поэтому в распоряжении ученых есть лишь ограниченное количество образцов для каждого возрастного периода развития ПЖ у плодов. Более того, данные, полученные разными авторами, достаточно противоречивы. Целью нашей работы было уточнить распределение транскрипционного фактора Pdx1 в ходе пренатального и раннего постнатального развития ПЖ человека.

### Материалы и методы

Работа выполнена на 14 аутопсиях поджелудочной железы плодов (гестационный возраст 12–40 недель) и четырех детей (3 и 7 месяцев) при помощи метода множественного ИГХ маркирования антителами (АТ) к Pdx1 (клон EP-139, кроличьи моноклональные, Eritomics, США, разведение 1:100) и к гормонам ПЖ – глюкагону (мышинные моноклональные, Sigma, Израиль) и инсулину (мышинные моноклональные, Sigma, Израиль, при двойной окраске и кроличьи поликлональные, Santa Cruz, США, при тройной окраске).

Фиксация материала проводилась в 4% параформальдегиде на 0,1М фосфатном буфере, pH 7,5. Поджелудочную железу – целиком (плоды с 12-й по 20-ю неделю развития) и кусочком размерами 1×1×0,5 мм (от плодов более поздних сроков развития и новорожденных) обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и диоксане, заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 5 мкм или 10 мкм.

В ИГХ реакциях использовали по три среза для каждого случая: по одному срезу для проведения двойного ИГХ окрашивания с АТ к Pdx1 и инсулину или глюкагону и один срез для проведения тройного ИГХ одновременного маркирования АТ к Pdx1, инсулину и глюкагону.

Для визуализации реакций двойного окрашивания использовали набор Multi Vision Polymer Detection System Anti-rabbit HRP + Antimouse AP, LV blue & LV Red (Thermo Scientific, США). Негативным контролем служили реакции с заменой первых АТ раствором PBS (0,01М фосфатный буфер, pH 7,3–7,5). В реак-

циях тройного ИГХ маркирования на первом этапе Pdx1 визуализировали с помощью системы детекции Ultra Vision ONE DAB plus chromogen (Thermo Fisher Scientific Inc., США). На втором этапе срезы обрабатывали смесью мышинных моноклональных АТ к глюкагону (Sigma, 1:8000) и кроличьих поликлональных АТ к инсулину (Santa Cruz, 1:100). Реакции на инсулин и глюкагон также визуализировали с помощью набора Multi Vision Polymer Detection System Anti-rabbit HRP + Antimouse AP, LV blue & LV Red (Thermo Scientific, США). Для негативного контроля первые АТ заменяли раствором PBS. Кроме различия по цвету указанные антигены имеют также разную локализацию в клетке: глюкагон и инсулин – цитоплазматическую, а Pdx1 – преимущественно ядерную, что позволяло различать метки на срезах.

### Результаты

Во всех образцах ПЖ плодов человека с 12-й по 40-ю неделю развития была выявлена интенсивная реакция к Pdx1, которая сохранялась и после рождения.

В конце пренатального и начале раннего фетального периодов развития на сроке 12 недель интенсивная ядерная реакция к Pdx1 была выявлена в подавляющем большинстве клеток сформированных и формирующихся первичных протоков ПЖ (рис. 1 А), а также в формирующихся кластерах эндокринных клеток, содержащих как инсулин (рис. 1 Б), так и глюкагон. Интересно отметить, что уже на этих сроках в части инсулинсодержащих В-клеток реакция к Pdx1 отсутствовала. На 15–16-й неделях в уже сформировавшихся плащевых и биполярных островках также можно было выявить В-клетки как с Pdx1-позитивными, так и с Pdx1-негативными ядрами. Кроме того, позитивная реакция к Pdx1 наблюдалась в некоторых А-клетках (рис. 1 В, Г).

Схожее распределение Pdx1 наблюдается на протяжении всего раннефетального (13–20-я недели) и среднефетального (21–28-я недели) периодов развития (рис. 2 А, Б). Pdx1-негативные В-клетки наиболее ярко выражены на периферии островков плащевых типа (рис. 1 В). Необходимо также отметить, что в пренатальном, раннефетальном и большей части среднефетального периодов Pdx1-позитивная реакция наблюдалась в большинстве клеток как экзо-, так и эндокринной части ПЖ (рис. 1, рис. 2 В, Г), поэтому пик относительного числа Pdx1-позитивных клеток на площадь среза ПЖ приходится на ранне- и среднефетальный периоды, во время активного формирования ПЖ человека.

В дальнейшем в пренатальном развитии реакция с АТ к Pdx1 была выявлена в клетках и экзо-, и эндокринной частей ПЖ, однако в позднем фетальном периоде (с 29-й по 40-ю неделю развития) наиболее выраженная реакция наблюдалась в инсулинсодержащих клетках, а количество Pdx1-позитивных экзокринных и А-клеток постепенно уменьшалось (рис. 3 А, Б).

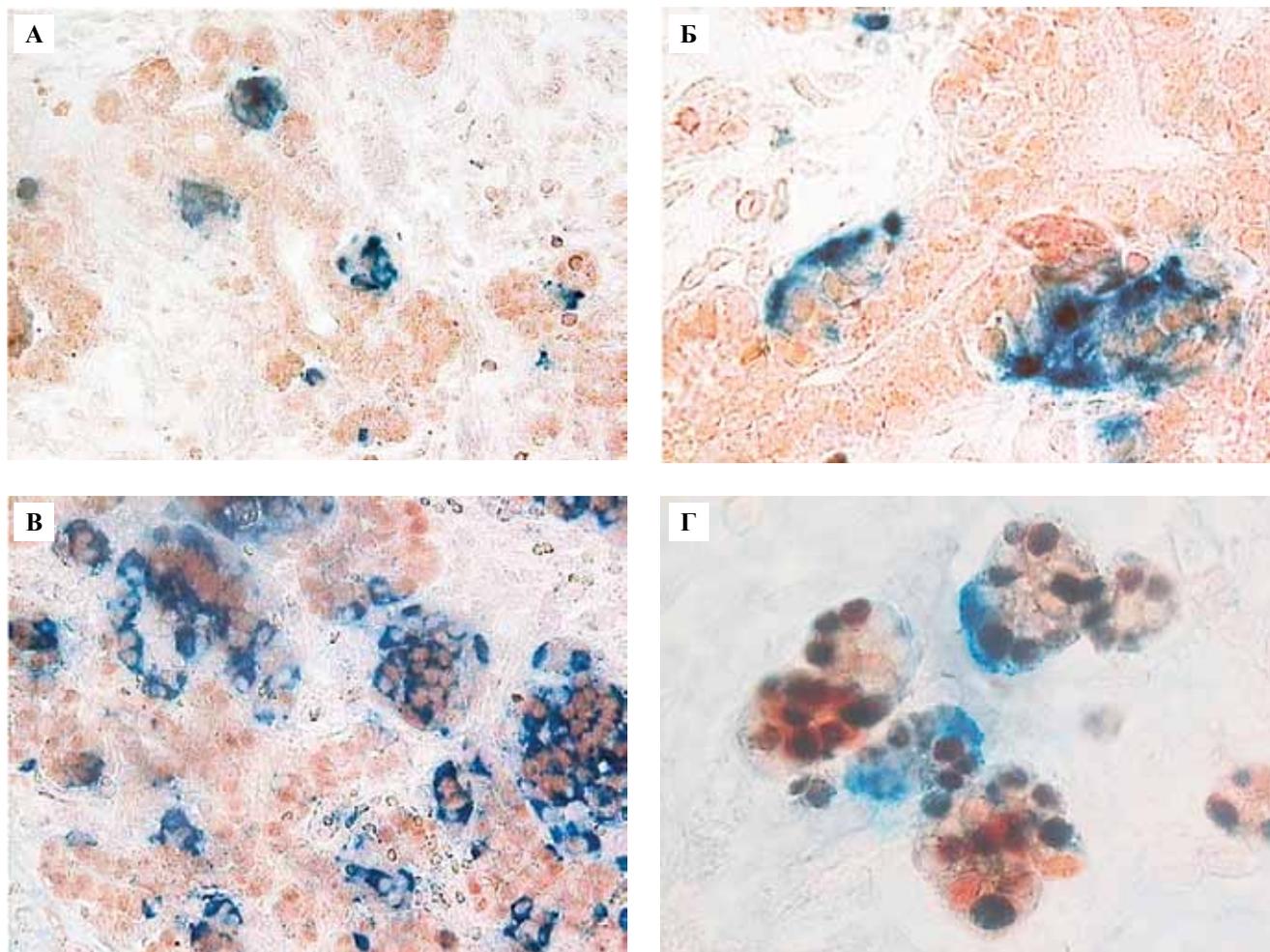


Рис. 1. Микрофотографии срезов поджелудочной железы человека в префетальном и раннефетальном периодах развития. Двойное ИГХ окрашивание (А, Б, В) с АТ к инсулину (синий) и Pdx1 (красный) и тройное (Г) – с АТ к инсулину (красный), глюкагону (синий) и Pdx1 (темно-коричневый). А – плод 12 недель развития, объектив  $\times 40$ ; Б – плод 12 недель развития, объектив  $\times 100$ ; В – плод 16 недель развития, объектив  $\times 40$ ; Г – плод 16 недель развития, объектив  $\times 100$

К рождению в экзокринной части ПЖ положительная реакция с АТ к Pdx1 сохранялась лишь в клетках протоков и centroacinarных клетках и исчезала в клетках ацинарной паренхимы. В эндокринной части железы наиболее выраженная реакция была обнаружена в В-клетках, но по-прежнему можно было выявить В-клетки с отрицательной реакцией к Pdx1. Схожая картина наблюдалась у детей в течение первых 7 месяцев жизни (рис. 3 В, Г).

### Обсуждение

В соответствии с данными литературы нами было показано, что экспрессию *Pdx1* в ПЖ можно обнаружить уже на ранних сроках пренатального развития человека. Иммунопозитивная реакция с АТ к Pdx1 обнаруживается в ядрах клеток ПЖ в самом начале процесса ее формирования, уже на 26-й день после оплодотворения [7, 13]. Намного более сильная реакция выявлена во всех клетках эпителия ПЖ на 41-й день

после оплодотворения (приблизительно 8 недель гестационного развития). В нашей работе на 12-й неделе развития иммунопозитивная реакция была обнаружена в большинстве клеток первичных протоков ПЖ и их ответвлений. По мере развития эндокринной части положительная реакция к Pdx1 появляется и в эндокринных клетках. По данным литературы, при помощи реакций двойного иммунофлуоресцентного маркирования уже на 14-й неделе после оплодотворения в клетках была выявлена колокализация Pdx1 с инсулином. В нашей работе колокализация Pdx1 с гормонами была обнаружена на более ранних сроках – уже на 12-й неделе развития (приблизительно на 10-й неделе после оплодотворения). В литературе приводятся противоречивые данные о локализации Pdx1 в клетках ПЖ. В нашей работе показано, что реакция к Pdx1 выражена гораздо сильнее в ядрах клеток, чем в цитоплазме. Также в нашей работе были подтверждены данные о колокализации Pdx1 с глюкагоном в части клеток. Согласно

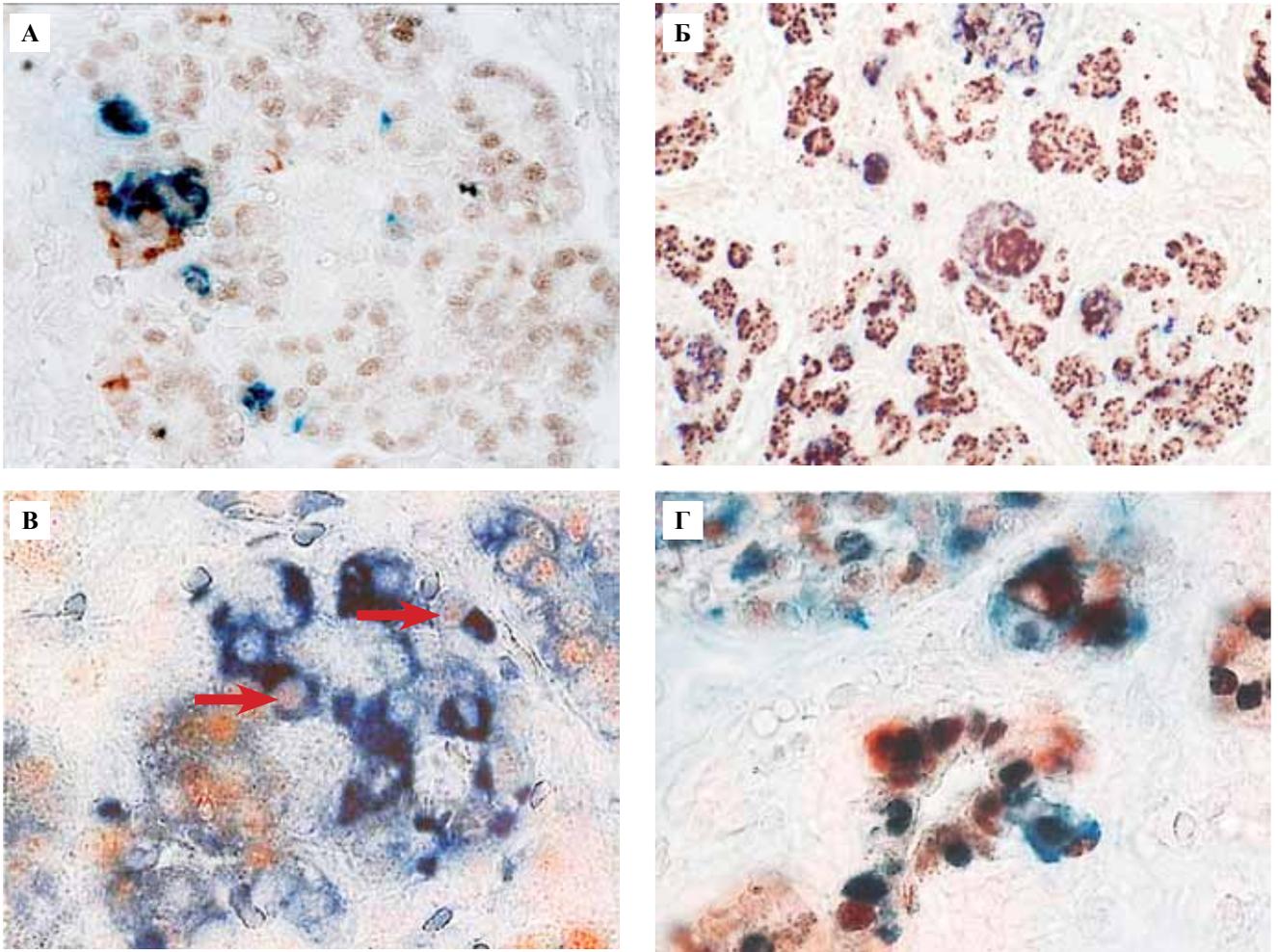


Рис. 2. Микрофотографии срезов поджелудочной железы человека в среднефетальном периоде развития. Двойное ИГХ окрашивание (В) с АТ к глюкагону (синий) и Pdx1 (красный) и тройное (А, Б, Г) – с АТ к инсулину (красный), глюкагону (синий) и Pdx1 (темно-коричневый).  
 А – плод 22 недель развития, объектив  $\times 40$ ; Б – плод 25 недель развития, объектив  $\times 40$ ;  
 В – плод 22 недель развития, объектив  $\times 100$  (стрелками отмечены Pdx1-позитивные А-клетки);  
 Г – плод 25 недель развития, объектив  $\times 100$

Jeon et al. [8], *Pdx1* экспрессируется в эпителиальных прогениторных клетках в течение периода с 7-й по 21-ю неделю гестации, а также в инсулинсодержащих клетках по мере их появления. В этой работе также была выявлена положительная реакция к Pdx1 в ряде глюкагонсодержащих клеток на ранних, но не на более поздних стадиях развития ПЖ. Реакция к Pdx1 в этих клетках была слабее, чем в клетках протоков ПЖ или в инсулинсодержащих клетках. В нашей работе было обнаружено большое количество Pdx1-позитивных А-клеток на всем протяжении ранне- и среднефетального периодов развития. При этом реакция с АТ к Pdx1 была в них ярко выражена.

В дополнение к этому нами подтверждено присутствие в ПЖ Pdx1-негативных В-клеток, которые были описаны в работах Anderson et al. [2] и Lyttle et al. [11]. Мы выявили эти клетки уже на 12-й неделе развития, что противоречит данным Anderson et al. [2], которые смогли их обнаружить лишь на 37-й неделе развития,

хотя к этой работе у нас возникают вопросы по специфичности использованных антител. Lyttle et al. [11] считают, что снижение числа Pdx1-негативных В-клеток в процессе развития свидетельствует о вовлеченности Pdx1 в процессы созревания этих клеток, однако, по нашему мнению, этот вопрос еще требует дополнительного изучения, так как при обобщении полученных результатов наши данные позволяют предположить возможность трансдифференцировки А-клеток в В-клетки и наоборот и свидетельствуют о высокой степени пластичности клеток ПЖ.

Наши результаты согласуются с данными Piper et al. [13] и демонстрируют, что на более поздних сроках развития иммунопозитивная реакция к Pdx1 в ПЖ сохраняется в части клеток протоков, но наиболее сильно выражена в клетках островков. В ПЖ взрослых людей экспрессия *Pdx1* преимущественно выявлена в В- и D-клетках [14]. Результаты нашего исследования подтверждают эти данные.

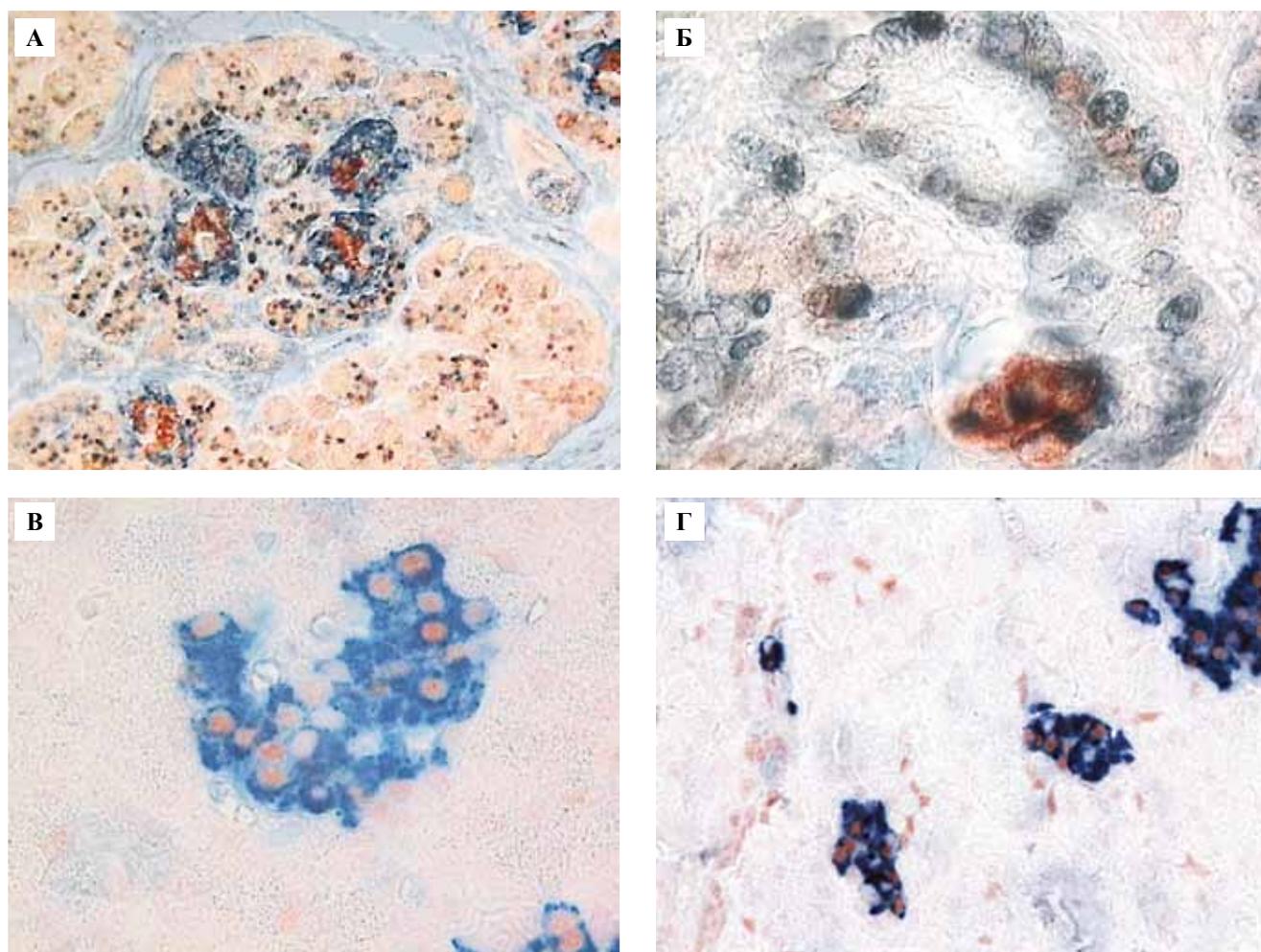


Рис. 3. Микрофотографии срезов поджелудочной железы человека в позднефетальном и раннем постнатальном периодах развития. Тройное (А, Б) – с АТ к инсулину (красный), глюкагону (синий) и Pdx1 (темно-коричневый) и двойное ИГХ окрашивание (В, Г) – с АТ к инсулину (синий) и Pdx1 (красный).  
А – плод 37 недель развития, объектив  $\times 40$ ; Б – плод 37 недель развития, объектив  $\times 100$ ;  
В – ребенок 3 месяца, объектив  $\times 100$ ; Г – ребенок 7 месяцев, объектив  $\times 40$

Нужно добавить, что на протяжении ранне- и среднефетального периодов нами была выявлена четкая реакция к Pdx1 и в ядрах ацинарных клеток ПЖ. К моменту рождения число таких клеток снижалось, а в раннем постнатальном периоде онтогенеза они становились единичными. Можно предположить, что отсутствие экспрессии Pdx1 в ацинарных клетках служит маркером функциональной зрелости экзокринной части ПЖ. Эти наши данные соответствуют гипотезе Jennings et al. [7], что Pdx1-позитивные клетки экзокринной части развивающейся ПЖ имеют прогениторный потенциал.

### Заключение

В нашей работе подтверждены данные о возможной экспрессии Pdx1 в раннем онтогенезе поджелудочной железы человека и уточнены сроки выявления этого маркера в разных типах ее клеток. Тем не менее исследования в этом направлении необходимо продолжить, поскольку накапливаются новые факты о роли Pdx1 в возникновении различных патологий поджелудочной

железы. В частности, было показано, что генетически обусловленная недостаточность Pdx1 приводит к развитию сахарного диабета молодого возраста (MODY4), аутомно-доминантной формы диабета, вызванного моногенными мутациями [17]. Предполагается, что Pdx1 может играть роль в разработке методов регенеративной медицины, направленной на лечение диабета, путем возобновления пула В-клеток поджелудочной железы. В то же время патологические процессы и нарушения в сигнальных и регуляторных механизмах дифференцировки эндокринных предшественников способствуют возникновению таких нарушений как гипогликемия и другие эндокринные патологии, обусловленные, например, незидиобластомом или формированием эндокринных опухолей. Есть гипотеза, что все новообразования в целом и так называемые нейроэндокринные в частности возникают из клеток, которые в процессе пролиферации повторяют путь эмбриональной дифференцировки. В последнее время очень перспективным маркером нейроэндокринных опухолей

поджелудочной железы считают фактор транскрипции Pdx1. По данным Л. Гуревич и И. Казанцевой [1], Pdx-1-позитивными было 86,3% исследованных опухолей, все (100%) соматостатиномы, 97,4% инсулином, 92,3% гастрином, 83,3% «пилом», 80% нефункционирующих нейроэндокринных опухолей, Pdx-1-негативными – все (100%) «кальцитониномы» и 57,1% нефункционирующих глюкагоном. В нашей работе показано, что часть А-клеток в пренатальном развитии может иметь положительную реакцию на Pdx-1, что объясняет положительную реакцию к этому фактору транскрипции в глюкагономах. Существование Pdx-1-негативных В-клеток является причиной отсутствия реакции к Pdx-1 в части инсулином.

Таким образом, результаты нашей работы могут помочь в поиске новых подходов к терапии заболеваний поджелудочной железы: с одной стороны, факторы транскрипции рассматриваются в качестве потенциального источника для регенерационной терапии сахарного диабета путем восстановления пула инсулин-содержащих В-клеток, а с другой – сверхэкспрессию генов факторов транскрипции можно использовать как потенциальную мишень для диагностики и терапии опухолей поджелудочной железы.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ18-015-00147.

## Литература/References

1. Гуревич Л.Е., Казанцева И.А. Современные подходы к морфологической диагностике нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы и прогнозированию их клинического течения на основе анализа собственной базы данных // Альманах клинической медицины. 2018. Т. 46, № 4. С. 298–313 [Gurevich L.E., Kazantseva I.A. Current approaches to the morphological diagnosis of pancreatic neuroendocrine tumors and prediction of their clinical course based on the analysis of our own database. // Almanac of clinical medicine. 2018. V. 46, No 4. P. 298–313 (In Russ.)].
2. Anderson S.J., Seeberger K.L., Ellis C.E., Eshpeter A. et al. Immunohistochemical Characterization of Insulin, Glucagon, PDX1, SOX17 and NGN3 Expression in Human Fetal Pancreatic Development // Journal of Stem Cell Research & Therapy. 2013;3(4):148.
3. Ben-Othman N., Courtney M., Vieira A., Pfeifer A. et al. From pancreatic islet formation to beta-cell regeneration // Diabetes Research and Clinical Practice. 2013;101(1):1–9.
4. Bouwens L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas // Microscopy Research and Technique. 1998;43(4):332–6.
5. Edlund H. Factors controlling pancreatic cell differentiation and function // Diabetologia. 2001;44(9):1071–9.
6. Gradwohl G., Deirich A., Lemeur M., Guillemot F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas // Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(4):1607–11.
7. Jennings R.E., Berry A.A., Kirkwood-Wilson R., Roberts N.A. et al. Development of the Human Pancreas from Foregut to Endocrine Commitment // Diabetes. 2013;62(10): 3514–22.
8. Jeon J., Correa-Medina M., Ricordi C., Edlund H. et al. Endocrine cell clustering during human pancreas development // J. Histochem. Cytochem. 2009;57(9):811–24.
9. Jonsson J., Carlsson L., Edlund T., Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice // Nature. 1994; 371(6498):606–9.
10. Jorgensen M.C., Ahnfelt-Ronne J., Hald J., Madsen O.D. et al. An illustrated review of early pancreas development in the mouse // Endocr Rev. 2007;28(6):685–705.
11. Lyttle B.M., Li J., Krishnamurthy M., Fellows F. et al. Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas // Diabetologia. 2008;51(7):1169–80.
12. Naya F.J., Huang H.P., Qui Y., Muton H. et al. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice // Genes Dev. 1997;11(18):2323–34.
13. Piper K., Brickwood S., Turnpenny L.W., Cameron I.T. et al. Beta cell differentiation during early human pancreas development // J Endocrinol. 2004;181:11–23.
14. Puri S., Hebrok M. Cellular Plasticity within the Pancreas—Lessons Learned from Development // Developmental Cell. 2010;18(3):342–56.
15. Schwitzgebel V.M., Scheel D.W., Connors J.R., Kalamaras J. et al. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas // Development. 2000;127:3533–42.
16. Slack J.M.W. Developmental biology of the pancreas // J. Development. 1995;121(6):16–21.
17. Stoffers D.A., Zinkin N.T., Stanojevic V., Clarke W.L. et al. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence // Nat Genet. 1997;51(1):106–10.

## DISTRIBUTION OF THE TRANSCRIPTION FACTOR PDX1 IN PANCREATIC CELLS DURING HUMAN PRENATAL DEVELOPMENT

A.E. Proshchina<sup>1</sup>, Yu.S. Krivova<sup>1</sup>, D.A. Otyga<sup>1</sup>, N.V. Besova<sup>1</sup>, L.E. Gurevich<sup>2</sup>, S.V. Saveliev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow

<sup>2</sup> Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow

Transcription factor Pdx1 - pancreatic and duodenal homeobox 1 is one of the earliest markers of the developing pancreatic cells. The aim of our study was to analyze its distribution during prenatal and early postnatal development of the human pancreas. The study was performed on 14 fetal pancreatic autopsies (gestational

age 12-40 weeks) and 4 child pancreatic samples (3 and 7 months) using multiple immunohistochemical labeling with antibodies to Pdx1 and pancreatic hormones, insulin and glucagon.

During the early fetal period, intensive nuclear reaction to Pdx1 was detected in the majority of cells of primary pancreatic ducts as well as in endocrine cells (both insulin- and glucagon-containing ones). In the further prenatal development, the positive immunohistochemical reaction with antibody to Pdx1 was also found in the cells of both exocrine and endocrine parts of the pancreas. However, during the late fetal period, the most pronounced reaction was detected in the nuclei of insulin-containing B-cells. The similar pattern of distribution was observed during the first 7 months of postnatal life. In all pancreatic samples, we found two types of insulin-containing cells, namely Pdx1-positive B-cells and a population of B-cells with Pdx1-immunonegative nuclei. In addition, we have detected some glucagon-containing A-cells with Pdx1-positive nuclei. Thus, our results indicate a plasticity of the human pancreas during prenatal development including possible transdifferentiation of insulin - and glucagon-containing cells.

*Key words:* pancreas, pancreatic islets, transcription factors, Pdx1, human prenatal development

### **Информация об авторах**

Прощина Александра Евгеньевна – доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 916 494 1734. E-mail: proschina@mtu-net.ru

Кривова Юлия Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Отлыга Дмитрий Александрович – научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Бесова Надежда Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Гуревич Лариса Евсеевна – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2–13.

Савельев Сергей Вячеславович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

*Материал поступил в редакцию 14 января 2019 года*

# ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ, ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И МОДЕЛИРОВАНИИ ПАРКИНСОНИЗМА

*Д.Н. Воронков, В.Н. Сальков, О.В. Сальникова, В.Б. Соболев, Р.М. Худоерков*

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва

Цель исследования – иммуногистохимически охарактеризовать распределение альфа-синуклеина в структурах нервной системы интактных животных, в эксперименте и при болезни Паркинсона (БП). У интактных крыс Вистар  $\alpha$ -Syn локализовался в синаптических окончаниях разных медиаторных систем, а в телах нейронов – преимущественно в области ядер ствола и в среднем мозге, которые наиболее подвержены нейродегенерации при БП. Обнаружена различная локализация  $\alpha$ -Syn и его фосфорилированной по серину-129 формы в зависимости от клона используемых антител. На ротеноновой модели паркинсонизма, а также на аутопсийном и биопсийном материале, взятом у лиц с БП, показано накопление фосфорилированного  $\alpha$ -Syn по мере развития дегенеративного процесса. Охарактеризовано несколько типов агрегатов  $\alpha$ -Syn, отражающих этапы созревания и формирования многослойной структуры телец Леви при болезни Паркинсона.

*Ключевые слова:* альфа-синуклеин, болезнь Паркинсона, иммуногистохимия, тельца Леви

В настоящее время накоплено множество фактов, подтверждающих участие альфа-синуклеина ( $\alpha$ -Syn) в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в первую очередь болезни Паркинсона (БП) [3, 9]. Предполагается, что прионоподобное распространение патологических форм  $\alpha$ -Syn в нервной системе по межнейрональным связям приводит к последовательному повреждению и дегенерации вначале структур периферической, а затем и центральной нервной системы [7]. Однако причины повышенной уязвимости нейронов черной субстанции (ЧС) остаются невыясненными.

Альфа-синуклеин, по-видимому, связан с синаптической передачей, так как он взаимодействует с синаптическими везикулами, участвует в аксональном транспорте и регуляции функциональной активности митохондрий [9, 34]. В нервной ткани содержится до 1%  $\alpha$ -Syn в цитозольном белке, вырабатывается он преимущественно в нейронах и, вероятно, в олигодендроглиоцитах на разных стадиях дифференцировки, а кроме того  $\alpha$ -Syn обнаруживается в гемоцитобластах и форменных элементах крови [12, 22, 35]. В клетке  $\alpha$ -Syn находится в динамическом равновесии между свободной и мембраносвязанной формами. При патологии конформационные изменения  $\alpha$ -Syn приводят

к образованию различных олигомерных форм белка, которые отличаются размерами, формой и проявлением токсических свойств [13]. Олигомеры способны образовывать фибриллярные структуры, которые при агрегации в нейронах формируют нерастворимые белковые включения – тельца Леви. Тем не менее остается неясным, является ли формирование нерастворимых внутриклеточных агрегатов  $\alpha$ -Syn побочной реакцией при нейродегенеративном процессе, проявлением нейропротекции или повреждающим клетку фактором [22]. Морфогенез телец Леви не выяснен полностью, а локализация  $\alpha$ -Syn в нервной системе в условиях нормы требует уточнения, поскольку отмечаются расхождения в результатах, получаемых на разных видах животных и с разными клонами антител [14, 19, 38]. Для практических целей перспективны исследования, направленные на выявление  $\alpha$ -Syn в качестве биомаркера, что необходимо для совершенствования патоморфологической диагностики БП, в том числе прижизненной, на ранних стадиях заболевания.

Цель исследования – охарактеризовать распределение альфа-синуклеина в структурах нервной системы в норме, его патологическую агрегацию при моделировании паркинсонизма и при болезни Паркинсона.

## Материалы и методы

Локализацию  $\alpha$ -Syn исследовали у интактных крыс Вистар в головном, спинном мозге и периферической нервной системе. Кроме того, исследовали локализацию  $\alpha$ -Syn в стриатуме крыс при повреждении дофаминовых нейронов черной субстанции, через 4 недели после одностороннего стереотаксического введения 6 мкг 6-гидроксидофамина гидрохлорида (6-OHDA, Sigma-Aldrich, Германия) в 3 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты. Локализацию  $\alpha$ -Syn в обонятельных луковицах крыс оценивали также на модели с интраназальным введением ротенона, который растворяли в диметилсульфоксиде, из расчета 2,5 мг/кг, и вводили его животным 2 недели, с интервалом через день. На аутопсийном мозге лиц с БП (материал получали из лаборатории патологической анатомии Научного центра неврологии и исследовали его с разрешения локального этического комитета) выявляли тельца и нейриты Леви в ЧС. Биопсийные образцы слюнных желез брали у пациентов с БП и у неврологически здоровых людей, оценивая тельца и нейриты Леви в периферических нервных волокнах (биоптаты брали сотрудники МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского у пациентов, дававших письменное согласие на проведение биопсии). Биопсийные образцы фиксировали в растворе формалина и готовили замороженные либо парафиновые срезы, которые для демаскировки антигенов обрабатывали или муравьиной кислотой, или цитратным буфером (рН=6,0) в микроволновой печи. Общий  $\alpha$ -Syn выявляли с помощью поликлональных антитела кролика к С-концевому фрагменту белка (Sigma-Aldrich, S3062, Германия). Фосфорилированный по остатку серина 129  $\alpha$ -Syn ( $\alpha$ -Syn-p129) выявляли моноклональными антителами разных производителей: Biolegend (клон PSyn/81A, США), Wako (PSyn #64, Япония), Abcam (EP1536Y, США). Кроме того, иммуногистохимически выявляли астроцитарную глию (GFAP), синаптические структуры (синаптофизин), белки нейрофиламентов и лектин IB4 для исследования микроглии и периферических нейронов. Реакцию связывания антител определяли при помощи меченных флуорохромов CF448 или CF555, соответствующих вторичных антител (Sigma-Aldrich, Германия) или пероксидазным методом (набор Sigma-Aldrich EXTRA3KIT, Германия, набор ThermoFisher UltraVison, США). Препараты исследовали и документировали под микроскопом Nikon Eclipse Ni-u (Япония), оснащенный цифровой фотокамерой Nikon Ds-Qi1 и программами анализа изображений.

## Результаты и обсуждение

### *Распределение $\alpha$ -Syn в головном и спинном мозге*

Имуногистохимически  $\alpha$ -Syn определяли во всех отделах мозга интактных животных, но больше всего его находили в слое IV коры головного мозга, обонятельных бугорках и пириформной коре (слой I), гиппокампе (мшистые волокна зубчатой фасции), обоня-

тельных луковицах (гломерулярный слой), переднем обонятельном ядре, амигдаларном комплексе, дорсальных ядрах таламуса, ретикулярной части черной субстанции (рис. 1 А) и в гранулярном и молекулярном слоях коры мозжечка. В стволовом отделе мозга  $\alpha$ -Syn выявляли в парабрахальном ядре, голубом пятне, дорсальном комплексе ядер вагуса. Пресинаптическая локализация  $\alpha$ -Syn подтверждалась совместным окрашиванием с синаптофизин (рис. 1 Б).

В результате обнаружили, что  $\alpha$ -Syn лишь отчасти связан с дофаминергическими структурами и его высокое содержание наблюдается как в глутаматергических, так и ГАМК-ергических окончаниях, что совпадает с данными других авторов [35]. Указанное распределение  $\alpha$ -Syn в нейрохимически разных структурах мозга было установлено нами при одностороннем разрушении дофаминовых нейронов ЧС мозга крыс нейротоксином 6-гидроксидофамином, который не снижал значительно интенсивность иммуноокрашивания на  $\alpha$ -Syn в стриатуме [2].

У интактных животных наряду с пресинаптической локализацией  $\alpha$ -Syn выявляли и в соме нейронов, в основном в дофаминергических или норадренергических структурах, которые соответствуют предполагаемым путям распространения патологических форм  $\alpha$ -Syn при БП [7]: дорсальное двигательное ядро блуждающего нерва, голубое пятно, компактная часть черной субстанции, вентральное поле покрывки, а также обонятельные сенсорные нейроны, перигломерулярные нейроны обонятельных луковиц и ядер гипоталамуса, что сопоставимо с результатами других авторов [14, 19, 23]. Вместе с тем в ядрах нейронов  $\alpha$ -Syn мы не находили. Следует отметить локализацию  $\alpha$ -Syn в сенсорных структурах, что может иметь значение в патогенезе недвигательных симптомов, наблюдаемых при БП, – помимо обонятельного эпителия он обнаруживался в ганглиозных клетках сетчатки и на синапсах внешних реснитчатых клеток внутреннего уха, что показали и другие исследователи [5, 33]. Кроме того, мы обнаружили цитоплазматическое окрашивание чувствительных нейронов спинального ганглия и их окончаний в области дорсальных рогов спинного мозга. На срезах спинного мозга при совместном выявлении  $\alpha$ -Syn и непертидергических нейронов (окрашивание лектином IB4) области их локализации перекрывались незначительно. Согласно нашим результатам,  $\alpha$ -Syn в спинальном ганглии в основном локализовался в клетках, которые не окрашиваются лектином IB4 и в литературе [8] характеризуются как пептидергические ноцицептивные нейроны, дающие проекции во внешнюю часть пластины II и первую пластину Рекседа в дорсальных рогах спинного мозга.

Очевидно, обнаруживаемая у интактных животных высокая экспрессия  $\alpha$ -Syn в структурах мозга, входящих в предполагаемый путь распространения патологических форм белка [7], повышает их уязвимость при патологическом процессе и вероятность формирования агрегатов  $\alpha$ -Syn.

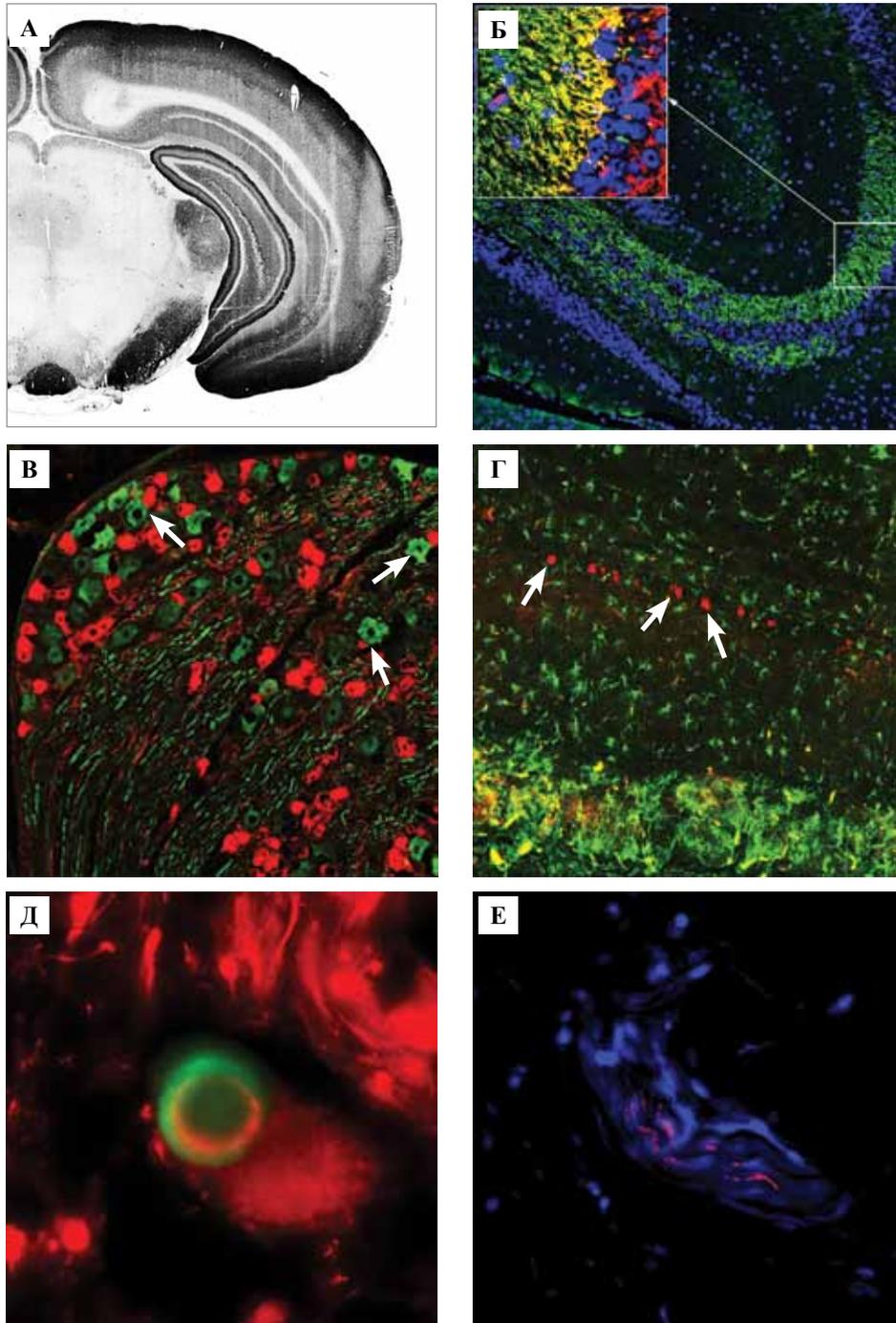


Рис. 1. Выявление альфа-синуклеина (a-Syn) в норме, при моделируемом паркинсонизме и болезни Паркинсона.

А – распределение a-Syn в структурах мозга крысы, на уровне черной субстанции.

Фронтальный срез, правое полушарие. Иммунопероксидазная реакция.  $\times 0,75$

Б – пресинаптическая локализация a-Syn в гиппокампе крысы ( $\times 4$ ). На вставке представлен фрагмент зубчатой фасции.

Обозначения: локализация синаптофизина (SP) – красным, локализация a-Syn – зеленым, ядра клеток (окрашены DAPI) – синим

В – цитоплазматическая локализация фосфорилированного a-Syn в нейронах спинального ганглия (антитела pSyn81/A)

интактной крысы, указано стрелками. Обозначения: красным – лектин IB4, зеленым – a-Syn.  $\times 10$

Г – накопление фосфорилированного a-Syn (указано стрелками) в нейронах митрального слоя обонятельных лукович мозга крысы после интраназального введения ротенона.

Обозначения: красным – фосфорилированный a-Syn, зеленым – GFAP, астроглия.  $\times 4$

Д – черная субстанция мозга человека, концентрическая структура телец Леви.

Обозначения: красным – нейрофиламенты, зеленым – альфа-синуклеин.  $\times 100$

Е – выявление нервного волокна, содержащего фосфорилированный a-Syn, в биопсийном материале слюнной железы пациента с болезнью Паркинсона. Обозначения: красным – фосфорилированный a-Syn, синим – окрашивание DAPI.  $\times 40$

### *Локализация фосфорилированной формы $\alpha$ -Syn в норме*

Фосфорилированный по серину  $\alpha$ -Syn ( $\alpha$ -Syn-p129) обнаруживается в тельцах Леви и служит маркером патологической агрегации белка [20, 26]. При этом исследования распределения и локализации  $\alpha$ -Syn-p129 в периферической нервной системе (ПНС) у пациентов с БП показывают противоречивые результаты [10, 18, 29], демонстрируя различную чувствительность и специфичность, что связано как с особенностями постановки иммуногистохимической реакции, так и с различиями клонов антител, использованных в этих работах. Кроме того, фосфорилирование  $\alpha$ -Syn, по-видимому, важно для взаимодействия белка с мембранами [6, 24] и происходит также и в норме.

В связи с тем, что локализация  $\alpha$ -Syn-p129 в норме требует уточнения, а используемые антитела могут влиять на результаты диагностического исследования, мы провели анализ выявления  $\alpha$ -Syn-p129 с помощью моноклональных антител, относящихся к разным клонам, в спинальном ганглии и спинном мозге крыс. Обнаружилось, что разные антитела к  $\alpha$ -Syn-p129 демонстрировали сходную, но не однотипную реакцию связывания. Локализацию, наиболее соответствующую реакции на общий  $\alpha$ -Syn, наблюдали с антителами EP1536Y. Тем не менее у части нейронов спинального ганглия антитела к EP1536Y и P-syn#64 связывались с клеточными ядрами. Антитела P-syn/81A выявляли  $\alpha$ -Syn-p129 в соме нейронов спинального ганглия (рис. 1 В). Упомянутые антитела избирательно связывались с популяцией IB4-негативных нейронов, а кроме того было отмечено их связывание с периферическими GFAP-негативными глиальными клетками в спинальном ганглии. Вслед за другими авторами [25, 34, 38] мы можем предположить, что различия в локализации белка с антителами разных клонов могут быть связаны с изменением конформации  $\alpha$ -Syn, что приводит к недоступности для антител определенных эпитопов белка и отражает внутриклеточную динамику фосфорилированного и нефосфорилированного  $\alpha$ -Syn, а также его взаимодействия с другими белками.

В то же время неоднозначность результатов, полученных при окрашивании разными антителами к фосфорилированному  $\alpha$ -Syn, может указывать на их неспецифическое связывание, в том числе с другими белками этого семейства, а локализация фосфорилированного  $\alpha$ -Syn в структурах ПНС в норме и при патологии требует дальнейшего анализа, особенно в свете обсуждаемой перспективы использования фосфорилированного  $\alpha$ -Syn как биомаркера БП [4, 21, 39].

### *Патологическая агрегация $\alpha$ -Syn в эксперименте и при болезни Паркинсона*

Для оценки возможности выявления и особенностей агрегации  $\alpha$ -Syn при моделировании БП нами было проведено интраназальное введение ротенона крысам. Ротенон – ингибитор митохондриального дыхания,

используемый как пестицид, вызывает окислительный стресс, нарушает синтез и сборку белков цитоскелета, репликацию ДНК и везикулярный транспорт медиаторов [32, 37]. В головном мозге он оказывает наибольшее воздействие на дофаминовые нейроны. Это, вероятно, способствует образованию токсичных продуктов неферментативного окисления дофамина, которые могут приводить к дисфункции убиквитин-протеасомной системы и патологической агрегации  $\alpha$ -Syn [32], что, впрочем, подтверждают работы о накоплении  $\alpha$ -Syn нейронами черной субстанции под действием ротенона [40]. Предполагается, что одним из основных патогенетических механизмов БП является распространение патологических форм  $\alpha$ -Syn в передний мозг через периферический отдел обонятельного анализатора, а распространение патологических форм в ствол мозга через блуждающий нерв происходит из кишечника [36]. В то же время работы об изменениях в обонятельных структурах под влиянием ротенона противоречивы [27, 30]. В нашем исследовании у животных, получавших ротенон интраназально, по сравнению с контролем статистически значимо снижалась плотность перигломерулярных дофаминовых нейронов (на 45%) и увеличивалась плотность микроглии (на 16%). При выявлении  $\alpha$ -Syn-p129 в группе контроля обонятельные гломерулы окрашивались слабо, а под действием ротенона окрашивание увеличивалось. При этом локализация фосфорилированного синуклеина не только соответствовала распределению общего  $\alpha$ -Syn, но и обнаруживалась в телах клеток митрального слоя обонятельных луковиц (рис. 1 Г), а число клеток митрального слоя не менялось. Важно, что общий  $\alpha$ -Syn не находили в соме митральных нейронов контрольной группы, что свидетельствует об изменении его локализации в клетке при фосфорилировании. Выявленное нами накопление фосфорилированной формы белка в митральных клетках согласуется с результатами, полученными на мышах с мутантным геном  $\alpha$ -Syn [36], и с работой, выполненной методами электрофизиологии [30], о дисфункции митральных клеток при введении ротенона. Обнаружены накопления фосфорилированного  $\alpha$ -Syn в митральном слое подтверждает предположение об участии связей обонятельного анализатора в распространении патологических форм белка, так как аксоны митральных нейронов проецируются в пириформную кору и переднее обонятельное ядро, а эти структуры, в свою очередь, имеют многочисленные связи со структурами переднего мозга, в которых показано накопление телец Леви при БП.

Тельца Леви в эксперименте мы не наблюдали, что может объясняться длительностью их формирования у человека, поэтому для уточнения особенностей их морфологии был использован аутопсийный материал мозга человека. При исследовании локализации общего и фосфорилированного  $\alpha$ -Syn в ЧС аутопсийного мозга людей, не имевших неврологической патологии в анамнезе (контрольная группа), тельца Леви находи-

ли исключительно у лиц старческого возраста, старше 75 лет (в трех из десяти исследованных случаев) [1]. В аутопсийном мозге людей с БП стадия 3 по шкале Хен–Яра – женщина 47 лет (смешанная форма), мужчины 59 лет (дрожательно-ригидная форма) и 70 лет (смешанная форма) – тельца Леви находили в ЧС во всех случаях [1], причем плотность их распределения, количество в нейронах и их размеры были больше, чем в контроле. Кроме того, в телах и отростках нейронов обнаруживали округлые  $\alpha$ -Syn-позитивные включения (или агрегаты) и вытянутые, деформированные нейриты Леви, которые давали иммунопозитивное окрашивание со всеми использованными в работе антителами к  $\alpha$ -Syn-p129. Площадь одного  $\alpha$ -Syn-позитивного включения составляла в среднем  $56,7 \pm 2,8$  мкм<sup>2</sup>. В зависимости от размеров, формы и локализации агрегатов их разделили с помощью кластерного анализа на три типа [1]: тип 1 – мелкие образования, тип 2 – крупные и округлые образования, определяемые как в телах, так и в отростках нейронов, сюда же отнесли и вытянутые нейриты Леви, и тип 3 – переходные формы, локализовавшиеся в отростках нейронов. В агрегатах типа 1 и типа 2 (46% случаев из 422 исследованных включений) наружный слой имел вид кольца и интенсивно окрашивался на  $\alpha$ -Syn, а центральная их часть на  $\alpha$ -Syn окрашивалась слабо (рис. 1 Д). В агрегатах типа 3 кольцевидное окрашивание на  $\alpha$ -Syn выявили лишь в 17,5% случаев, а большая их часть окрашивалась равномерно. По-видимому, уплотнение диффузных белковых агрегатов («бледных телец») со временем приводит к формированию телец Леви со слоистой структурой [16, 17]. Снижение окрашивания на  $\alpha$ -Syn в центральной части свидетельствует о «созревании» белковых включений и может быть связано с убиквитинилированием и другими модификациями синуклеина или малой доступностью центральной части телец Леви для антител.

Кроме того, в тельцах Леви обнаруживали и нейрофиламенты, причем их концентрическую локализацию, сходную с локализацией  $\alpha$ -Syn, выявили лишь в одной трети агрегатов. Сравнение интенсивности иммунофлуоресцентного окрашивания на  $\alpha$ -Syn, белок нейрофиламентов и синаптофизин показало, что пик интенсивности окрашивания на нейрофиламенты смещен к центру телец Леви, а локализация синаптофизина и  $\alpha$ -Syn совпадает.

Наличие внешнего слоя (гало) и ядра в тельцах Леви определяется при окрашивании эозином в световом микроскопе и электронномикроскопически [31]. По данным литературы, в тельцах Леви иммуногистохимически обнаруживают не менее 70 разных белков [31], в том числе убиквитин, синаптофизин и белки нейрофиламентов. Продемонстрированная слоистая организация  $\alpha$ -Syn-позитивных включений при БП подтверждается исследованиями других авторов [16]. В целом агрегация белков цитоскелета и синаптофизина при БП, очевидно, связана с наруше-

ниями структуры аксонов и везикулярного транспорта в нейронах ЧС [28].

#### *Возможности прижизненной патоморфологической диагностики БП*

Выявление ранних симптомов БП, основанное на оценке накопления  $\alpha$ -Syn в вегетативных нервных волокнах, представляется весьма перспективным для клинической диагностики, поскольку вегетативные нарушения часто предшествуют появлению двигательных расстройств при БП [3, 11]. Раннее выявление  $\alpha$ -Syn у пациентов с экстрапирамидной патологией важно для дифференциальной диагностики БП с другими нейродегенеративными заболеваниями и может принципиально влиять на тактику лечения и прогноз болезни [3]. Работы по прижизненному обнаружению агрегатов  $\alpha$ -Syn в структурах периферической нервной системы и оценке его диагностического значения ведутся разными группами исследователей на биопсийных образцах толстой кишки, кожи, слюнных желез [4, 21, 39]. В настоящем исследовании в связи с малой инвазивностью проводимой операции использовали биопсийный материал подъязычной слюнной железы, который брали у пациентов с БП и у лиц контрольной группы (неврологически здоровых). Обнаружено, что нефосфорилированный  $\alpha$ -Syn локализовался в крупных нервно-сосудистых пучках слюнной железы (рис. 1 Е) и в отдельных волокнах вокруг ацинусов железы. Сходную локализацию имел и фосфорилированный  $\alpha$ -Syn. У пациентов с БП в пяти случаях из восьми скопления  $\alpha$ -Syn-p129 выявляли в нервных волокнах, содержащих тирозингидроксилазу. У двух пациентов в ранний период заболевания (стадия 1 по Хен–Яру)  $\alpha$ -Syn-p129 не определялся. При этом у одного из неврологически здоровых пациентов  $\alpha$ -Syn-p129 выявляли в двух срезах из 25 (с минимальной частотой). Для уточнения значения выявления  $\alpha$ -Syn у неврологически здоровых лиц требуются дальнейшие исследования. Так, усиление фосфорилирования  $\alpha$ -Syn при старении может быть причиной ложноположительных результатов [15], что согласуется с нашими данными, полученными при исследовании мозга людей старческого возраста. Исход исследования может зависеть и от специфичности используемых антител. В целом полученные данные демонстрируют накопление фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина в периферических нервных окончаниях у пациентов с БП и свидетельствуют о возможности прижизненной оценки патологической агрегации  $\alpha$ -Syn на биопсийном материале слюнных желез.

#### **Заключение**

Обобщая представленные результаты, можно отметить, что  $\alpha$ -синуклеин широко распространен в нервной системе, а его локализация не ограничивается дофаминергическими структурами. Кроме того, полученные данные позволяют предположить, что особенностью дофаминергических структур, вовле-

ченных в предполагаемый путь распространения патологического  $\alpha$ -синуклеина при болезни Паркинсона, является локализация этого белка или одной из его форм в перикарионе нейронов. Фосфорилированный  $\alpha$ -синуклеин обнаруживается в нервной системе и в норме, но при болезни Паркинсона наблюдается его накопление, изменение локализации в клетке и формирование агрегатов, что позволяет делать выводы о характере и особенностях течения нейродегенеративного процесса. Агрегаты  $\alpha$ -синуклеина в нейронах ЧС могут быть разделены на несколько типов, отражающих этапы их созревания и формирования классических телец Леви с концентрической многослойной структурой. И тем не менее вопрос, свидетельствует ли наличие этих агрегатов у неврологически здоровых людей о ранней стадии синуклеинопатии или оно связано с физиологическим старением, остается открытым.

### Литература/References

1. Воронков Д.Н., Сальков В.Н., Ануфриев П.Л., Худоевков Р.М. Тельца Леви при болезни Паркинсона (гистологическое, иммуногистохимическое и интерферометрическое исследование) // Архив патологии. 2018. Т. 80, № 4. С. 9–13 [Voronkov D.N., Salkov V.N., Anufriev P.L., Khudoerkov R.M. Lewy bodies in Parkinson's disease: histological, immunohistochemical, and interferometric examinations // *Arkhiv patologii*. 2018. V. 80, No 4. P. 9–13. (In Russ.)].
2. Воронков Д.Н., Худоевков Р.М., Сальникова О.В., Соболев В.Б. Локализация альфа-синуклеина в мозгу крысы и ее взаимосвязь с дофаминергическими структурами // Морфология. 2017. Т. 151, № 1. С. 7–13 [Voronkov D.N., Khudoerkov R.M., Sal'nikova O.V., Sobolev V.B. Localization of  $\alpha$ -Synuclein in the Rat Brain and Its Relationship with Dopaminergic Structures // *Morfologiya*. 2017. V. 151, No 1. P. 7–13 (In Russ.)].
3. Иллариошкин С.Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона // Неврологический журнал. 2015. Т. 20, № 4. С. 4–13 [Illarioshkin S.N. Modern view on etiology of Parkinson's disease // *Nevrologicheskiy zhurnal*. 2015. V. 20, No 4. P. 4–13 (In Russ.)].
4. Соболев В.Б., Худоевков Р.М. Иммуногистохимическое выявление  $\alpha$ -синуклеина в слюнной железе как биомаркер болезни Паркинсона // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. 2017. № 2. С. 16–23 [Sobolev V.B., Khudoerkov R.M. Immunohistochemical assessment of  $\alpha$ -synuclein in salivary glands as a biomarker of Parkinson's disease // *Byulleten' Natsional'nogo obshchestva po izucheniyu bolezni Parkinsona i rasstroistv dvizhenii*. 2017. V. 2. P. 16–23 (In Russ.)].
5. Akil O., Weber C.M., Park S.N., Ninkina N. et al. Localization of Synucleins in the Mammalian Cochlea // *JARO: Journal of the Association for Research in Otolaryngology*. 2008;9(4): 452–63.
6. Arawaka S., Sato H., Sasaki A., Koyama S. et al. Mechanisms underlying extensive Ser129-phosphorylation in alpha-synuclein aggregates // *Acta Neuropathologica Communications*. 2017;1(5):48.
7. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197–211.
8. Braz J.M., Nassar M.A., Wood J.N., Basbaum A.I. Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor // *Neuron*. 2005;47(6):787–93.
9. Burré J. The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein // *J Parkinsons Dis*. 2015;5(4):699–713. doi: 10.3233/JPD-150642.
10. Corbillé A.G., Letournel F., Kordower J.H., Lee J. et al. Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies // *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4:35. doi: 10.1186/s40478-016-0305-8.
11. Dickson D.W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2012;2(PII):a009258. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009258>.
12. Djelloul M., Holmqvist S., Boza-Serrano A., Azevedo C. et al. Alpha-Synuclein Expression in the Oligodendrocyte Lineage: an In Vitro and In Vivo Study Using Rodent and Human Models // *Stem Cell Reports*. 2015;5(2):174–84.
13. Fusco G., Chen S.W., Williamson P.T.F., Cascella R. et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by  $\alpha$ -synuclein oligomers // *Science*. 2017;358(6369):1440–43.
14. Huang Z., Xu Z., Wu Y., Zhou Y. Determining nuclear localization of alpha-synuclein in mouse brains // *Neuroscience*. 2011;199:318–32.
15. Jellinger K.A. Lewy body-related  $\alpha$ -synucleinopathy in the aged human brain // *J. Neural. Transm. (Vienna)*. 2004;111(10–11):1219–35.
16. Kanazawa T., Uchihara T., Takahashi A., Nakamura A. et al. Three-Layered Structure Shared Between Lewy Bodies and Lewy Neurites –Three-Dimensional Reconstruction of Triple-Labeled Sections // *Brain Pathol*. 2008;18(3):415–22.
17. Kuusisto E., Parkkinen L., Alafuzoff I. Morphogenesis of Lewy Bodies: Dissimilar Incorporation of  $\alpha$ -Synuclein, Ubiquitin, and p62 // *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(12):1241–53.
18. Lee J.M., Derkinderen P., Kordower J.H., Freeman R. The Search for a Peripheral Biopsy Indicator of  $\alpha$ -Synuclein Pathology for Parkinson Disease // *J Neuropathol Exp Neurol*. 2017;76(1):2–15. doi: 10.1093/jnen/nlw103.
19. Li J., Henning J.P., Dahlstrom A. Differential localization of alpha-, beta- and gamma-synucleins in the rat CNS // *Neuroscience*. 2002;113(2):463–78.
20. Ma M.R., Hu Z.W., Zhao Y.F., Chen Y.X. et al. Phosphorylation induces distinct alpha-synuclein strain formation // *Scientific Reports*. 2016;6:37130. <https://doi.org/10.1038/srep37130>.
21. Malek N., Swallow D., Grosset K.A., Aichtchik O. et al. Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease – a systematic review // *Acta Neurol Scand*. 2014;130(2):59–72.
22. Miraglia F., Ricci A., Rota L., Colla E. Subcellular localization of alpha-synuclein aggregates and their interaction with membranes // *Neural Regeneration Research*. 2018;13(7): 1136–44.

23. Mori F., Tanji K., Yoshimoto M., Takahashi H. et al. Immunohistochemical comparison of alpha- and beta-synuclein in adult rat central nervous system // *Brain Res.* 2002;941(1–2):118–26.
24. Muntané G., Ferrer I., Martínez-Vicente M.  $\alpha$ -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain // *Neuroscience.* 2012;200:106–19.
25. Nam M.K., Han J.H., Jang J.Y., Yun S.E. et al. A novel link between the conformations, exposure of specific epitopes, and subcellular localization of alpha-synuclein // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects.* 2015;12:2497–505.
26. Oueslati A. Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? // *J Parkinsons Dis.* 2016;6(1):39–51.
27. Rojo A.I., Cavada C., De Sagarra M.R., Cuadrado A. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats // *Exp Neurol.* 2007;208(1):120–6.
28. Rudrabhatla P. Regulation of neuronal cytoskeletal protein phosphorylation in neurodegenerative diseases // *J Alzheimers Dis.* 2014;41(3):671–84. <https://doi.org/10.3233/JAD-130794>
29. Ruffmann C., Bengoa-Vergniory N., Poggiolini I., Ritchie D. et al. Detection of alpha-synuclein conformational variants from gastro-intestinal biopsy tissue as a potential biomarker for Parkinson's disease // *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2018;44(7):722–36. doi: 10.1111/nan.12486.
30. Sasajima H., Miyazono S., Noguchi T., Kashiwayanagi M. Intranasal Administration of Rotenone to Mice Induces Dopaminergic Neurite Degeneration of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra // *Biol. Pharm. Bull.* 2017;40(1):108–12.
31. Shahmoradian S.H., Genoud C., Graff-Meyer A., Hench J. et al. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of a crowded organellar membranous medley // *BioRxiv.* Jan. 2017. <https://doi.org/10.1101/137976>.
32. Sherer T.B., Betarbet R., Testa C.M., Seo B.B. et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease // *J. Neurosci.* 2003;23:10756–64.
33. Surgucheva I., Weisman A.D., Goldberg J.L., Shnyra A. et al.  $\gamma$ -Synuclein as a marker of retinal ganglion cells // *Molecular Vision.* 2008;14:1540–8.
34. Surguchov A. Intracellular Dynamics of Synucleins: “Here, There and Everywhere” // *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015;320:103–69.
35. Taguchi K., Watanabe Y., Tsujimura A., Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-Synuclein // *J. Comp. Neurol.* 2016;524(6):1236–58.
36. Ubeda-Bañon I., Saiz-Sanchez D., De la Rosa-Prieto C., Martínez-Marcos A.  $\alpha$ -Synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: role of neural connections on spreading pathology // *Brain Struct Funct.* 2014;219(5):1513–26.
37. Uversky V.N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration // *Cell Tissue Res.* 2004;318:225–41.
38. Vivacqua G., Casini A., Vaccaro R., Fornai F. et al. Different subcellular localization of alpha-synuclein in the C57BL/6J mouse's central nervous system by two novel monoclonal antibodies // *J Chem Neuroanat.* 2011;41(2):97–110.
39. Yan F., Chen Y., Li M., Wang Y. et al. Gastrointestinal nervous system  $\alpha$ -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease // *Medicine (Baltimore).* 2018;97(28):e11337. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011337>.
40. Zhang Z.N., Zhang J.S., Xiang J., Yu Z.H. et al. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study // *Brain Res.* 2017;15(1655):104–13.

## IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF $\alpha$ -SYNUCLEIN IN THE NERVOUS SYSTEM OF INTACT ANIMALS, IN PARKINSON'S DISEASE AND PARKINSONISM MODELING

*D.N. Voronkov, V.N. Salkov, O.V. Salnikova, V.B. Sobolev, R.M. Khudoerkov*

Research Center of Neurology, Moscow

The purpose of the study is to characterize immunohistochemically the distribution of alpha synuclein ( $\alpha$ -Syn) in the structures of the nervous system of intact animals, in the experiment and in Parkinson's disease (PD). In intact Wistar rats,  $\alpha$ -Syn was localized in the synaptic terminals belonging to different mediatory systems and in the soma of neurons, predominantly in the nuclei of brain stem and midbrain, which are most susceptible to neurodegeneration in PD. We found that  $\alpha$ -Syn and its serine-129 phosphorylated form were localized depending on the clone of antibodies used. Phosphorylated  $\alpha$ -Syn accumulation was shown in the progression of the degenerative process in the rotenone model of parkinsonism, as well as in autopsies and biopsies from persons with PD. The types of aggregates of  $\alpha$ -Syn that reflect the stages of maturation and the formation of the multilayered Lewy bodies in PD were described.

*Key words:*  $\alpha$ -synuclein, Parkinson's disease, immunohistochemistry, Lewy bodies

**Информация об авторах**

Воронков Дмитрий Николаевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

Адрес: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. E-mail: [neurolab@yandex.ru](mailto:neurolab@yandex.ru)

Сальков Владимир Николаевич – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: [vla-salkov@yandex.ru](mailto:vla-salkov@yandex.ru)

Сальникова Ольга Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: [fial88@mail.ru](mailto:fial88@mail.ru)

Соболев Валерий Борисович – младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: [vsobolev@outlook.com](mailto:vsobolev@outlook.com)

Худоерков Рудольф Михайлович – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: [rolfbrain@yandex.ru](mailto:rolfbrain@yandex.ru)

*Материал поступил в редакцию 24 октября 2018 года*

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-47-55

УДК: 59.084, 57: 571.27

# МОРФОЛОГИЯ ПЕЧЕНИ И ЛЕГКИХ И ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ СИСТЕМНОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ У САМЦОВ КРЫС С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

*Д.Ш. Джалилова, А.М. Косырева, М.Е. Диатроптов, М.А. Макарова, О.В. Макарова*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Индивидуальная устойчивость к гипоксии может определять выраженность воспалительных реакций, так как по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии животных в норме выше содержание HIF-1, который взаимосвязан с NF-κB, регулирующим воспалительные процессы. Цели и задачи исследования – охарактеризовать морфологические изменения легких и печени и фагоцитарную активность клеток периферической крови при системном воспалительном ответе, индуцированном липополисахаридом (ЛПС), у животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии. Устойчивость крыс Вистар к гипоксии определяли в барокамере по времени жизни на «высоте» 11 500 м. Системный воспалительный ответ моделировали с помощью внутрибрюшинного введения ЛПС в дозе 1,5 мг/кг.

После введения ЛПС как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс увеличивается количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких. По сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии животными системный воспалительный ответ у крыс с низкой устойчивостью к гипоксии более выражен, что характеризуется значительной инфильтрацией межальвеолярных перегородок нейтрофилами, большей площадью некрозов в печени, повышенным уровнем активности АЛТ и АСТ, содержанием С-реактивного белка и кортикостерона в сыворотке крови. Более тяжелые проявления системного воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии крыс сопровождаются активацией фагоцитов периферической крови, тогда как у высокоустойчивых к гипоксии животных при введении ЛПС наблюдалось увеличение относительного числа гранулоцитов в периферической крови без изменений показателей активности фагоцитоза.

Полученные данные необходимо учитывать при разработке новых подходов к терапии инфекционно-воспалительных заболеваний с учетом индивидуальной чувствительности к содержанию кислорода.

*Ключевые слова:* гипоксия, индивидуальная устойчивость, липополисахарид, воспаление

Устойчивость организма к гипоксии определяется в первую очередь особенностями энергетического обмена и регуляторными механизмами, позволяющими приспособляться к недостатку кислорода. По данным литературы, между группами низкоустойчивых и высокоустойчивых к гипоксии животных существуют различия в поведенческих реакциях, уровне нейромедиаторов в центральной нервной системе, метаболизме, характере реакций сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а также содержании HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) – фактора, индуцируемого гипоксией [2–5,

8, 23, 26]. HIF-1 тесно связан с транскрипционным фактором NF-κB (nuclear factor κB), который является ключевым медиатором воспалительного ответа и контролирует экспрессию генов различных цитокинов, хемокинов, белков острой фазы воспаления, молекул адгезии и тем самым может определять выраженность воспалительных реакций [21].

Известно, что HIF-1 способствует выживанию базофилов, эозинофилов, нейтрофилов и тучных клеток, активирует миграцию нейтрофилов и макрофагов, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов

дендритными клетками, индуцирует поляризацию макрофагов в M1 тип [9, 30]. Миелоидные клетки, включая нейтрофилы и моноциты/макрофаги, содержат множество протеолитических ферментов, быстро генерируют активные формы кислорода (АФК), осуществляют фагоцитоз, поэтому их активация может сопровождаться повреждением клеток и тканей [13, 19]. Установлено, что патологические изменения в легких, печени и других органах-мишенях при системных проявлениях воспаления, в том числе сепсисе, во многом опосредованы нейтрофилами [27, 40].

По данным литературы, гипоксия и содержание в клетках HIF-1 $\alpha$  являются критическими факторами для выживания и функционирования нейтрофилов и макрофагов [42]. При нормальной концентрации кислорода в кровотоке нейтрофилы находятся в неактивном состоянии, в них мало белка HIF-1 $\alpha$ , несмотря на обилие его мРНК, что свидетельствует о регуляции активности HIF-1 $\alpha$  пролилгидроксилазами (prolyl hydroxylase – PHDs) [24]. При миграции нейтрофилов в зону воспаления, где содержание кислорода низкое, HIF-1 $\alpha$  стабилизируется, что приводит к активации нейтрофилов [42]. Установлено, что в нейтрофилах человека, стимулированных липополисахаридом (ЛПС), HIF-1 $\alpha$  необходим для образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NETs) – сложных комплексов антимикробных белков, ДНК и гистонов, которые способствуют захвату и лизису бактериальных клеток [12, 35]. *In vitro* и *ex vivo* показано, что ЛПС активирует в нейтрофилах мишень рапамицина млекопитающих – mTOR (mammalian target of rapamycin), который посттрансляционно стабилизирует HIF-1 $\alpha$  и впоследствии способствует образованию NETs [44]. По данным литературы гипоксия и/или генетическая гиперэкспрессия HIF-1 $\alpha$  усиливает фагоцитарную способность активированных макрофагов [9].

Индивидуальная устойчивость к гипоксии может определять выраженность воспалительных изменений при инфекционно-воспалительных заболеваниях, так как у низкоустойчивых к гипоксии животных в норме содержание HIF-1 выше [4], а после острого гипоксического воздействия у них повышается концентрация 8-изопростана в сыворотке крови, что сопряжено с повреждением клеточных макромолекул и увеличением уровня TGF- $\beta$  [3]. Более того, особенности реакции нейтрофилов у животных с разной устойчивостью к гипоксии могут влиять на выраженность повреждений органов при инфекционно-воспалительных заболеваниях, в частности при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС. Тем не менее в литературе эта проблема не освещена.

Цель работы – охарактеризовать морфологические изменения легких и печени и фагоцитарную активность клеток периферической крови при системном воспалительном ответе, индуцированном ЛПС, у животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии.

## Методика исследования

Работа выполнена на половозрелых самцах крыс Вистар (n=40) массой тела 220–270 граммов (филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России). При работе с экспериментальными животными руководствовались принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов (ETS 123, Страсбург, 1986) и директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/EU, Страсбург, 2010). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 16 от 11 ноября 2015 года). Животных содержали по 6–7 особей в клетке при естественном освещении и температуре 20–22°C. Доступ к воде и пище был свободным.

С целью определения устойчивости к гипоксии животных помещали в вентилируемую барокамеру на «высоту» 11 500 м [1, 6], подъем осуществляли со скоростью 80 м/с. К высокоустойчивым к гипоксии относили крыс, время жизни (до принятия бокового положения) которых «на высоте» составляло более 240 секунд (n=15), к низкоустойчивым – менее 80 секунд (n=13). Среднеустойчивым к гипоксии крыс в эксперименте не использовали.

Для моделирования системного воспалительного ответа через месяц после определения устойчивости к гипоксии высокоустойчивым (n=10) и низкоустойчивым (n=8) крысам внутрибрюшинно вводили ЛПС *Escherichia coli* O26:B6 (Sigma-Aldrich, США) в дозе 1,5 мг/кг, которая вызывает патологические изменения во внутренних органах [29]. Высокоустойчивым (n=5) и низкоустойчивым (n=5) к гипоксии крысам контрольных групп внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Через 24 часа после введения ЛПС животных выводили из эксперимента передозировкой золетила (Virbac Sante Animale, Франция). Срок выведения из эксперимента объясняется тем, что в первые сутки после введения ЛПС развиваются выраженные морфологические изменения печени и легких [7].

Для морфологического исследования проводили забор фрагментов легких и печени, фиксировали их в жидкости Буэна в течение 24 часов. После гистологической проводки по спиртам восходящей концентрации и хлороформу в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США) кусочки органов заливали в гистомикс на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, США), изготавливали гистологические срезы толщиной 5–8 мкм на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, США). Полученные препараты окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия). С помощью микроскопа Leica DM2500 в гистологических препаратах легких при  $\times 640$  получали цифровые изображения 10 полей зрения. В каждом поле зрения в программе Image Score M оценивали площадь межальвеолярных перегородок и количество нейтрофилов в них. Полученные данные нормировали на 10 000 мкм<sup>2</sup> площади межальвеолярных перегородок. У высокоустойчивых

( $n=5$ ) и низкоустойчивых ( $n=5$ ) к гипоксии животных с некрозами в печени их площадь оценивали в программе Image Scope M при  $\times 200$  в интерактивном режиме с использованием камеры Leica DFC290. Измерения проводили в 10 полях зрения, результаты выражали в микрометрах квадратных ( $\text{мкм}^2$ ).

Кровь забирали из шейных вен, в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) проводили определение содержания кортикостерона (IBL International, Германия) и С-реактивного белка (СРБ) (Cloud-Clone Corp., Китай), согласно приложенной инструкции. Для регистрации интенсивности цветной реакции использовали микропланшетный ИФА-анализатор (ANTHOS 2010, Австрия).

Для оценки функциональных нарушений гепатоцитов в сыворотке крови на автоматическом биохимическом анализаторе Mindray Bs-120 (Китай) кинетическим методом определяли активность ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Использовали наборы реактивов Human GmbH (Германия).

Абсолютное и относительное количество гранулоцитов в периферической крови оценивали с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800Vet (Китай).

Для определения фагоцитарной активности клеток периферической крови использовали набор IngoFlowEx kit (Exbio Diagnostics, Чехия). Клетки крови инкубировали с *E. coli*, конъюгированной с FITC, при  $37^\circ\text{C}$  в термостате в течение 30 минут в соответствии с инструкцией. Несвязанные с клетками крови *E. coli* отмывали, эритроциты лизировали с помощью прилагаемого раствора. Параллельно проводили контрольную реакцию без добавления *E. coli* в кровь. Оценивали фагоцитарный показатель (процент клеток с *E. coli*-FITC<sup>+</sup>) и индекс стимуляции (средняя интенсивность свечения *E. coli*-FITC, фагоцитированной клетками) клеток периферической крови на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США).

Полученные данные подвергали статистической обработке. Характер распределения показателей устанавливали с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Поскольку данные были распределены ненормально, для оценки статистической значимости полученных результатов использовали методы непараметрической статистики (U-критерий Манна–Уитни) в программе Statistica 8.0. Данные выражали в виде медианы и интерквартильного размаха (Med (Low-High)). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Через 24 часа после введения ЛПС в легких как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдались очаговый интраальвеолярный отек и выраженное неравномерное полнокровие сосудов (рис. 1). По сравнению с контрольными группами и у высокоустойчивых, и у низкоустойчивых к

гипоксии крыс число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было статистически значимо выше (табл. 1). Через 24 часа после введения ЛПС число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких было выше у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми. Повышение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких обусловлено увеличением синтеза хемокинов и молекул адгезии эндотелиальными клетками в ответ на введение ЛПС [13, 38]. По-видимому, более выраженное повышение числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у низкоустойчивых к гипоксии животных связано с более высокой экспрессией *Hif-1 $\alpha$* , который усиливает миграцию и уменьшает апоптоз нейтрофилов [42]. Повышение уровня экспрессии гена *Hif-1 $\alpha$*  приводит к увеличению экспрессии *Nf- $\kappa$ b*, который регулирует воспалительные процессы и, в частности, усиливает экспрессию молекул адгезии и хемокинов [18, 25].

После введения ЛПС у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс в печени выявлялись альтеративные изменения – выраженная и распространенная средне- и мелкокапельная дистрофия гепатоцитов, очаговые и субтотальные ландшафтообразные некрозы (рис. 2). Выражено неравномерное полнокровие центральных вен и синусоидных капилляров, определялись стазы и сладжи.

В печени у высокоустойчивых к гипоксии крыс очаговые некрозы выявлялись у пяти из восьми животных (63%), у трех из восьми (37%) животных наблюдалась умеренно выраженная мелкокапельная дистрофия гепатоцитов. В печени у низкоустойчивых к гипоксии животных некрозы были обнаружены у всех пяти крыс (100%), причем у трех крыс из пяти (60%) они были ландшафтообразными. При морфометрической оценке площади некрозов было установлено, что у низкоустойчивых к гипоксии крыс этот показатель статистически значимо выше (рис. 3).

Таблица 1

**Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар ( $n=23$ ) контрольных групп и через 24 часа после введения ЛПС (Ме; 25–75%).**

Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках легких/10 000 $\text{мкм}^2$			
Группы	Контрольные	24 часа ЛПС	p
ВУ ( $n=13$ )	2,1 (1,4–2,5)	6,8 (5,8–8,0)	0,003
НУ ( $n=10$ )	2,1 (1,7–2,7)	9,5 (8,7–9,9)	0,009
p	0,75	0,01	

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

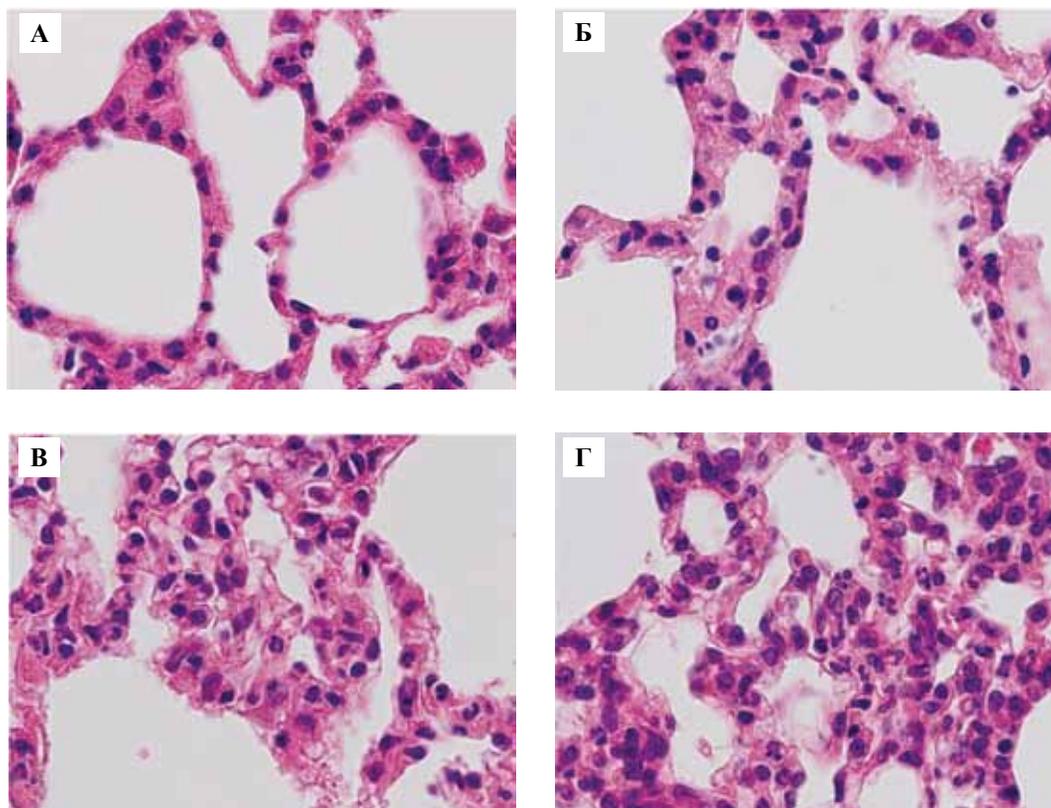


Рис. 1. Морфологические изменения в легких у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (Б, Г) к гипоксии самцов крыс Вистар контрольных групп и через 24 часа после введения ЛПС (В, Г).

Контрольная группа. А, Б – небольшое количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках; 24 часа после введения ЛПС.

В – диффузно рассеянные полиморфноядерные лейкоциты в межальвеолярных перегородках.

Г – нейтрофильная инфильтрация межальвеолярных перегородок. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 1000$

По данным биохимического анализа нами показано, что через сутки после введения ЛПС в сыворотке крови как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых к гипоксии крыс уровень активности ферментов печени (АСТ и АЛТ) повышался по сравнению с контрольными группами (табл. 2). Между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии животными контрольных и опытных групп статистически значимые различия не выявлены, однако у низкоустойчивых к гипоксии крыс после введения ЛПС уровни активности АСТ и АЛТ были, соответственно, в 5,6 и 5,2 раза выше по сравнению с высокоустойчивыми. Значительное повышение активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови свидетельствует о выраженных повреждениях гепатоцитов [31, 36].

Известно, что повреждение гепатоцитов печени развивается в ответ на прямое действие ЛПС, микроциркуляторные нарушения, повышение уровня цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-10), активных форм кислорода и NO [15, 16, 28]. Нами было показано, что концентрация некоторых провоспалительных цитокинов, в частности IL-1 $\beta$ , в крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс выше по сравнению с высокоустойчивыми [18], что может определять большие повреждения гепатоцитов у низкоустойчивых к гипоксии крыс,

о чем свидетельствуют высокий показатель площади некрозов печени и уровень активности АЛТ и АСТ в сыворотке крови у них.

По данным ИФА по сравнению с контрольной группой через 24 часа после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс концентрация маркера воспаления – СРБ в сыворотке крови увеличилась (табл. 2). СРБ является одним из клинических маркеров тяжести инфекционно-воспалительных заболеваний, в том числе сепсиса [37], и его высокие концентрации свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе заболевания [10].

Таким образом, более выраженные патологические изменения, обнаруженные в печени у низкоустойчивых к гипоксии крыс, сопровождаются увеличением концентрации СРБ в сыворотке крови, тогда как у высокоустойчивых к гипоксии крыс, у которых содержание СРБ в сыворотке крови статистически значимо не отличалось от контрольных значений, патологические изменения в печени были менее выраженными. Выявленные различия в тяжести индуцированного ЛПС системного воспалительного ответа у животных с разной устойчивостью к гипоксии, возможно, определяются содержанием HIF-1 $\alpha$ , так как в условиях низкого содержания кислорода при воспалении у низкоустойчивых к

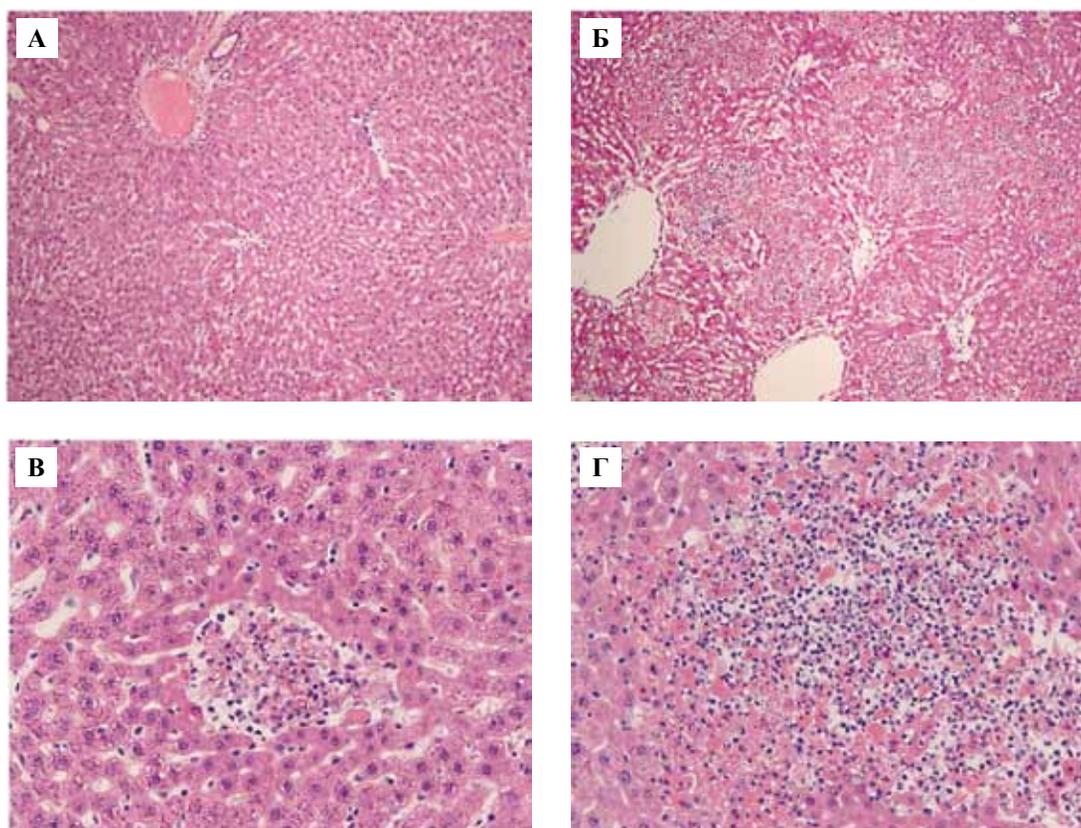


Рис. 2. Морфологические изменения в печени у высокоустойчивых (А, В) и низкоустойчивых (Б, Г) к гипоксии крыс Вистар через 24 часа после введения ЛПС. Высокоустойчивые (А, В) – очаговые некрозы, неравномерное полнокровие междольковых вен и артерий, синусоидных капилляров. Низкоустойчивые (Б, Г) – обширные некрозы. Окраска гематоксилином и эозином. А, Б –  $\times 100$ , В, Г –  $\times 320$

Таблица 2

Уровень активности АЛТ и АСТ, содержание СРБ и кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар (n=23) контрольных групп и через 24 часа после введения ЛПС (Ме; 25–75%)

Показатели	Группы	Контрольные	24 часа ЛПС	p
АСТ, МЕ/л	ВУ (n=10)	147,6 (132,2–157,3)	895,5 (378,7–1290,9)	0,03
	НУ (n=10)	152,4 (140,8–168,9)	5048,3 (1599,5–6691,0)	0,02
	p	0,67	0,35	
АЛТ, МЕ/л	ВУ (n=10)	64,8 (55,6–74,5)	790,4 (246,2–1046,9)	0,01
	НУ (n=10)	67,6 (64,3–72,4)	4132,0 (1490,8–4420,4)	0,006
	p	0,83	0,25	
СРБ, пг/мл	ВУ (n=13)	1833 (1645–2585)	2115 (1974–2397)	0,60
	НУ (n=10)	1363 (1128–1551)	2421 (1810–2844)	0,04
	p	0,09	0,81	
Кортикостерон, нмоль/л	ВУ (n=13)	739,6 (384,6–767,2)	426,8 (402,4–556,0)	0,85
	НУ (n=10)	715,2 (701,6–764,0)	701,6 (653,2–725,6)	0,66
	p	0,92	0,04	

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

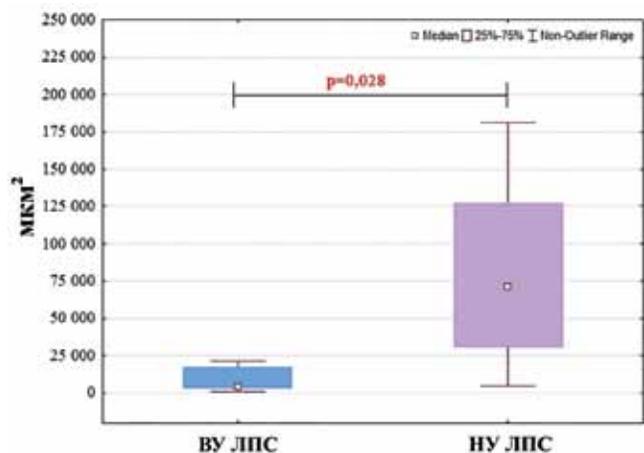


Рис. 3. Площадь некрозов на стандартной площади среза (50 000 мкм²) печени у высокоустойчивых (ВУ) (n=5) и низкоустойчивых (НУ) (n=5) к гипоксии крыс Вистар через 24 часа после введения ЛПС (Me; 25–75%).

Данные представлены без учета животных, имеющих только дистрофические изменения

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

гипоксии особой высокая продукция HIF-1a приводит к выраженной активации NF-κB-зависимой продукции провоспалительных цитокинов [17, 21].

По данным литературы, эндотоксины, в том числе ЛПС, стимулируют синтез АКТГ и кортикостерона гипофизом и надпочечниками, как напрямую, так и опосредованно, через повышение продукции провоспалительных цитокинов [11, 33]. Глюкокортикоиды подавляют синтез цитокинов иммунными клетками, регулируют их миграцию в очаги воспаления и поляризуют иммунный ответ преимущественно по Th2-типу [14]. Нами показано, что через сутки после введения ЛПС по сравнению с низкоустойчивыми к гипоксии животными в сыворотке крови у высокоустойчивых крыс концентрация кортикостерона была статистически значимо ниже (табл. 2). Вероятно, более высокий уровень кортикостерона у низкоустойчивых к гипоксии крыс по сравнению с высокоустойчивыми обусловлен

активацией компенсаторных реакций в ответ на более выраженный ЛПС-индуцированный системный воспалительный ответ.

При оценке относительного и абсолютного числа гранулоцитов в периферической крови между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми к гипоксии крысами контрольных и опытных групп различия не выявлены. Через сутки после введения ЛПС только у высокоустойчивых к гипоксии крыс происходило статистически значимое повышение относительного числа гранулоцитов в крови (табл. 3).

Оценка фагоцитарной активности клеток периферической крови показала, что по сравнению с высокоустойчивыми у низкоустойчивых к гипоксии крыс процент фагоцитирующих клеток был статистически значимо выше как в контрольной группе, так и через 24 часа после введения ЛПС (рис. 4 А). Тем не менее по сравнению с соответствующей контрольной группой у крыс и с высокой, и с низкой устойчивостью к гипоксии в ответ на введение ЛПС изменения фагоцитарного показателя не выявлены. Возможно, высокий показатель числа фагоцитирующих клеток крови у низкоустойчивых к гипоксии крыс как в норме, так и после введения ЛПС определяется исходной высокой генетически запрограммированной продукцией HIF-1a в гранулоцитах. В литературе данные о содержании HIF-1a в гранулоцитах животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии, не представлены, но известно, что у низкоустойчивых животных в норме содержание HIF-1 в неокортексе и печени выше [4, 18].

Индекс стимуляции фагоцитарной активности клеток периферической крови в контрольных группах у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс не различался (рис. 4 Б), однако через 24 часа после введения ЛПС только у низкоустойчивых к гипоксии крыс наблюдалось увеличение этого показателя, в то время как у высокоустойчивых животных изменения индекса стимуляции фагоцитарной активности не обнаружены. Выявленная нами ЛПС-индуцированная стимуляция фагоцитарной активности гранулоцитов только у низкоустойчивых к гипоксии животных мо-

Таблица 3

Относительное и абсолютное число гранулоцитов в периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар (n=23) контрольных групп и через 24 часа после введения ЛПС (Me; 25–75%)

Показатели	Группы	Контрольные	24 часа ЛПС	p
Абсолютное число, млн/мл	ВУ (n=13)	3,3 (2,9–6,9)	7,7 (5,9–8,3)	0,33
	НУ (n=10)	4,1 (2,9–4,4)	6,0 (2,5–9,1)	0,30
	p	0,67	0,66	
Относительное число, %	ВУ (n=13)	15,3 (13,3–25,5)	40,9 (36,0–42,9)	0,01
	НУ (n=10)	21,1 (19,6–23,2)	33,0 (22,1–43,3)	0,07
	p	0,28	0,42	

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

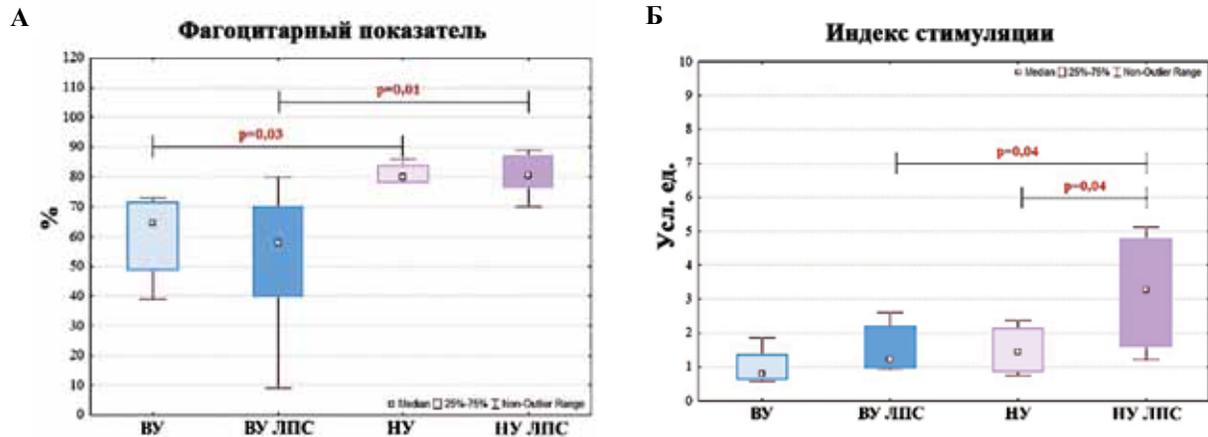


Рис. 4. Фагоцитарный показатель (А) и фагоцитарный индекс стимуляции (Б) клеток периферической крови у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии крыс Вистар контрольных групп (ВУ, НУ) и через 24 часа после введения ЛПС (ВУ ЛПС, НУ ЛПС), Me (25%; 75%)

p – статистическая значимость различий, критерий Манна–Уитни

жет определяться более выраженным воспалительным ответом, характеризующимся в том числе повышенным уровнем NF-κB-зависимой продукции провоспалительных цитокинов [32] и активацией HIF-1α [41]. S. Frede et al. [22] показано, что активация HIF-1α может осуществляться как непосредственно ЛПС, так и транскрипционным фактором NF-κB [39, 43]. ЛПС-индуцированный высокий уровень продукции и стабилизации HIF-1α в гранулоцитах у низкоустойчивых к гипоксии крыс в результате развивающейся гипоксии при системном воспалительном ответе, по-видимому, определяет высокую фагоцитарную активность клеток периферической крови у этих животных, что, отражает высокую тяжесть воспалительного процесса [22]. В свою очередь, гиперстимуляция фагоцитарной активности моноцитов и гранулоцитов, направленная на нейтрализацию ЛПС, может приводить к повреждению органов и тканей и развитию полиорганной недостаточности.

Таким образом, по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии животными ЛПС-индуцированный системный воспалительный ответ у крыс с низкой устойчивостью к гипоксии более выражен, что характеризуется большей нейтрофильной инфильтрацией межальвеолярных перегородок легких, площадью некрозов печени, высоким уровнем активности АЛТ и АСТ, содержания СРБ и кортикостерона в сыворотке крови. Более тяжелые проявления системного воспалительного ответа у низкоустойчивых к гипоксии крыс сопровождаются активацией фагоцитарной активности моноцитов и гранулоцитов периферической крови, тогда как у высокоустойчивых к гипоксии животных при введении ЛПС наблюдалось увеличение относительного числа гранулоцитов в периферической крови без изменений показателей активности фагоцитоза. Полученные новые данные о различиях морфологических изменений печени и фагоцитарной активности гранулоцитов периферической крови при ЛПС-

индуцированном системном воспалительном ответе у самцов крыс Вистар с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии необходимо учитывать при разработке новых подходов к терапии инфекционно-воспалительных заболеваний в зависимости от индивидуальной чувствительности к содержанию кислорода.

#### Литература/References

1. Агаджанян Н.А., Хачатурьян М.Л., Панченко Л.А. Влияние острого гипоксического воздействия на устойчивость крыс к гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. Т. 127, № 6. С. 625–628 [Agadzhanyan N.A., Khachatryan M.L., Panchenko L.A. Effect of acute hypoxia on resistance to hypoxia in rats. // Bulletin of experimental biology and medicine. 1999. V. 127, No 6. P. 625–628 (In Russ.)].
2. Грек О.Р., Ефремов А.В., Шарпов В.И. Гипобарическая гипоксия и метаболизм ксенобиотиков. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 120 с. [Grek O.R., Efremov A.V., Sharпов V.I. Hypobaric hypoxia and metabolism of xenobiotics. M.: GEOTAR-Media, 2007. 120 s. (In Russ.)].
3. Джалилова Д.Ш., Диатроптов М.Е., Цветков И.С., Макарова О.В., Кузнецов С.Л. Экспрессия генов Hif-1α, Nf-κb и Vegf в печени и содержание HIF-1α, эритропоэтина, VEGF, TGF-β, 8-изопростана и кортикостерона в сыворотке крови у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. Т. 165, № 6. С. 742–747 [Dzhalilova D.Sh., Diatroptov M.E., Tsvetkov I.S., Makarova O.V., Kuznetsov S.L. Expression of Hif-1α, Nf-κb and Vegf genes in the liver and the content of HIF-1α, erythropoietin, VEGF, TGF-β, 8-isoprostane and corticosterone in the blood serum in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats // Bulletin of experimental biology and medicine. 2018. V. 165, No 6. P. 742–747 (In Russ.)].
4. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1α в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. Т. 154, № 12. С. 681–686 [Kirova Y.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of the dynamics of HIF-1α content in the neocortex of rats under different hypoxia regimes // Bulletin of experimental biology and medicine. 2012. T. 154, No 12. P. 681–686 (In Russ.)].

- Lukyaynova L.D.* Phenotypic features of the dynamics of HIF-1 $\alpha$  levels in rat neocortex in different hypoxia regimens // Bulletin of experimental biology and medicine. 2012. V. 154, No 12. P. 681–686 (In Russ.).
5. *Лукьянова Л.Д.* Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптации организма. Физиологический журнал. 2003. Т. 49, № 3. С. 17–35. [*Lukyaynova L.D.* Molecular mechanisms of tissue hypoxia and adaptation // Fiziologichnyi zhurnal. 2003. V. 49, No 3. P. 17–35 (In Russ.).]
  6. *Лукьянова Л.Д., Кирова Ю.И.* Влияние гипоксического preconditionирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. Т. 151, № 3. С. 263–268 [*Lukyaynova L.D., Kirova Y.I.* Effect of hypoxic preconditioning on free radical processes in tissues of rats with different resistance to hypoxia // Bulletin of experimental biology and medicine. 2011. V. 151, No 3. P. 263–268 (In Russ.).]
  7. *Писарев В.Б., Богомолова Н.В., Новочадов В.В.* Бактериальный эндотоксикоз: взгляд патолога. Волгоград: Издательство Волгоградского государственного медицинского университета, 2008. 208 с. [*Pisarev V.B., Bogomolova N.V., Novochadov V.V.* Bacterial endotoxicosis: pathologist's view. Volgograd: Publisher Volgograd state medical university, 2008. 308 s. (In Russ.).]
  8. *Саноцкая Н.В., Мацневский Д.Д., Лебедева М.А.* Изменение гемодинамики и дыхания крыс с различной чувствительностью к острой гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 138, № 7. С. 24–28 [*Sanotskaya N.V., Matsievskii D.D., Lebedeva M.A.* Changes in hemodynamics and respiration in rats with different resistance to acute hypoxia // Bulletin of experimental biology and medicine. 2004. V. 138, No 7. P. 24–28 (In Russ.).]
  9. *Anand R.J., Gribar S.C., Li J., Kohler J.W. et al.* Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 $\alpha$ -dependent manner // J Leukoc Biol. 2007;82(5):1257–65.
  10. *Beltempo M., Viel-Therault I., Thibeault R., Julien A.S.* C-reactive protein for late-onset sepsis diagnosis in very low birth weight infants // BMC Pediatr. 2018;18:16.
  11. *Bornstein S.R., Ziegler C.G., Krug A.W., Kanczkowski W. et al.* The role of Toll-like receptors in the immune-adrenal crosstalk // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006;1088:307–18.
  12. *Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B. et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria // Science. 2004;303(5663):1532–5.
  13. *Brown K.A., Brain S.D., Pearson J.D., Edgeworth J.D. et al.* Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis // Lancet. 2006;368(9530):157–69.
  14. *Chrousos G.P.* The stress response and immune function: clinical implications. The 1999 Novera H. Spector lecture // Ann N. Y. Acad. Sci. 2000;917:38–67.
  15. *Cinell I., Opal S.M.* Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer // Crit Care Med. 2009;37(1):291–304.
  16. *Cohen J.* The immunopathogenesis of sepsis // Nature. 2002;420(6917):885–91.
  17. *Cummins E.P., Berra E., Comerford K.M., Ginouves A. et al.* Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I $\kappa$ B kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NF $\kappa$ B activity // Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103:18154–9.
  18. *Dzhalilova D.S., Kosyreva A.M., Diatroptov M.E., Ponomarenko E.A. et al.* Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats // Journal of Inflammation Research. 2019;12:1–14.
  19. *Fang H., Jiang W., Cheng J., Lu Y. et al.* Balancing Innate Immunity and Inflammatory State via Modulation of Neutrophil Function: A Novel Strategy to Fight Sepsis // Journal of Immunology Research. 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/187048>.
  20. *Flores-Mejia L.A., Cabrera-Rivera G.L., Ferat-Osorio E., Mancilla-Herrera I. et al.* Function is dissociated from activation-related immunophenotype on phagocytes from patients with sirs/sepsis syndrome // Shock. 2018.doi: 10.1097/SHK.0000000000001314.
  21. *Fratantonio D., Cimino F., Speciale A., Virgili F.* Need (more than) two to Tango: Multiple tools to adapt to changes in oxygen availability // BioFactors. 2018;44:207–18.
  22. *Frede S., Stockmann C., Freitag P., Fandrey J.* Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- $\kappa$ B // Biochem. J. 2006;396:517–27.
  23. *Ghosh D., Kumar R., Pal K.* Individual variation in response to simulated hypoxic stress of rats // Ind J Exp Biol. 2012;50:744–48.
  24. *Harris A.J., Thompson A.R., Whyte M.K., Walmsley S.R.* HIF mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications // Hypoxia (Auckland, NZ). 2014;2:47–58.
  25. *Hirota K.* Involvement of hypoxia-inducible factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis // Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2015;15:29–40.
  26. *Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L.* Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia // High alt med biol. 2013;14(1):65–77.
  27. *Kabay B., Kocaepe C., Baykal A., Ozden H. et al.* Interleukin-10 gene transfer: prevention of multiple organ injury in a murine cecal ligation and puncture model of sepsis // World J Surg. 2007;31(1):105–15.
  28. *Koo D.J., Chaudry I.H., Wang P.* Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis // J Surg Res. 1999;83:151–7.
  29. *Kosyreva A.M., Makarova O.V., Kakturskiy L.V., Mikhailova L.P. et al.* Sex differences of inflammation in target organs, induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide, depend on its dose // J Inflamm Res. 2018;11:431–45.
  30. *Krzywinska E., Stockmann C.* Hypoxia, metabolism and immune cell function // Biomedicines. 2018;6:1–20.
  31. *Lee T.H., Kim W.R., Poterucha J.J.* Evaluation of elevated liver enzymes // Clin Liver Dis. 2012;16:183–98.
  32. *Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.-C.* NF- $\kappa$ B signaling in inflammation // Signal Transduction and Targeted Therapy. 2017;2:e17023.
  33. *Ma X.C., Chen L.T., Oliver J., Horvath E. et al.* Cytokine and adrenal axis responses to endotoxin // Brain Research. 2000;861:135–42.
  34. *Ma A.C., Kubes P.* Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis // J. Thromb Haemost. 2008;6(3):415–20.
  35. *McInturff A.M., Cody M.J., Elliott E.A., Glenn J.W. et al.* Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  // Blood. 2012;120(15):3118–25.

36. *Nesslerer N., Launey Y., Aninat C., Morel F. et al.* Clinical review: the liver in sepsis // *Critical Care*. 2012;16:235.
37. *Póvoa P., Souza-Dantas V.C., Soares M., Salluh J.F.* C-reactive protein in critically ill cancer patients with sepsis: influence of neutropenia // *Crit Care*. 2011;15:R129.
38. *Remick D.G.* Pathophysiology of sepsis // *Am J Pathol*. 2007;170(5):1435–44.
39. *Rius J., Guma M., Schachtrup C., Akassoglou K. et al.* NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha // *Nature*. 2008;453:807–11.
40. *Stehr S.N., Knels L., Weissflog C., Schober J. et al.* Effects of IGM-enriched solution on polymorphonuclear neutrophil function, bacterial clearance, and lung histology in endotoxemia // *Shock*. 2008;29:167–72.
41. *Taylor C.T., Colgan S.P.* Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches // *Nature*. 2017;17:774–85.
42. *Thompson A.A., Binham J., Plant T., Whyte M.K. et al.* Hypoxia, the HIF pathway and neutrophilic inflammatory responses // *Biol Chem*. 2013;394(4):471–7.
43. *Van Uden P., Kenneth N.S., Rocha S.* Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB // *Biochem J*. 2008;412:477–84.
44. *Vollger L., Akong-Moore K., Cox L., Goldmann O. et al.* Iron-chelating agent desferrioxamine stimulates formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in human blood-derived neutrophils // *Biosci Rep*. 2016;36(3):e00333.

## LIVER AND LUNG MORPHOLOGY AND PHAGOCYtic ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD CELLS DURING SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE IN MALE RATS WITH DIFFERENT RESISTANCE TO HYPOXIA

*D.Sh. Dzhililova, A.M. Kosyreva, M.E. Diatroptov, M.A. Makarova, O.V. Makarova*

Research Institute of Human Morphology, Moscow

Individual tolerance to hypoxia may determine the severity of inflammatory reactions, since hypoxia susceptible animals show elevated HIF-1 levels compared with hypoxia tolerant ones. HIF-1 is known to correlate with NF-kB regulating inflammatory responses.

The goals and objectives of the study are to characterize the morphological changes in the lungs and liver as well as the phagocytic activity of peripheral blood cells in the systemic inflammatory response induced by lipopolysaccharide (LPS) in animals with different hypoxic resistance.

The resistance of Wistar rats to hypoxia was determined in the barochamber by the gasping time at the altitude of 11,500 m. The systemic inflammatory response was modeled by intraperitoneal injection of LPS at a dose of 1.5 mg/kg.

After the administration of LPS, the number of neutrophils in the interalveolar septa of the lungs increased in both hypoxia tolerant and hypoxia susceptible rats. In tolerant animals, systemic inflammatory response in susceptible rats was more pronounced, which was expressed in dense infiltration of interalveolar septa with neutrophils, larger area of liver necrosis, higher levels of ALT, AST, serum C-reactive protein and corticosterone. The more prominent manifestations of the systemic inflammatory response in hypoxia susceptible rats were accompanied by the activation of peripheral blood phagocytes. In hypoxia tolerant animals after LPS administration, the increased relative number of granulocytes in the peripheral blood with unchanged phagocytosis activity was detected.

The obtained data should be considered in the development of new approaches to the therapy of infectious and inflammatory diseases, taking into account the individual sensitivity to oxygen content.

*Key words:* hypoxia, individual resistance, lipopolysaccharide, inflammation

### Информация об авторах

Джалилова Джулия Шавкатовна – младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 906 715 7024. E-mail: juliajal93@mail.ru

Косырева Анна Михайловна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Диатроптов Михаил Евгеньевич – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Макарова Мария Александровна – младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Макарова Ольга Васильевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

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

*Материал поступил в редакцию 15 февраля 2019 года*

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-56-62

УДК: 616-091.8

# ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА И АУТОФАГИИ В ПЕРЕВИТОЙ САРКОМЕ-45 У КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ФЛАВОНОИДСОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*GRATIOLA OFFICINALIS* L.)

Н.А. Наволокин, Г.Н. Маслякова, Д.А. Мудрак, Н.В. Полуконова,  
Е.С. Воронина, А.Б. Бучарская

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Минздрава России

Цель исследования – в экспериментах *in vivo* установить механизмы патоморфоза перевитой саркомы под влиянием флавоноидсодержащего экстракта аврана. Эксперимент проводили на 60 самцах крыс линии Вистар с перевитой саркомой-45. В опытных группах крысы через 72 часа после перевивки на протяжении 14 суток получали экстракт аврана перорально или внутримышечно в дозе 110 мг/кг/сут и затем выводились из эксперимента. Группу сравнения составили животные с опухолью, но без воздействия. Проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование опухолевой ткани с маркерами апоптоза (p53, bax, bcl-2, Fas-receptor, Fas-ligand), аутофагии LC3b, пролиферации Ki67 и ангиогенеза VEGF. При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения групп использовали критерий Крамера–Уэлча (T). Под влиянием экстракта аврана развивается выраженный патоморфоз перевитой саркомы-45. В опухоли разрастается фиброзная ткань, снижается пролиферация, ангиогенез и активизируются сигнальный и митохондриальный пути апоптоза, а также блокируется протекторная аутофагия. Маркер аутофагии LC3b может использоваться в качестве дополнительного критерия оценки лечебного патоморфоза опухолей.

*Ключевые слова:* биофлавоноиды, патоморфоз, саркома-45, *Gratiola officinalis*, апоптоз, аутофагия

Смертность от онкологических заболеваний продолжает расти, и, к сожалению, современные методы лечения не всегда оказываются эффективными [3]. Кроме того, применяемые противоопухолевые средства имеют ряд побочных действий: токсическое влияние на органы и ткани организма, развитие у опухолей к ним резистентности [1]. В связи с этим остается актуальным поиск новых, более безопасных и эффективных лекарственных средств.

Лекарственные средства растительного происхождения обладают минимальным количеством побочных эффектов, что обуславливает приоритетность их разработки. Препараты на их основе могут использоваться не только для лечения опухолей при монотерапии, но и в комплексном лечении при проведении стандартного

курса химио- и лучевой терапии для защиты нормальных клеток [1, 3].

В 2011 году у растительного флавоноида вогонина была выявлена способность активизировать апоптоз в опухолевых клетках [10]. Это обстоятельство активизировало поиск других биофлавоноидов, обладающих противоопухолевой активностью.

Ранее на животных с перевиваемыми опухолями было показано, что флавоноидсодержащий экстракт аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) наряду с малой токсичностью обладает противоопухолевой активностью в отношении перевиваемого рака печени, почки [8, 9], а также другими биологическими свойствами [13]. Тем не менее детальное изучение механизмов гибели опухолевых клеток перевиваемой саркомы с

применением иммуногистохимических маркеров под действием экстракта аврана ранее не проводилось.

Цель исследования – в экспериментах *in vivo* установить механизмы патоморфоза перевитой саркомы под влиянием флавоноидсодержащего экстракта аврана.

### Материалы и методы

Экстракты были получены нами авторским способом, позволяющим существенно повысить экстракцию биофлавоноидов и предусматривающим минимальный выход токсичных соединений – алкалоидов, гликозидов и т.д. [11]. Экстракт из аврана лекарственного, полученный данным способом, имеет следующий химический состав: 4-винил-2-метоксифенол; 2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4он; 2,3-дигидробензофуран; 3-фуранкарбоновая кислота; 5-гидроксиметил-2-фуральдегид; этил-а-d-рибозид; 4-пропилфенол; пирокатехин; L-люксоза (пентоза); 6-деоксигексоза L-галактоза; бензоилуксусной кислоты этиловый эфир; пальмитиновая кислота; гомованилиновая кислота; глюкоза; 1,4-ангидро-d-маннитол; бензойная кислота; кверцетин [11].

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований, не противоречащих Женевской конвенции 1985 года о Международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных. Тема и описание экспериментов одобрены этической комиссией СГМУ им. В.И. Разумовского (протокол № 13 от 3 мая 2011 года). Исследование проведено на базе Центра коллективного пользования НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им В.И. Разумовского.

Исследование проводили в соответствии с руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [4]. В работе было использовано 60 самцов белых лабораторных крыс линии Вистар массой 150±20 граммов, которым подкожно, в область лопатки, имплантировали по 0,5 мл 25% опухолевой взвеси саркомы-45 в растворе Хэнкса. Животные с перевиваемой саркомой-45 методом случайной выборки были разделены на три группы по 20 крыс: первую и вторую опытные, получавшие водный раствор сухого экстракта аврана перорально или внутримышечно в одинаковой дозировке 110 мг/кг и третью – группу сравнения (животные с перевиваемой опухолью, но без воздействия). В опытных группах крысам раствор экстракта вводили перорально или внутримышечно, ежедневно, в течение 2 недель. Начинали вводить экстракт через 72 часа после трансплантации опухоли. По окончании опыта (через 2 недели) крыс выводили из эксперимента и для дальнейшего исследования проводили забор образцов ткани органов, опухоли.

Использовали показатель торможения роста опухоли (ТРО), свидетельствующий об эффективности

противоопухолевого препарата. Вычисляли его по формуле:

$$\text{ТРО} = [(M_{\text{контр}} - M_{\text{опыт}}) / M_{\text{контр}}] \times 100\%,$$

где  $M_{\text{контр}}$  – средняя масса опухоли в группе контроля, а  $M_{\text{опыт}}$  – опытной группы (оценивали массу опухоли в конце эксперимента).

Для изучения патоморфоза опухоли использовали морфологические и морфометрические методы, гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. При иммуногистохимическом исследовании применяли систему детекции REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System с антителами фирмы ABCAM (Великобритания) в разведении к антителу от 1:50 до 1:100. Использовали следующую панель моно- и поликлональных антител: маркеры апоптоза (p53 (clone PAb 1801, ab28), bax (clone 100/D5, ab692), bcl-2 (ab54829), Fas-receptor (ab15285), Fas-ligand (ab82419) для установки его возможного пути реализации, аутофагии LC3b (ab48394) для уточнения роли этого процесса в механизме гибели клеток опухоли, маркер пролиферации Ki67 (clone SP6, ab16667) и ангиогенеза VEGF (clone JH121, ab28775). При окраске с иммуногистохимическими маркерами учитывали положительный и отрицательный контроль для исключения ложноотрицательных и ложноположительных результатов, окрашивание на каждый маркер проводилось для всех образцов тканей одновременно для создания стандартизации условий окраски и повышения объективности полученных результатов. Подсчитывали процент экспрессирующих клеток в 10 полях зрения каждого микропрепарата, а также степень выраженности иммуногистохимических реакций: слабая (+), умеренная (++) и выраженная (+++). Учитывали наличие дистрофических и некротических изменений, а также такие цитоморфометрические показатели как диаметр опухолевых клеток, ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ), среднее количество клеток в поле зрения (под термином «среднее» принимали медиану). Все морфометрические исследования проводили с помощью микровизора медицинского проходящего света  $\mu$ Vizo-103 (ЛОМО) при  $\times 774$  не менее чем в 10 полях зрения.

При статистической обработке данных нормальность распределения показателей в группах была проверена при помощи критерия Шапиро–Уилка. При непараметрическом распределении значимость различий определяли при помощи критерия Манна–Уитни (Z-критерий) с вычислением медианы, 25 и 75 перцентилей, максимума и минимума. При данном методе отличия между группами определяются при  $Z \geq 1,96$  и  $p < 0,05$  с вероятностью в 95%. Весь статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel.

**Результаты**

В группе сравнения перевитая саркома-45 макроскопически имела вид одного или нескольких узлов. Масса опухоли на конец эксперимента составила 18,8±6,43 грамма. При введении экстракта наблюдали резкое замедление темпов роста опухоли и в конце эксперимента в группе с внутримышечным введением она была меньше на 70,6% (6,6±2,8 грамма), а при пероральном введении – на 65,7% (6,4±5,0 грамма), чем в группе сравнения. Максимально индекс торможения по массе опухоли при внутримышечном введении составил 84,2%. В двух случаях на конец эксперимента макроскопически привитая опухоль не определилась.

Микроскопически в группе животных без воздействия экстракта опухоль представляла собой веретеноклеточный вариант саркомы и состояла из плотно расположенных пучков веретеновидных вытянутых клеток разных размеров и формы, распространяющихся в разных направлениях.

Ядра были гиперхромными, овально-округлыми, веретенообразными, хроматин распределялся в виде зернистых скоплений. Фигур митозов насчитывали до трех в поле зрения (рис. 1 А). Для цитоплазмы клеток саркомы-45 была характерна повышенная базофилия. Опухоль была окружена периферической капсулой с полнокровными сосудами, в ее центре наблюдали в единичных случаях очаги дистрофически измененных клеток и микронекрозы, обусловленные ее быстрым ростом.

В группах животных при обоих способах введения экстракта отмечали патоморфоз опухоли 2–3-й степени на 14-й день после начала введения: обширные зоны некроза, выраженная степень дистрофии в живых клетках, участки фиброза и дезорганизации соединительной ткани. Появлялась четкая граница между некрозом и сохранной тканью опухоли, площадь некроза составляла от 80 до 90% площади среза.

При проведении морфометрии как при внутримышечном, так и при пероральном введении экстракта

наблюдали значимое снижение числа клеток в поле зрения (при ×774,4) – в 1,7 раза и увеличение клеток в состоянии некроза и некробиоза (табл. 1).

Выявили уменьшение диаметра ядра и диаметра клетки в 1,5–1,6 раза при обоих способах введения, в отличие от группы сравнения, что свидетельствовало об атрофических изменениях в клетках под действием экстракта. При этом значение ядерно-цитоплазматического индекса также уменьшалось, в отличие от группы сравнения, в 1,3 раза при внутримышечном введении экстракта и в 1,2 раза при пероральном (табл. 1).

При окраске саркомы-45 методом ОКГ в группе сравнения между опухолевыми клетками выявляли тонкие прослойки соединительной ткани. При обоих путях введения экстракта наблюдали появление участков фиброза самой ткани опухоли без развития предшествующего некроза (рис. 1 Г).

При иммуногистохимическом исследовании саркомы-45 в экспериментальных группах при обоих путях введения экстракта маркер пролиферации Ki67 давал очень слабую экспрессию – индекс пролиферации при внутримышечном пути введения составил 1% и при пероральном пути 9%, в отличие от группы сравнения (без воздействия экстракта), где индекс пролиферации составлял 56% (рис. 1 Б). При этом больше половины клеток в поле зрения давало выраженную экспрессию (табл. 2).

При окраске с маркером EGFR в группе сравнения отмечали умеренную, но распространенную цитоплазматическую экспрессию рецептора эпидермального фактора роста. В экспериментальных группах при обоих путях введения экстракта отмечали очень слабую экспрессию в единичных клетках.

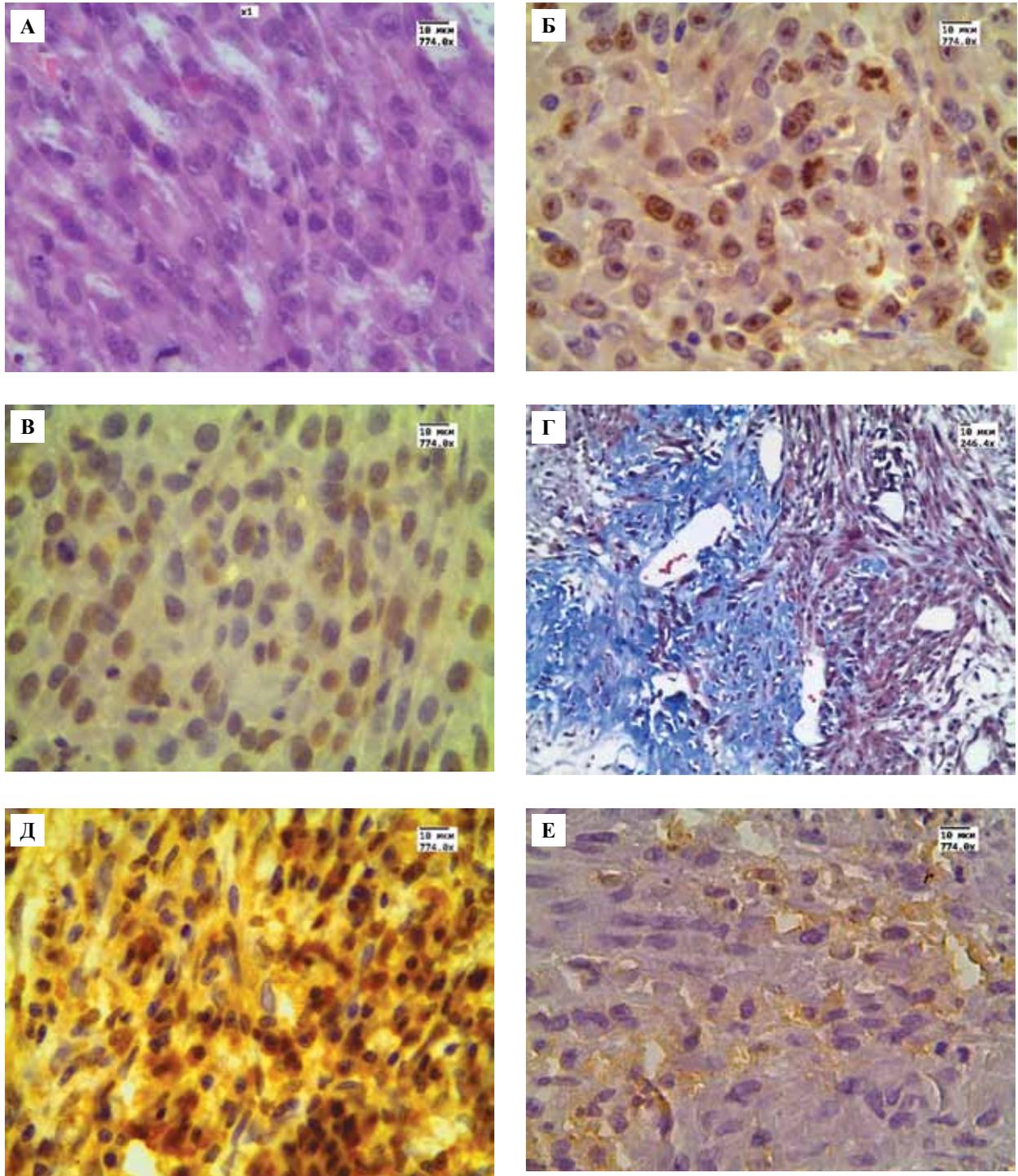
При оценке экспрессии маркера ангиогенеза VEGF в ткани саркомы-45 группы сравнения наблюдали его умеренную цитоплазматическую экспрессию. При пероральном введении экстракта в зоне повреждения опухоли отмечали очаговую и слабую экспрессию маркера

Таблица 1

**Морфометрические показатели клеток саркомы-45 на конец эксперимента**

Группа	Показатели				
	число клеток в поле зрения (×768)	диаметр ядра	диаметр клетки	ЯЦИ	число некротических клеток в поле зрения
	Медиана; (квартиль 25–75); [min-max]				
Группа сравнения	97,5 (86–109) [83–111]	0,012 (0,010–0,013) [0,010–0,014]	0,021 (0,018–0,024) [0,017–0,025]	0,69 (0,061–0,072) [0,058–0,074]	1,5 (0–2) [0–4]
Экстракт аврана внутримышечно	<b>55,3*</b> (48–61) [44–63]	<b>0,0078*</b> (0,007–0,0082) [0,007–0,0084]	<b>0,014*</b> (0,011–0,014) [0,010–0,016]	<b>0,57*</b> (0,045–0,063) [0,045–0,066]	37,4* (30–38) [29–39]
Экстракт аврана перорально	<b>57,1*</b> (47–62) [45–64]	<b>0,0087*</b> (0,007–0,009) [0,006–0,01]	<b>0,014*</b> (0,011–0,013) [0,010–0,015]	<b>0,58*</b> (0,048–0,064) [0,046–0,071]	38,9* (33–40) [31–41]

\* – различия между экспериментальной группой и группой сравнения достоверны на уровне p<0,05 и z >|2|



*Рис. 1.* Морфология опухоли и экспрессия маркеров пролиферации, апоптоза и аутофагии.

А – группа сравнения, окраска гематоксилином и эозином

Б – экспрессия Ki67 в группе сравнения

В – экспрессия p53 при пероральном введении экстракта аврана

Г – склероз стромы опухоли при пероральном введении экстракта аврана, окраска оранжевым Ж, красным 2С, голубым

Д – экспрессия CD95 (Fas/APO-1) при внутримышечном введении экстракта аврана

Е – экспрессия LC3B при пероральном введении экстракта аврана

А–В, Д–Е –  $\times 774$ , Г –  $\times 246$

ангиогенеза VEGF, а при внутримышечном введении экстракта экспрессия маркера ангиогенеза в опухоли отсутствовала.

При оценке супрессора опухолевого роста p53 выявили отсутствие экспрессии в группе сравнения, а после введения экстракта – появление в клетках опухоли умеренной как цитоплазматической, так и ядерной экспрессии маркера p53. Данная реакция была наиболее выражена в зонах наибольшего повреждения опухоли и в клетках с более конденсированным хроматином. При внутримышечном введении экстракта количество экспрессирующих клеток достигало 69% (преобладала выраженная экспрессия), а при пероральном пути – 39% (слабая экспрессия) (рис. 1 В).

При окрашивании цитоплазматическим маркером активации апоптоза Вах в клетках саркомы-45 в группе сравнения наблюдали отрицательную реакцию, как и при пероральном введении экстракта. При внутримышечном введении отмечали слабую и умеренную экспрессию маркера более чем в 90% клеток. Кроме того, экспрессия данного маркера при внутримышечном введении наблюдалась в уже погибших клетках, что может служить подтверждением гибели клеток опухоли через апоптоз (табл. 2).

При окрашивании на маркеры апоптоза CD95 (Fas/APO-1) и FAS-ligand в группе сравнения отмечали отрицательную реакцию, а в экспериментальных группах при обоих способах введения экстракта – выраженную цитоплазматическую экспрессию (рис. 1 Д).

При оценке маркера аутофагии LC3b в клетках саркомы-45 в группе сравнения и при внутримышечном введении экстракта положительная экспрессия отсутствовала, а при пероральном введении слабая экспрессия наблюдалась только в отдельных полях зрения (рис. 1 Е).

**Обсуждение**

После введения животным экстракта аврана в опухолевой ткани развивался выраженный патоморфоз с образованием обширных очагов некроза, фиброза и дистрофических изменений опухолевых клеток. Качественно изменялась экспрессия изученных маркеров: уменьшалась экспрессия Ki67, EGFR, VEGF и увеличивалась экспрессия маркеров программированной гибели клеток: апоптоза (p53, Вах, CD95(Fas/APO-1), FAS-ligand) и аутофагии (LC3b). Следует отметить, что количественные изменения экспрессии маркеров не противоречат друг другу и согласуются с данными об апоптотической активности флавоноидов, полученными другими авторами в экспериментах *in vitro* [13].

Обращало на себя внимание, что экспрессия маркеров активации апоптоза наблюдается даже в безъядерных клетках. Это позволило предположить, что обширные поля безъядерных клеток, появляющиеся в опухоли под действием экстракта, формируются путем гибели их не через механизм некроза, а через апоптоз. Подтверждается это не только иммуногисто-

**Экспрессия иммуногистохимических маркеров в группе сравнения и экспериментальных группах под действием экстракта аврана**

Маркер	Группы		
	сравнения	внутримышечное введение экстракта	пероральное введение экстракта
% положительно экспрессирующих клеток			
Индекс пролиферации (Ki67)	56 (47–62) [44–63] +++	<b>1±0,4*</b> (0–2) [0–3] +	<b>9±0,1*</b> (5–15) [3–16] +
Маркер EGFR	92 (75–96) [70–97] +/++	<b>0*</b>	<b>0*</b>
Маркер ангиогенеза (VEGF)	85 (72–89) [65–92] ++	<b>0*</b>	<b>5</b> (3–6) [2–11] +
Маркер аутофагии (LC3B)	0	0	<b>11</b> (8–15) [6–19] +
p53	0	<b>67*</b> (51–81) [49–86] +++	<b>36*</b> (32–43) [31–46] +
Вах	0	<b>68*</b> (45–82) [42–88] +/++	0
CD95 (Fas/APO-1)	0	<b>44,7*</b> (40–51) [39–53] ++	<b>41,6*</b> (37–50) [30–52] ++
FAS-ligand	0	<b>40,3*</b> (31–42) [30–45] +++	<b>38,7*</b> (31–48) [29–49] +++

\* – различия между экспериментальной группой и группой сравнения достоверны на уровне  $p < 0,05$  и  $z > |2|$

+, ++, +++ – степень выраженности экспрессии (слабая, умеренная и выраженная)

химическими маркерами, но и следующими морфологическими изменениями: уменьшение размеров клеток, сохранность мембраны клеток (при отсутствии ядра), отсутствие признаков реактивного воспаления в опухоли. Также это согласуется с низким содержанием продуктов перекисного окисления липидов у животных с опухолями на фоне введения экстракта аврана и отсутствием признаков интоксикации у крыс, которые должны бы были появиться, если бы в опухоли развивались массивные очаги некроза [8, 9].

Нами было выявлено, что в опухолевых клетках развивается аутофагия, и частота ее развития зависит от пути введения экстракта. Установлено, что аутофагия развивается в опухолевых клетках только при пероральном пути введения аврана и не наблюдается при внутримышечном введении, что, скорее всего, связано с большей биодоступностью и, следовательно, большей концентрацией экстракта в опухоли при данном пути введения. Аутофагия не диагностировалась и в группе сравнения. Этот факт позволяет предположить, что аутофагия действительно развивается как защитный механизм опухолевой клетки при действии повреждающего агента (в данном случае – противоопухолевого средства). В литературе нет однозначного мнения о появлении признаков аутофагии в опухолевых клетках. Некоторые авторы говорят о более благоприятном прогнозе для пациентов при появлении аутофагов в опухолевых клетках [12, 15], однако большинство исследователей считают, что экспрессия LC3b связана с худшим прогнозом течения заболевания [6, 7, 14]. Мнения всех специалистов сходятся в том, что аутофагия может развиваться в клетках (в том числе опухолевых) как защитный механизм в ответ на лечение [5–7, 12, 14, 15]. Следовательно, нельзя исключить, что появление факта аутофагии может считаться признаком развития резистентности опухоли к действию препаратов из-за недостаточной дозировки, и это необходимо учитывать при оценке степени патоморфоза и определения дальнейшей тактики лечения пациентов.

## Выводы

Патоморфоз саркомы-45 после курса введения экстракта аврана в дозе 110 мг/кг проявляется в виде развития выраженных некробиотических и атрофических изменений в опухолевых клетках (уменьшение размеров ядра и клетки в 1,5 раза, снижение пролиферативной активности (Ki-67), исчезновении фигур митозов и переходе клеток в состояние G0, снижении экспрессии маркера ангиогенеза (VEGF).

Механизм противоопухолевой активности экстракта аврана реализуется через активацию апоптоза в клетках саркомы. При этом происходит активация как митохондриального (белки p53, BAX), так и внешнего рецепторного пути через белки CD95 (Fas/APO-1) и FAS-ligand.

Все описанные процессы развиваются более интенсивно (в 1,5–2 раза) при внутримышечном введении аврана. В опухолевых клетках при недостаточной концентрации экстракта при его пероральном введении развивается цитопротекторная аутофагия, а при внутримышечном происходит ее блокирование.

Маркер аутофагии LC3b может использоваться в качестве дополнительного критерия оценки лечебного патоморфоза опухолей, так как отражает эффективность терапии.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России «Исследование экстрактов лекарственных растений, содержащих флавоноиды, и их фракций с целью создания препаратов, обладающих противоопухолевой, антиоксидантной, антикахексической и другой активностью» и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-015-00298.*

## Литература/References

1. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н., Крылова С.Г., Гольдберг В.Е. Растения в комплексной терапии опухолей М.: Издательство РАМН, 2008. С. 180–190 [Gol'dberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P., Amosova E.N., Krylova S.G., Gol'dberg V.E. Plants in the treatment of tumors М.: Izdatel'stvo RAMN, 2008. P. 180–190 (In Russ.)].
2. Горбунова В.А. Новые подходы в лекарственном лечении сарком мягких тканей // Поволжский онкологический вестник. 2012 № 2. С. 25–34 [Gorbunova V.A. Novye podhody v lekarstvennom lechenii sarkom myagkikh tkanej // Povolzhskij onkologicheskij vestnik. 2012. V. 2. P. 25–34 (In Russ.)].
3. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой терапии. М.: Практическая медицина, 2006. 190 с. [Korman D. B. Osnovy protivopukholevoi terapii. М.: Prakticheskaya meditsina, 2006. 190 p. (In Russ.)].
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Мироннова. М.: Гриф и К., 2012. 944 с. [Guidelines for conducting pre-clinical trials of drugs. Part one / Pod red. A.N. Mironova. М.: Grif i K., 2012. 944 p. (In Russ.)].
5. Dokladny K., Zuhl M.N., Mandell M., Bhattacharya D. et al. Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: heat shock response and autophagy // Journal of Biological Chemistry. 2013;288:14959–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462408>
6. Lai K., Mathews S., Wilmott J.S., Killingsworth M.C. et al. Differences in LC3B expression and prognostic implications in oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma patients // BMC Cancer. 2018;18:624. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4536-x>
7. Liu J.L., Chen F.F., Lung J., Lo C.H. et al. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma // Br J Cancer. 2014;111:944–54. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.355>
8. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B. et al. Effect of extracts of Gratiola officinalis and Zea mays on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with transplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012;2(1):0203. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2012.0203>
9. Navolokin N.A., Mudrak D.A., Bucharskaya A.B., Matveeva O.V. et al. Effect of flavonoid-containing extracts on the growth of transplanted sarcoma 45, peripheral blood and bone marrow condition after oral and intramuscular administration in rats // Russian Open Medical Journal. 2017;6(3):e0304. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2017.0304>
10. Polier G., Ding J., Konkimalla B.V., Eick D. et al. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apop-

- tosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1 // Cell Death Dis. 2011;2:e182. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.66>
11. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B. et al. A new extraction method of bioflavonoids from poisonous plant (*Gratiola officinalis* L.) // Russian Open Medical Journal. 2014;3(3):304. <https://doi.org/10.15275/rusomj.2014.0304>
  12. Tang J.Y., Hsi E., Huang Y.C., Hsu N.C. et al. High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma // Hum Pathol. 2013;44:2558–62. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.06.017>
  13. Tkachenko N., Pravdin A., Terentyuk G., Navolokin N. et al. Inhibitor of photodynamic haemolysis by *Gratiola officinalis* L. Extract // SPIE Proceedings. 2015;9448:94480. <https://doi.org/10.1117/12.2179862>
  14. Wu D.H., Jia C.C., Chen J., Lin Z.X. et al. Autophagic LC3B overexpression correlates with malignant progression and predicts a poor prognosis in hepatocellular carcinoma // Tumour Biol. 2014;35:12225–33. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2531-7>
  15. Yang Z., Ghoorun R.A., Fan X., Wu P. et al. High expression of Beclin-1 predicts favorable prognosis for patients with colorectal cancer // Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2015;39:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.06.014>

## EXPRESSION OF MARKERS OF APOPTOSIS AND AUTOPHAGIA IN TRANSPLANTED SARCOMA-45 IN RATS IN CASE OF ADMINISTRATION OF FLAVONOID-CONTAINING EXTRACT OF *GRATIOLA OFFICINALIS* L.

N.A. Navolokin, G.N. Maslyakova, D.A. Mudrak, N.V. Polukonova, E.S. Voronina, A.B. Bucharskaya

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov

The aim of the study was to determine the mechanisms of pathomorphosis of transplanted sarcoma 45 under the influence of the flavonoid-containing extract of *Gratiola officinalis* in experiments in vivo. Materials and methods. The experiment was carried out on 60 male Wistar rats with transplanted sarcoma 45. The rats received the *Gratiola officinalis* extract orally or intramuscularly 72 hours after the inoculation for 14 days at a dose of 110 mg/kg/day and then were removed from the experiment. The comparison group comprised untreated animals with a tumor. The histological and immunohistochemical examination of tumor tissue was performed using markers of apoptosis (p53, bax, bcl-2, Fas-receptor, Fas-ligand), autophagy (LC3b), proliferation (Ki67) and angiogenesis (VEGF). The normality of the distribution was verified using the Shapiro-Wilk test. The Cramer-Welch criterion (T) was used for comparison of groups. Results. The pronounced pathomorphological changes in sarcoma-45 were revealed under the influence of *Gratiola officinalis* extract. Fibrous tissue expansion, decreased proliferation and angiogenesis, activation of mitochondrial signaling of apoptosis as well as blocking protective autophagy were found in the tumor. The LC3b autophagy marker can be used as an additional criterion for pathomorphological analysis of treated tumors.

*Key words:* bioflavonoids, pathomorphosis, sarcoma 45, *Gratiola officinalis*, apoptosis, autophagy

### Информация об авторах

Наволокин Никита Александрович – ассистент кафедры патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410049, Саратов, 3-й Кавказский тупик, д. 7а, кв. 29. Телефон 8 903 045 8463. E-mail: [nik-navolokin@yandex.ru](mailto:nik-navolokin@yandex.ru)

Маслякова Галина Никифоровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410012, Саратов, ул. Университетская, д. 56, кв. 42. Телефон 8 (8452) 996 75. E-mail: [gmaslyakova@yandex.ru](mailto:gmaslyakova@yandex.ru)

Мудрак Дмитрий Андреевич – ассистент кафедры патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410009, Саратов, ул. Цветочная, д. 1, кв. 116. Телефон 8 967 506 3525. E-mail: [хурпр-wh@mail.ru](mailto:хурпр-wh@mail.ru)

Полуконова Наталья Владимировна – доктор биологических наук, профессор, кафедра общей биологии, ботаники и фармакогнозии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410012, Саратов, ул. Большая казачья, д. 112. Телефон 8 960 344 6347. E-mail: [polukonovanv@yandex.ru](mailto:polukonovanv@yandex.ru)

Воронина Елена Сергеевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410012, Саратов, ул. Большая казачья, д. 112. Телефон 8 903 021 5216. E-mail: [lenchicves@mail.ru](mailto:lenchicves@mail.ru)

Бучарская Алла Борисовна – кандидат биологических наук, руководитель ЦКП НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии СГМУ им. В.И. Разумовского.

Адрес: 410000, Саратов, ул. Клиническая, д. 5. Телефон 8 905 385 0895. E-mail: [allaalla\\_72@mail.ru](mailto:allaalla_72@mail.ru)

Материал поступил в редакцию 18 октября 2018 года

© Коллектив авторов, 2019

DOI: 10.31088/2226-5988-2019-29-1-63-70

УДК 612.345; 616.379

# МИГРАЦИЯ НЕЙРОБЛАСТОВ И ФОРМИРОВАНИЕ ПАТТЕРНА ПЕРВИЧНЫХ НЕРВНЫХ СВЯЗЕЙ У *XENOPUS LAEVIS*

*С.В. Савельев, Н.В. Бесова, Е.С. Савельева, В.И. Гулимова*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Исследованы миграция нейробластов на стадии нейруляции и образование первичного паттерна нервных связей головного мозга у шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). В экспериментах было использовано 129 зародышей от стадии формирования нервной пластинки до начала активного питания вылупившихся личинок. Для исследования миграции нейроэпителиальных клеток во время нейруляции проводили внутриклеточное маркирование отдельных нейробластов при помощи проционовых красителей RS и B2BS. После формирования нервной трубки и начала дифференцировки нейронов клетки, содержащие краситель, выявляли методом флуоресцентной микроскопии. В обнаруженные клетки при помощи микроэлектрода ионофоретически вводили второй краситель – люциферовый желтый СН. Он заполнял тела и отростки нейронов, что позволило выявить паттерн связей головного мозга. Установлено, что первичные связи формируются между клетками, происходящими из нескольких клонов, которые разобщаются за счет интеркаляции эпидермального и гиподермального слоев нейроэктодермы, пролиферации и миграции нейробластов.

*Ключевые слова:* нейробласты, миграция клеток, формирование паттерна, развитие мозга, нейронные связи

Экспериментальные исследования эмбрионального развития нервной системы в настоящее время активно проводятся на моделях, хорошо изученных как в морфологическом, так и в генетическом плане. Среди них наиболее удобны зародыши амфибий, которые обладают крупными клетками и независимым от родителей развитием [5]. В эмбриональном развитии бесхвостых амфибий проходящих метаморфоз, есть несколько особенностей, которые стали причиной проведения данной работы. Во время личиночного развития у лягушек происходит формирование временной нервной системы, обеспечивающей выживание и рост особи [4, 7]. Эта нервная система нужна только в эмбриональный период и необходима для обслуживания органов, которые отсутствуют у взрослых животных. Такие временные адаптации носят приспособительный или ценогенетический характер, а их функционирование связано лишь с эмбриональным и личиночным развитием. Эти эмбриональные приспособления нервной системы исчезают после прохождения метаморфоза.

Следовательно, во время индивидуального развития у метаморфизирующих амфибий существует две конструкции нервной системы. Первой появляется эмбриональная, которая нужна для выполнения временных личиночных функций. Пока временная эмбриональная

нервная система выполняет свои задачи, развивается «взрослая» нервная система для функционирования после метаморфоза. Это условное разделение общей нервной системы имеет большое биологическое значение, поскольку нейроны, принимающие участие в ценогенетических адаптациях, чаще всего просто погибают [8, 10]. Примером могут служить парные маутнеровские нейроны заднего мозга личинок амфибий. Они являются двигательными нейронами и управляют всем движением хвоста. Во время метаморфоза хвост исчезает, а маутнеровские нейроны фагоцитируются своим окружением.

По этой причине ранее была высказана гипотеза об общем происхождении всего пула нейронов, выполняющих ценогенетические функции [1, 2]. Предполагалось, что, происходя из общего клона клеток, эти нейробласты мигрируют, первыми выходят в дифференцировку, а затем между собой устанавливают первичный паттерн нервных связей [4, 10]. Для проверки этой гипотезы и выполнена настоящая работа. На первом этапе было проведено маркирование нейробластов нервной пластинки и отслеживание их миграций. На втором этапе маркированные нейроны выявляли в нервной трубке и вторично маркировали для выявления паттерна первичных нервных связей. Если связи будут формироваться между нейробласта-

ми, мечеными на стадии нервной пластинки, то гипотеза общего клонального источника верна [12, 13]. При формировании первичного паттерна нервных связей как между мечеными, так и немечеными нейронами сделанное предположение подвергнется сомнению.

**Материалы и методы**

Работа выполнена на 129 эмбрионах шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*), полученных в условиях лабораторного разведения. В экспериментах использовали зародыши от стадии нейруляции до начала активного питания. Для исследования миграции нейроэпителиальных клеток применяли маркирование проционовыми красителями RS и B2BS. Внутриклеточное введение красителей проводили при помощи микроманипулятора Leitz (Германия) и электродов, подсоединенных к микроинъекционной системе. Маркирование осуществляли на стадии ранней нейрулы, когда большие размеры клеток позволяли в 45% случаев проводить удачные инъекции проционовых красителей. Меченые нейробласты отслеживали во время развития на поверхности нейруляционной пластинки до стадии 19–20 [3, 9] при помощи флуоресцентных микроскопов Leitz II Pol BK (Германия) и «Люам И-3» (Россия). Относительно безопасного для клеток объема

красителя иногда хватало для обнаружения меченых потомков нейробластов после 4–6 делений. Следы флуоресценции обнаруживали перед вылуплением зародышей из икринок в вышедших из пролиферации и мигрировавших к поверхности мозга нейронах. На стадиях 32–38 [3] после обнаружения меченой клетки в нее вводили микроэлектрод и ионофоретически подавали краситель. Для заполнения тел и отростков клеток использовали люциферовый желтый СН. Заполнение нейронов красителем продолжали от 2 до 9 часов. К сожалению, заполнить красителем отдельный нейрон удавалось только в 30% операций. Как правило, краситель поступал в несколько отростков и распространялся по ним. После инъекции зародыши переживали от 2 до 3 суток, а затем подвергались фиксации в 10% нейтральном формальдегиде. Введение люциферового желтого проводили в разные отделы дифференцирующегося головного мозга, как показано на схеме (рис. 1 В), где были обнаружены маркированные во время нейруляции клетки (рис. 1 Г, рис. 2). Они были выявлены в переднем, среднем и заднем мозге. На схеме (рис. 3) показаны области и число введений, которое соответствует числу синих меток. Фиксированные в 10% формальдегиде зародыши пропитывали 30% сахарозой и получали криостатные срезы. Сагит-

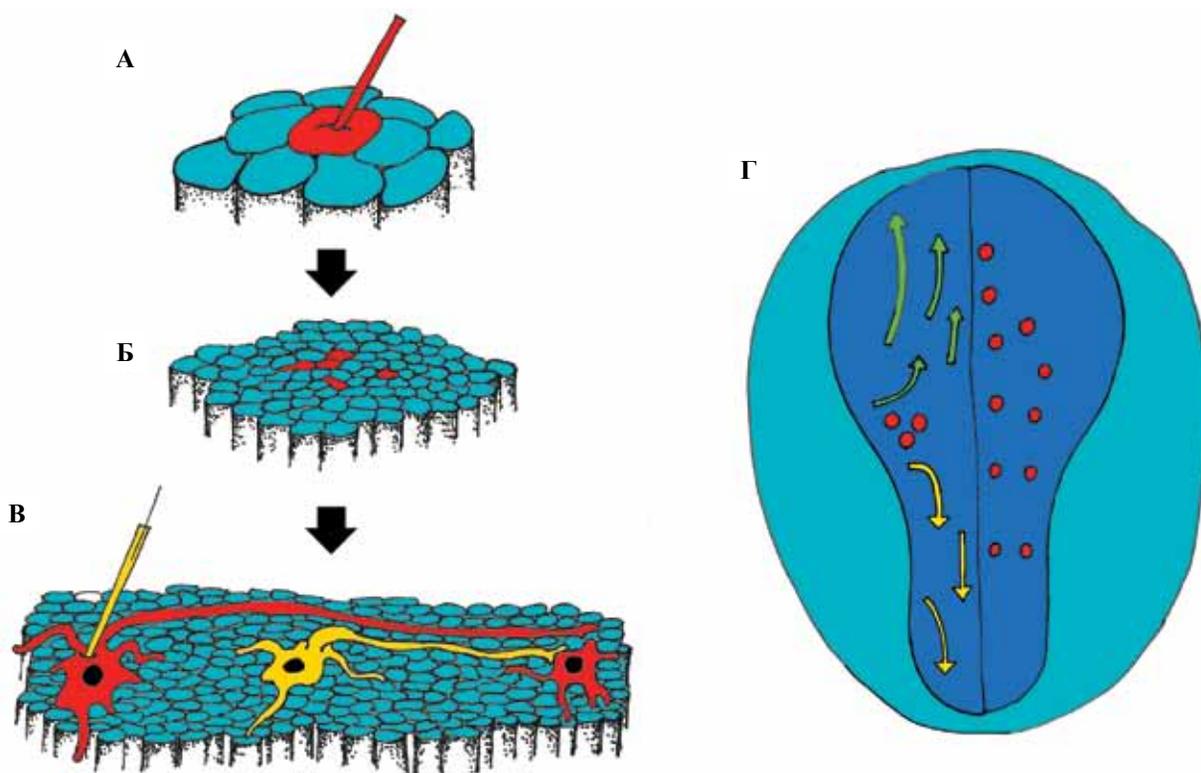


Рис. 1. Схема проведенных экспериментов и основные направления перемещения нейробластов на стадии нервной пластинки.

А – введение проционовых красителей на стадии нервной пластинки;

Б – перемешивание и миграция нейроэпителиальных клеток после интеркаляции; В – введение люциферового желтого СН в дифференцирующиеся нейроны на поверхности нервной трубки и ионофоретическое заполнение красителем их отростков;

Г – направление перемещения меченых клеток во время нейруляции

тальные срезы толщиной 20–25 мкм заключали в глицерин или полиэтиленгликоль с молекулярной массой 4000–6000. Маркированные нейробласты и нейроны исследовали при помощи флуоресцентного микроскопа в сочетании с использованием методов интерференции в поляризованном свете, фазового контраста и темного поля.

### Результаты

В случае удачного введения проционового маркера на стадии нервной трубки были хорошо заметны

группы и одиночные клетки, содержащие краситель (рис. 2). Необходимо отметить, что нейроэпителий зародышей шпорцевой лягушки двуслон. Маркированию подвергались только клетки эпидермального слоя, лежащего на поверхности нервной пластинки. Непосредственно после нейруляции происходит встречное вытягивание отростков нейробластов эпидермального и гиподермального слоев нервной пластинки. Результатом встречной интеркаляции становится монослойный эпителий, характерный для большинства позвоночных. Меченые клетки закрепляются как на базальной, так

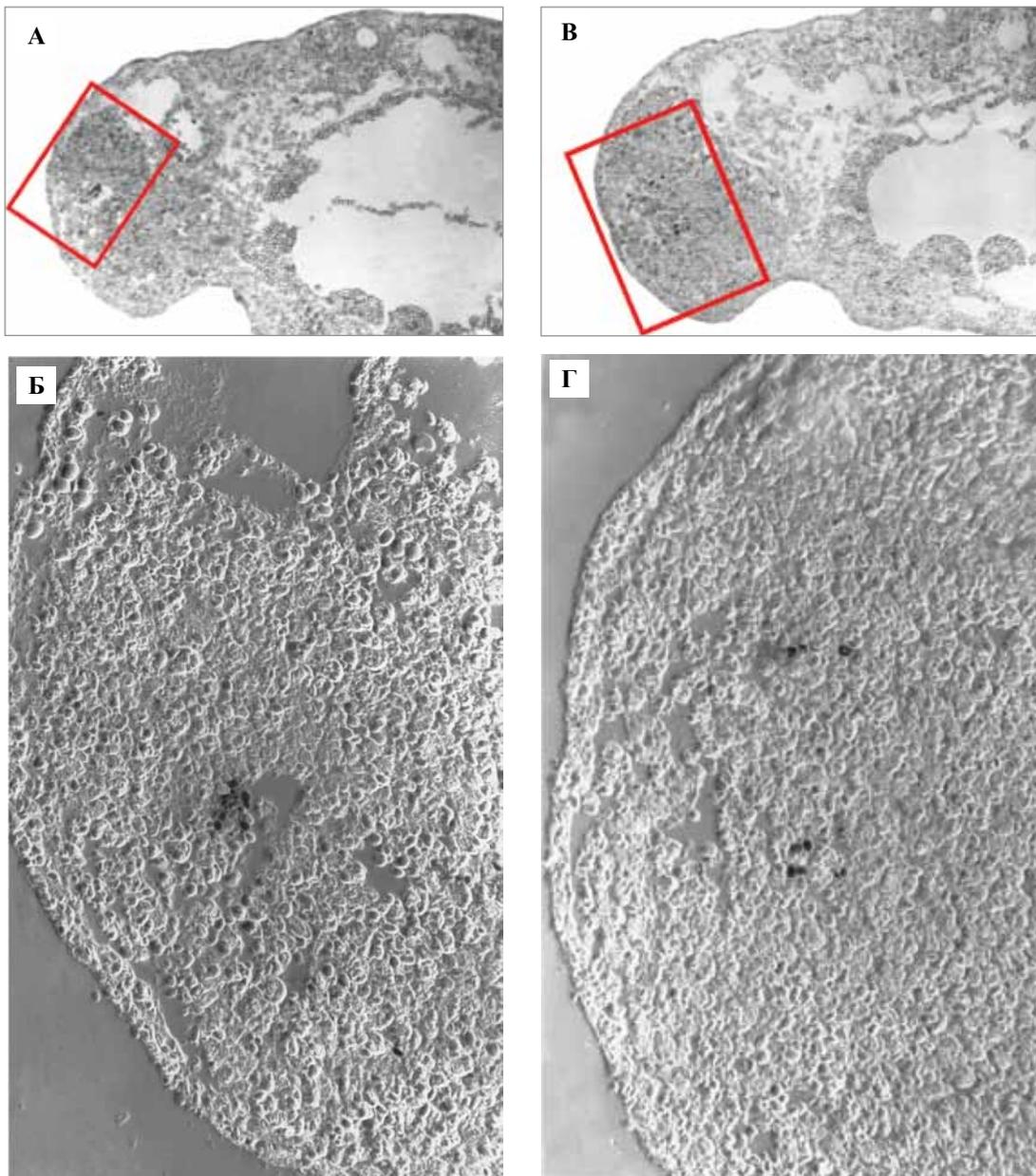


Рис. 2. Микрофотографии сагиттальных срезов нервной трубки, содержащих маркированные клетки в стенке мозга, среди неокрашенных нейробластов.

А, Б – компактная группа меченых клеток; В, Г – разошедшиеся потомки меченых клеток. На срезах, сделанных при малом увеличении, красными прямоугольниками показаны увеличенные участки на фотографиях Б и Г.

Неокрашенные криостатные срезы, заключенные в полиэтиленгликоль, фазовый контраст.

А – стадия 25, объектив  $\times 10$ ; Б – стадия 25, объектив  $\times 40$ ; В – стадия 32, объектив  $\times 10$ ; Г – стадия 32, объектив  $\times 40$

и на апикальной поверхности нервной трубки. Результатом интеркаляции становится перемешивание потомков меченых и немеченых нейробластов. Этот процесс усиливался пролиферацией нейробластов. При каждом пролиферативном цикле нейробласты утрачивают связь с наружной мембраной нервной трубки и проходят телофазу в прижелудочковой зоне. Затем апикальный отросток нейробласта возвращается по мембранам соседних клеток к апикальной мембране. Возвращение апикального отростка всегда происходит по новым путям, поскольку соседние клетки пролиферируют и принимают участие в активном изменении формы эмбрионального мозга. Следовательно, в миграционные процессы разделения потомков меченых клеток включена как постнейруляционная интеркаляция двуслойного нейроэпителия, так и процессы пролиферации.

Исследование путей движения маркированных нейробластов показало, что основным направлением перемещения клеток в период нейруляции является росто-каудальная миграция (рис. 1). Она начиналась от латеральных краев средней части нервной пластинки и продолжалась одновременно в ростральном и каудальном направлениях. К концу нейруляции каудальные миграции нейроэпителиальных клеток останавливались. Ростральные движения нейробластов становились все более локальными и к началу первичной дифференцировки полностью прекращались.

После замыкания нервной трубки и формирования эктодермы меченые нейроэпителиальные клетки выявлять не удавалось. В течение 20–28 часов на латеральной поверхности нервной трубки появляются отростки нейробластов, которые вышли из пролиферации. Эти клетки начинают дифференцироваться и образуют активные отростки. Они совершают поисковые движения, двигаясь по максимально гетерогенному субстрату из апикальных поверхностей рапировидных нейробластов (рис. 1 В). В этот период устанавливается первичный паттерн связей между дифференцирующимися нейронами. К моменту вылупления зародышей из икринок первичная система нервных связей достаточно развита для обеспечения минимальных активных движений и реакции на резкие механические колебания воды.

Для выявления первичного паттерна нервных связей мы проводили вторичное маркирование нейронов, сохранивших первичную метку, стильбеновыми красителями (рис. 1 А–В). Вторичное маркирование показало существование длинных нервных связей, объединяющих наиболее удаленные отделы головного мозга (рис. 4). Отдельные нейроны были обнаружены в переднем мозге после введения люциферового желтого в медиальной и латеральной зонах заднего мозга. При этом введение красителя в двигательные (медиальные) области правой области заднего мозга приводило к выявлению нейронов в правом (контралатеральном) полушарии переднего мозга. Инъекции красителя в дорсолатеральные (сенсорные) зоны левой половины

заднего мозга позволяло определить связи в ипсилатеральном полушарии переднего мозга (рис. 3 А, Б). Отдельные нейроны выявляли в структурах медиального плаща (*medial pallium*) переднего мозга, который является эволюционным предшественником гиппокампа (*hippocampus primordialis*). Кроме того, метки были найдены в септуме (*lateral septal nucleus*) и даже в молекулярном слое обонятельной луковицы (*molecular layer bulbous olfactorius*) (рис. 4 А, Б).

Полученные данные проверены в эксперименте по введению люциферового желтого в правое полушарие переднего мозга (рис. 3 Г). Оказалось, что медиальный плащ связан как с сенсорными, так и с двигательными отделами заднего мозга. Особый интерес представляет выявленная в двух случаях флуоресценция крупных маутнеровских нейронов продолговатого мозга (рис. 4 Е). Эти нейроны осуществляют управление мускулатурой хвоста и исчезают в конце метаморфоза шпорцевой лягушки. Введение красителя в передний мозг показало раннее формирование межполушарных связей через переднюю комиссуру (*commissura anterior*) (рис. 3 Г). При анализе последствий введения маркера в передний мозг выявлены связи медиального плаща с крышей среднего мозга. Обнаруженные нейроны были расположены в слоях крыши среднего мозга (*stratum griseum centrale*) (рис. 3 Г, 4 В).

Люциферовый желтый, введенный в крышу среднего мозга, не позволил выявить связи с полушариями переднего мозга (рис. 3 В). Меченые нейроны были преимущественно обнаружены в противоположном полушарии крыши среднего мозга, что говорит о наличии развитых связей через комиссуру крыши среднего мозга (*commissura tecti*). Отдельные нейроны выявлены в заднем межжолковом ядре промежуточного мозга (*nucleus entopeduncularis posterior*) и двигательных центрах заднего мозга (*nucleus reticularis medius*) (рис. 3 В, 4 Д). Существование установленных связей удалось подтвердить введением красителя в моторные центры заднего мозга. После этих операций нейроны были выявлены в центральном сером веществе крыши среднего мозга и крупных клетках базальных ядер (*nucleus magnocellularis torus semicircularis*) (рис. 4 Г).

### Обсуждение

В экспериментах по маркированию нейробластов на стадии нейруляции нами были выявлены их росто-каудальные перемещения. От средней линии нервной пластинки миграция нейробластов происходила как в ростральном, так и в каудальном направлениях (рис. 1 Г). Эти данные совпадают с результатами экспериментов по нейруляционным миграциям, полученным другими методами на хвостатых и бесхвостых амфибиях [6, 11]. Основным отличием нашей работы является доказательство существования росто-каудальных миграций при наличии двуслойного нейроэпителия. Существенным результатом можно считать выявленную расходимость потомков меченых клеток

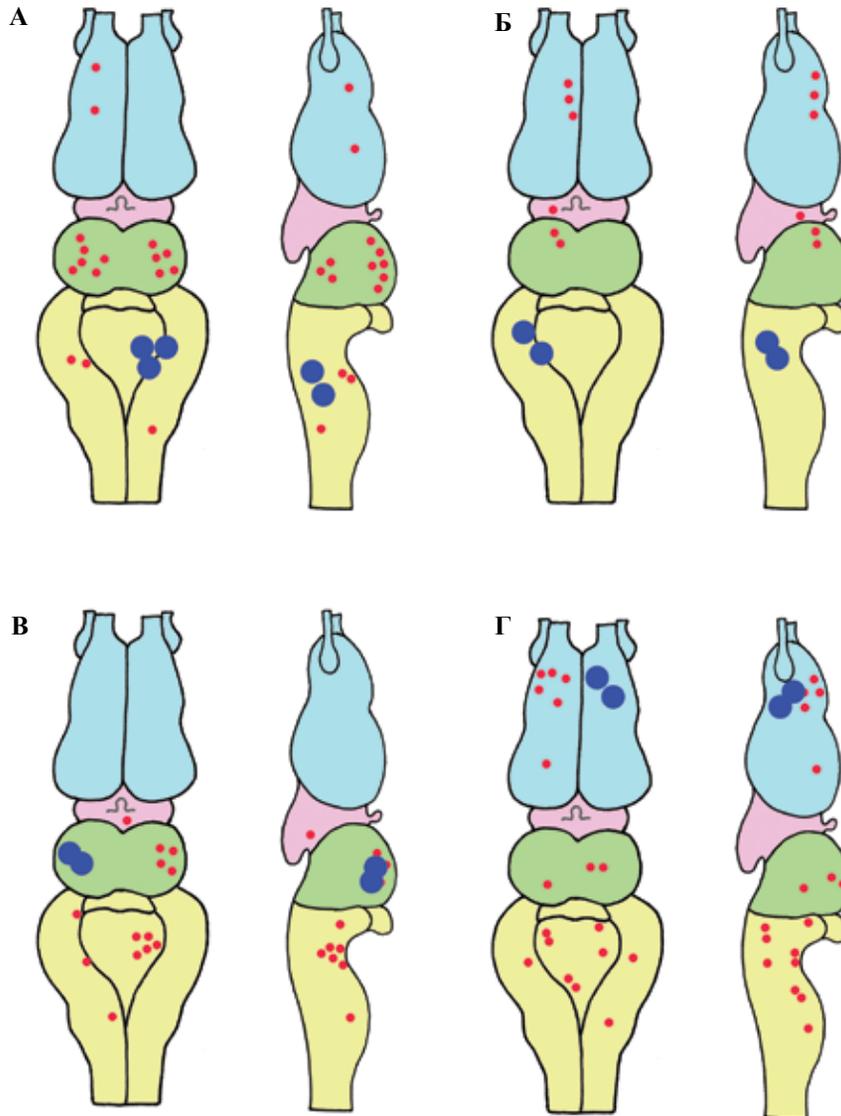
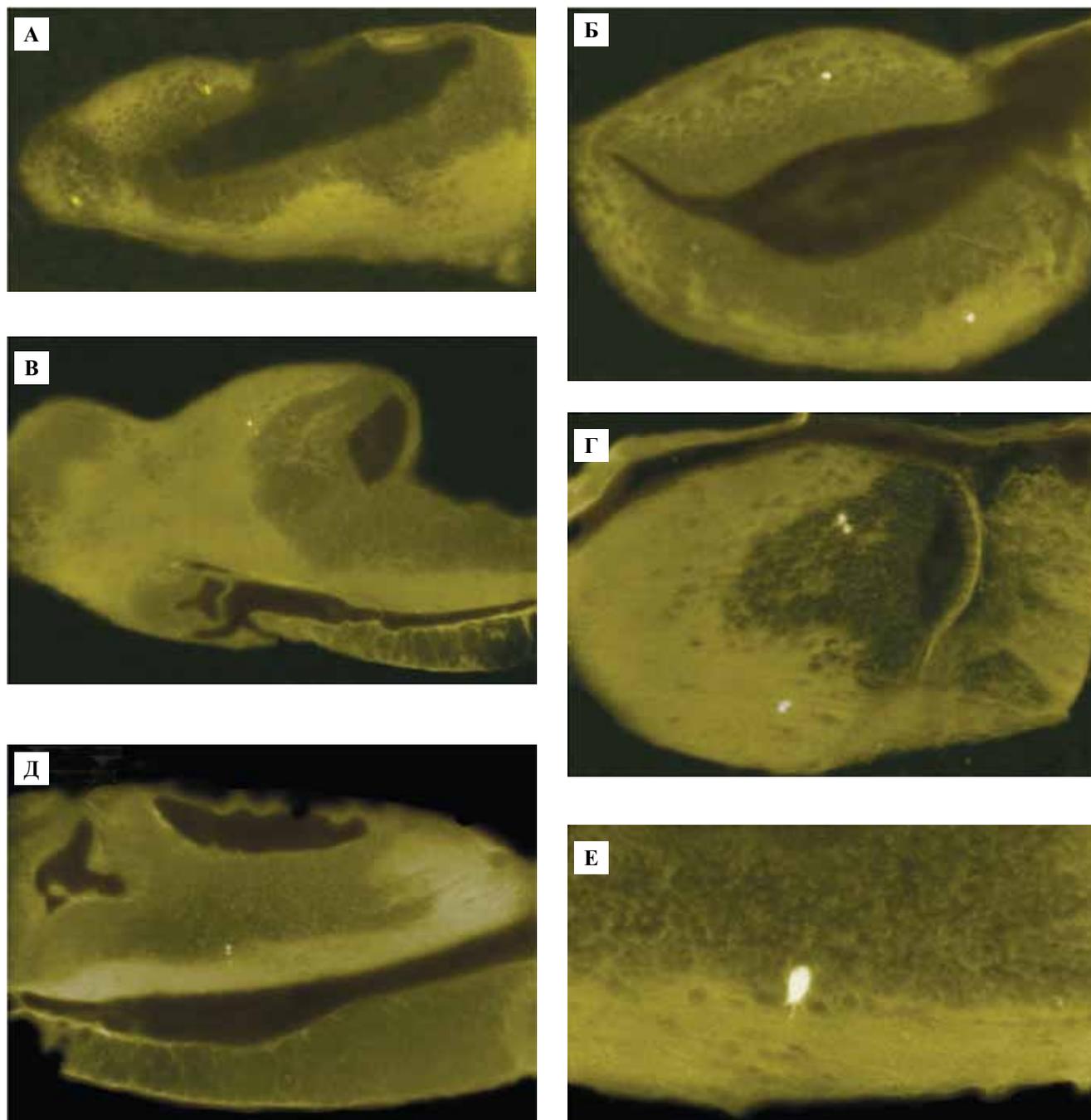


Рис. 3. Схема головного мозга личинки шпорцевой лягушки с местами введения люциферового желтого и локализация меченых нейронов. Введение красителя в задний мозг (А, Б), средний мозг (В) и передний мозг (Г). Синими точками обозначены зоны введения красителя, красными – места выявления меченых нейронов. Голубым обозначен передний мозг, розовым – промежуточный, зеленым – средний, желтым – задний и продолговатый мозг

от общей анцестральной клетки-предшественника. Это доказывает возможность перемешивания потомков одного клона клеток на стадии нейруляции и нервной трубки. В этом отношении полученные результаты подтверждают данные о 60% перемешивании потомков отдельных бластомеров, меченных на клеточных стадиях 256, 512 и 1024 развития шпорцевой лягушки [7–10].

Исследование ранних эмбриональных связей в мозге зародышей шпорцевой лягушки показало, что первичный паттерн нервных связей не зависит от морфогенетических миграций нейробластов. Аксоны нейронов формируются как между потомками нейронов из одной клональной группы, так и клетками из других областей нервной пластинки. Следовательно, процессы rostro-каудальной миграции и перемешивания потомков

общей анцестральной нейроэпителиальной клетки не предполагают установление жестко детерминированных связей. Это означает, что первичный паттерн нервных связей образуется случайным образом между нейронами, происходящими от клеток из различных первичных клонов. Основным отличием первичного паттерна связей является его направленность на выполнение временных эмбриональных функций [9]. Так, большая часть волокон, идущих от обонятельных, зрительных, сенсомоторных центров и октаволатеральной системы, заканчивается в двигательных отделах нервной системы. Таким способом происходит простейшее обеспечение системной адаптации организма, которая построена на движении личинок в водной среде. По сути дела, основным исполнительным



*Рис. 4.* Микрофотографии сагиттальных срезов головного мозга личинок шпорцевой лягушки с нейронами, заполненными люциферовым желтым СН. В переднем мозге нейроны выявлены в структурах медиального плаща (medial pallium), в септуме (lateral septal nucleus) и молекулярном слое обонятельной луковицы (molecular layer bulbus olfactorius) (А, Б).

В среднем мозге нейроны выявлены в крыше (stratum griseum centrale) и крупных клетках базальных ядер (nucleus magnocellularis torus semicircularis) (В, Г).

В заднем мозге краситель обнаружен в крупных маутнеровских нейронах и двигательных медиальных ядрах (nucleus reticularis medius) (Д, Е).

А – личинка на стадии 41, объектив  $\times 10$ ; Б – личинка на стадии 40, объектив  $\times 20$ ;

В – личинка на стадии 39, объектив  $\times 10$ ; Г – личинка на стадии 42, объектив  $\times 20$ ;

Д – личинка на стадии 41, объектив  $\times 10$ ; Е – личинка на стадии 42, объектив  $\times 40$

механизмом, детерминирующим поведение личинок, являются маутнеровские нейроны. Они обеспечивают реакции избегания и направленную миграцию по пищевым, температурным и световым градиентам. Следовательно, вместе с гибелью маутнеровских нейронов вся временная адаптивная нервная сеть распадается. Нейроны сенсорных центров переключают свои связи на «взрослые» двигательные центры.

### Заключение

В нашей работе подтверждены данные о rostro-caudальной миграции нейробластов на стадии нервной пластинки. Это происходит в двуслойном нейроэпителии и продолжается после интеркаляции нейробластов на стадии нервной трубки. В перемешивании потомков одиночных нейробластов большую роль играют пролиферация и движения нейроэпителия, связанные с формообразованием. Анализ результатов первичных нервных связей нейронов показал, что гипотеза клональной детерминации циногенетических связей неверна. Паттерн первичных нервных связей нервной трубки может возникать между любыми дифференцирующимися нейронами. Следовательно, развитие и первичная дифференцировка в данном случае носят регуляционный, а не детерминационный характер.

*Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Молекулярно-гистогенетические нарушения дифференцировки нервной и эндокринной систем в эмбриональном развитии и в патогенезе социальнозначимых заболеваний», номер госрегистрации АААА-А17-117013050051-6.*

### Литература/References

1. Детлаф Т.А., Руднева Т.Б. Шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* Daudin. В кн.: Объекты биологии развития / Под ред. Б.Л. Астаурова, Т.А. Детлаф. М.: Наука, 1975, С. 392–441 [Detlaf T.A., Rudneva T.B. Clawed frog *Xenopus laevis*. V kn.: Ob'yekty biologii razvitiya / Pod red. B.L. Astaurova, T.A. Detlaf. M.: Nauka, 1975. S. 392–441 (In Russ.)].
2. Савельев С.В. Формообразование мозга позвоночных. М.: Издательство МГУ, 1993. 143 с. [Saveliev S.V. Morphogenesis of vertebrates brain. M.: Moscow State University Publishing House, 1993. 143 s. (in Russ.)].
3. Савельев С.В. Эмбриональная патология нервной системы. М.: ВЕДИ, 2007. 215 с. [Saveliev S.V. Embryonic pathology of nervous system. M.: VEDI, 2007. 215 s. (in Russ.)].
4. Bandin S., Morona R., Gonzalez A. Prepatterning and patterning of the thalamus along embryonic development of *Xenopus laevis* // Front. Neuroanat. 2015;9:107. doi: 10.3389/fnana.2015.00107
5. Borodinsky L.N. *Xenopus laevis* as model organism for the study of spinal cord formation, development, function and regeneration // Front. Neural Circuits. 2017;11:90. doi:10.3389/fncir.2017.00090.
6. Carpenter E. The head pattern in *Amblystoma* studied by vital staining and transplantation methods // J. Exper. Zool. 1937; 75(1):103–29.
7. D'Amico L.A., Boujard D., Coumilleau P. Proliferation, migration and differentiation in juvenile and adult *Xenopus laevis* brains // Brain Res. 2011;1405:31–48. doi: 10.1016/j.brainres.2011.06.032
8. Jacobson M., Hirose G. Clonal organization of the central nervous system of the frog. II. Clones stemming from individual blastomeres of the 32- and 64-cell stages // J. Neurosci. 1981;1(3):271–84.
9. Jacobson M., Klein S.L. Analysis of clonal restriction of mingling in *Xenopus* // Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. 1985;312: 57–65.
10. Hirose G., Jacobson M. Clonal organization of the central nervous system of the frog. I. Clones stemming from individual blastomeres of the 16-cell and earlier stages // Dev. Biol. 1979;71:191–202.
11. Moody S.A. Fates of the blastomeres of the 32-cell stage *Xenopus* embryo // Dev. Biol. 1987;122:300–19.
12. Moreno N., Gonzales A. Pattern of neurogenesis and identification of neuronal progenitor subtypes during pallial development in *Xenopus laevis* // Front. Neuroanat. 2017. doi.org/10.3389/fnana.2017.00024.
13. Shepard P., Jacobson M. Clonal restriction boundaries in *Xenopus* embryos shown with two intracellular lineage tracers // Science. 1987;236(4799): 851–4.

## NEUROBLASTS MIGRATION AND PATTERN FORMATION DURING DEVELOPMENT OF THE *XENOPUS LAEVIS*

S.V. Saveliev, N.V. Besova, E.S. Savelieva, V.I. Gulimova

Research Institute of Human Morphology, Moscow

The migration of neuroblasts at the stage of neurulation and the formation of a primary pattern of neural connections of the brain in a spur frog (*Xenopus laevis*) were studied. In the experiments, 129 embryos from the stage of the formation of the neural plate before the start of active feeding of the hatched larvae were used. To study the migration of neuroepithelial cells during neurulation, intracellular labeling of individual neuroblasts was performed using procyon dyes RS and B2BS. After the formation of the neural tube and the start of differentiation of neurons, cells containing the dye were detected using a fluorescent microscope. Using a microelectrode, a second dye, luciferous yellow CH, was introduced into the detected cells using a microelectrode. It filled the bodies and processes of neurons, which made it possible to reveal the pattern

of connections of the brain. It is established that primary bonds are formed between cells originating from a different clones, which disintegrates due to the intercalation of the epidermal and hypodermal layers of the neuroectoderm, proliferation and migration of neuroblasts.

*Key words:* neuroblasts, cell migration, pattern formation, brain development, neuronal connections

### **Информация об авторах**

Савельев Сергей Вячеславович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 985 922 2938. E-mail: braincase@yandex.ru

Бесова Надежда Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Савельева Екатерина Сергеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Гулимова Виктория Игоревна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

*Материал поступил в редакцию 13 февраля 2019 года*

# МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ КОЖИ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ

*М.Ю. Соболева*

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко»  
Минздрава России, Воронеж

Одной из ведущих проблем регенеративной медицины является полноценное восстановление кожи как органа. При этом морфологические аспекты заживления кожного дефекта продолжают оставаться в центре внимания многих исследований. Термическая травма и ожоговые раны в сравнении с другими повреждениями кожи занимают особое место. Это обусловлено специфичностью раневого процесса и длительным этапом восстановления целостности кожного покрова. В настоящем обзоре освещены современные достижения в области регенеративной медицины при лечении ожоговых ран кожи.

*Ключевые слова:* ожоги, раневой процесс, воспалительный ответ, репаративная регенерация, лечение ожогов, стволовые клетки

Вопросы репаративной регенерации кожи при ожоговой травме имеют большое клиническое значение. При оценке восстановительных процессов особое внимание уделяется структурно-функциональной характеристике регенерата, что обуславливает полноценность кожного покрова в зоне повреждения. На данном этапе тесно взаимодействуют процессы воспаления и пролиферации тканей, в организме запускается системный воспалительный ответ на травму [5]. В репаративный процесс активно включаются различные клеточные диффероны, участвующие в формировании тканевого гомеостаза. Реактивные свойства кожи четко выражены при действии внешних факторов, приводящих к механическим повреждениям кожного покрова [1].

Ежегодно регистрируется около 500 000 случаев ожогов. При этом порядка 40 000 пострадавших госпитализируются и получают стационарное лечение. Лечение термической травмы очень ресурсоемко и дорогостояще, поскольку стационарный этап продолжителен. Ожоговые раны по глубине повреждения классифицируются на поверхностные (I степень), при поражении до росткового слоя (II степень), при повреждении всех слоев (III степень).

Целью лечения ожоговой раны является полное восстановление барьерной функции кожи как можно в более ранние сроки при минимизации раневой инфекции. Данная концепция ведения пациентов с обширными раневыми дефектами способствует уменьшению осложнений в виде развития рубцов и контрактур. Формирование рубца, его развитие из грануляционной ткани и возможность перестройки в нормальную кожу

были и до настоящего времени продолжают оставаться ключевыми вопросами при рассмотрении регенерационной способности кожи [3].

Таким образом, одна из ведущих проблем регенеративной медицины – полноценное восстановление кожи как органа. Морфологические аспекты заживления кожного дефекта остаются в центре внимания многих исследований.

В настоящее время существует несколько стратегий лечения ожоговых ран в зависимости от глубины и степени ожога. Все они направлены на купирование воспалительного процесса, ускорение эпителизации и улучшение общего заживления раны. Целью восстановления функции кожи является сохранение ее барьерных свойств, сенсорной и тактильной чувствительности, функции потоотделения и участия в формировании волосяного фолликула.

В зарубежной литературе встречаются исследования, посвященные изучению сохранности кожной чувствительности, чувства давления и осязания у детей после получения термической травмы [14].

Многие исследователи отмечают, что причиной около 50% смертей при термической травме является сепсис [15]. Ожоговая рана быстро колонизируется рядом патогенов вследствие нарушения барьерной функции кожи. Кроме того, двухфазный иммунный ответ, острое воспаление с последующей иммуносупрессией, наблюдаемое при ожогах, не позволяют пациенту бороться с инфекцией. Помимо этого, ожоговый струп обеспечивает оптимальную температуру и идеальную среду для микробного роста, содержащую

денатурированные белки, липиды [29]. Вследствие длительной госпитализации после тяжелой ожоговой травмы наблюдается всплеск грибковой колонизации и инвазивных инфекций, которые связаны с высокой смертностью [26]. Несмотря на то, что ожоговые раны непосредственно вызывают повреждение кожи, тяжелые ожоги запускают системную воспалительную реакцию, которая приводит к нарушениям со стороны всего организма. Это системное повреждение гораздо более выражено при ожогах в сравнении с другими видами травм. Синдром системного воспалительного ответа (SIRS) описывает воспалительный ответ, который имеет общие черты с различными типами повреждений, включая инфекцию, травму и ожоги. Причины SIRS не обязательно совпадают. Например, не все инфекции вызывают сепсис, и даже если инфекция действительно приводит к сепсису, это не означает, что в результате SIRS. Для пациентов с обширными ожогами, превышающими 30% общей площади поверхности тела, даже при отсутствии инфекции риск SIRS увеличивается в 3 раза и характеризуется повышенными уровнями IL-6, IL-2 и IL-8 и сниженным уровнем IL-10. Во время системного ответа на ожоговую травму провоспалительные цитокины, такие как IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , продуцируются многочисленными клетками в непосредственной близости от раны. IL-6 способствует активации Т-клеток, хотя неясно, являются ли высокие уровни IL-6 системным ответом или просто отражением тяжести ожога. Активированные Т-клетки также продуцируют провоспалительный цитокин интерферон гамма, активирующий макрофаги. В противовес воспалительной реакции при ожоговых травмах возникают противовоспалительная и последующая иммуносупрессивная реакции, в то время как воспалительный ответ в неожоговой травматической ране после первоначального постепенно снижается до исходных уровней. Иммуносупрессия является характерной особенностью обширных ожоговых травм, предрасполагая пациентов к инфекциям. Об иммуносупрессии свидетельствуют характеристики популяции лимфоцитов и, как следствие, длительная выживаемость аллотрансплантатов при проведении хирургического лечения. После ожоговой травмы макрофаги регулируют экспрессию PGE2 и понижают экспрессию провоспалительного цитокина IL-12. Подавление реактивности лимфоцитов в результате повышенной экспрессии простагландина E2 макрофагами ведет к изменению количества CD4<sup>+</sup> Т-хелперов по отношению к числу CD8<sup>+</sup> супрессорных Т-клеток. Это, в свою очередь, приводит к подавлению пролиферации лимфоцитов при снижении Т-клеточнозависимых иммунных функций. Тенденция к иммуносупрессивному ответу может включать множество системных гормональных ответов эндокринной системы, а также изменения различных сигнальных каскадов, увеличение продукции гормона роста, катехоламинов и кортизола. Повышение уровня глюкокортикоидов также ингиби-

рует выработку провоспалительных, но не противовоспалительных цитокинов [23].

Очевидно, что ожоги являются особым видом травмы, поскольку повреждения клеток в области одной раны могут происходить на разной глубине и даже жизнеспособные ткани, прилежащие к зоне повреждения, оказываются затронуты патологическим процессом [20]. Ожоговые раны характеризуются областью некроза, называемой зоной коагуляции, в которой ткани недостаточно насыщены кислородом для поддержания репаративной регенерации. Вокруг зоны коагуляции, характеризующейся наличием некротических тканей, не способных к восстановлению, определяется участок с менее серьезными повреждениями – зона стаза, характеризующаяся снижением перфузии тканей. Дальнейшее состояние тканей в зоне стаза зависит от раневой среды, что приводит либо к регенерации, либо к некрозу. Внешняя зона ожоговых ран – зона гиперемии, характеризующаяся расширением сосудов и воспалением в неповрежденных тканях. Эта ткань, явно жизнеспособная и с низким риском некроза, образует ядро, из которого начинается заживление раны. Таким образом, ожоговые раны у пострадавших пациентов представляют особую проблему, поскольку большая часть поврежденной ткани нежизнеспособна [23].

Нарушение целостности кожного покрова при термической травме стимулирует четко организованный физиологический процесс заживления, что в конечном счете приводит к структурному и функциональному восстановлению поврежденных тканей. В первые дни после термической травмы на фоне возникающей воспалительной реакции, повышения кровотока пролиферативная активность в клеточных дифферензах низкая, во второй фазе на фоне нарастания репаративных процессов появляется грануляционная ткань, восстанавливается кровоток, начинается эпителизация раны, идентифицируется наибольшая плотность элементов микроциркуляторного русла [7]. Процесс регенерации можно в целом разделить на четыре непрерывные и взаимосвязанные фазы – гемостаз и коагуляцию, воспаление, пролиферацию, ремоделирование [11]. Во время первой фазы разрушаются поврежденные кровеносные сосуды. Гемостаз достигается накоплением тромбоцитов в месте повреждения и образованием фибринового сгустка крови. После дегрануляции, индуцированной тромбином, из тромбоцитов высвобождаются факторы роста (тромбоцитарный фактор роста (PDGF- $\alpha/\beta$ ), TGF- $\alpha/\beta$  и эпидермальный фактор роста (EGF), которые накапливаются в сгустке крови и являются хемоаттрактантами для различных типов клеток, участвующих в репарации раны [33]. Воспаление, вторая фаза заживления ожоговой раны, развивается в первые часы после травмы. Первыми в область раны мигрируют нейтрофилы, затем в течение 1–2 суток – моноциты и лимфоциты. Лейкоциты продуцируют широкий спектр протеиназ и активных форм кислорода, защищая рану от инфекции, и участвуют в фагоцитозе



обширных ожогов и их последствий. Наиболее частой областью применения были конечности. Ретроспективно, в течение нескольких лет исследователи оценивали тенденцию к вторичному сокращению и гипертрофии рубца, косметические и функциональные результаты. В течение указанного периода наблюдения только у одного пациента развился рецидив за счет гипертрофии рубца [21, 28].

Исследователями в эксперименте на взрослых крысах Вистар моделировались глубокие ожоги с целью гистологической и иммуногистохимической оценки процесса кожного ангиогенеза при экспериментальных ожогах кожи III степени, обработанных аллотрансплантатом. Сосудистое русло кожи в области раневого процесса было значительно изменено. Через три дня после поражения как в контрольной группе животных, так и у животных, получавших аллотрансплантат, большая часть ожоговой раны была занята погибшими клетками и тканями. На периферии раневого ложа отмечено наличие умеренного воспалительного инфильтрата, состоящего из полиморфноядерных нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов, рассеянных неравномерно, и начало процесса восстановления за счет появления дермальных соединительнотканых фибробластов. Численная плотность новообразованных сосудов в группе с применением аутоаллотрансплантата была выше, чем в условиях спонтанного заживления, и через 9 дней ее значение на 97% превышало аналогичный показатель в группе сравнения. На следующих этапах репаративного процесса количество вновь образованных сосудов постепенно уменьшалось по мере созревания грануляционной ткани и снижения воспалительного ответа. Тем не менее даже через 21 день, когда основная часть раны оказалась занята зрелой грануляционной тканью и эпидермис был восстановлен, авторы отметили персистенцию относительно большого количества неососудов с CD34<sup>+</sup> и/или  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> (64 сосуда на 1 мм<sup>2</sup> против 40 сосудов на 1 мм<sup>2</sup>). Это свидетельствует о том, что ремоделирование соединительной ткани кожи продолжается еще долго после того, как рана заживет макроскопически. Авторами исследования отмечено, что у животных с применяемым аллотрансплантатом, который служил естественной повязкой, воспалительный ответ нейтрофилов и особенно макрофагов был более интенсивным, чем в контрольной группе, что выражалось в появлении большего количества новообразованных сосудов. Поскольку в формировании сосудов участвуют два типа клеток – ангиобласты и перициты, авторы подчеркивают их роль в возникновении и развитии репаративного процесса при ожогах. Для более точного выявления взаимосвязи между двумя типами клеток был проведен иммунофлуоресцентный анализ ангиобластов и перицитов. Отмечено, что первыми и наиболее многочисленными клетками, образующими грануляционную ткань сосудистых трубок, являются CD34<sup>+</sup>, а перициты и  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> появляются позже ангиобластов. Количество сосудов и их просвет внутри

грануляционной ткани увеличиваются, поэтому перициты появляются на периферии новообразованных сосудов. С началом созревания грануляционной ткани, характеризующейся снижением воспалительного ответа и увеличением внеклеточного матрикса, особенно коллагеновых волокон, количество новообразованных сосудов постепенно уменьшалось как у животных, получавших аллотрансплантат, так и у животных контрольной группы. По результатам проведенного исследования авторы пришли к выводу, что в сравнении с контрольной группой у животных, лечение которых проводилось с помощью аллотрансплантата, репаративная реакция была интенсивнее. Это может быть связано с появлением большого количества индуцированных стимулов репарации, более сильной воспалительной реакцией у животных, получавших лечение. При восстановлении сосудистой сети поврежденных тканей в группе с аллотрансплантатом ангиогенез протекал так же динамично, как и при спонтанном заживлении, но более интенсивно примерно на 10–15% по сравнению с контрольной группой. Таким образом применение аллотрансплантата способствовало восстановлению сосудистой системы в глубине ожоговой раны. Ангиогенез характеризуется более быстрым темпом в первые 9–12 дней раневого процесса, после чего количество сосудов регрессирует по мере созревания дермальной грануляционной ткани. Персистенция сосудов ангиогенеза в дерме после полного восстановления эпидермиса показывает, что процессы созревания и моделирования дермальной соединительной ткани продолжают и после этой стадии [10].

Известно, что ожоговая травма сопровождается гипоксальбуминемией, появлением продуктов перекисного окисления в обожженной коже. Группой авторов [22] исследована роль диметилсульфоксида (димексид, ДМСО), который часто используют в качестве средства для лекарственной терапии. ДМСО легко проникает, диффундирует через биологические мембраны, в связи с чем увеличивает текучесть липосомных мембран, моделирующих роговой слой. Влияние димексидна на структуру и стабильность белка зависит от концентрации и температуры.

Ремоделирование матрикса – заключительный этап заживления ран. Известно, что выраженные фиброзные изменения в зоне регенерата сопровождаются уменьшением скорости заживления и способствуют формированию келоидных рубцов [6].

Нарушение регуляции гибели клеток и персистенция фибробластов после закрытия раны могут привести к развитию контрактур и гипертрофических рубцов [25]. К механизмам патологического рубцевания при ремоделировании раны исследователи относят длительное воспаление, затянувшуюся реэпителизацию, повышенную неоваскуляризацию, атипичное ремоделирование внеклеточного матрикса, снижение апоптоза [32]. В эксперименте на грызунах исследователи определили ключевые молекулы, ответственные

за развитие патологического рубца. Среди них TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 способствуют образованию рубцов, в то время как TGF- $\beta$ 3 уменьшает рубцевание [10]. Подобным образом провоспалительные цитокины IL-6 и IL-8 повышают склонность к патологическому рубцеванию, тогда как IL-10 замедляет этот процесс.

Если заживление раны длится больше трех недель, существует большая вероятность развития гипертрофического рубца. Среди факторов риска, способствующих формированию рубцов, исследователи отмечают детский возраст, более темный цвет кожи, женский пол, травмы лица или шеи, а также тяжесть ожога. В ряде исследований сообщается, что от 32 до 72% всех ожогов приводит к образованию гипертрофических рубцов [9]. В настоящее время единого мнения относительно наилучшего метода предотвращения патологического рубцевания нет [31].

К стандартным методикам противорубцовой терапии относят увлажняющие средства, силиконовые гели и пластины, использование компрессионной одежды, эластичного бинтования, а также физиопроцедуры и лечебную физкультуру [8]. Окончательным методом устранения и минимизации выраженности гипертрофических рубцов, особенно при наличии сопутствующих контрактур, остается хирургическое лечение.

Термическая травма связана с изменением локального и системного иммунного ответа. При морфологическом исследовании со стороны раны определяются инфильтрации иммунными клетками из-за изменений проницаемости тканей и отсутствия функционирующей сосудистой сети в областях коагуляции [23]. В эксперименте на крысах смоделированы ожоги пламенем и показано истощение T-клеток, а также уменьшение продукции интерферона гамма (ИФН- $\gamma$ ) при более тяжелых ожогах, что способствовало иммуносупрессии за счет снижения активности адаптивного иммунного ответа. Через восемь дней после ожога наблюдавшаяся иммуносупрессия сменялась преобладанием макрофагов гипервоспалительного фенотипа, а также отмечалось трехкратное увеличение количества ИФН- $\gamma$ , продуцируемого T-клетками.

Хорошо известно, что иммунная компетентность необходима для заживления ран и иммунные клетки играют ведущую роль в борьбе с раневой инфекцией [24]. Например, в эксперименте после применения эмульсии биафин для лечения ожоговых ран у крыс отмечалось снижение количества нейтрофилов и увеличение числа макрофагов. Авторы предположили, что это привело к значительному увеличению продукции NO в микроокружении ожоговой раны, тем самым увеличив скорость пролиферации клеток [16].

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и ингибиторы циклооксигеназы-2 были изучены в качестве лекарственных препаратов, способных снижать воспалительный ответ. Однако было показано, что при их системном введении уменьшается пролиферация эпителиальных клеток и отложение внеклеточ-

ного матрикса и коллагена, что замедляет заживление ран [12].

В большинстве современных исследований рассматривается ключевая роль мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в лечении ожоговых ран. Независимо от типа раны МСК выделяют противовоспалительные факторы, такие как IL-10. Недавние исследования показывают, что МСК из разных источников (стволовые клетки костного мозга, мезенхимальные стволовые клетки из жировой ткани, пуповины) секретируют провоспалительные цитокины IL-1 $\alpha$ , IL-6 и IL-8 через PGE2. Кроме того, нужно помнить, что повышенный уровень NF- $\kappa$ B (факторы транскрипции) после повреждения ткани стимулирует секрецию PGE2 МСК, что, в свою очередь, значительно уменьшает воспалительный цитокиновый всплеск после ожога.

Стволовые клетки костного мозга, вводимые вблизи ожоговой раны, дифференцируются на несколько типов клеток кожи, включая кератиноциты, эндотелиальные клетки, перициты и моноциты [17].

Небольшое число исследований было проведено в США, где стволовые клетки используют для лечения острой ожоговой травмы с целью установления безопасности этого метода. Новые устройства (например, гидрогели, нано- и микрочастицы, нановолокна, сфероиды и синтетические матриксы) могут доставлять МСК для максимального увеличения их потенциала в ускорении заживления ран.

При глубоких ожогах применение искусственно-го заменителя кожи Integra (коллагеновый матрикс, хондроитин-6-сульфат, гликозаминогликан), засеянного стволовыми клетками, полученными из жировой ткани, усиливает ангиогенез в ране, созревание кровеносных сосудов и ремоделирование матрикса по сравнению с Integra без стволовых клеток [13].

Одним из способов лечения ожоговой раны может быть применение обогащенной тромбоцитами плазмы крови (ОТПК). Сокращение сроков закрытия раневого дефекта при использовании обогащенной плазмы было отмечено при поражениях II степени. Морфологический анализ репаративных процессов выявил высокий регенерационный потенциал тканей при воздействии ОТПК. В эпидермисе преобладала активация пластических функций, а в соединительной ткани отмечалось купирование воспалительной реакции с последующим усилением восстановительных процессов. Применение обогащенной тромбоцитами плазмы в период фазы альтерации позволило получить состоятельный эпидермис, зрелые волокна коллагена [18].

## Заключение

Проведенный анализ литературных источников позволил систематизировать данные по вопросам морфологических особенностей регенерации кожи при термической травме. Ожоговые раны характеризуются особым течением раневого процесса. По мнению авторов, это лежит в основе наблюдаемых различий

между заживлением разнообразных по этиологическому признаку ран. Основными задачами регенеративной медицины при ожогах являются полное восстановление анатомии и физиологии кожи, освоение и применение генной терапии в лечении ожоговых ран, автоматизированное и роботизированное изготовление тканеинженерных конструкций для повышения эффективности и снижения затрат при лечении ожоговых ран.

Перспективы для биологических заменителей кожи обширны и разнообразны. Использование стволовых клеток в лечении ожоговых ран способствует восстановлению пигментации кожи, эпидермальных придатков – волос, сальных и потовых желез, сосудистого сплетения и дермы. Достижения фундаментальных исследований экстраполируются в клиническую медицину, поэтому можно с уверенностью предсказать, что снижение смертности и инвалидизации вследствие термической травмы также будет реализовано.

### Литература/References

1. Алексеева Н.Т., Клочкова С.В., Никитюк Д.Б., Глухов А.А. Регенерация кожи: актуальные методы воздействия. Воронеж: Научная книга, 2015. 300 с. [Alekseeva N.T., Klochkova S.V., Nikityuk D.B., Glukhov A.A. Skin regeneration: current methods of exposure. Voronezh: Nauchnaya kniga, 2015. 300 p. (In Russ.)].
2. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. М.: Медицина, 1985. 256 с. [Babayeva A.G. Regeneration and system of immunogenesis. M.: Meditsina, 1985. 256 p. (In Russ.)].
3. Бабаева А.Г. Регенерация. Факты и перспективы. М.: Издательство РАМН, 2009. 336 с. [Babayeva A.G. Regeneration. Facts and perspectives. M.: Publishing house of Russian Academy of medical Sciences, 2009. 336 p. (In Russ.)].
4. Глуткин А.В., Ковальчук В.И., Островская О.Б. Морфологические изменения кожи при термическом ожоге у крысят в условиях коррекции внутривенным лазерным облучением крови и эмоксипином // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2013. № 3. С. 87–91 [Hlutkin A.V., Kovalchuk V.I., Ostrovskaya O.B. Morphological skin changes at thermal burn in infant rats under the conditions of correction by intravenous laser radiation of blood and emoksipin // Journal of the Grodno State Medical University. 2013. V. 3. P. 87–91 (In Russ.)].
5. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А., Юрченко Л.Н. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса // Цитокины и воспаление. 2007. Т. 6, № 4. С. 9–21 [Gusev E.Y., Chereshev V.A., Yurchenko L.N. Systemic inflammation as a typical pathological process // Cytokines and Inflammation. 2007. V. 6, No 4. P. 9–21 (In Russ.)].
6. Озерская О.С. Рубцы кожи и их дерматокосметологическая коррекция. СПб., 2007. 224 с. [Ozerskaya O.S. Cicatrices of the skin and dermatological correction. SPb., 2007. 224 p. (In Russ.)].
7. Соболева М.Ю. Морфологическая характеристика кожи при термической травме у детей // Журнал анатомии и гистопатологии. 2017. Т. 6, № 2. С. 108–114 [Soboleva M.Yu. Morphological characteristics of skin in children with thermal trauma // Journal of anatomy and histopathology. 2017. V. 6, No 2. P. 108–114 (In Russ.)].
8. Anthonissen M., Daly D., Janssens T., Van den Kerckhove E. The effects of conservative treatments on burn scars: a systematic review // Burns. 2016;42:508–18. doi: 10.1016/j.burns.2015.12.006.
9. Bombaro K.M., Engrav L.H., Carrougher G.J., Wiechman S.A. et al. What is the prevalence of hypertrophic scarring following burns? // Burns. 2003;29:299–302. doi: 10.1016/S0305-4179(03)00067-6.
10. Busuioc C.J., Popescu F.C., Mogosanu G.D., Parvsnescu H. et al. Histological and immunohistochemical study of cutaneous angiogenesis process in experimental third-degree skin burns treated with allograft // Rom J Morphol Embryol. 2012;53(4):1061–7.
11. Demidova-Rice T.N., Hamblin M.R., Herman I.M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care // Adv Skin Wound Care. 2012;25(7):304–14. doi: 10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0.
12. Fairweather M., Heit Y.I., Buie J., Rosenberg L.M. et al. Celecoxib inhibits early cutaneous wound healing // J. Surg. Res. 2015;194:717–24. doi:10.1016/j.jss.2014.12.026.
13. Foubert P., Barillas S., Gonzalez A.D., Alfonso Z. et al. Uncultured adipose-derived regenerative cells (ADRCs) seeded in collagen scaffold improves dermal regeneration, enhancing early vascularization and structural organization following thermal burns // Burns. 2015;41:1504–16. doi: 10.1016/j.burns.2015.05.004.
14. Fuchs S., Klohs G., Kornhuber M., Finke R. Clinical trial: regeneration of skin perception after deep-degree burns in childhood // Handchirurgie Mikrochirurgie Plastische Chirurgie. 2018. doi: 10.1055/s-0043-121634.
15. Greenhalgh D.G., Saffle J.R., Holmes J.H.T., Gamelli R.L. et al. American Burn Association consensus conference to define sepsis and infection in burns // J. Burn Care Res. 2007;28:776–90. doi:10.1097/BCR.0b013e3181599bc9.
16. Krausz A.E., Adler B.L., Landriscina A., Rosen J.M. et al. Biafine topical emulsion accelerates excisional and burn wound healing in mice // Arch. Dermatol. Res. 2015;307:583–94. doi:10.1007/s00403-015-1559-x.
17. Li X., Liu L., Yang J., Yu Y. et al. Exosome derived from human umbilical cord mesenchymal stem cell mediates MiR-181c attenuating burn-induced excessive inflammation // EBioMedicine. 2016;8:72–82. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.030.
18. Marck R.E., Gardien K.L., Stekelenburg C.M., Vehmeijer M. et al. The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns: A randomized, double-blind, intra-patient controlled study // Wound Repair Regen. 2016; 24:712–20. doi: 10.1111/wrr.12443.
19. McCarty S.M., Percival S.L. Proteases and delayed wound healing // Adv. Wound Care. 2013;2(8):438–47. doi:10.1089/wound.2012.0370.
20. Monstrey S., Hoeksema H., Verbelen J., Pirayesh A. et al. Assessment of burn depth and burn wound healing potential // Burns. 2008;34:761–9. doi:10.1016/j.burns.2008.01.009.

21. Nicoletti G., Tresoldi M.M., Malovini A., Visaggio M. et al. Versatile use of dermal substitutes: A retrospective survey of 127 consecutive cases // *Indian Journal of Plastic Surgery*. 2018;51(1):46–53. doi: 10.4103/ijps.IJPS\_217\_17).
22. Pielesz A., Gawlowski A., Biniak D., Bobinski R. et al. The role of dimethyl sulfoxide (DMSO) in ex-vivo examination of human skin burn injury treatment. *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018;196:344–52. doi: 10.1016/j.saa.2018.02.035.
23. Rose L.F., Chan R.K. The burn wound microenvironment // *Adv. Wound Care*. 2016;5:106–18. doi: 10.1089/wound.2014.0536.
24. Rosique R.G., Rosique M.J., Farina Junior J.A. Curbing inflammation in skin wound healing: a review // *Int. J. Inflamm*. 2015;316235. doi: 10.1155/2015/316235.
25. Sarrazay V., Billet F., Micallef L., Coulomb B. et al. Mechanisms of pathological scarring: role of myofibroblasts and current developments // *Wound Repair Regen*. 2011;19(1):S10–S15. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00708.x
26. Sharma S., Bajaj D., Sharma P. Fungal infection in thermal burns: a prospective study in a tertiary care centre // *J. Clin. Diagn. Res*. 2016;10: Pc05–Pc07. doi: 10.7860/JCDR/2016/20336.8445.
27. Singer A.J., Clark R.A. Cutaneous wound healing // *N. Engl. J. Med*. 1999;341:738–46. doi: 10.1056/NEJM199909023411006.
28. Spacek B., Jester I., Schmedding A., Loff S. et al. Integra beyond acute burn treatment in children – A five-year report. *Zentralblatt fur Kinderchirurgie*. 2002;11(1):22–8. doi: 10.1055/s-2002-20546.
29. Taneja N., Chari P., Singh M., Singh G. et al. Evolution of bacterial flora in burn wounds: key role of environmental disinfection in control of infection // *Int. J. Burns Trauma*. 2013;3:102–7.
30. Toriseva M., Kähäri V.M. Proteinases in cutaneous wound healing // *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(2):203–24. doi: 10.1007/s00018-008-8388-4.
31. Tziotziou C., Profyris C., Sterling J. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures // *J. Am. Acad. Dermatol*. 2012;66:13–24. quiz 25–16. doi: 10.1016/j.jaad.2011.08.035.
32. Van der Veer W.M., Bloemen M.C., Ulrich M.M., Molema G. et al. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation // *Burns*. 2009;35:15–29. doi:10.1016/j.burns.2008.06.020.
33. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines // *Physiol. Rev*. 2003; 83:835–70. doi:10.1152/physrev.2003.83.3.835.
34. Yussof Shah J.M., Omar E., Pai D.R., Sood S. Cellular events and biomarkers of wound healing // *Indian J Plast Surg*. 2012;45(2):220–8. doi: 10.4103/0970-0358.101282.

## MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF THE RESTORATION OF THE INTEGRITY OF THE SKIN AFTER THERMAL INJURY

**M. Yu. Soboleva**

Voronezh N.N. Burdenko State Medical University, Voronezh

The complete restoration of the skin as an organ is one of the leading problems of regenerative medicine. At the same time, the morphological aspects of the healing of the skin defect are still the object of numerous studies. Thermal injury and burn wounds are of special interest in comparison with other skin lesions due to the specificity of the wound process and the long stage of restoring the integrity of the skin. This review highlights current advances in regenerative medicine in the treatment of skin burn wounds.

*Key words:* burns, wound process, inflammatory response, reparative regeneration, burn treatment, stem cells

### Информация об авторе

Соболева Мария Юрьевна – ассистент кафедры нормальной анатомии человека Воронежского государственного медицинского университета им. Н.Н. Бурденко, детский хирург областной детской клинической больницы № 2.  
Адрес: 394036, Воронеж, ул. Студенческая, д. 10. Телефон 8 (473) 253 0253. E-mail: soboleva.doc1@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 7 ноября 2018 года

# I ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПАМЯТИ АЛЕКСАНДРА ЭДУАРДОВИЧА МАЦИОНИСА «СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОПУХОЛЕЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ И ЛИМФОИДНОЙ ТКАНЕЙ»

25 января 2019 года в Ростове-на-Дону прошла I Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная памяти Александра Эдуардовича Мациониса «Современные аспекты патологоанатомической диагностики опухолей гемopoэтической и лимфоидной тканей». Конференция была организована Министерством здравоохранения Ростовской области, Ростовским областным патологоанатомическим бюро, Российским обществом патологоанатомов. В работе конференции приняли участие патологоанатомы Ростова-на-Дону, Ростовской области, Краснодарского края, Северного Кавказа, научные сотрудники Ростовского государственного медицинского университета, Ростовского научно-исследовательского онкологического института. Открыла конференцию министр здравоохранения Ростовской области Т.Ю. Быковская, подчеркнувшая большой вклад А.Э. Мациониса в развитие патологоанатомической службы, отметив его незаурядные организаторские способности и крупные научные достижения.

На конференции были заслушаны доклады А.М. Ковригиной (Москва) «Новое в классификации ВОЗ, 2017: диагностика лимфом и лимфопролиферативных заболеваний», В.В. Байкова (Санкт-Петербург) «Новое в классификации ВОЗ, 2017: миелолифоидные опухоли», Д.М. Коновалова (Москва) «CD30-позитивные лимфомы в детском возрасте, дифференциальная диагностика с неопухолевыми процессами», П.Э. Повилайтите (Ростов-на-Дону) «Диагностика опухолей гемopoэтической и лимфоидной тканей в ГБУ РО «ПАБ», Т.А. Агеевой (Новосибирск) «Экстранодальные лимфомы. Лимфомы ЦНС: патогенез,

диагностика» и Л.В. Кактурского (Москва) «Новейшие требования к формулировке патологоанатомического диагноза».

В выступлении академика РАН Г.А. Франка прозвучали слова, характеризующие А.Э. Мациониса как человека большой души, огромных знаний и бескорыстной любви к людям. Он поделился воспоминаниями о последней встрече с А.Э. Мационисом на международном конгрессе Европейского общества патологоанатомов в Кельне (Германия), о посещении Бремена.

А.М. Ковригина продемонстрировала видеозапись последнего выступления Александра Эдуардовича на «Лимфофоруме». Участники конференции увидели и услышали эмоциональное, как всегда, выступление и ощутили его незримое присутствие в зале.

В докладах Г.Л. Резниковой и П.Э. Повилайтите были освещены этапы развития Ростовского областного патологоанатомического бюро, связанные с деятельностью А.Э. Мациониса, активно внедрявшего в работу высокотехнологичные современные методы морфологического исследования.

Конференция прошла на высоком уровне. Ее участники отдали заслуженную дань памяти Александру Эдуардовичу Мационису и обогатились новыми знаниями, необходимыми в повседневной практической работе.

*Евгения Непомнящая,  
доктор медицинских наук, профессор,  
руководитель патологоанатомического отделения  
Ростовского научно-исследовательского  
онкологического института*

# ПАМЯТИ ИРИНЫ АЛЕКСАНДРОВНЫ КАЗАНЦЕВОЙ (2.09.1938 – 27.02.2019)

27 февраля 2019 года после тяжелой болезни ушла из жизни выдающийся отечественный патологоанатом Ирина Александровна Казанцева, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный работник здравоохранения Российской Федерации, Заслуженный деятель науки Российской Федерации.

Профессиональная деятельность Ирины Александровны и ее творческий путь в науке были связаны с наиболее востребованной клинической медициной областью знаний – онкоморфологией. В 1961 году И.А. Казанцева окончила лечебный факультет Первого ММИ имени И.М. Сеченова, в 1966 году – аспирантуру по патологической анатомии при МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского, в 1967-м защитила кандидатскую диссертацию на тему «Предрак и рак гортани (патоморфологическое и цитологическое исследование)», в 1974-м – докторскую диссертацию на тему «Митотический режим, концентрация сульфгидрильных групп и содержание ДНК при гиперплазии и малигнизации некоторых эпителиальных тканей человека». В 1986 году ей было присвоено звание профессора.

С 1978 по 1992 год И.А. Казанцева возглавляла центральную патологоанатомическую лабораторию НИИ морфологии человека РАМН. Во главе центральной патологоанатомической лаборатории она проводила большую организационную работу по совершенствованию патологоанатомической службы в стране. Под ее руководством лаборатория выполняла функции Всесоюзного научно-методического центра патологоанатомической службы, издавая научно-методическую литературу, участвуя в подготовке нормативных документов Министерства здравоохранения. По инициативе И.А. Казанцевой и при ее участии в стране была проведена чрезвычайно важная перестройка патологоанатомической службы с созданием централизованных патологоанатомических бюро. С 1992 года и до последних дней жизни Ирина Александровна Казанцева руководила патологоанатомическим отделением МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского, не разрывая научную и творческую связь с НИИ морфологии человека.

Научно-исследовательская деятельность И.А. Казанцевой была посвящена фундаментальным и при-



кладным исследованиям в области онкоморфологии – патологии митоза при предраковых процессах и в различных опухолях, опухолевой патологии при иммунодефицитных состояниях, клинической морфологии новообразований эндокринных желез, рака желудка, молочной железы и гастроинтестинальных стромальных опухолей. Одной из первых в России она занялась проблемой IgG4-связанной болезни. Результаты ее научных исследований получили международное признание, опубликованы в более чем 400 работах, в том числе в восьми монографиях и главах в руководствах.

Выступления Ирины Александровны с научными докладами и лекциями всегда вызывали живой интерес у слушателей благодаря ее незаурядному таланту лектора, яркой индивидуальности личности, высочайшей эрудиции и широкому кругозору.

Ирина Александровна Казанцева являлась блестящим диагностом, непререкаемым авторитетом в клинической онкоморфологии и других областях патологической анатомии.

И.А. Казанцева уделяла большое внимание воспитанию научных кадров. В течение 26 лет она вела преподавательскую работу в системе дополнительного медицинского образования в качестве профессора последипломной кафедры патологической анатомии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова на всем протяжении периода существования этой кафедры. Будучи членом диссертационных советов МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского и НИИ морфологии человека,

Ирина Александровна часто выступала официальным оппонентом при защите кандидатских и докторских диссертаций и рецензентом научных работ. Ирина Александровна Казанцева щедро делилась своими знаниями и опытом с молодыми специалистами, под ее руководством были защищены восемь докторских и 17 кандидатских диссертаций.

И.А. Казанцева вела большую научно-практическую и организационную работу, являясь главным патологоанатомом Минздрава Московской области и главным внештатным патологоанатомом Центрального федерального округа, членом совета старейшин Российского общества патологоанатомов.

Ирина Александровна была яркой, незаурядной личностью, притягивавшей к себе людей. Ее отличали преданность науке и любимой работе, она высоко чтит отечественные научные традиции, помнила своих наставников и учителей и с благодарностью отзывалась о них. Высокий профессионализм, честность, поря-

дочность и бескомпромиссность снискали ей глубочайшее уважение окружающих. Присущее ей чувство юмора всегда создавало вокруг Ирины Александровны ореол непосредственности и радостного мироощущения. Дочь великой певицы Надежды Аполлинарьевны Казанцевой, Ирина Александровна Казанцева была знатоком и ценителем оперного искусства, увлекалась живописью, любила путешествовать и делиться впечатлениями. Память о выдающемся ученом и светлом человеке навсегда сохранится в сердцах ее многочисленных коллег, учеников и всех, кто ее знал.

*Коллектив Научно-исследовательского института  
морфологии человека,  
редакционная коллегия журнала  
«Клиническая и экспериментальная морфология»,  
Российское общество патологоанатомов*