

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2226-5988

№ 2 (26) / 2018

## «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*

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*

Профессор *Л.М. Михалева*

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

- |  |    |   |
|--|----|---|
| <p><i>Л.Ф. Курило</i><br/>Количественные методы оценки мейоза женских и мужских половых клеток</p>   | 4  | <p><i>L.F. Kurilo</i><br/>Methods of quantitative evaluation of the meiotic pathology of male and female germ cells</p>   |
| <p><i>Ю.М. Забродская, Д.А. Ситовская, С.М. Малышев, Т.В. Соколова, Д.В. Рыжкова, В.Г. Нездоровина, Г.В. Одинцова</i><br/>Редкое наблюдение фармакорезистентной эпилепсии, ассоциированной с кортикальной микродисгенезией</p> | 13 | <p><i>Yu.M. Zabrodskaya, D.A. Sitovskaya, S.M. Malyshev, T.V. Sokolova, D.V. Ryzhkova, V.G. Nezdorovina, G.V. Odintsova</i><br/>A rare case of drug-resistant epilepsy associated with cortical microdysgenesis</p> |

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

- |   |    |  |
|---|----|--|
| <p><i>И.С. Цветков, М.Т. Добрынина, В.А. Мхитаров, Л.П. Михайлова, О.В. Макарова</i><br/>Морфологические изменения органов иммунной системы у самцов мышей C57BL/6 при воздействии высокой дозы тестостерона</p>  | 19 | <p><i>I.S. Tsvetkov, M.T. Dobrynina, V.A. Mkhitarov, L.P. Mikhailova, O.V. Makarova</i><br/>Morphological changes in the organs of the immune system in male C57BL/6 mice after high dose testosterone treatment</p>                                       |
| <p><i>Д.А. Цомартова, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, С.В. Назимова, Ю.П. Следнева, В.В. Яглов</i><br/>Изменения кортикостероцитов клубочковой зоны надпочечников крыс при воздействии низких доз ДДТ в постнатальном развитии</p>                               | 25 | <p><i>D.A. Tsomartova, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, S.V. Nazimova, Y.P. Sledneva, V.V. Yaglov</i><br/>Changes in adrenal zona glomerulosa cells of rats exposed to low doses of DDT during postnatal development</p>                                     |
| <p><i>А.Г. Бабаева, Н.В. Тишевская, Н.М. Геворкян</i><br/>Морфофункциональные особенности эритропоэза, наблюдаемые при воздействии суммарной РНК мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга</p>   | 31 | <p><i>A.G. Babaeva, N.V. Tishevskaya, N.M. Gevorkyan</i><br/>Morphofunctional features of in vitro erythropoiesis under the influence of total RNA from bone marrow multipotent mesenchymal stromal cell</p>   |
| <p><i>Н.А. Золотова, Ю.Е. Козловский, Е.А. Тихонов, О.В. Макарова, Г.В. Козловская, Н.Ф. Чертович</i><br/>Морфологическая характеристика слизистой оболочки ободочной кишки у крыс Спрейг-Дуоли при воздействии пробиотика <i>Lactobacillus plantarum</i></p> | 36 | <p><i>N.A. Zolotova, Yu.E. Kozlovsky, E.A. Tikhonov, O.V. Makarova, G.V. Kozlovskaya, N.F. Chertovich</i><br/>Morphological characteristics of the colonic mucosa in the Sprague-Dawley rats under effect of probiotics <i>Lactobacillus plantarum</i></p> |

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

- |  |    |   |
|--|----|---|
| <i>Т.В. Липина, А.В. Комова,<br/>С.Ю. Сосновская, Н.В. Кошелева</i><br>Эндогенные и экзогенные источники репарации<br>миокарда млекопитающих             | 42 | <i>T.V. Lipina, A.V. Komova,<br/>S.Y. Sosnovskaya, N.V. Kosheleva</i><br>Endogenous and exogenous sources of cardiac repair<br>in mammals                               |
| <i>К.А. Rogov, Н.Б. Тихонова,<br/>М.Н. Болтовская, А.П. Милованов</i><br>Морфологические аспекты нарушения репарации<br>миометрия после кесарева сечения | 48 | <i>K.A. Rogov, N.B. Tikhonova,<br/>M.N. Boltovskaya, A.P. Milovanov</i><br>Morphological aspects of the disturbances of the<br>myometrial repair after cesarean section |
| <i>А.А. Веревкин, А.А. Славинский, Е.Д. Космачева</i><br>Морфофункциональная характеристика<br>отторжения трансплантированного сердца                    | 55 | <i>A.A. Verevkin, A.A. Slavinskiy, E.D. Kosmacheva</i><br>Morphofunctional characteristic of the transplanted<br>heart rejection  |

## ДИСКУССИИ DISCUSSIONS

- |   |    |  |
|---|----|--|
| <i>О.В. Подобед, В.Л. Коваленко</i><br>Методологические и технологические аспекты<br>достоверного клинико-патологоанатомического<br>анализа летальных исходов           | 61 | <i>O.V. Podobed, V.L. Kovalenko</i><br>Methodological and technological aspects of a reliable<br>clinical and pathological analysis of lethal outcomes |
| <i>И.В. Дмитриев, А.Е. Доросевич</i><br>Унифицированная формулировка<br>клинического и патологоанатомического<br>(судебно-медицинского) диагнозов<br>и их сопоставление | 65 | <i>I.V. Dmitriev, A.E. Dorosevich</i><br>Unified clinical and pathologic (forensic) diagnosing<br>and comparison of diagnoses                          |

## НЕКРОЛОГ OBITUARY

- |  |    |
|--|----|
| Памяти<br>Юрия Ивановича<br>Денисова-Никольского | 69 |
|--|----|

## ХРОНИКА CHRONICLE

- |   |    |
|---|----|
| X пленум Российского общества<br>патологоанатомов | 70 |
|---|----|

# КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ МЕЙОЗА ЖЕНСКИХ И МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

*Л.Ф. Курило*

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

Целью исследования являлась разработка количественных методов оценки нарушений последовательных стадий мейоза (профазы I: прелептотены, лептотены, зиготены, пахитены, диплотены, диктиотены; метафазы I и II мейоза, ана- и телофазы I и II мейоза (MI и MII)), а также неидентифицируемых, дегенерирующих женских и мужских гамет млекопитающих. Отработаны методы количественной оценки стадий мейоза. Приведены результаты исследований нарушения стадий женского и мужского мейоза при воздействии на организм физическими, биологическими или химическими (ТиоТЭФ, 17-β-эстрадиол, алкоголь, никотин) факторами. Эти факторы приводят к снижению числа гамет, блоку стадий мейоза, повышению частоты дегенерации гамет, бесплодию.

*Ключевые слова:* митоз, мейоз, профаза, метафаза, анафаза, телофаза, яйчники, яички, ооциты, сперматоциты

Целью данного исследования была разработка количественных методов оценки нарушений разных стадий мейоза (профазы I: прелептотены, лептотены, зиготены, пахитены, диплотены, диктиотены; метафазы I и II мейоза, ана- и телофазы I и II мейоза), неидентифицируемых – дегенерирующих женских и мужских гамет млекопитающих. Как ни один другой из 230 типов клеток организма млекопитающих, половые клетки, участвуя в оплодотворении, обеспечивают своей уникальной генетической информацией (геномом) развитие нового организма.

Первичные половые клетки (ППК), сформированные в области эпибласта, при миграции заселяют гонады, дифференцируются в гонии и обладают высокой потенцией к пролиферации митозом, формируя резерв половых клеток: несколько миллионов гамет – у плода женского пола, то есть в антенатальный период у млекопитающих, и миллиарды – в мужском организме, после наступления полового созревания.

После заселения гаметами гонад хронология и динамика дальнейшей дифференцировки ППК зависят от вида и пола эмбриона. В яйчниках эмбрионов и плодов женского пола ППК после нескольких митозов и завершения последнего, премейотического, синтеза ДНК (в ооцитах I в прелептотене) переходят в мейоз (рис. 1). Профаза I мейоза, в отличие от профазы митоза, многостадийная, состоящая из прелептотены, лептотены, зиготены, пахитены, диплотены, диктиотены. У плодов женского пола в ооцитах I – первичных ооцитах, заключающихся в примордиальные фолликулы на стадии диплотены [13], мейоз останавливается (на стадии

диктиотены профазы I мейоза) и продолжается лишь при наступлении полового созревания (рис. 1) [13]. В мужском организме кроме прелептотены все последующие стадии профазы I мейоза и дальнейшая дифференцировка гамет происходят в половозрелый период (рис. 2) [29].

При наступлении полового созревания, циклически, в гаметах (после завершения стадий профазы I мейоза) начинается развиваться диакинез, за ним – метафаза I мейоза, анафаза I мейоза и телофаза I мейоза, что обеспечивает образование из одной половой клетки (ооцита I или сперматоцита I) двух клеток. Далее, в сперматогенезе (рис. 2), образующиеся сперматоциты II равноценны, и в делении II мейоза из каждого из них формируются по две равноценные сперматиды. В оогенезе (рис. 1) при делении I мейоза из ооцита I формируются ооцит II (с максимальным количеством цитоплазмы) и первое полярное тельце. После короткой профазы II наступает метафаза II мейоза, затем анафаза II и телофаза II, при которых ооцит делится на яйцеклетку (с максимальным количеством цитоплазмы) и второе полярное тельце.

Внутренние и внешние факторы окружающей среды – физические, химические, биологические – могут индуцировать в гаметах генные, геномные или хромосомные мутации, проявляющиеся гаметотоксическими, эмбриотоксическими, тератогенными либо иными эффектами. Для половых клеток подобные факторы приводят к нарушениям: разных этапов дифференцировки гамет, формирования их резерва (не восстанавливающегося в женском организме), аномалиям

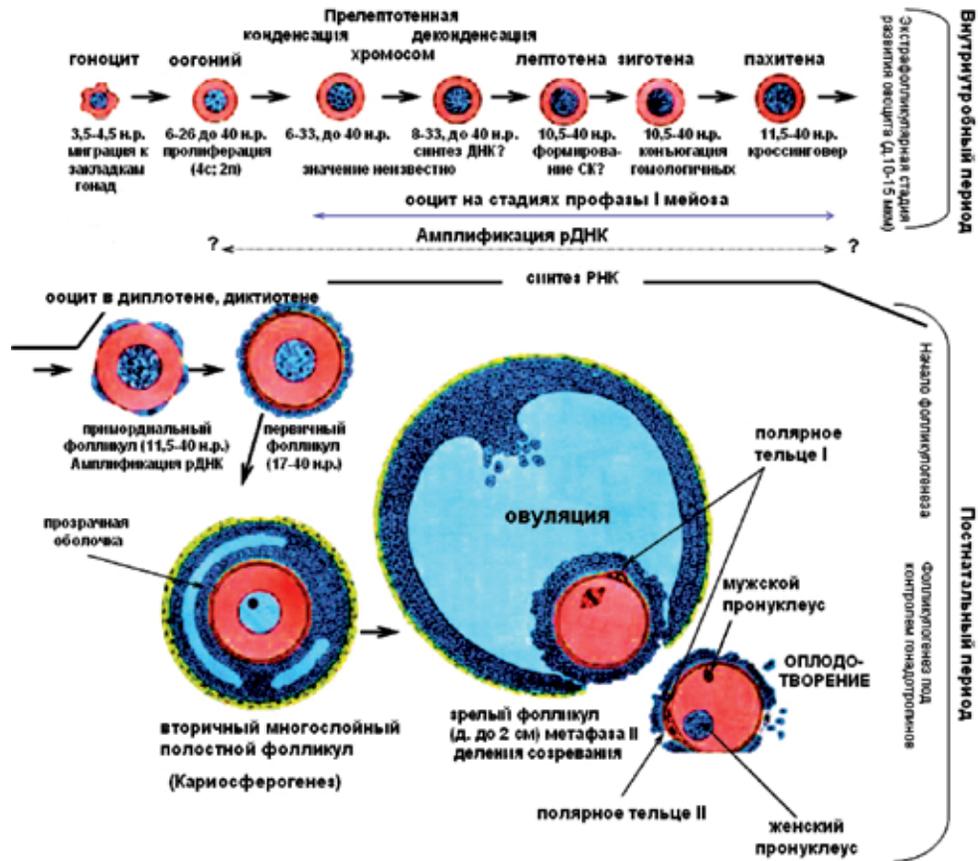


Рис. 1. Хронология и динамика оогенеза человека (Курило Л.Ф., 2012) [13]

оплодотворения и развития эмбрионов. Такие эффекты выявлены и нами в серии количественных исследований влияния ряда факторов на беременных мышей и крыс, на гаметогенез их потомства, а также на сперматогенез мужчин при воздействии некоторых факторов [6–9, 11, 12, 16, 19, 20, 26–28, 30–32]. Возможности анализа и имеющаяся информация о характере проявления и частоте развития мутаций и иных эффектов повреждающих факторов в гаметах, о степени патологии гамет (на разных стадиях развития) относительно их общего резерва в организме и даже само представление о динамике и хронологии, об особенностях и регуляторных механизмах дифференцировки и формирования резерва женских и мужских гамет млекопитающих находятся на этапе накопления фактов [13, 18, 29].

Мейоз гамет, проходя через перечисленные выше стадии (рис. 1, 2), может быть нарушен вследствие аномалии конденсации хромосом, их конъюгации или кроссинговера, при нарушении формирования веретена деления или расхождения центриолей, центромер, нарушении формирования метафазной пластинки хромосом по экватору веретена деления, при аномалии цитотомии в телофазе I или II мейоза, что может привести к формированию двух- или четырехъядерных гамет. Все эти формы патологии мейоза следует отмечать, каждую в отдельности, при проведении количественного подсчета соотношения половых клеток на каждой стадии

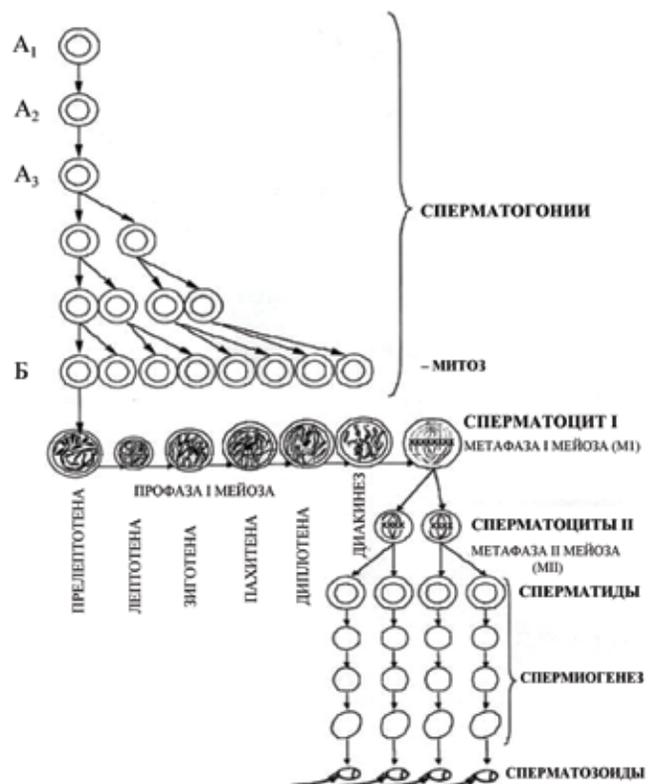


Рис. 2. Схема сперматогенеза человека (Курило Л.Ф., 1989) [15]

их развития при анализе состояния (патологии) стадий мейоза.

Длительный, многостадийный процесс оогенеза и сперматогенеза человека полностью доступен исследователю лишь при анализе аутопсийного материала или биоптата гонады, получение которого строго ограничено [10, 22–25]. Медицинским показанием для биопсии яичка являются олигозооспермия тяжелой степени и азооспермия, а такие случаи составляют в целом не более 30% от того числа мужчин, для которых необходимо проведение анализа всех стадий сперматогенеза. Получение биопсии из интактного яичника женщины проводить не разрешается. Анализ его структур, в том числе гамет, возможен лишь при получении фрагмента яичника при изъятии ткани гонады в процессе ее хирургического удаления по медицинским показаниям [22].

### Материалы и методы

Материалом служили гистологические срезы яичников и семенников мышей и крыс разного возраста (в исследованиях выполнялись требования Европейской конвенции по защите позвоночных животных и соответствующих документов Российской Федерации) [10, 22–25], женских и мужских гонад и гамет эмбрионов и плодов человека, полученных при спонтанных и медицинских абортках, фрагменты гонад от секционного материала, а также образцы эякулята от доноров спермы (табл. 1, 1-я группа, 23 человека), от мужчин – ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) (табл. 1, 2-я группа – 27 мужчин, эякулят от них был получен и проанализирован в 1992 году). Практически у всех обследованных в лаборатории ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС был выявлен простатит, поэтому для сравнения состояния сперматогенеза у них и исключения влияния на гаметы простатита в исследование были включены 14 мужчин с хроническим простатитом (табл. 1, 3-я группа), а для сравнения с иными причинами нарушения сперматогенеза сформирована 4-я группа (10 мужчин с гонореей, после лечения).

Проведено также исследование состояния сперматогенеза с помощью разработанных нами количественных методов оценки состояния мейоза у мужчин репродуктивного возраста, перенесших вирусную (вирус простого герпеса, вирус папилломы или цитомегаловирус) либо бактериальную (хламидийную или микоплазменную) урогенитальную инфекцию [1–5, 11, 19, 26, 31, 32] (табл. 1, 5-я группа – 24 мужчины с герпесвирусной инфекцией в сперматозоидах) [4]. В обследование включали мужчин в возрасте 23–45 лет, проводили стандартный спермиологический анализ (ВОЗ, 1992), анализ форм патологии спермиев, количественный кариологический анализ состава (по всем стадиям развития) незрелых половых клеток (НПК) из эякулята (Курило Л.Ф., патент № 2328736, 2007) [15, 17, 21], цитогенетический анализ (хромосом лимфо-

цитов периферической крови). Поскольку в оогенезе у млекопитающих митозы оогониев и все стадии профазы I мейоза от прелептотены до диктиотены, а также формирование примордиальных фолликулов вокруг диплотены [13, 14] проходят в антенатальный период онтогенеза, анализ патологии (и состояния) мейоза в женских гаметах проводили у эмбрионов и плодов человека (спонтанно абортированных или после выполнения медицинского аборта по медицинским показаниям), а также у эмбрионов и плодов нелинейных мышей и крыс, мышей линии СВА, 101/Н, АКР или у половозрелого потомства этих животных (Курило Л.Ф., патенты № 2328736, 2007 и № 2367949, 2008) [6–9, 12, 14–16, 20, 27, 28, 31]. Другими словами, состояние стадий мейоза и гаметогенеза в целом оценивали количественными методами согласно виду, полу и возрасту обследуемых. Вывод животных из эксперимента проводили путем дислокации шейных позвонков [10, 22–26].

Биоптаты гонад или фрагменты аутопсийного материала гонад фиксировали в растворе Буэна, приготовленном *ex tempore*, и далее подвергали стандартной гистологической обработке: после обезвоживания фрагменты гонад заливали в парафин, готовили срезы (толщиной 6–7 микрон), окрашивали их гематоксилином Эрлиха с докрасиванием эозином, заключали в канадский бальзам. Количественный анализ состояния гамет на разных стадиях мейоза выполняли подсчетом половых клеток на тотальных препаратах суспензии гамет или на серийных срезах фрагментов гонад (биопсии или аутопсии) (через 5–10 срезов) с использованием следующих цитологических показателей: 1) индекс половых клеток (в %) – доля гамет от общего числа подсчитанных клеток (половых и соматических); 2) индекс дегенерации – доля дегенерирующих (гамет от общего числа подсчитанных (в %); 3) мейотический индекс половых клеток (в % от общего числа подсчитанных гамет); 4) доля гамет на каждой стадии профазы I мейоза (в % от суммы подсчитанных гамет в профазе I мейоза); 5) доля гамет на каждой из стадий метафазы I или II, анафазы I или II, телофазы I или II мейоза (в %, в зависимости от общего числа подсчитанных гамет в мейозе I или II); 6) доля неразшедшихся гамет в MI и MII (в %, в зависимости от числа подсчитанных гамет в ана- и телофазе MI и MII (табл. 1 и 2, колонка 7). Все полученные количественные данные обрабатывали статистически в программе Statistica 6,0 (StatSoft), достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Исследовали состав НПК и состояние стадий мейоза у 23 здоровых фертильных мужчин – доноров эякулята, с кариотипом 46,XY (табл. 1, условно контрольные, 1-я группа). Полученная в данной группе доноров эякулята информация о состоянии и соотношении стадий мейоза мужских гамет служит контролем для сперматогенеза человека [15, 21]. Вначале проведено количествен-

Таблица 1

Количественные данные по соотношению НПК на разных стадиях мейоза из эякулята обследованных мужчин (доля в процентах от числа подсчитанных половых клеток) [14]

Группы пациентов	Число анализированных незрелых половых клеток (НПКЭ) на одного пациента	Количественные данные по составу незрелых половых клеток различных стадий развития в эякуляте обследованных пациентов						
		Сперматогциты в профазе I мейоза			Сперматогциты в метафазе I, II мейоза (%)	Сперматогциты и сперматиды (%)	Неидентифицируемые НПКЭ (%)	Неразошедшиеся в MI и MII гаметы (%)
		предпахитена (%)	пахитена (%)	диплотена (%)				
1-я (n=23) Контроль	345,53±24,07	1	2	3	4	5	6	7
2-я (n=27) Ликвидаторы последствий аварии на ЧАЭС	331,07±21,35	0,66±0,16	0,45±0,10	1,11±0,26	0,04±0,02	91,99±0,89	5,85±0,85	22,98±2,65
3-я (n=14) Простагит	258,57±42,09	1,18±0,42	0,10±0,03	1,58±0,37	0,01±0,01	87,06±1,93	5,72±0,99	22,60±3,65
4-я (n=10) Гонорея	307,80±47,76	0,93±0,42	0,55±0,27	1,28±0,39	0,10±0,07	88,35±2,83	8,22±2,19	24,70±4,38
5-я (n=24) Сперматозоиды с ВИП	300	1,93±0,42	0,08±0,07	0,23±0,10	0	85,44±4,84	13,67±5,66	29,56±6,74
						87,07±1,16	10,61±1,06	21,80±1,64

Таблица 2

Состояние мейоза в НПК из эякулята обследованных мужчин  
(доля в процентах от числа подсчитанных половых клеток определенных стадий) [14]

Группа доноров (n=23) и (№ 1-12) пациентов	Число анализированных незрелых половых клеток (НПКЭ) на одного пациента, %	Количественные данные по составу незрелых половых клеток различных стадий развития в эякуляте обследованных пациентов							Неразошедшиеся в М1 и МII гаметы, %
		Сперматоциты в профазе I мейоза				Сперматоциты в метафазе I, II мейоза, %	Сперматоциты вторичные и сперматиды, %	Неидентифицируемые НПКЭ, %	
		Сперматоциты, предпахитена, %	пахитена, %	диплотена, %	3				
1		2	3	4	5	6	7		
Доноры	345,53±24,07	0,66±0,16	0,45±0,10	1,11±0,26	0,04±0,02	91,99±0,89	5,85±0,85	22,98±2,65	
Пациенты с бесплодием									
1	89	0	0	0	0	85	14	24	
2	49	0	0	0	0	96	4	21	
3	24	0	0	0	0	100	0	4	
4	28	0	0	0	0	100	0	0	
5	152	0	0	0	0	95	5	17	
6	74	2,7	1,3	0	0	96	0	2,5	
7	113	2	0	0	0	92,6	5,4	13	
8	229	6	0,9	1,7	0	83	8,4	16	
9	114	3,4	0,8	0,8	0	81	14	3	
10	80	2,5	1,3	1,3	0	92,5	2,4	7	
11	177	1	0	0,6	0	92	6,4	31	
12	25	0	0	0	0	68	32	29	

ное исследование мейоза на тотальных препаратах незрелых половых клеток из эякулята 12 пациентов с бесплодием неясной этиологии (табл. 2). У семи из 12 мужчин выявлен блок прохождения гаметой стадий прелептотена–лептотена–зиготена (то есть до стадии пахитены), у четырех – также блок в пахитене, у одного – блок в диплотене. У одного пациента отмечено повышение уровня нерасхождения гамет в ана- и телофазах МI и МII. У пяти пациентов показатели концентрации сперматозоидов в 1 мл эякулята значительно превышали условно контрольный уровень. У двух мужчин с азооспермией (отсутствие спермиев в эякуляте) в осадке эякулята были обнаружены атипичные сперматозоиды: у первого – 52 на 500 полей зрения, у второго – 253 на 500 полей зрения. У обоих пациентов выявлен блок сперматогенеза на стадиях прелептотены–зиготены, а также повышение уровня сперматид с неразошедшимися в ана- и телофазах МI и МII клетками и повышение числа гамет в дегенерации. У четырех мужчин этой группы установлено повышение количества сперматоцитов II и сперматид на фоне практически сниженного числа НПК, у одного – снижение их числа, что свидетельствует о нарушении прохождения гаметой ана- и телофаза МI и МII и может быть причиной азооспермии. Результаты проведенного исследования эякулята данной группы 12 пациентов (по диагнозу – мужское бесплодие неясного генеза, азооспермия или олигозооспермия тяжелой степени) однозначно свидетельствуют о том, что более четкая (детальная) характеристика заключения о состоянии сперматогенеза и, по возможности, его стадий будет способствовать более конкретному представлению о причинах и механизмах развития разных форм патозооспермии у пациентов (при разных клинических случаях) и о путях ее корректирования.

Следующим этапом работы стали исследования особенностей нарушения каждой стадии мейоза у пациентов, включенных в разные группы, согласно причине их бесплодия. При отработке критериев оценки нарушения стадий мейоза [4, 17, 21] проводили исследование каждой стадии НПК из эякулята пациентов с патозооспермией разной этиологии. Кроме 1-й группы – контрольной (доноры эякулята), во 2-ю группу включены 27 мужчин – ликвидаторы последствий аварии на ЧАЭС; 3-ю группу составляли 14 мужчин с хроническим простатитом; 4-ю – 10 мужчин, переболевших гонореей (табл. 1). В исследовании использовали эякулят мужчин активного репродуктивного возраста – от 23 до 45 лет. У всех мужчин 1–4-й групп кариотип был без патологии, 46,XY.

Наиболее высокое по сравнению с контролем повышение числа сперматоцитов в метафазе I и II мейоза было в 4-й группе – у пациентов, перенесших гонорею. У них же отмечено максимальное количество (около 30% по сравнению с 23% в контроле) не разошедшихся сперматоцитов 1 в МI и сперматоцитов 2 в МII, что свидетельствует о частичном блоке МI и МII на ме-

тафазы, ана- и телофаза, а также значительное повышение числа неидентифицируемых гамет, то есть НПК в дегенерации – более 13% (табл. 1). У мужчин – ликвидаторов последствий аварии на ЧАЭС (2-я группа, табл. 1) выявлено повышение числа НПК на стадиях до пахитены (то есть блок мейоза в прелептотене, лептотене и зиготене) [15, 21].

Разработку количественного анализа состояния женского мейоза начинали на эмбрионах и плодах животных (мыши, крысы, коровы) и гонадах эмбрионов и плодов человека (от спонтанных и медицинских абортов), поскольку в женском организме стадии профазы I мейоза протекают антенатально [6–9, 12–14].

Нами проведены серии экспериментов по введению беременным животным (мышам или крысам) некоторых соединений с последующей оценкой их влияния на формирующиеся гонады и дифференцирующиеся гаметы их эмбрионов, плодов и половозрелого потомства. Были уточнены хронология и динамика появления каждой из последовательных стадий профазы I мейоза в оогенезе и их морфология (у эмбрионов и плодов человека, коровы, мыши и крысы). Это позволило выявлять нарушение данных стадий у потомства при повреждающих воздействиях на беременных самок – мышей, крыс (использовали ТиоТЭФ, окситетрациклин (ОТЦ), алкоголь, никотин, 17-β-эстрадиол) [6–9, 12, 16]. Например, введение препарата ТиоТЭФ самкам мышей на 12-й день беременности приводит к многократному снижению числа гамет у их 19-дневных плодов и женского, и мужского пола, замедлению дифференцировки женских гамет по стадиям профазы I мейоза, отставанию хромосом при митозе гамет [6–9, 12, 14–16, 20, 27, 28, 30]. Повреждающий эффект алкоголя на гаметы плодов мужского пола имеет пролонгированный характер и проявляется у половозрелого потомства крыс на завершающих этапах сперматогенеза в виде повышения числа сперматоцитов с отставанием хромосом при формировании их в метафазную пластинку, в ана- и телофазах и других форм патологии при МI и МII, что может быть причиной формирования гамет с анеуплоидией [14, 15, 18, 27].

Определен спектр форм патологии мейоза также в яичниках и семенниках половозрелого потомства грызунов после антенатального воздействия на беременных ими самок грызунов окситетрациклином, алкоголем, никотином, ТиоТЭФ или другими соединениями в разные сроки беременности, при внутриутробном развитии этого потомства [6–9, 12, 14–16, 27–31]. В оогенезе и сперматогенезе у потомства этих самок выявлен блок мейоза на стадиях прелептотены–лептотены–зиготены, либо пахитены или диплотены профазы I мейоза, либо ана- и телофаза МI и МII (мейоза), снижение числа овулирующих яйцеклеток, что объясняет снижение количества и качества дифференцирующихся гамет и повышает риск бесплодия при наступлении репродуктивного возраста [6–9, 12, 14–16, 27–31].

Нами проведена также серия исследований влияния перенесенных урогенитальных инфекций (бактериальной – хламидийной или микоплазменной; вирусной – вирус простого герпеса, вирус папилломы, цитомегаловирус) на гаметогенез с помощью оценки стадий мейоза в сперматогенезе у человека (5-я группа, табл. 1). Были установлены частичный блок сперматогенеза на стадиях предпахитены, снижение числа сперматоцитов I в пахитене, диплотене, сперматоцитов II и сперматид, повышение числа гамет в дегенерации и разных форм патологии сперматозоидов (с цитоплазматической каплей на шейке, головке, с аморфной головкой, аномалиями жгутика, нарушением (снижением) их концентрации и подвижности, нарушением цитотомии) у пациентов, перенесших какую-либо из указанных выше урогенитальных инфекций [1–5, 11, 15, 19, 26, 31, 32].

Полученные данные свидетельствуют об информативности используемых критериев анализа и о возможности количественной оценки нарушения определенных стадий мейоза при дифференцировке гамет. В ряде случаев это позволяет установить причину аномалии мейоза и может стать основой для разработки профилактики определенных форм аномалии мейоза и нарушений репродукции в целом. Последние могут приводить к снижению резерва и женских, и мужских половых клеток, нарушениям структуры и митотических, и мейотических хромосом, развитию хромосомных, геномных и генных мутаций, что отражается и на фенотипических изменениях, на гаметогенезе и состоянии репродуктивного здоровья следующих поколений [1–9, 11, 14, 15, 18, 19, 31, 32].

## Заключение

Количественные методы анализа состава незрелых половых клеток (из эякулята или яичника) позволяют выявлять нарушения мейоза на стадиях его развития и другие формы (снижение числа гамет, повышение числа аномальных гамет и их дегенерацию) патологии женского или мужского гаметогенеза, что говорит о необходимости внедрения такого анализа в практику диагностики патологии репродукции у пациентов, а также при проведении токсикологических исследований.

## Литература/References

1. Абудуев Н.К., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Брагина Е.Е., Гришина Е.М. Состояние сперматогенеза у мужчин с урогенитальными инфекционными заболеваниями. В сб.: Отечественная дерматовенерология: Проблемы поиска решения / Под ред. Н.И. Никулина. Н. Новгород, 2000. С. 158–160 [Abuduev N.K., Kurilo L.F., Shileiko L.V., Bragina E.E., Grishina E.M. The state of spermatogenesis in men with urogenital infectious diseases In: Nikulin N.I. (ed.) Otechestvennaya dermatovenerologia. N. Novgorod, 2000. P. 158–160. (In Russ.)].
2. Бочарова Е.Н., Брагина Е.Е., Гусак Ю.К., Зыкова М.С., Лихаев Д.Н., Зотов В.В., Терещенко А.Б., Шилейко Л.В., Курило Л.Ф., Климова Р.Р., Куц А.А. Спонтанное прерывание бере-

менности, неудачи при использовании репродуктивных технологий и герпетическое инфицирование сперматозоидов // Андрология и генитальная хирургия. 2006. № 1. С. 59–65. [Bocharova E.N., Bragina E.E., Gusak Y.K., Zikova M.S., Likhaev D.N., Zotov V.V., Tereshchenko A.B., Shileiko L.V., Kurilo L.F., Klimova R.R., Kusch A.A. Spontaneous termination of pregnancy, failure to use reproductive technologies and herpetic infection of spermatozoa // Andrologiya i genitalnaya khirurgiya. 2006. No 1. P. 59–65. (In Russ.)].

3. Бочарова Е.Н., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Брагина Е.Е., Юров Ю.Б., Ворсанова С.Г., Юров И.Ю., Климова Р.Р., Куц А.А. Анализ популяции половых клеток в эякуляте мужчин, инфицированных вирусом простого герпеса // Онтогенез. 2008. Т. 39, № 1. С. 1–11. [Bocharova E.N., Kurilo L.F., Shileiko L.V., Bragina E.E., Yurov Yu.B., Vorsanova S.G., Yurov I.Yu., Klimova R.R., Kusch A.A. Analysis of the population of germ cells in the ejaculate of men infected with herpes simplex virus // Ontogenez. 2008. V. 39., No 1. P. 1–11. (In Russ.)].
4. Бочарова Е.Н., Шилейко Л.В., Брагина Е.Е., Климова Р.Р., Куц А.А., Курило Л.Ф. Нарушение сперматогенеза человека: количественное исследование состава незрелых половых клеток при инфицировании сперматозоидов вирусом простого герпеса // Проблемы репродукции. 2006. Т. 12, № 6. С. 75–80. [Bocharova E.N., Shileiko L.V., Bragina E.E., Klimova R.R., Kusch A.A., Kurilo L.F. Violation of human spermatogenesis: a quantitative study of the composition of immature germ cells when infection with spermatozoa virus of herpes simplex // Problemy reproduktivnoy. 2006. V. 12, No 6. P. 75–80. (In Russ.)].
5. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.М., Бочарова Е.Н., Куц А.А., Гребенча С.В., Курило Л.Ф. Внутриклеточное инфицирование сперматозоидов человека вирусами группы герпеса // Андрология и генитальная хирургия. 2002. № 3. С. 81–82. [Bragina E.E., Abdumalikov R.M., Bocharova E.N., Kusch A.A., Grebencha S.V., Kurilo L.F. Intracellular infection of human spermatozoa by the herpes group viruses // Andrologiya i genitalnaya khirurgiya. 2002. V. 3. P. 81–82. (In Russ.)].
6. Игнатьева Е.Л., Курило Л.Ф., Марданова Г.В., Шевелева Г.А. Анализ повреждающего действия различных доз никотина на женские половые клетки плодов крыс // Цитология и генетика. 1987. Т. 21, № 2. С. 91–94. [Ignatieva E.L., Kurilo L.F., Mardanova G.V., Sheveleva G.A. Analysis of the damaging effects of various doses of nicotine on rat female fetal germ cells // Tsitologia i genetika. 1987. V. 21. № 2. P. 91–94. (In Russ.)].
7. Игнатьева Е.Л., Курило Л.Ф. Антенатальный оогенез мышей и его экспериментальная модификация // Онтогенез. 1984. Т. 15. № 2. С. 206–211 [Ignatieva E.L., Kurilo L.F. Antenatal oogenesis in mice and its experimental modification // Ontogenez. 1984. V. 15, No 2. P. 206–211. (In Russ.)].
8. Игнатьева Е.Л., Курило Л.Ф. Гаметотоксическое действие окситетрациклина на ранний антенатальный оогенез мышей в экспериментах in vivo и in vitro // Фармакология и токсикология. 1984. Т. 47, № 5. С. 75–77. [Ignatieva E.L., Kurilo L.F. Gametotoxic effect of oxytetracycline on early antenatal oogenesis of mice in experiments in vivo and in vitro // Farmakologiya i toksikologiya. 1984. V. 47, No 5. P. 75–77. (In Russ.)].
9. Игнатьева Е.Л., Курило Л.Ф. Гистологическая оценка репродуктивной функции яичников половозрелых мышей

- после антенатального воздействия окситетрациклином // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1984. Т. 97, № 5. С. 608–610. [Ignatieva E.L., Kurilo L. F. Histological assessment of reproductive function of ovaries of the pubertal mice after antenatal treatment with protein synthesis inhibitor. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 1984. V. 97, No 5. P. 608–610. (In Russ.).]
10. Каркищенко Н.Н., Грачев С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М., 2010. 344 с. [Karkishchenko N.N., Grachev S.V. The guide to laboratory animals and alternative models in biomedical researches M., 2002. 344 s. (In Russ.).]
  11. Кубанова А.А., Абудуев Н.К., Курило Л.Ф., Брагина Е.Е., Шилейко Л.В., Гришина Е.М. Влияние урогенитального хламидиоза и уреамикоплазмоза на состояние сперматогенеза мужчин // Вестник дерматологии и венерологии. 2000. № 6. С. 7–11. [Kubanova A.A., Abuduev N.K., Kurilo L.F., Bragina E.E., Shileiko L.V., Grishina E.M. Effect of urogenital chlamydiosis and urea- mycoplasmosis on the spermatogenesis of men // Vestnik dermtologii i venerologii. 2000. V. 6. P. 7–11.]
  12. Курило Л.Ф., Игнатъева Е.Л., Хилькевич Л.В., Леонов Б.В. Нарушение пролиферации оогониев при введении в культуру яичника плодов человека окситетрациклина либо 17-β-эстрадиола // Акушерство и гинекология. 1985. № 4. С. 53–55. [Kurilo L.F., Ignatieva E.L., Khil'kevich L.V., Leonov B.V. A Violation of the proliferation of oogonia in the introduction to the culture of human fetal ovary oxytetracycline or 17-β-estradiol // Akusherstvo i ginekologiya. 1985. V. 4. P. 53–55. (In Russ.).]
  13. Курило Л.Ф. Закономерности овоариогенеза и оогенеза млекопитающих: хронология и динамика развития гонад, гамет и фолликулов человека и млекопитающих животных. Saarbrücken: Lambert Acad. Publ., 2012. 282 с. [Kurilo L.F. Regularities of ovaryogenesis and oogenesis in mammals. M.: Lambert Acad Publ. 2012. 282 p. (In Russ.).]
  14. Курило Л.Ф. Способ диагностики генеративной потенции яичников. Заявка № 2008112732/15 (013771) от 03.04.2008. Патент № 2367949 [Kurilo L.F. Method of diagnostic of generative potency of ovaries (Patent for invention No. 2367949 from 03.04.2008). (In Russ.).]
  15. Курило Л.Ф. Способ цитологической диагностики нарушения сперматогенеза. Заявка № 2007103879 от 01.02.2007. Патент № 2328736 [Kurilo L.F. Method of cytological diagnostics of spermatogenetic disorders. Patent N 2328736 from 01.02.2007. (In Russ.).]
  16. Курило Л.Ф., Корогодина Ю.В., Игнатъева Е.Л. Действие тиофосфамида на популяцию дифференцирующихся половых клеток самок мышей линии СВА, 101/Н и АКР // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1983. Т. 95, № 6. С. 110–113 [Kurilo L.F., Korogodina Yu.V., Ignatieva E.L. The effect of thiophosphamide on the population of differentiating gametes of female mice line CBA, 101/H and AKR // Buleten'eksperimental'noy biologii i meditsiny. 1983. V. 95, No 6. P. 110–113. (In Russ.).]
  17. Курило Л.Ф., Любашевская И.А., Дубинская В.П., Гаева Т.Н. Кариологический анализ состава незрелых половых клеток эякулята // Урология и нефрология. 1993. № 2. С. 45–47 [Kurilo L.F., Lubashevskaya I.A., Dubinskaya V.P., Gaeva T.N. Karyological analysis of the composition of immature germ cells of ejaculate // Urologia i nefrologia. 1993. V. 2. P. 45–47. (In Russ.).]
  18. Курило Л.Ф., Макарова Н.П., Шилейко Л.В. Система оценки состояния сперматогенеза человека и млекопитающих (Клинические лекции) // Андрология и генитальная хирургия. 2005. № 4. С. 8–17. [Kurilo L.F., Makarova N.P., Shileiko L.V. System of assessment of the state of spermatogenesis in humans and mammals (clinical lectures) // Andrologiya i genitalnaya khirurgiya . 2005. V. 4. P. 8–17. (In Russ.).]
  19. Курило Л.Ф., Сорокина Т.М., Матюшенко Г.Н., Евдокимов В.В., Малолина Е.А., Ковалык В.П., Яковлева В.А., Гомберг М.А., Куц А.А. Влияние бессимптомных инфекций урогенитального тракта на показатели эякулята у мужчин с бесплодием и варикоцеле // Андрология и генитальная хирургия. 2016. № 2. С. 98–103. [Kurilo L.F., Sorokina T.M., Matyushchenko G.N., Evdokimov V.V., Malolina E.A., Kovalyk V.P., Yakovleva V.A., Gomberg M.A., Kushch A.A. Impact of asymptomatic urogenital tract infections on ejaculate parameters in infertile men with varicocele. Andrologiya i genitalnaya khirurgiy. 2016. V. 17, No 2. P. 98–103. (In Russ.).]
  20. Курило Л.Ф., Хилькевич Л.В., Дубинская В.П., Лильп И.Г. Эффект антенатального воздействия ТиоТЭФ на сперматогенез половозрелых мышей линии 101/Н и СВА // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1992. Т. 114, № 9. С. 307–308 [Kurilo L.F., Khil'kevich L.V., Dubinskiy V.P., Lil'p I.G. The effect of prenatal exposure Tiote on spermatogenesis of sexually mature mice lines 101/H and CBA// Bulletin'eksperimental'noy biologii i meditsiny. 1992. V. 114, No 9. P. 307–308. (In Russ.).]
  21. Курило Л.Ф., Чеботарев А.Н., Шилейко Л.В., Остроумова Т.В., Гаева Т.Н., Мхитаров В.А. Сравнительный анализ соотношения незрелых половых клеток на разных стадиях их дифференцировки в биоптате яичка и эякуляте у пациентов с азоо- и олигозооспермией // Проблемы репродукции. 1997. Т. 3, № 1. С. 80–84 [Kurilo L.F., Chebotarev A.N., Shileyko L.V. et al. Comparative analysis of the ratio of immature germ cells at different stages of their differentiation in the biopsy of the testis and ejaculate in patients with azoo- and oligozoospermia // Problemy reproduksii. 1997. V. 3, No 1. P.80–84. (In Russ.).]
  22. Порядок оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)», утвержденный приказом МЗ РФ 01.11. 2012 № 572н), приложение № 20 [The order of rendering of medical aid according to the specialty «Obstetrics and gynecology (with the exception of the use of assisted reproductive technologies)» from 01.11.2012 No 572н. Supplement №20. (In Russ.).]
  23. Правила и принципы проведения исследований с использованием экспериментальных животных: Закон Российской Федерации № 4979-1 от 14.05.1993 «О ветеринарии». [Rules and principles for research using experimental animals: Law of the Russian Federation №4979-1 of 14.05.1993 «On Veterinary». (In Russ.).]
  24. Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики». [Order of the Ministry of Health of

- the Russian Federation №267 of 19.06.2003 «On approval of the rules of laboratory practice».(In Russ.).
25. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р53434, 2009, «Принципы надлежащей лабораторной практики». [National Standard of the Russian Federation GOST R53434, 2009, «Principles of Good Laboratory Practice». (In Russ.).]
  26. Туленев Ю.А., Науменко В.А., Шилейко Л.В., Курило Л.Ф., Гущина Е.А., Альховский С.В., Куц А.А. Нарушение сперматогенеза при заражении вирусом простого герпеса в препубертатном периоде: исследование на модели органной культуры семенника мыши // Андрология и генитальная хирургия. 2012. № 3. С. 33–37. [Tulenev Yu.A., Naumenko V.A., Shileiko L.V., Kurilo L.F., Guschina E.A., Alkhovskiy S.V., Kusch A.A. Disturbance of spermatogenesis during infection with herpes simplex virus in the prepubertal period: study on the mouse testis organ culture model // *Andrologiya i genitalnaya khirurgiya*. 2012. V. 3. P. 33–37. (In Russ.)]
  27. Хилькевич Л.В., Курило Л.Ф. Влияние алкогольной интоксикации в антенатальном периоде на развитие мужских половых клеток крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1992. № 9. С. 305–306. [Khil'kevich L.V., Kurilo L.F. The influence of alcohol intoxication in the antenatal period on the development of male reproductive cells of rats // *Vyulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 1992. V 9. P. 305–306. (In Russ.)].
  28. Хилькевич Л.В., Курило Л.Ф. Гаметотоксический эффект антенатального воздействия ТiоТЭФ у мышей // Онтогенез. 1992. Т. 23, № 4. С. 401–406. [Khil'kevich L.V., Kurilo L.F. Gametotoxic effect of antenatal action of TioTEF in mice // *Ontogenez*. 1992. V. 23, No 4. P. 401–406. (In Russ.)].
  29. Хилькевич Л.В., Курило Л.Ф. Кинетика популяции мужских половых клеток человека в антенатальном периоде онтогенеза // Онтогенез. 1992. Т. 23, № 5. С. 506–510 [Khil'kevich L.V., Kurilo L.F. Kinetics of populations of male germ cells in the antenatal period of ontogenesis // *Ontogenez*. 1992. V. 23, No 5. P. 506–510. (In Russ.)].
  30. Хилькевич Л.В., Курило Л.Ф., Корогодина Ю.В. Эффект тиофосфамида на ранний период гаметогенеза у мышей линии СВА, 101Н и АКР // Цитология и генетика. 1991. Т. 25, № 6. С. 11–17. [Khil'kevich L.V., Kurilo L.F., Korogodina Yu.V. Effect of thiophosphamide on early gametogenesis in mice lines CBA, 101H and AKR // *Tsitologia i genetika*. 1987. V. 21, No 2. P. 91–94. (In Russ.)].
  31. Naumenko V., Tyulenev Y., Kurilo L., Shileiko L. et al. Detection and qualification of human herpes viruses types 4-6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases // *Andrology*. 2014;2(5):687–94.
  32. Naumenko V.A., Tyulenev Y.A., Yakovenko S.A., Kurilo L.F. et al. Detection of Cytomegalovirus in Motile Human Spermatozoa and Spermatogenetic Cells in Human Testis Organotypic Culture // *Herpesviridae*. 2011;2(1):7.

## METHODS OF QUANTITATIVE EVALUATION OF THE MEIOTIC PATHOLOGY OF MALE AND FEMALE GERM CELLS

*L.F. Kurilo*

The aim of the study was to develop quantitative methods to evaluate disturbances of meiosis at the stages of prophase I, namely preleptotene, leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, dictyotene, diakinesis; metaphase I and II, anaphase I and II, telophase I and II) as well as unidentifiable degenerating female and male mammal gametes. Methods for the quantitative evaluation of the stages of meiosis have been developed. The results of studies of female and male meiosis stages violation under chemical (thiophosphamid, 17- $\beta$ -estradiol, alcohol, nicotine), physical and biological factors are presented. These factors lead to the decrease in the number of gametes, block of meiotic stages, increasing frequency of gamete degeneration, and infertility.

*Key words:* mitosis, meiosis, prophase, metaphase, anaphase, telophase, ovaries, testes, oocytes, spermatoocytes

### Информация об авторе

Курило Любовь Федоровна – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории генетики нарушений репродукции Медико-генетического научного центра.

Адрес: 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1. Телефон 8 (499) 324 1320. E-mail: kurilo@med-gen.ru

*Материал поступил в редакцию 4 июля 2017 года*

# РЕДКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ ФАРМАКОРЕЗИСТЕНТНОЙ ЭПИЛЕПСИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С КОРТИКАЛЬНОЙ МИКРОДИСГЕНЕЗИЕЙ

*Ю.М. Забродская<sup>1</sup>, Д.А. Ситовская<sup>1</sup>, С.М. Малышев<sup>2</sup>, Т.В. Соколова<sup>1</sup>,  
Д.В. Рыжкова<sup>2</sup>, В.Г. Нездоровина<sup>1</sup>, Г.В. Одинцова<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова» – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Нарушения кортикального развития – это большая группа различных изменений в коре головного мозга, представляющая собой мальформации кортикальной организации. Гетеротопированные нейроны в I слое неокортекса впервые были описаны Н.Ж. Meencke и D. Janz (1984) под названием «микродисгенезии». Отмечено, что кортикальные микродисгенезии встречаются крайне редко и не являются специфичными для какой-то конкретной формы эпилепсии. Представлено редкое наблюдение фармакорезистентной эпилепсии у пациентки, обусловленной кортикальной микродисгенезией.

*Ключевые слова:* эпилепсия, фармакорезистентная эпилепсия, нарушения кортикального развития, кортикальная микродисгенезия, микродисгенезия

Фармакорезистентные эпилепсии составляют 30% всех форм данного заболевания, несмотря на существенные успехи современной неврологии и эпилептологии [1, 4]. Во внутриутробном периоде в результате различных патологических процессов формируются нарушения кортикального развития (НКР), представляющие собой большую группу различных изменений в коре головного мозга. Преимущественно НКР являются нарушением кортикального созревания, но по своей сути не все НКР – следствие сбоя процесса миграции нервных клеток [7]. Детальное изучение данного вопроса стало возможным только с развитием методов нейровизуализации, иммуногистохимического и молекулярного анализа. Выделяют локальные и диффузные НКР, также они могут сочетаться с другими пороками головного мозга. Причины развития НКР окончательно не ясны, однако в настоящее время обнаруживают все больше генов, отвечающих за развитие данной патологии [3, 5]. В 2004 году A. Palmiini et al. впервые ввели термин «легкие нарушения кортикального развития» (лНКР). Так, при лНКР I типа выявляют наличие большого количества кластеров гетеротопированных нейронов, находящихся субпiallyно в молекулярном слое коры, а при лНКР II типа – в субкортикальном белом веществе [6]. Н.Ж. Meencke и D. Janz в 1984 году впервые описали микродисгенезию: гетеротопию нейронов в I слой неокортекса [5]. В 2012 году A.J. Barkovich et al. была представлена современная дополненная класси-

фикация нарушений кортикального развития, в которой определены НКР в результате патологии пролиферации нейробластов и глии; как следствие нарушения нейрональной миграции, а также аномалий постмиграционного развития (формирования коры) [2]. Интересно, что Н.В. Samat и I. Blümcke (2015) отмечают, что дистопия нейронов в белое вещество – довольно частая находка при гистологическом исследовании мозга пациентов с эпилепсией, в то время как кортикальные микродисгенезии (лНКР) встречаются крайне редко и не являются специфичными для какой-то конкретной формы эпилепсии [7].

## Клиническое наблюдение

Пациентка Ш., 32 лет, находилась на лечении в РНХИ им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова в рамках поддержанного РФФИ научного проекта № 15-06-10816 с жалобами на приступы потери сознания, предваряемые аурой, эпизоды изолированной ауры и ухудшение памяти. Отмечалось два вида приступов.

1) Приступы потери сознания частотой 2–3 раза в месяц и чаще, провоцирующиеся эмоциональным напряжением, сменой погоды.

Аура: восходящая боль в груди (может отсутствовать). Приступ: потеря сознания, амбулаторный автоматизм, иногда психомоторное возбуждение, агрессивность.

Послеприступный период: слабость, сонливость.

2) Генерализованные судорожные приступы частотой 1–2 раза в месяц, преимущественно в период месячных.

Аура: восходящая боль в груди.

Приступ: потеря сознания, падение, генерализованные судороги, прикусывание языка, отхождение пены изо рта.

Послеприступный период: слабость, сонливость.

Со слов пациентки, первый приступ произошел в девятилетнем возрасте (1994 год), по описанию – генерализованный судорожный припадок, с прикусыванием языка, отхождением пены изо рта. Пациентку направили к неврологу, был назначен бензобарбитал в комбинации с карбамазепином. На фоне приема данных препаратов отмечались частые (6–7 раз в день) приступы в виде замираний, а также генерализованные судорожные приступы частотой 1–2 раза в месяц. Существенная динамика в виде урежения приступов до 8 раз в месяц наметилась с 2015 года на фоне приема вальпроатов 3000 мг/сут, оксаказефина 600 мг/сут и лакосамида 600 мг/сут. С июля 2016 года пациентка принимает комбинацию из вальпроатов 2000 мг/сут и лакосамида 600 мг/сут, на фоне которой число приступов снизилось до 2–3 раз в месяц. Концентрация вальпрооевой кислоты в плазме крови, определенная уже в стационаре, находилась в пределах референсных значений (83,7 мкг/мл).

Из анамнеза жизни известно, что пациентка родилась в срок, роды протекали с выдавливанием в ягодичном предлежании. В трехлетнем возрасте перенесла менингит неуточненной этиологии. Наследственность по эпилепсии не отягощена.

В неврологическом статусе на момент осмотра выявлялись когнитивные нарушения (по Монреальской шкале оценки когнитивных функций MoCA 23 балла).

При проведении электроэнцефалографии (ЭЭГ) регистрировались умеренно выраженные очаговые эпилептиформные изменения в височно-теменном отделе левого полушария с вовлечением в патологический процесс пароксизмального характера срединных структур головного мозга. По результатам трехчасового видео-ЭЭГ-мониторинга также был выявлен устойчивый очаг эпилептиформной активности в височной области левого полушария.

По данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга, выполненной по эпилептической программе, структурные изменения не выявлены, однако при позитронно-эмиссионной томографии/компьютерной томографии (ПЭТ/КТ) головного мозга с  $^{18}\text{F}$ -фтордезоксиглюкозой визуализировалась зона гипометаболизма глюкозы, локализованная в латеральной и медиобазальной коре левой височной доли с индексом межполушарной асимметрии 23% (рис. 1 А–Г), что позволило

локализовать эпилептический очаг и совпало с данными ЭЭГ.

Результаты обследования пациентки были обсуждены на заседании мультидисциплинарной группы по эпилепсии, где констатировали симптоматическую височно-долевую фармакорезистентную эпилепсию с частыми полиморфными приступами и рекомендовали хирургическое лечение.

Больной выполнена передняя височная лобэктомия. Данные интраоперационной электрокортикографии с восьмиконтактного грид-электрода подтвердили индекс представленности эпилептиформных стигматов 70–80%. После удаления передних двух третей височной доли, миндалевидного тела и передних отделов гиппокампа в левой височной области сохранялась эпилептиформная активность с индексом представленности до 40–60%. В связи с высоким риском речевых нарушений от манипуляций на задней трети височной доли было решено отказаться.

На контрольной ЭЭГ, выполненной на 10-й день после резекции, отмечалась положительная динамика в виде значительного уменьшения выраженности изменений в височном отделе левого полушария и регресса стволовой симптоматики.

При патоморфологическом исследовании удаленных фрагментов полюса височной доли при окраске гематоксилином и эозином выявлены признаки дисплазии коры головного мозга, которая проявлялась нарушением цитоархитектоники коры в виде очагов дезорганизации структуры вертикальных колонковых модулей клеток мантии, а также горизонтальной ламин-

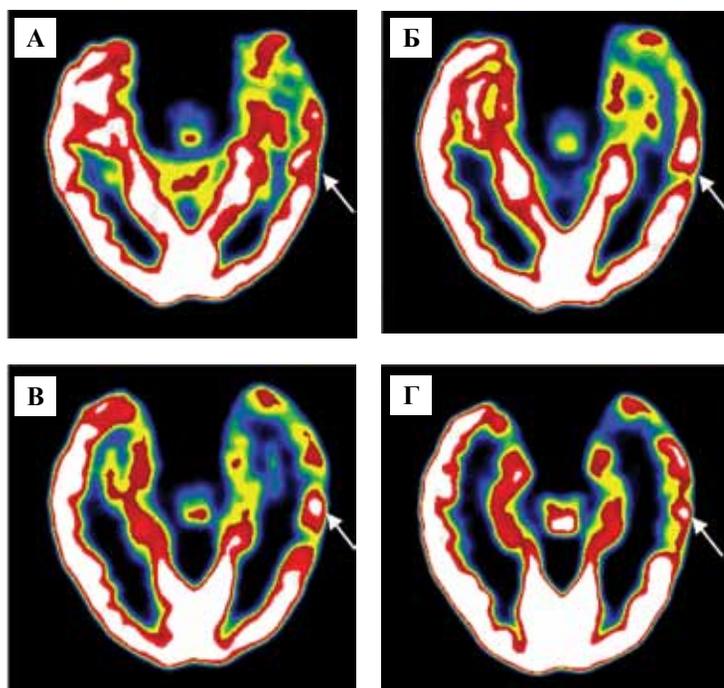


Рис. 1. ПЭТ/КТ головного мозга с  $^{18}\text{F}$ -фтордезоксиглюкозой. А–Г – зона гипометаболизма глюкозы, локализованная в латеральной и медиобазальной коре левой височной доли (указано стрелкой)

нации (рис. 2 А–В). В I молекулярном слое неокортекса обнаружены гетеротопированные зрелые нейроны и нейрциты, характерные для лНКР I типа (рис. 2 Г).

Во II–III слоях обнаружены единичные нейроны с реактивно-деструктивными изменениями, хроматолиз, клетки-тени, фокусы ишемически измененных нейронов (рис. 3 А), сопровождающиеся явлениями саттелитоза и нейронофагии. При окраске толуидиновым синим по методу Ниссля выявляются гиперхромные нейроны с признаками «спекания» тигроидного вещества и хроматолиза, дисморфные нейроны – их отростки разнонаправлены, утолщены, имеют извитой ход (рис. 3 Б).

При иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании с антителами к нейрофиламентам (Daako, система визуализации EnVision, Дания) выявлены единичные нейроны с ярко выраженной экспрессией, структурная организация аксонов сохранена. Граница между корой и белым веществом выражена неотчетливо.

При исследовании белого вещества определяется выраженный клеточный, преимущественно олигодендроглиоцитарный глиоз, что подтверждено ИГХ реакцией с антителами к Olig2 (Gene Tech, США) с наличием дренажных форм олигодендроглии (рис. 4 А).

Астроцитарный компонент глиоза выражен умеренно, при ИГХ исследовании с антителами к глиально-фибрилярному кислому белку (GFAP, Daako, Дания) выявлены реактивные астроциты с развитыми отростками (рис. 4 Б).

При проведении ИГХ с антителами к основному белку миелина (MBP, Daako, Дания) отмечена слабая экспрессия, что позволяет судить о нарушении миелинизации нервных волокон (рис. 5 А). Кроме того, обнаружено наличие большого количества эктопированных нейронов в белом веществе (рис. 5 Б). В сосудах определяется образование инвагинатов, а также конволютов, встречаются единичные сосуды с признаками склерозирования. Субпиально выявляются очаги скопления амилоидных телец, склероз арахноидальной оболочки. Также имеет место расширение периваскулярных и перичеселлюлярных пространств, разрежение нейропиля вплоть до образования микрокист.

Гиппокамп при интраоперационном заборе фрагментирован. Отмечаются резкое нейрональное опустошение структур гиппокампальной формации, глиальные реакции с участками скопления клеток, явлениями саттелитоза и нейронофагии (рис. 6 А, Б).

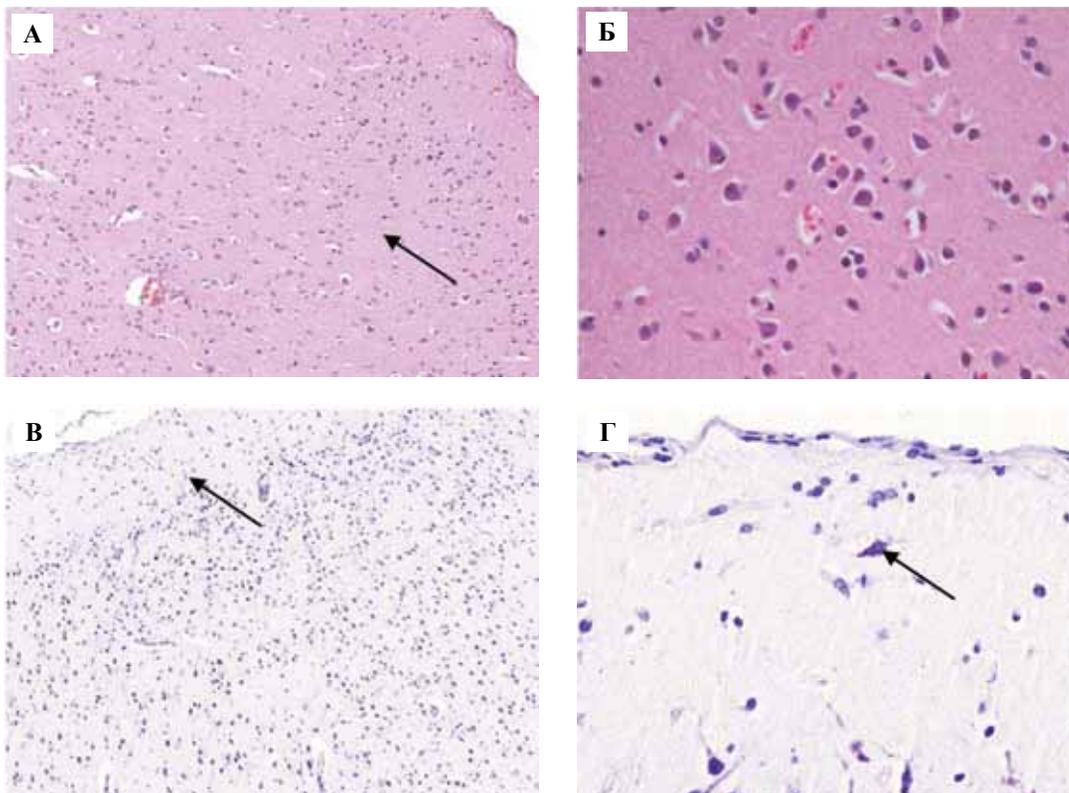


Рис. 2. Кора височной доли.

А – нарушения citoархитектоники с очагами выпадения нейронов (указано стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Б – беспорядочные скопления нейронов разного размера II–III слоя. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

В – нарушения горизонтальной ламинации, участок повышенной клеточности молекулярного слоя (указано стрелкой).

Окраска по Ниссля,  $\times 100$

Г – крупный гетеротопированный нейрон в молекулярном слое (указано стрелкой). Окраска по Ниссля,  $\times 400$

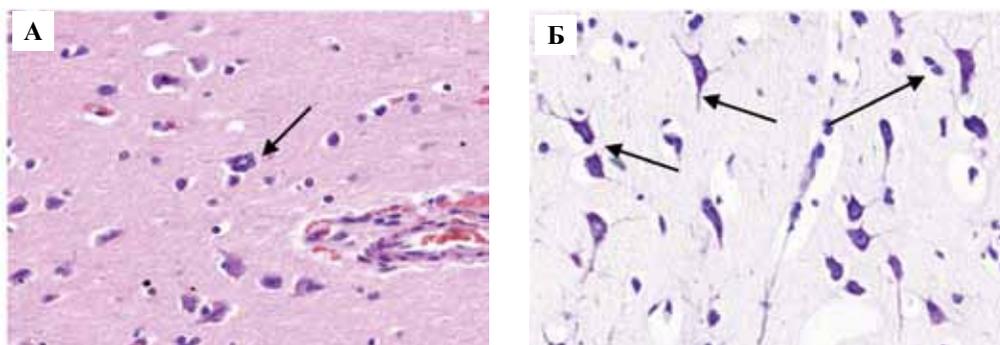


Рис. 3. Кора височной доли.

А – нейроны с реактивно-деструктивными изменениями, явление сателлитоза (указано стрелкой), склерозированный сосуд. Окраска гематоксилином и эозином, ×400  
 Б – крупные неправильной формы дисморфные нейроны во II–III слоях коры (указано стрелками). Окраска по Нисслю, ×400

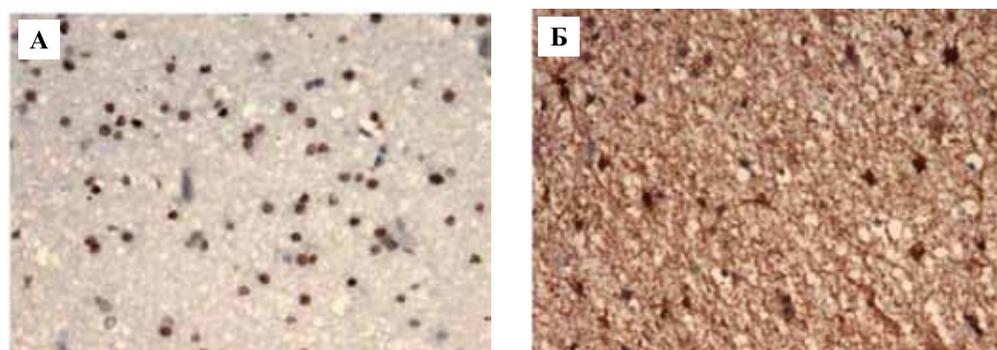


Рис. 4. Белое вещество.

А – значительный олигодендроглиальный компонент глиоза. ИГХ с антителами к Olig2, ×400  
 Б – реактивные астроциты. ИГХ с антителами к глиально-фибрилярному белку GFAP, ×400

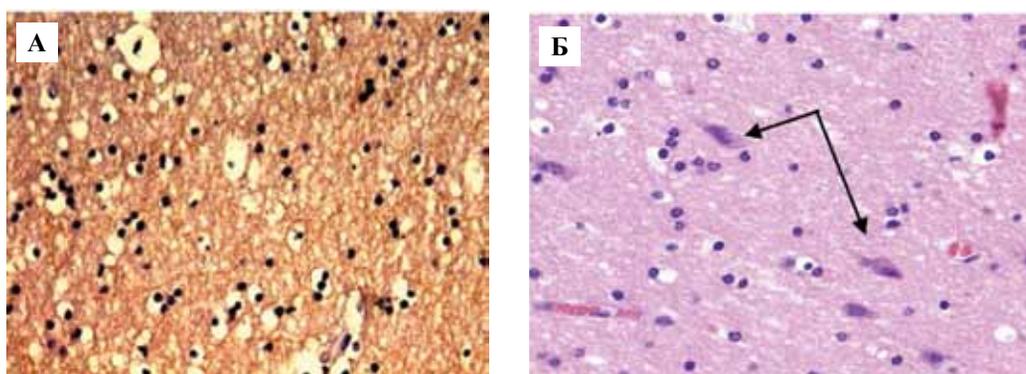


Рис. 5. Белое вещество.

А – нарушение миелинизации нервных волокон. ИГХ с антителами к основному белку миелина (МВР), ×400  
 Б – эктопированные нейроны (указано стрелками). Окраска гематоксилином и эозином, ×400

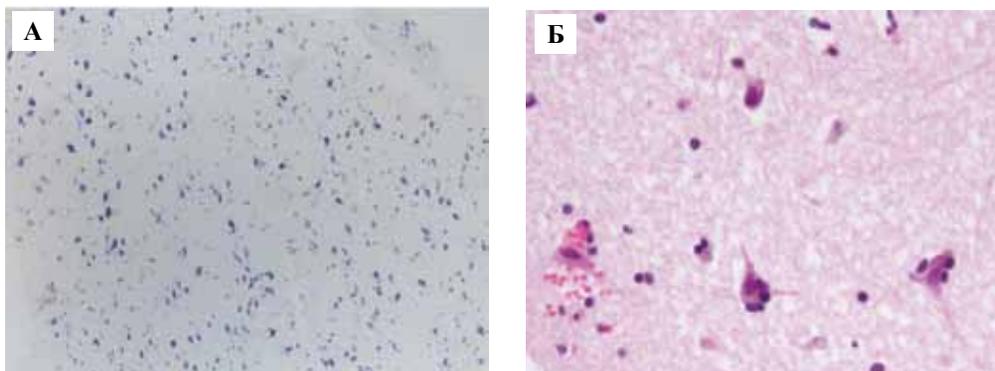


Рис. 6. Гиппокамп.

А – нарушение цитоархитектоники, очаги выпадения нейронов. Окраска по Нисслию,  $\times 100$   
 Б – сохранившиеся нейроны с явлениями саттелитоза. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

### Заключение

В данном клиническом случае представлена редкая форма кортикальной микродисгенезии, сопровождающаяся фармакорезистентной эпилепсией. Патология была диагностирована только при гистологическом исследовании и проявилась сочетанием фокальной дисплазии коры и гетеротопии нейронов как в белом веществе, так и в наружном маргинальном слое коры. Кроме того, при морфологическом исследовании эпилептического очага в белом веществе отмечаются реактивно-деструктивные процессы и комплекс изменений, характерный для эпилептической лейкоэнцефалопатии. В гиппокампе признаки выраженной атрофии с нейрональным опустошением ядер. Заболевание протекало длительно, с двумя типами приступов, однако морфологический субстрат не был выявлен при проведении МРТ (МР-негативная форма). Только при ПЭТ/КТ отмечена зона гипометаболизма глюкозы, совпадающая с эпилептическим очагом. Представленный случай показывает необходимость дальнейшего изучения данной проблемы и более углубленного обследования пациентов с фармакорезистентной эпилепсией.

### Литература/References

1. Карлов В.А. Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин. М.: Медицина, 2010. 720 с. [Karlov V.A. Epilepsy in children and adult men and women. M.: Meditsina, 2010. 720 p. (In Russ.)].

2. Barkovich A.J., Guerrini R., Kuzniecky R.I. et al. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012 // Brain. 2012;135(Pt 5):1348–69. doi: 10.1093/brain/aws019.
3. Glauser T., Ben-Menachem E., Bourgeois B. et al. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes // Epilepsia. 2006;47(7): 1094–120. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00585.x.
4. Kwan P., Brodie M.J. Refractory epilepsy: mechanisms and solutions // Expert Rev Neurother. 2006;6(3):397–406. doi: 10.1586/14737175.6.3.397.
5. Meencke H.J., Janz D. Neuropathological findings in primary generalized epilepsy: a study of eight cases // Epilepsia. 1984;25(1):8–21.
6. Palmieri A., Najm I., Avanzini G. et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias // Neurology. 2004;62(Suppl 3):2–8.
7. Sarnat H.B., Blümcke I. Malformations of cortical development. In: Surgical neuropathology of focal epilepsies: textbook and atlas. Ed. by I. Blümcke, H.B. Sarnat, R. Coras. Paris: John Libbey Eurotext, 2015. P. 18–53.

## A RARE CASE OF DRUG-RESISTANT EPILEPSY ASSOCIATED WITH CORTICAL MICRODYSGENESIS

*Yu.M. Zabrodskaya, D.A. Sitovskaya, S.M. Malyshev, T.V. Sokolova, D.V. Ryzhkova, V.G. Nezdorovina, G.V. Odintsova*

The term “disorders of cortical development” designates a group of various changes in the cerebral cortex expressed in the malformation of the cortical organization. Heterotopic neurons in layer I of the neocortex were first described by H. J. Meencke and D. Janz (1984) under the name of microdysgenesis. It was noted that cortical microdysgenesis was extremely rare and is not specific to any particular form of epilepsy. We present a rare case of pharmacoresistant epilepsy caused by cortical microdysgenesis.

**Key words:** epilepsy, drug-resistant epilepsies, malformation of cortical development, cortical microdysgenesis, microdysgenesis

**Информация об авторах**

Забродская Юлия Михайловна – доктор медицинских наук, заведующая научно-исследовательской лабораторией патологической анатомии РНХИ им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Ситовская Дарья Александровна – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории патологической анатомии РНХИ им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Мальшев Станислав Михайлович – аспирант кафедры нервных болезней с курсом восстановительной медицины, Институт медицинского образования НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Соколова Татьяна Владиславовна – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории патологической анатомии РНХИ им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Рыжкова Дарья Викторовна – доктор медицинских наук, заведующая научно-исследовательской лабораторией ядерной медицины НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Нездоровина Виктория Геннадьевна – кандидат медицинских наук, заведующая нейрохирургическим отделением № 2 РНХИ им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Одинцова Галина Вячеславовна – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории эпилептологии РНХИ им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Контакты: Ситовская Дарья Александровна

Российский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова – филиал НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России

Адрес: 191014 Санкт-Петербург, ул. Маяковского, д. 12.

Телефон 8 (981) 761 31 97. E-mail: sitovskaya\_da@almazovcentre.ru

*Материал поступил в редакцию 4 декабря 2017 года*

# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У САМЦОВ МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ВЫСОКОЙ ДОЗЫ ТЕСТОСТЕРОНА

*И.С. Цветков<sup>1</sup>, М.Т. Добрынина<sup>2</sup>, В.А. Мхитаров<sup>1</sup>, Л.П. Михайлова<sup>1</sup>, О.В. Макарова<sup>1,2</sup>*

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

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

На фоне курсового введения высоких доз препарата тестостерона у мышей выявлены выраженная акцидентальная инволюция тимуса, в лимфатических узлах гиперплазия В-зоны, увеличение количества макрофагов в мозговых синусах, отмечались гиперплазия белой пульпы селезенки и расширение герминативных центров лимфоидных узелков.

*Ключевые слова:* тестостерон, инволюция тимуса, селезенка, лимфатические узлы, мыши

По данным литературы, тестостерон оказывает супрессорное действие на клеточные и гуморальные реакции иммунного ответа [14]. Большинство работ, посвященных исследованию эффектов тестостерона на иммунную систему, выполнено в системе *in vitro*. Показано, что андрогены подавляют дифференцировку лимфоцитов и дендритных клеток [19, 13].

В настоящее время важной медико-биологической проблемой является изучение морфологических изменений иммунной системы на фоне длительной супрафизиологической концентрации тестостерона у мужчин, использующих его с целью контрацепции или для достижения высоких результатов в спорте [4, 7]. Длительное применение фармакологических препаратов тестостерона подавляет секрецию лютеинизирующего гормона (ЛГ) и фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) по принципу отрицательной обратной связи в системе гипоталамус–гипофиз–тестикулы, что приводит к нарушению сперматогенеза [4].

Данные о воздействии половых стероидных гормонов на морфофункциональное состояние иммунной системы немногочисленны. Показано, что андрогены *in vitro* снижают пролиферативную активность лимфоцитов селезенки и лимфатических узлов [10]. Физиологические концентрации андрогенов регулируют пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток в тимусе. Андрогены, включая дигидротестостерон и тестостерон, подавляют клеточное звено иммунитета, снижают содержание НК-клеток [15]. По данным литературы, андрогены оказывают влияние на гистофизиологическое состояние тимуса. Известно, что эпителиальные клетки тимуса экспрессируют

рецепторы к андрогенам и эстрогенам [22]. В исследованиях *in vitro* выявлено, что андрогены подавляют пролиферацию лимфоцитов в субкапсулярной зоне тимуса [18]. После гонадоэктомии у крыс наблюдается расширение коркового вещества тимуса [1, 21]. Повышение уровня продукции половых гормонов в период полового созревания вызывает инволюцию тимуса [2].

Активная форма тестостерона – дигидротестостерон поляризует иммунный ответ по Тх1-типу [14, 23], ингибируя продукцию ИЛ-12, ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  [13]. Тх1-тип иммунного ответа сопровождается повышением продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2 [15]. В результате развиваются выраженные клеточно-опосредованные и слабо выраженные гуморальные иммунные реакции. Кроме того, в экспериментальных работах показано, что тестостерон оказывает супрессорное воздействие на Тх2- и Тх17-типы иммунного ответа, определяющие развитие адаптивного иммунитета [13]. Данных, посвященных исследованию морфологических изменений органов иммунной системы на фоне супрафизиологической концентрации тестостерона, в литературе нет.

Цель работы – охарактеризовать морфофункциональные изменения тимуса, селезенки и лимфатических узлов и оценить субпопуляционный состав лимфоцитов лимфатических узлов у самцов мышей C57BL/6, развивающихся на фоне длительной супрафизиологической концентрации препарата тестостерона.

## Материалы и методы

Работа выполнена в осенне-зимний период на 20 половозрелых самцах мышей линии C57BL/6 массой тела

17–23 грамма (филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России). Животных содержали в условиях вивария при естественной смене дня и ночи со свободным доступом к воде и корму. Использовали две группы мышей (n=10 в каждой группе) – с физиологическим и супрафизиологическим уровнем тестостерона. Животных выводили из эксперимента с помощью диэтилового эфира. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека.

С целью достижения супрафизиологической концентрации тестостерона вводили препарат смеси эфиров тестостерона омнадрен-250 (Jelfa, Польша) внутримышечно троекратно в дозе 250 мг/кг с интервалом 14 дней. Длительность эксперимента составила 42 дня.

Для морфологического исследования выделяли тимус, селезенку и аксиллярные лимфатические узлы, фиксировали в жидкости Буэна в течение 24 часов. После стандартной гистологической проводки с помощью гистопроцессора Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, Япония) материал заливали в парафин. Срезы изготавливали с помощью микротомы (Thermo Scientific HM 355S, США) и окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия).

Методом иммуноферментного анализа определяли концентрацию общего тестостерона в сыворотке крови. Использовали коммерческий набор (Diagnostics Biochem Canada Inc., Канада). Для оценки субпопуляционного состава лимфоцитов из аксиллярных лимфатических узлов выделяли клетки с помощью гомогенизатора Поттера. Оценивали содержание CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (В-лимфоциты), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Т-хелперы), CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Т-цитотоксические) клеток (антитела eBioscience, США) у животных контрольной и опытной групп методом проточной цитофлуориметрии на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 8.0. По результатам теста Колмогорова–Смирнова данные были распределены ненормально. Использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при p≤0,05.

**Результаты**

По сравнению с контрольной группой у мышей на фоне курсового введения высоких доз омнадрена-250 уровень общего тестостерона в сыворотке крови повышался в 12 раз (рис. 1). При морфологическом исследовании в тимусе у животных контрольной группы корковое вещество преобладало над мозговым, границы между ними были четкие (рис. 2). Корковое вещество плотно заселено лимфоцитами, субкапсулярная зона узкая, представлена 8–12 рядами лимфобластов, в ней определялись единичные митозы (в поле зрения при ×400). В мозговом веществе выявлялось небольшое количество тимических телец, состоящих из 5–7 эпителиальных клеток (рис. 2 Б), а также единичные в препа-

рате тимические тельца, имеющие вид кистоподобных полостей.

В группе мышей с супрафизиологической концентрацией тестостерона в тимусе развивалась выраженная акцидентальная инволюция. Площадь долек была уменьшена в 3–5 раз по сравнению с таковой в контрольной группе. Корковое и мозговое вещество опустошены, границы между ними нечеткие, наблюдалась частичная инверсия слоев, в мозговом веществе

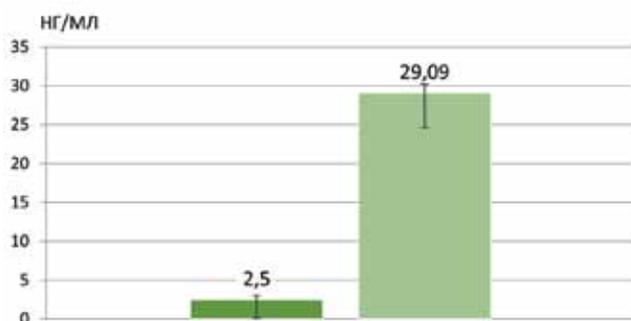


Рис. 1. Концентрация общего тестостерона в сыворотке крови у мышей контрольной группы и после курсового введения омнадрена 250 в дозе 250 мг/кг; Ме (25%, 75%)

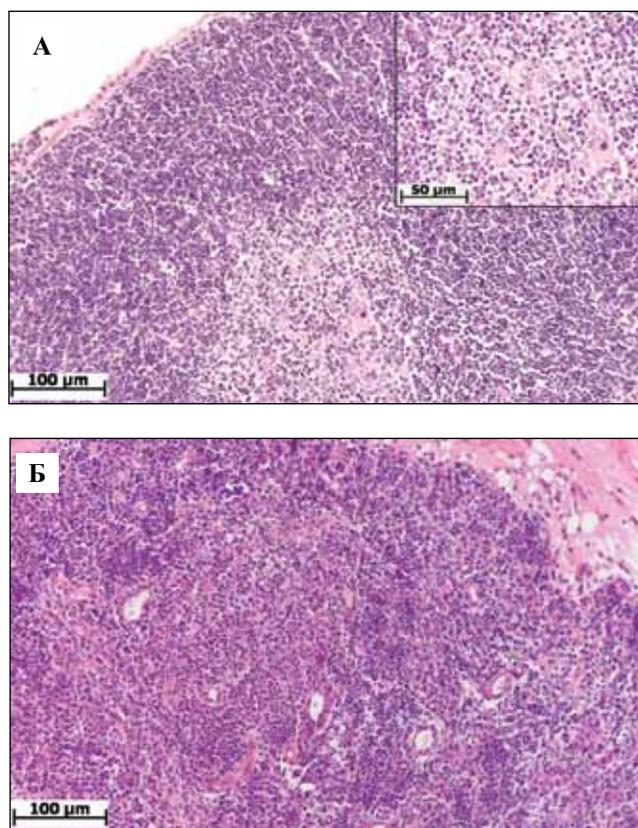


Рис. 2. Морфология тимуса у мышей с физиологической (А) и супрафизиологической (В) концентрацией тестостерона.

А – корковое вещество преобладает, плотно заселено лимфоцитами; на врезке – в мозговом веществе тимическое тельце. В – выраженная акцидентальная инволюция.

Окраска гематоксилином и эозином

преобладали эпителиальные клетки. Кистоподобные полости и тимические тельца с кератогиалином не обнаружены.

В лимфатических узлах у мышей с физиологическим уровнем тестостерона в корковом веществе определялись лимфоидные узелки с герминативными центрами и без них. Герминативные центры относительно широкие, представлены преимущественно рыхло расположенными лимфообластами, с небольшим количеством зрелых лимфоцитов и макрофагов, обнаруживались единичные митозы. Паракортикальная зона плотно заселена лимфоцитами. Краевые синусы с узкими щелевидными просветами, в которых определялись лимфоциты и макрофаги; соотношение их составляло примерно 1:1. В мозговых тяжах определялись лимфоциты, макрофаги и единичные плазмциты. В мозговых синусах выявлялось небольшое количество лимфоцитов и макрофагов, а также единичные нейтрофилы.

По сравнению с контрольной группой у мышей на фоне супрафизиологической концентрации тестостерона в корковом веществе лимфатических узлов опре-

делялись преимущественно вторичные лимфоидные узелки с центрами размножения, представленными плотно расположенными лимфообластами (рис. 3). В герминативных центрах были единичные митозы, а также гнущие клетки и фрагменты ядер. Паракортикальная зона плотно заселена лимфоцитами. В мозговых тяжах определялись лимфоциты, макрофаги и единичные плазмциты. В расширенных краевых и мозговых синусах обнаруживались макрофаги и лимфоциты в соотношении 2:1. Таким образом, на фоне курсового введения фармакологического препарата тестостерона в лимфатических узлах по сравнению с контролем наблюдалась выраженная гиперплазия В-зоны, а в мозговых синусах – увеличение количества макрофагов.

По сравнению с контрольной у мышей опытной группы в селезенке определялись гиперплазия белой пульпы и расширение герминативных центров лимфоидных узелков. Объемная доля белой пульпы у мышей с супрафизиологической концентрацией тестостерона была увеличена в 2,5 раза (12,0 (9,1;19,0) – контрольная группа, 29,4 (29,0;31,3) – опытная группа;  $p=0,003$ ).

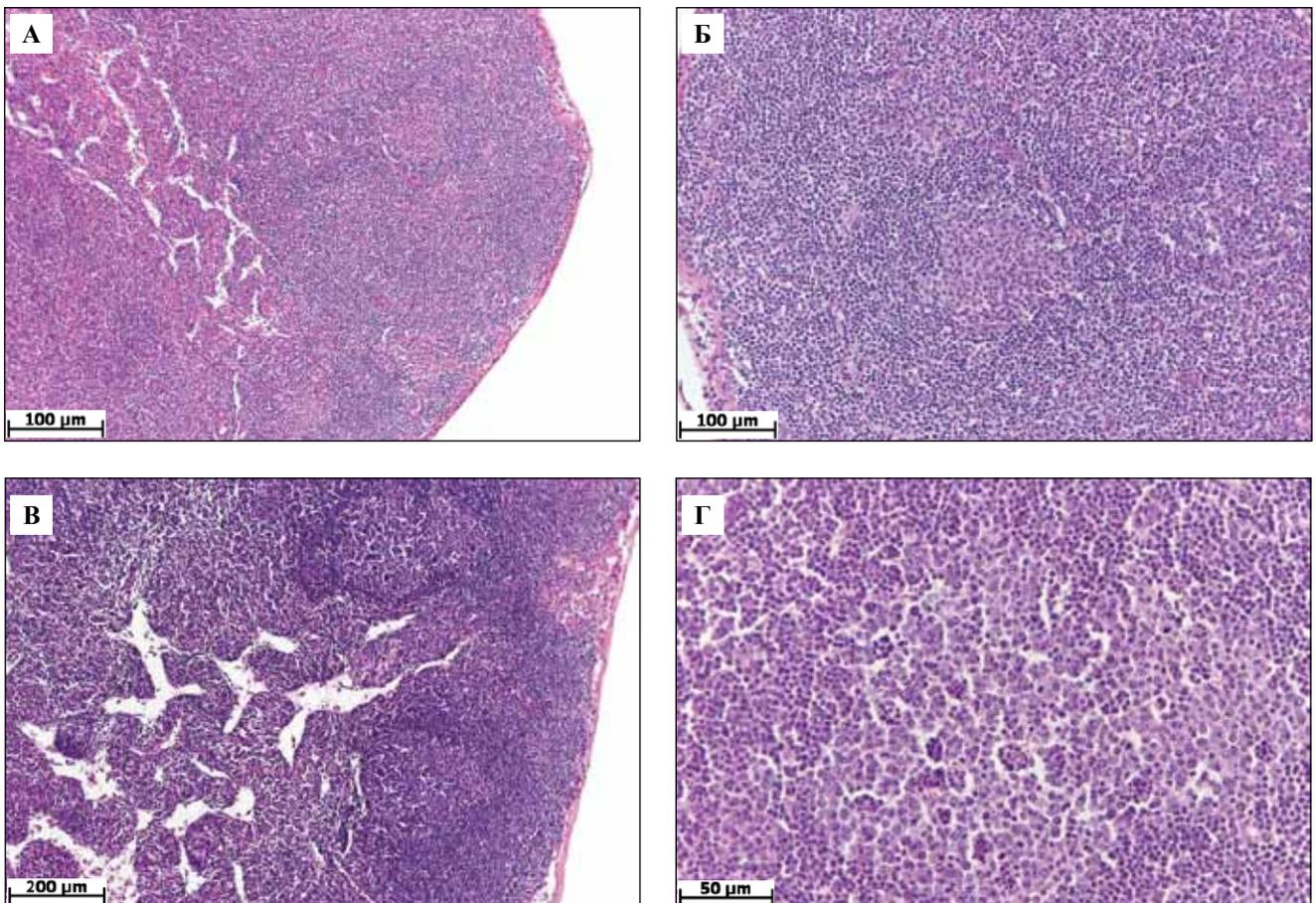


Рис. 3. Морфологическая характеристика лимфатических узлов у мышей с физиологической (А, Б) и супрафизиологической (В, Г) концентрацией тестостерона. А – лимфоидные узелки в корковом веществе с небольшими светлыми центрами; Б – светлый центр. В – лимфоидные узелки в корковом веществе с широкими светлыми центрами; Г – светлый центр. Окраска гематоксилином и эозином

По результатам морфометрического исследования нами выявлено, что курсовое введение фармакологического препарата тестостерона вызывает гиперплазию белой пульпы селезенки и расширение герминативных центров лимфоидных узлов.

По данным литературы, у спортсменов на фоне приема препаратов тестостерона не выявлены различия в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови [16]. В нашем исследовании методом проточной цитофлуориметрии в лимфатических узлах также не были выявлены статистически значимые различия показателей относительного содержания В-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) и Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) у мышей с физиологической и супрафизиологической концентрацией тестостерона. В то же время относительное содержание цитотоксических Т-лимфоцитов в лимфатических узлах (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) при высоком уровне тестостерона снижалось в 1,8 раза (рис. 4).

### Обсуждение

На экспериментальной модели длительной супрафизиологической концентрации тестостерона, которая может наблюдаться у спортсменов, использующих анаболические андрогенные стероиды, изучены морфофункциональные изменения органов иммунной системы. В тимусе у мышей на фоне длительной супрафизиологической концентрации тестостерона наблюдается выраженная акцидентальная инволюция, а в селезенке и лимфатических узлах – активация В-зон, при этом в лимфатических узлах снижается содержание цитотоксических Т-лимфоцитов.

Влияние супрафизиологических концентраций тестостерона на иммунную систему изучено недостаточно. В физиологических условиях функциональное состояние иммунной системы у самцов во многом определяется половыми стероидами. Тестостерон у мужчин даже в физиологической концентрации оказывает на иммунную систему выраженный супрес-

сорный эффект [11, 14]. В нашем эксперименте при введении супрафизиологической дозы тестостерона выявлялась выраженная акцидентальная инволюция тимуса с опустошением коркового и мозгового вещества, что также указывает на иммуносупрессорный эффект тестостерона. Молекулярные механизмы действия тестостерона на иммунокомпетентные клетки изучены недостаточно. Показано, что тестостерон модулирует их функцию, связываясь с рецепторами к андрогенам. Тестостерон супрессирует дифференцировку Т-лимфоцитов Тх1-типа путем подавления активности фермента Ptpn1 (protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 1), но повышает содержание в периферической крови Т-регуляторных лимфоцитов [3, 13].

Снижение содержания цитотоксических лимфоцитов в лимфатических узлах у мышей с супрафизиологической концентрацией тестостерона является, очевидно, следствием повышения содержания Т-регуляторных лимфоцитов, которые находятся в реципрокной связи с цитотоксическими лимфоцитами [20]. Выявленная нами гиперплазия В-зон селезенки и лимфатических узлов, по-видимому, обусловлена тем, что на фоне длительной супрафизиологической концентрации тестостерона баланс Тх1- и Тх2-типов иммунного ответа смещается в сторону Тх2-типа с индукцией гуморальных иммунных реакций.

### Выводы

1. Курсовое введение препарата омнадрен-250 в дозе 250 мг/кг в течение 6 недель самцам мышей C57BL/6 вызывает стабильное увеличение концентрации общего тестостерона в сыворотке крови в среднем в 12 раз.

2. По сравнению с контрольной группой при супрафизиологической концентрации тестостерона у мышей развивается выраженная акцидентальная инволюция тимуса, опустошается корковое и мозговое вещество, наблюдается их инверсия.

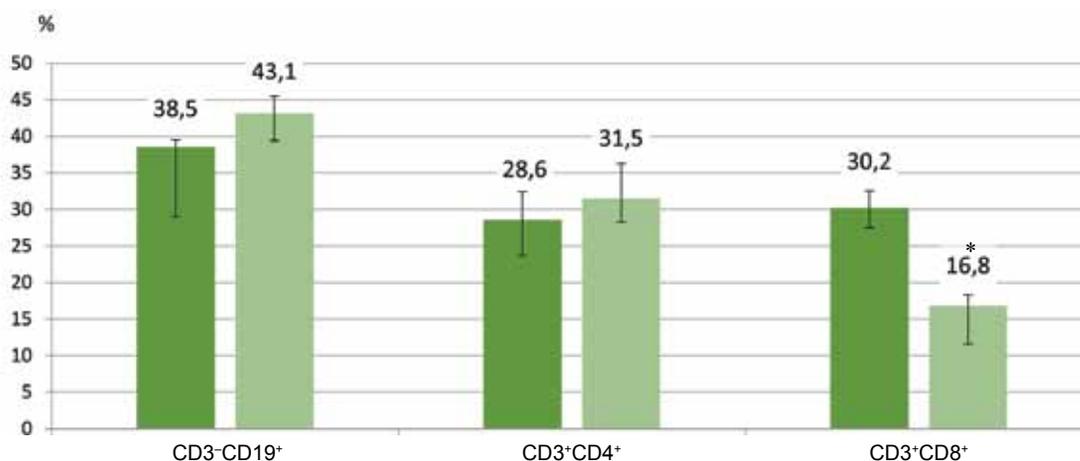


Рис. 4. Содержание субпопуляций лимфоцитов в лимфатических узлах у мышей C57BL/6 с физиологической и супрафизиологической концентрацией тестостерона

\*p<0.05. CD3-CD19<sup>+</sup> В- лимфоциты, CD3+CD4<sup>+</sup> Т-хелперы, CD3+CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты

3. При супрафизиологической концентрации тестостерона у мышей развивается гиперплазия белой пульпы селезенки и В-зоны, а в лимфатических узлах – гиперплазия В-зоны и снижение содержания цитотоксических Т-лимфоцитов.

### Литература/References

1. *Косырева А.М.* Гистофизиология иммунной системы и барьерных органов крыс Вистар в отдаленные сроки после орхихтомии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. № 10. С. 476–480. [*Kosyreva A.M.* Histophysiology immune system and barrier organs of rat Wistar in distant duration after orchietomy // *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2012. V. 10. P. 476–480. (In Russ.)].
2. *Розен В.Б.* Основы эндокринологии: Учебник. М.: Изд-во МГУ, 1994. 384 с. [*Rozen V.B.* *Osnovy ehndokrinologii: Uchebnik.* M.: Izd-vo MGU, 1994. 384 s. (In Russ.)].
3. *Afshan G., Afzal N., Qureshi S.* CD4+CD25(hi) regulatory T cells in healthy males and females mediate gender difference in the prevalence of autoimmune diseases // *Clin Lab.* 2012;58(5–6):567–71.
4. *Amory J.K.* Male contraception // *Fertility and Sterility.* 2016;106(6):1303–9. doi: 10.1016/j.fertnstert.
5. *Ansari A.S., Yadav C.S., Lohiya N.K.* Testosterone and Its Analogs as a Male Contraceptive // *Advances in Sexual Medicine.* 2013;3:3.
6. *Araneo B.A., Dowell T., Diegel M., Daynes R.A.* Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells // *Blood.* 1991;78(3):688–99.
7. *Bhasin S., Storer T.W., Berman N.* The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men // *N Engl J Med.* 1996;335(1):1–7.
8. *Calabrese V., Scapagnini G., Davinelli S. et al.* Sex hormonal regulation and hormesis in aging and longevity: role of vitagenes // *J Cell Commun Signal.* 2014;8(4):369–84. doi: 10.1007/s12079-014-0253-7.
9. *Cooper T.G., Noonan E., von Eckardstein S. et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics // *Hum Reprod Update.* 2010;16(3):231–45. doi: 10.1093/humupd/dmp048.
10. *De León-Nava M.A., Nava K., Soldevila G. et al.* Immune sexual dimorphism: Effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation // *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009;113(1–2):57–64. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.11.003.
11. *Foo Y.Z., Nakagawa S., Rhodes G., Simmons L.W.* The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis // *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2017;Feb;92(1):551–71. doi: 10.1111/brv.12243.
12. *Hughes T.K., Rady P.L., Smith E.M.* Potential for the effects of anabolic steroid abuse in the immune and neuroendocrine axis // *J Neuroimmunol.* 1998;83:162–7.
13. *Kissick H.T., Sanda M.G., Dunn L.K.* Androgens alter T-cell immunity by inhibiting T-helper 1 differentiation // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(27):9887–92. doi: 10.1073/pnas.1402468111.
14. *Klein S.L., Roberts C.W.* Sex hormones and immunity to infection. Springer, 2010. 329 p.
15. *Klein S.L., Flanagan K.L.* Sex differences in immune responses // *Nat Rev Immunol.* 2016;16(10):626–38. doi: 10.1038/nri.2016.90.
16. *Marshall-Gradisnik S., Green R., Brenu E.W. et al.* Anabolic androgenic steroids effects on the immune system: a review // *Cent Eur J Biol.* 2009;4(1):19–33.
17. *Matsumoto A.M.* Is high dosage testosterone an effective male contraceptive agent? // *Fertility and sterility.* 1988;50:2.
18. *Olsen N.J., Viselli S.M., Shults K.* Induction of immature thymocyte proliferation after castration of normal male mice // *Endocrinology.* 1994;134(1):107–13.
19. *Olsen N.J., Viselli S.M., Fan J. et al.* Androgens accelerate thymocyte apoptosis // *Endocrinology.* 1998; Feb;139(2):748–52.
20. *Page S.T., Daniel W. Lin., Elahe A.* Dihydrotestosterone administration does not increase intraprostatic androgen concentrations or alter prostate androgen action in healthy men: a randomized-controlled trial // *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;Feb;96(2):430–7. Published online 2010 Dec 22. doi: 10.1210/jc.2010-1865.
21. *Pejčić-Karapetrović B., Kosec D., Leposavić G.* Differential effects of male and female gonadal hormones on the intrathymic T-cell maturation // *Dev Immunol.* 2001;8(3–4):305–17.
22. *Phiel K.L., Henderson R.A., Adelman S.J. et al.* Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations // *Immunol Lett.* 2005;15;97(1):107–13.
23. *Spellberg B., Edwards J.E. Jr.* Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases // *Clin Infect Dis.* 2001;32(1):76–102.
24. *Sthoeger Z.M., Chiorazzi N., Lahita R.G.* Regulation of the immune response by sex hormones: I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B-cell differentiation // *J Immunol.* 1988;141:91–8.

## MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE ORGANS OF THE IMMUNE SYSTEM IN MALE C57BL/6 MICE AFTER HIGH DOSE TESTOSTERONE TREATMENT

*I.S. Tsvetkov, M.T. Dobrynina, V.A. Mkhitarov, L.P. Mikhailova, O.V. Makarova*

During the course of high dose testosterone injections, experimental mice showed accidental thymic involution, hyperplasia of B-zone cells in the lymph nodes, and increased number of macrophages in the medullar sinuses. Hyperplasia of the white pulp of the spleen and expansion of the germinal centers of lymphoid nodules were also detected.

*Key words:* testosterone, thymic involution, spleen, lymphatic nodes, mice

**Информация об авторах**

Цветков Иван Сергеевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120 4283. E-mail: davedm66@gmail.com

Добрынина Маризтта Тиграновна – кандидат биологических наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1. стр. 12.

Мхитаров Владимир Аршакович – кандидат биологических наук, руководитель группы информатики и морфометрии НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 129 0625. E-mail: mkhitarov@mail.ru

Михайлова Лилия Петровна – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120 0441. E-mail: morfolhum@mail.ru

Макарова Ольга Васильевна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека, профессор кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

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

Контакты: Цветков Иван Сергеевич. E-mail: davedm66@gmail.com

*Материал поступил в редакцию 17 января 2018 года*

# ИЗМЕНЕНИЯ КОРТИКОСТЕРОЦИТОВ КЛУБОЧКОВОЙ ЗОНЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКИХ ДОЗ ДДТ В ПОСТНАТАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

*Д.А. Цомартова, Н.В. Яглова, С.С. Обернихин,  
С.В. Назимова, Ю.П. Следнева, В.В. Яглов*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Цель работы – исследование цитофизиологии кортикостероцитов клубочковой зоны надпочечников крыс пубертатного возраста и половозрелых крыс, подвергавшихся воздействию низких доз дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) с первого дня постнатального развития. В пубертатном возрасте концентрация альдостерона в сыворотке крови крыс опытной группы была повышена. Выявлены изменения ультраструктуры кортикостероцитов, свидетельствующие о повышенной секреторной активности. После достижения половой зрелости у крыс опытной группы наблюдалось уменьшение размеров клеток и уменьшение числа митохондрий в цитоплазме, свидетельствующее о снижении их функциональной активности, что подтверждалось снижением концентрации альдостерона в системном кровотоке. У крыс развивалась компенсаторная гиперплазия клубочковой зоны. Полученные данные указывают на снижение числа митохондрий как ведущий клеточный механизм дисрапторного действия ДДТ, нарушающий цитофизиологию клеток клубочковой зоны.

*Ключевые слова:* клубочковая зона, надпочечник, ультраструктура, альдостерон, эндокринный дисраптор, ДДТ

Клубочковая зона коркового вещества надпочечников имеет сложную тройную регуляцию секреторной деятельности, включающую ренин-ангиотензиновую систему, изменения содержания калия в системном кровотоке и адренкортикотропный гормон гипофиза [3]. Продуцируемый ею гормон альдостерон играет важную роль в поддержании водного и электролитного баланса и функционировании сердечно-сосудистой системы. Способность эндокринных дисрапторов изменять секрецию альдостерона может быть обусловлена влиянием на любое из регуляторных звеньев, а также быть связанной с непосредственным воздействием на секреторный аппарат клеток. Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) обладает способностью накапливаться и длительно сохраняться в организме, оказывая дисрапторное действие на функцию семенников, яичников, щитовидной железы [2, 9, 12]. Возможность низких доз ДДТ изменять секреторную деятельность клеток клубочковой зоны надпочечника мало изучена, несмотря на длительное исследование свойств ДДТ как эндокринного дисраптора.

Целью настоящего исследования было изучение изменений цитофизиологии кортикостероцитов клубочковой зоны надпочечников крыс пубертатного возраста и половозрелых крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ с первого дня постнатального развития.

## Материалы и методы

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар (n=48). Новорожденные крысы опытной группы (n=24) потребляли ДДТ с молоком матери, получавшей вместо воды раствор с концентрацией о,п-ДДТ (Sigma-Aldrich, США) 20 мкг/л, а с трехнедельного возраста – самостоятельно аналогичный раствор ДДТ ad libitum до достижения пубертатного возраста. Учет потребления ДДТ проводили ежедневно. Расчет потребляемой дозы ДДТ проводили на основе требований Национальной токсикологической программы США к определению низких доз [8], пороговых значений низких доз для ДДТ (50 мкг/кг/сут) [11] и нормативов содержания ДДТ в пищевой продукции [1]. Среднесуточное самостоятельное потребление ДДТ самцами крыс составило  $3,71 \pm 0,15$  мкг/кг, что соответствует уровню потребления ДДТ человеком с продуктами питания с учетом особенностей метаболизма этого вещества в организме крысы [13]. Животные контрольной группы (n=24) получали водопроводную воду. Отсутствие в воде и стандартном корме для лабораторных животных ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Половину опытных и контрольных животных выводили из эксперимента передозировкой золетила на 42-е сутки постнатального развития (P42), что соответ-

ствует пубертатному периоду, вторую половину – после достижения половой зрелости на 70-е сутки (P70), когда надпочечник крысы достигает своего максимального развития [10]. Эксперимент выполнен в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977, и этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. Надпочечники фиксировали в растворе Буэна. После стандартной гистологической проводки изготавливали экваториальные срезы органа, которые затем окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование гистологических препаратов проводили методом световой микроскопии и компьютерной морфометрии с использованием программы ImageScope (Leica Microsystems, Австрия). Для электронно-микроскопического исследования надпочечники фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида с постфиксацией в 1% растворе тетраоксида осмия. После стандартной проводки заливали в смесь эпона и аралдита. Полутоновые и ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультратома PowerTome XL (RMC Boeckeler, США). Определяли концентрацию альдостерона в сыворотке крови крыс методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов (Cusabio, КНР). Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением  $M$  и стандартной ошибкой среднего значения  $m$ . Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,01$ .

### Результаты

В пубертатном периоде у крыс контрольной группы клубочковая зона коркового вещества располагалась под капсулой в виде непрерывного слоя равномерной толщины. Она занимала менее 10% площади коркового вещества (рис. 1) и была представлена эндокриноцитами с круглыми и овальными ядрами и просветленной цитоплазмой. Клетки формировали клубочкообразные структуры, между которыми выявлялись тонкие прослойки рыхлой соединительной ткани. Просветы капилляров были очень малы и, как правило, заполнены плазмой. Кортикостероциты клубочковой зоны крыс контрольной группы имели продолговатую форму, эксцентрически расположенное ядро округлой или овальной формы с преобладанием эухроматина в структуре и эктопией ядрышка. Митохондрии округлой или овальной формы имели пластинчатые кристы и гомогенный средней электронной плотности матрикс. У многих митохондрий наблюдался отек матрикса раз-

ной степени выраженности. В некоторых клетках был хорошо выражен комплекс Гольджи. Его цистерны имели содержание низкой электронной плотности. Лизосомы встречались редко и были небольшого размера. Эндоплазматическая сеть (ЭПС) была представлена мелкими пузырьками, диффузно распределенными в цитоплазме. Липидные капли небольшого размера с содержимым умеренной электронной плотности контактировали с митохондриями, но встречались не во всех клетках. Микроворсинки на плазматической мембране были слабо развиты.

Площадь клубочковой зоны крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в постнатальном периоде развития, не отличалась от значений контрольной группы (рис. 1). Клубочковая зона была представлена клетками с округлыми крупными ядрами и слабобазофильной просветленной цитоплазмой, не отличавшимися по размеру от клеток контрольных животных (рис. 2). Изменения сосудов микроциркуляторного русла не вы-

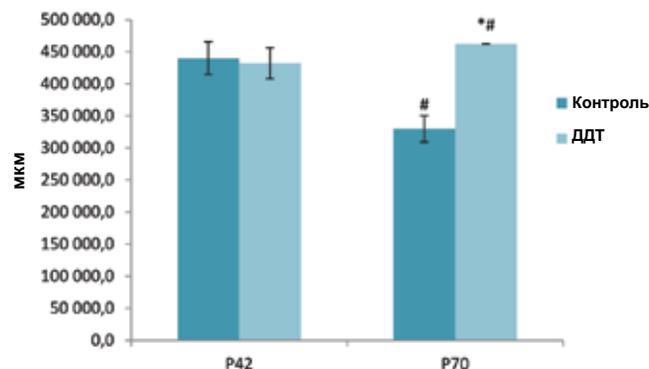


Рис. 1. Площадь клубочковой зоны в срезах надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пубертатном и постпубертатном периоде ( $M \pm m$ )

Статистически значимые различия: \* – при сравнении с контрольной группой, # – при сравнении с предыдущим сроком исследования

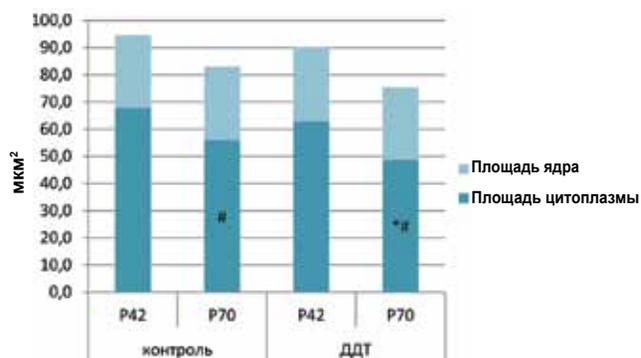


Рис. 2. Размеры кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пубертатном и постпубертатном периоде

Статистически значимые различия: \* – при сравнении с контрольной группой, # – при сравнении с предыдущим сроком исследования

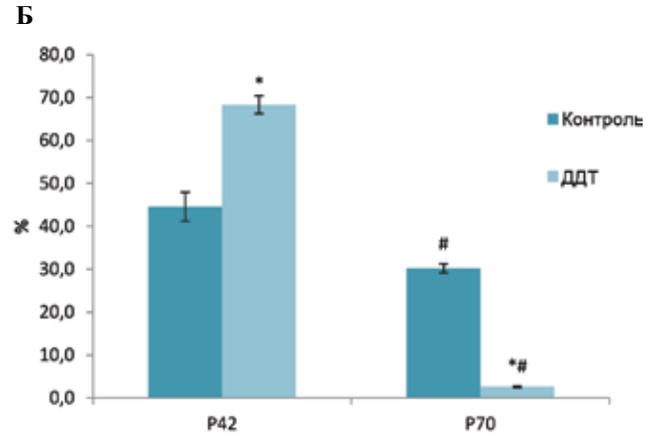
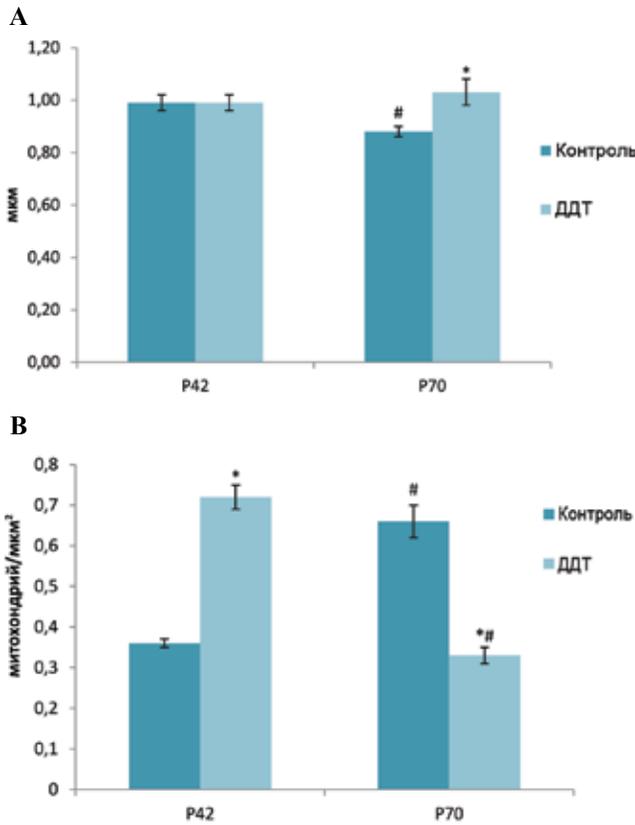


Рис. 3. Изменения характеристик митохондрий кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пубертатном и постпубертатном периоде (M±m).  
 А – диаметр митохондрий,  
 Б – количество митохондрий в 1 мкм<sup>2</sup> цитоплазмы,  
 В – процент митохондрий с отеком матрикса  
 Статистически значимые различия: \* – при сравнении с контрольной группой, # – при сравнении с предыдущим сроком исследования

явлены. Дистрофически измененные кортикостероциты в клубочковой зоне встречались крайне редко. Ядра кортикостероцитов клубочковой зоны располагались эксцентрично. Они характеризовались преобладанием эухроматина, центрально расположенным ядрышком и расширением перинуклеарного пространства. Митохондрии округлой и овальной формы не отличались по размеру от контрольных значений (рис. 3 А). Некоторые из них имели тубулярные кристы. Число митохондрий в 1 мкм<sup>2</sup> цитоплазмы было увеличено (рис. 3 Б). Митохондрии имели овальную форму. Часто встречались клетки, в которых большая часть митохондрий характеризовалась отеком матрикса и расширением крист (рис. 3 В). ЭПС была более выражена, чем у крыс контрольной группы. Ее каналы были расширены и заполнены содержимым низкой электронной плотности. Лизосомы встречались не во всех клетках. Содержание липидных включений в цитоплазме было значительно меньшим, чем в контрольной группе (рис. 4). Липидные капли, как и в контроле, имели среднюю электронную плотность, но отличались очень небольшими размерами. На плазматической мембране были хорошо выражены микроворсинки. Концентрация альдостерона в сыворотке крови была повышена (рис. 5).

После достижения половой зрелости у крыс контрольной группы отмечалось уменьшение площади клубочковой зоны (рис. 1) и размеров ее клеток (рис. 2). Размер ядер не изменялся (рис. 2). Ядра характеризовались преобладанием эухроматина в структуре и центрально расположенным ядрышком. Ци-

топлазма имела умеренную электронную плотность. Митохондрии уменьшились в размерах (рис. 3 А). Количество митохондрий в 1 мкм<sup>2</sup> цитоплазмы увеличилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 3 Б). В некоторых митохондриях наряду с ламеллярными встречались и тубулярные кристы. Отек матрикса митохондрий отмечался реже (рис. 3 В). ЭПС была представлена мелкими пузырьками, диффузно расположенными в цитоплазме. Комплекс

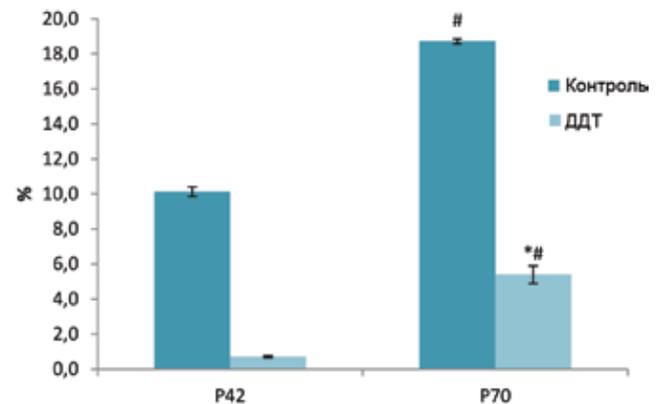


Рис. 4. Содержание липидных включений в цитоплазме кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пубертатном и постпубертатном периоде (M±m)  
 Статистически значимые различия: \* – при сравнении с контрольной группой, # – при сравнении с предыдущим сроком исследования

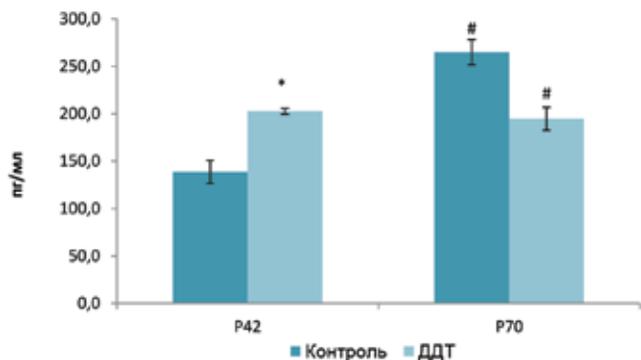


Рис. 5. Изменения концентрации альдостерона в сыворотке крови крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пубертатном и постпубертатном периоде (M±m)

Статистически значимые различия: \* – при сравнении с контрольной группой, # – при сравнении с предыдущим сроком исследования

Гольджи был слабо развит. Липидные включения распределялись в клетках неравномерно и либо были представлены скоплением большого числа липидных капель низкой электронной плотности, мало контактирующими с митохондриями, или единичными каплями, либо отсутствовали. В среднем содержание липидных включений уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 4). Лизосомы практически не выявлялись. На плазматических мембранах находились немногочисленные микроворсинки. Просветы капилляров были заполнены плаз-

мой. Концентрация альдостерона в сыворотке крови увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 5).

Клубочковая зона крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, после достижения половой зрелости была хорошо выражена. Ее площадь не изменялась по сравнению с предыдущим сроком и превысила значения контрольной группы (рис. 1). Кортикостероциты клубочковой зоны уменьшились в размерах, размеры их ядер не изменялись (рис. 2). Ядра в клетках располагались эксцентрично. Эухроматин преобладал над гетерохроматином. Ядрышко располагалось центрально. Расширение перинуклеарного пространства не наблюдалось. Размеры митохондрий не изменялись, но были больше, чем в контроле (рис. 3 А). Количество митохондрий в клетках уменьшилось по сравнению с предыдущим сроком исследования в отличие от контрольной группы (рис. 3 Б). Они имели как округлую, так и удлинённую форму. Локальный отек матрикса митохондрий встречался крайне редко (рис. 3 В). Крысты митохондрий характеризовались гетероморфностью: встречались ламеллярные, тубулярные, а также везикулярные крысты. ЭПС была хорошо выражена. В цитоплазме встречались свободно лежащие рибосомы. Лизосомы практически не выявлялись. Содержание липидов было ниже контрольных значений, как и на предыдущем сроке исследования (рис. 4). Концентрация альдостерона в сыворотке крови не изменялась по сравнению с предыдущим сроком и была меньше контрольных значений (рис. 6).

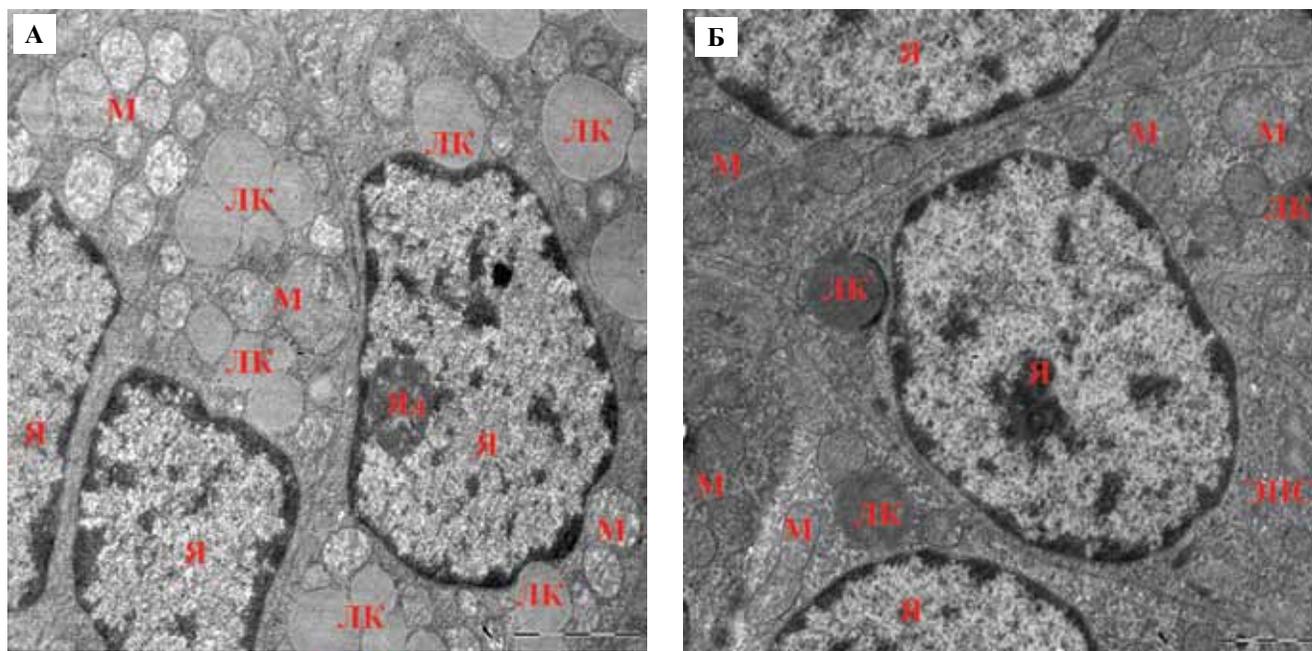


Рис. 6. Ультраструктура кортикостероцитов клубочковой зоны коркового вещества надпочечников крыс контрольной группы и подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пубертатном и постпубертатном периоде.

А – содержание липидных капель (ЛК) более высокое, чаще встречаются митохондрии (М) с отеком матрикса, ×6300.  
 Б – ядра (Я) с преобладанием эухроматина, в цитоплазме множественные микропузырьки и каналцы эндоплазматической сети, митохондрии (М) небольшого размера овальной или продолговатой формы с разнообразными по структуре кристами и электронно плотным матриксом, единичные липидные капли (ЛК) повышенной электронной плотности, ×8000

## Обсуждение

Проведенное исследование показало, что воздействие низких доз ДДТ с первого дня постнатального развития приводит к усилению секреторной деятельности кортикостероцитов клубочковой зоны в пубертатном периоде. Изменения ультраструктуры митохондрий, такие как увеличение размеров и отек матрикса, указывают на значительное функциональное напряжение этих органелл, обеспечивающих как биологическое окисление и окислительное фосфорилирование, так и начальные и конечные сайты стероидогенеза [7]. *In vitro* исследования продукции стероидных гормонов в культуре клеток коркового вещества надпочечников H295R при воздействии низких доз метаболитов о,п-ДДТ не выявляли изменение секреции альдостерона [3], однако результаты нашего исследования показывают, что продукция альдостерона *in vivo* характеризуется высокой чувствительностью к воздействию низких доз ДДТ. Причины повышения продукции альдостерона у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в постнатальном периоде, могут быть связаны со стимулирующим действием ДДТ на ренин-ангиотензиновую систему, описанным М. La Merrill et al. у половозрелых мышей, получавших ДДТ в дозе 0,17 мг/кг с 11,5 суток пренатального до 5-х суток постнатального развития [6]. Электронная микроскопия клубочковой зоны выявила не только расширение канальцев ЭПС, но и существенное увеличение численности митохондрий в эндокриноцитах, что, несомненно, является основной причиной усиления продукции альдостерона.

Возрастные изменения синтеза альдостерона сопровождалась изменениями ультраструктурных проявлений секреторного процесса. В пубертатном периоде активный синтез стероидов в клубочковой зоне крыс контрольной группы проявлялся отеком матрикса митохондрий, свидетельствующим об усилении процессов синтеза стероидов и биологического окисления. После наступления половой зрелости повышенная продукция альдостерона обеспечивалась в том числе за счет структурной реорганизации митохондрий, а именно увеличения их числа, уменьшения размера и появления гетероморфности крист, что, как известно, является признаком усиления функциональной активности кортикостероцитов [5]. У крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию ДДТ, возрастные изменения митохондрий не соответствовали контрольным. Ультраструктура клеток свидетельствовала о пониженной функциональной активности, включая значительное уменьшение размеров клеток и числа митохондрий. ЭПС в кортикостероцитах, тем не менее, была хорошо выражена. Наблюдавшееся уменьшение числа митохондрий в клетках клубочковой зоны у половозрелых крыс позволяет рассматривать данное явление как результат дисрапторного действия ДДТ. То есть, если на 42-е сутки гиперпродукция альдостерона достигалась за счет усиления синтеза стероидов в митохондриях и цитоплазме, то на 70-е аналогичный уровень продукции гормонов обеспечивался увеличе-

нием числа клеток в клубочковой зоне. Выявленная гиперплазия клубочковой зоны после наступления половой зрелости указывает на компенсаторный характер этого изменения. Но так как уровень альдостерона был ниже контрольных значений, следовательно, больший объем клубочковой зоны не позволял нормализовать продукцию альдостерона, что подтверждает гипотезу о поражении митохондриального звена стероидогенеза как механизма дисрапторного действия ДДТ на клетки клубочковой зоны.

Таким образом, воздействие низких доз ДДТ с первого дня постнатального развития приводит к изменениям ультраструктуры кортикостероцитов клубочковой зоны, обуславливающим нарушения секреторной деятельности клеток как в пубертатном, так и постпубертатном периоде. Изменения цитофизиологии клеток свидетельствуют о ведущей роли снижения численности митохондрий в выявленных нарушениях стероидогенеза клеток клубочковой зоны и высокой чувствительности кортикостероцитов клубочковой зоны к действию эндокринного дисраптора.

## Литература/References

1. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». СПб.: ГИОРД, 2015. 176 с. [Technical regulations of the Customs Union TR CU 021/2011. SPb.: GIORД, 2015. 176 p. (In Russ.)].
2. Яглова Н.В., Яглов В.В. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156, № 12. С. 720–722. [Yaglova N.V., Yaglov V.V. Changes in Thyroid Status of Rats after Prolonged Exposure to Low Dose Dichlorodiphenyltrichloroethane // Bulletin Experimentalnoi Biologii i Mediciny. 2013. V. 156, No 6. P. 760–762 (In Russ.)].
3. Asp V., Ulleras E., Lindstrom V., Bergstrom U. et al. Biphasic hormonal responses to the adrenocorticolytic DDT metabolite 3-methylsulfonyl-DDE in human cells // Toxicology and Applied Pharmacology. 2010;242:281–9.
4. Bollag W. Regulation of aldosterone synthesis and secretion // Compr Physiol. 2014;4(3):1017–55.
5. Domoto D., Boyd J., Mulrow P., Kashgarian M. The ultrastructure of the adrenal zona glomerulosa of rats on potassium-supplemented or sodium-depleted diets // Am J Pathol. 1973;72: 433–46.
6. La Merrill M., Sethi S., Benard L., Moshier E. et al. Perinatal FFT exposure induces hypertension and cardiac hypertrophy in adult mice // Environ Health Perspect. 2016;124(11):1722–7.
7. Muller W. Steroid hormone synthesis in mitochondria // Mol Cell Endocrinol. 2013;379(1–2):62–73.
8. National Toxicology Program. National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low dose peer review // Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2001.
9. Ozen S., Darcan S. Effects of environmental endocrine disruptors on pubertal development // J Clin Res Ped Endo. 2011;3(1):1–6.
10. Pignatelli D., Xiao F., Gouveia A., Ferreira J. et al. Adrenarche in the rat // Journal of Endocrinology. 2006;191:301–8.

11. Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses // *Endocrine Reviews*. 2012;33:378–455.
12. Vasiliu O., Muttinemi J., Karmaus W. In utero exposure to organochlorines and age at menarche // *Human Reproduction*. 2004;19(7):1506–12.
13. Yamazaki H., Takano R., Horiuchi K., Shimizu M. et al. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling // *Journal of health science*. 2010;(5):566–75.

## CHANGES IN ADRENAL ZONA GLOMERULOSA CELLS OF RATS EXPOSED TO LOW DOSES OF DDT DURING POSTNATAL DEVELOPMENT

*D.A. Tsomartova, N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, S.V. Nazimova, Y.P. Sledneva, V.V. Yaglov*

The research is focused on cytophysiology of adrenal glomerulosa cells of rats exposed to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) since the first day of postnatal development. At pubertal age, aldosterone serum levels in experimental rats were increased. The changes in fine structure found in glomerulosa cells indicated higher functional activity. Decreased size of glomerulosa cells and reduced mitochondria content per  $\mu\text{m}^2$  of cytoplasm indicated lowered secretory activity after puberty proved by decreased level of serum aldosterone. Lowered hormone production induced hyperplasia of zona glomerulosa. The data obtained showed that DDT disrupts cytophysiology of glomerulosa cells, primarily caused by reduction in the number of mitochondria.

*Key words:* zona glomerulosa, adrenal gland, ultrastructure, aldosterone, endocrine disruptor, DDT

### Информация об авторах

Цомартова Дибахан Асланбековна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 17418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Яглова Наталья Валентиновна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон/факс (499) 120 8065, телефон 8 910 404 2101. E-mail: yaglova@mail.ru

Оберникхин Сергей Станиславович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

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

Назимова Светлана Владимировна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

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

Следнева Юлия Петровна – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

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

Яглов Валентин Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

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

Контакты: Яглова Наталья Валентиновна.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон/факс (499) 120 8065, телефон 8 910 404 2101. E-mail: yaglova@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 27 декабря 2017 года*

# МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОПОЭЗА, НАБЛЮДАЕМЫЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУММАРНОЙ РНК МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

*А.Г. Бабаева<sup>1</sup>, Н.В. Тишевская<sup>2</sup>, Н.М. Геворкян<sup>3</sup>*

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск

<sup>3</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва

При внесении в среду культивирования эритробластических островков (ЭО) костного мозга крыс 2 мкг/мл или 4 мкг/мл суммарной РНК мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) наблюдалась стимуляция эритропоэза. Под действием 4 мкг/мл РНК<sub>ммск</sub> через 24 часа культивирования активировались процессы эритропоэза *de novo* и *de repeto*. Была обнаружена морфологически выявляемая особенность изменения структуры ЭО под действием РНК<sub>ммск</sub>, которая, в отличие от лимфоцитарной РНК, обладала прямым индуцирующим эритропоэз свойством и не вызывала увеличения числа контактов ЭО с лимфоцитами.

*Ключевые слова:* ММСК, эритропоэз, эритробластические островки, РНК

Ранее в ряде работ [1, 2, 3, 11] нами было показано, что суммарная РНК лимфоидных клеток играет ключевую роль в реализации их регуляторной и морфогенетической функций, обладая способностью адекватно воспроизводить те морфофункциональные свойства лимфоцитов, которые им присущи в момент выделения из них РНК. Обнаружение этого факта имеет большое значение, так как позволяет существенно расширить показания к применению регуляторных, корригирующих и лечебных свойств лимфоидных клеток в медицинской практике, заменив необходимость их трансплантации, требующей тщательного подбора трансплантата по антигенам гистосовместимости, введением реципиенту РНК, не имеющей ни аллогенного, ни ксеногенного ограничения и при этом обладающей такими же морфофункциональными свойствами, как и сами клетки.

Как показали наши исследования, принцип замены трансплантации и других клеток введением препаратов полученной из них суммарной РНК правомерен и актуален для решения проблемы их практического использования [4, 5]. В частности, это важно для применения в регенерационной терапии, в которой используются стволовые клетки и которая тоже имеет ряд ограничений (например, необходимость подбора совместимого донора и возможная угроза трансформации стволовых клеток в злокачественные). Использование РНК вместо самих клеток, из которых она получена, является возможным решением указанных проблем.

Доказано, что регуляторные препараты суммарной РНК, выделенной из нефракционированных клеток костного мозга и плаценты, обладают выраженной морфогенетической активностью и способны стимулировать эритропоэз [4, 5]. Тем не менее не ясно, обладает ли этим свойством только РНК кровяных клеток-предшественниц или оно присуще и РНК мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), которые, по данным ряда авторов, поддерживают выживание и пролиферацию гемопоэтических прекурсоров [15], а также продуцируют цитокины, участвующие в регуляторном гемопоэтическом каскаде [13, 14]. Неясно и то, сохраняется ли на уровне физиологического темпа формирования и развития эритробластических островков (ЭО) в системе *in vitro* в присутствии РНК<sub>ммск</sub> или в этих условиях указанные процессы имеют какие-либо особенности.

## Материалы и методы

Для решения поставленных задач мы использовали суммарную РНК, выделенную, согласно методу П. Хомчинского [12], из культивируемых (2-й пассаж) ММСК костного мозга. РНК<sub>ммск</sub> добавляли к культурам ЭО костного мозга крыс в концентрациях 2 мкг/мл или 4 мкг/мл. Культуральная среда была приготовлена на основе RPMI-1640 и содержала эмбриональную телячью сыворотку, гепарин, антибиотики, 2-меркаптоэтанол, L-глутамин, 0,25 МЕ/мл эритропо-

этина (Рекормон, Рош Диагностикс ГмбХ, Германия). Культивирование ЭО производили в течение 24 часов в газопроточном термостате при температуре +37°C, относительной влажности 95% и 4,5% содержания CO<sub>2</sub> [7]. Эта методика позволила визуализировать последовательность всех фаз терминальной стадии эритропоэза начиная с этапа присоединения колониеобразующей единицы эритроцитарной (КОЕ-Э) к костномозговым макрофагам, а также качественно и количественно оценить темп развития эритроидных клеток в культуре. Добавленного в культуральную среду эритропоэтина было недостаточно для моделирования физиологического эритропоэза, поскольку доказано [9, 10], что ЭО нормально развиваются только в присутствии 0,5 МЕ/мл гормона, но такой подход позволил нам оценить возможный механизм эритропоэтической активности исследуемой РНК.

Полученные препараты ЭО фиксировали метанолом и окрашивали по Паппенгейму. Оценивая последовательность удвоения эритроидных клеток в «короне» ЭО, начинающегося от колониеобразующей единицы эритроцитарной или проэритроблеста, ЭО разделяли на пять классов зрелости, пользуясь классификацией Ю.М. Захарова [6]. «Корона» ЭО 1-го класса зрелости (ЭО1) была представлена дифференцирующимися проэритроблестами и базофильными эритроблестами с числом клеток от 2 до 8 (результат амплификации 1:2:4:8); «корона» ЭО 2-го класса (ЭО2) – базофильными и ранними полихроматофильными эритроблестами с числом клеток от 9 до 16 (следствие удвоения 8:16). ЭО 3-го класса (ЭО3) содержали от 17 до 32 полихроматофильных и оксифильных эритроблестов (следствие

удвоения 16:32). «Корона» инволюцирующих островков (ЭОинв) была представлена поздними полихроматофильными, оксифильными эритроблестами и ретикулоцитами числом менее 16. К реконструирующимся островкам (ЭОрек) относили инволюцирующие ЭО, в «короне» которых обнаруживались проэритроблесты и/или базофильные эритроблесты – результат дифференцировки КОЕ-Э, присоединившихся к макрофагам ЭОинв. Количество ЭО1 характеризовало эритропоэз *de novo*, число ЭОрек – эритропоэз *de repeto*.

Для оценки темпа развития ЭО в культуре использовались расчетные характеристики: 1) общее количество КОЕ-Э, вступивших в дифференцировку (число ЭО всех классов зрелости + ЭОрек), которое представляет собой сумму ЭО, формирующихся *de novo* и *de repeto*; 2) показатель созревания эритроблестов (ЭО3 + ЭОинв/ЭО1 + ЭО2 + ЭОрек); 3) показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз (ЭОрек/ЭОинв).

Через 6, 12 и 24 часа культивирования в супернатанте контрольных и опытных культур ЭО определяли содержание эритропоэтина методом иммуноферментного анализа с помощью набора реагентов «Эритропоэтин-ИФА-Бест» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

### Результаты и обсуждение

При добавлении в культуральную среду 2 мкг/мл или 4 мкг/мл РНКммск через 24 часа общее количество ЭО в культурах, по сравнению с контролем, достоверно увеличивалось (табл. 1). Если в культурах, содержащих 2 мкг/мл исследуемой РНК, прирост

Таблица 1

Влияние суммарной РНКммск костного мозга на эритропоэз *in vitro*

Показатели	Контроль (n=10)	2 мкг/мл РНКммск (n=10)	4 мкг/мл РНКммск (n=10)
Количество ЭО/см <sup>2</sup>	1236,2±3,7	1298,3±2,2*	1352,4±2,6**
% ЭО1	3,5±0,01	3,9±0,01	5,9±0,01**
% ЭО2	4,9±0,01	5,1±0,01	8,1±0,02**
% ЭО3	30,5±0,02	31,8±0,01	28,3±0,02*
% ЭОинв	53,8±0,02	49,7±0,02	45,5±0,02**
% ЭОрек	7,1±0,01	9,4±0,01*	12,1±0,01**
Количество КОЕ-Э, вступивших в дифференцировку	1323,7±3,6	1413,2±1,8*	1515,2±3,3**
Показатель созревания эритроблестов	5,36±0,02	4,37±0,01*	2,81±0,01**
Показатель повторного вовлечения макрофагов в эритропоэз	0,132±0,002	0,184±0,001*	0,267±0,001**
Количество ЭО с лимфоидными клетками/см <sup>2</sup>	222,6±2,1	218,5±2,3	220,1±1,9

\* обозначены достоверные различия между опытными и контрольными культурами ЭО

■ – достоверные различия между эффектами 2 мкг/мл и 4 мкг/мл РНКммск; p<0,05

Таблица 2

**Влияние суммарной РНК ММСК костного мозга  
на динамику концентрации эритропоэтина (МЕ/мл) в культурах ЭО**

Длительность культивирования	Контроль	2 мкг/мл РНКммск	4 мкг/мл РНКммск
Исходное содержание ЭПО	0,25	0,25	0,25
6 часов	0,155±0,018	0,159±0,014	0,151±0,008
12 часов	0,151±0,015	0,148±0,06	0,150±0,017
24 часа	0,157±0,015	0,149±0,016	0,148±0,015

числа ЭО происходил за счет усиления реконструкции эритропоэза и повторного вовлечения макрофагов в процесс формирования новых ЭО, то под влиянием 4 мкг/мл РНКммск помимо этого активировались процессы комплексации КОЕ-Э со свободными макрофагами, то есть и эритропоэз *de repeto*, и эритропоэз *de novo*. Наряду с этим отмечалось достоверное уменьшение числа ЭО, содержащих зрелые эритроидные клетки в «короне», что отразилось на показателе созревания эритробластов, который при добавлении в культуру 2 мкг/мл РНК достоверно уменьшился в 1,2 раза, а при добавлении 4 мкг/мл РНКммск – в 1,9 раза и это явилось дополнительным свидетельством ускорения развития эритроидных клеток в ЭО.

С целью определения возможного механизма усиления эритропоэза под влиянием суммарной РНКммск была измерена концентрация эритропоэтина в культуральной среде через 6, 12 и 24 часов после начала культивирования (табл. 2). Отсутствие различий между опытными и контрольными показателями свидетельствует о том, что в механизме стимуляции эритропоэза под действием суммарной РНКммск не участвуют процессы активации синтеза эндогенного эритропоэтина центральными макрофагами ЭО. В отличие от этого при стимуляции эритропоэза под действием суммарной РНК лимфоцитов селезенки в течение первых 12 часов наблюдалось достоверное нарастание продукции эритропоэтина макрофагами, поддерживающими развитие эритробластов [5].

Исходя из полученных данных, мы полагаем, что суммарная РНКммск обладает непосредственной эритропоэтической активностью и способна напрямую регулировать экспрессию эритроидспецифичных генов в эритроидных клетках, минуя механизмы лимфоидной регуляции эритропоэза. Известно, что и при усилении постгеморрагического гемопоэза, и при введении экзогенного эритропоэтина лимфоциты достоверно чаще встраиваются в «корону» ЭО [8]. Так, если в норме в «короне» ЭО лимфоциты встречаются примерно в 11% случаев, то при 2% кровопотере число ЭО с лимфоцитами увеличивается до 35%, а при 3% кровопотере – до 73,8% уже через 1 сутки после кровопускания. И если после 2% кровопотери число

ЭО с лимфоцитами к 3-м суткам уже не отличается от контроля, то после 3% кровопотери к этому сроку численность ЭО, находящихся в контакте с лимфоцитами, продолжает оставаться высокой, составляя 72,5% [8]. В данном эксперименте под влиянием РНКммск, при общем увеличении числа островков за счет их пролиферирующих классов, количество ЭО, контактирующих с лимфоцитами, не отличалось от контрольных показателей (табл. 1).

Таким образом, в представленной работе нами были получены данные, свидетельствующие о том, что РНКммск обладает эритропоэтической активностью. Это может служить основанием для изучения возможности замены трансплантации ММСК полученной из этих клеток суммарной РНК.

*Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы по теме: «Создание клеточных моделей молекулярных процессов в органах и тканях» (НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича) и комплексной темы НИР «Регуляция кроветворной и некротворной функций клеток костного мозга в эксперименте и клинике» № 01201354257 (Южно-Уральский государственный медицинский университет)*

### Литература/References

1. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки крыс на эритропоэз *in vitro* // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 4. С. 35–39. [Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. Effect of total RNA preparations of the rat spleen lymphoid cells on erythropoiesis *in vitro* // Clinical and Experimental Morphology. 2014. V. 4. P. 35–39 (In Russ.)].
2. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Комарова И.А. Влияние препаратов суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз в культуре эритробластических островков крыс с полицитемией // Клиническая и экспериментальная морфология. 2014. № 4. С. 40–43. [Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Komarova I.A. Influence of total RNA preparations of spleen lymphoid cells on erythropoiesis in culture of erythroblastic islet of rats with polycythemia //

- Clinical and Experimental Morphology. 2014. V. 4. P. 40–43. (In Russ.).
3. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В., Головкина Л.Л., Муратова Ю.А., Рагимов А.А.* О гемопоэтических свойствах рибонуклеиновой кислоты лимфоцитов периферической крови больных истинной полицитемией и здоровых доноров // Онкогематология. 2015. № 2. С. 58–62. [*Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V., Golovkina L.L., Muratova Yu.A., Ragimov A.A.* About hematopoietic properties of ribonucleic acid of peripheral blood lymphocytes in patients with true polycythemia and healthy donors // *Oncohematology*. 2015. V. 2. P. 58–62. (In Russ.).]
  4. *Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Тишевская Н.В.* Эритропоэтическая активность суммарной РНК клеток плаценты *in vitro* // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. № 4. С. 31–35. [*Babaeva A.G., Gevorkyan N.M., Tishevskaya N.V.* Erythropoietic activity of total RNA of placenta cells *in vitro* // *Clinical and Experimental Morphology*. 2016. V. P. 31–35. (In Russ.).]
  5. *Бабаева А.Г., Тишевская Н.В., Геворкян Н.М.* О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах. М.: Группа МДВ, 2016. 272 с. [*Babaeva A.G., Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M.* About the morphogenetic properties of RNA of lymphoid and stem cells during regeneration processes. M.: MDV Group. 2016, 272 p. (In Russ.).]
  6. *Захаров Ю.М., Мельников И.Ю., Рассохин А.Г.* Классификация эритробластических островков костного мозга с учетом изменения их клеточного состава // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1990. № 5. С. 38–42. [*Zakharov Yu.M., Melnikov I.Yu., Rassokhin A.G.* Classification of erythroblastic islets of the bone marrow with allowance for changes in their cellular composition // *Archive of Anatomy, Physiology and Embryology*. 1990. V. 5. P. 38–42. (In Russ.).]
  7. *Захаров Ю.М., Тишевская Н.В.* Культура эритробластических островков – новый инструмент для исследования эритропоэза // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2003. № 1. С. 65–68. [*Zakharov Yu.M., Tishevskaya N.V.* Culture of erythroblastic islets is a new tool for the study of erythropoiesis // *Bulletin of the Ural Medical Academical Science*. 2003. V. 1. P. 65–68. (In Russ.).]
  8. *Захаров Ю.М., Рассохин А.Г.* Эритробластический островок. М.: Медицина, 2002. 280 с. [*Zakharov Yu.M., Rassokhin A.G.* Erythroblastic islet. M.: Medicine, 2002. 280 p. (In Russ.).]
  9. *Тишевская Н.В., Болотов А.А., Захаров Ю.М.* Математическое моделирование межклеточных взаимодействий в культуре эритробластических островков // Медицинский академический журнал. 2005. № 4, Т. 5. С. 50–59. [*Tishevskaya N.V., Bolotov A.A., Zakharov Yu.M.* Mathematical modeling of intercellular interactions in the culture of erythroblastic islands // *Medical Academical Journal*. 2005. V. 4, No 5. P. 50–59. (In Russ.).]
  10. *Тишевская Н.В., Шевяков С.А., Захаров Ю.М.* Влияние эритропоэтина и макрофагального колониестимулирующего фактора на пролиферативную активность эритроидных клеток в культуре эритробластических островков // Медицинский академический журнал. 2003. № 3, Т. 3. С. 67–72. [*Tishevskaya N.V., Shevyakov S.A., Zakharov Yu.M.* Influence of erythropoietin and macrophage colony-stimulating factor on proliferative activity of erythroid cells in erythroblastic islet culture // *Medical Academic Journal*. 2003. V. 3, No 3. P. 67–72. (In Russ.).]
  11. *Тишевская Н.В., Геворкян Н.М., Бабаева А.Г., Захаров Ю.М., Козлова Н.И., Болотов А.А.* Влияние суммарной РНК лимфоидных клеток селезенки на эритропоэз при экспериментальной полицитемии // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2015. № 4, Т. 101. С. 451–461. [*Tishevskaya N.V., Gevorkyan N.M., Babaeva A.G., Zakharov Yu.M., Kozlova N.I., Bolotov A.A.* Influence of the total RNA of lymphoid cells of the spleen on erythropoiesis under experimental polycythemia // *Russian Journal of Physiology named for Sechenov*. 2015. V. 4, No 101. P. 451–461. (In Russ.).]
  12. *Chomczynski P., Sacchi N.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156–9.
  13. *Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F. et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form an unique bone marrow niche // *Nature*. 2010;466:829–34.
  14. *Rubina K., Kalinina N., Efimenko A. et al.* Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation // *Tissue Eng. Part A*. 2009;15(8):2039–50.
  15. *Xie Y., Yin N., Wiegraebe W. et al.* Detection of functional hematopoietic stem cell niche using real-time imaging // *Nature*. 2009;457:97–101.

## MORPHOFUNCTIONAL FEATURES OF *IN VITRO* ERYTHROPOIESIS UNDER THE INFLUENCE OF TOTAL RNA FROM BONE MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELL

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

Total RNA isolated from multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) at a dose of 2 and 4 ug/ml was added to the culture medium of erythroblastic islands (EI) of rat bone marrow, which resulted in stimulation of erythropoiesis. The processes of erythropoiesis *de novo* and *de repeto* in 24-hour EI cultures were activated after adding of total RNAMMSK at 4 ug/ml. The morphologically revealed feature of the change in EI structure under the action of RNAMMSK was detected *in vitro*. Unlike lymphocytic total RNA, RNAMMSK directly induced erythropoiesis not accompanied by the increase in the number of contacts of

EI with lymphocytes. The results obtained suggest the conceptual possibility of an adequate replacement of MMSC transplanted with the introduction of total RNAMMSK.

*Key words:* MMSC, erythropoiesis, erythroblastic islets, RNA

### **Информация об авторах**

Бабаева Анна Георгиевна – академик РАЕН, док. мед. наук, консультант лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека.  
Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Тишевская Наталья Викторовна – доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии  
Южно-Уральского государственного медицинского университета.  
Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64.

Геворкян Нина Михайловна – научный сотрудник лаборатории биосинтеза белков НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича.  
Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8. E-mail: gevorgiann@yandex.ru

*Материал поступил в редакцию 27 февраля 2017 года*

# МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ У КРЫС СПРЕЙГ-ДОУЛИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОБИОТИКА *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Н.А. Золотова, Ю.Е. Козловский, Е.А. Тихонов,  
О.В. Макарова, Г.В. Козловская, Н.Ф. Чертович

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

В клинике для коррекции нарушений состава микрофлоры широко используются пероральные пробиотики, однако до сих пор нет доказательных методов оценки их влияния на структурные изменения толстой кишки. Целью работы была оценка цитофизиологических изменений бокаловидных клеток и структуры лимфоидных узелков ободочной кишки при воздействии пробиотика *Lactobacillus plantarum*. Самцам крыс Спрейг-Доули в течение 21 дня ежедневно интрагастрально вводили 108 КОЕ *Lactobacillus plantarum*, после выведения из эксперимента в ободочной кишке животных оценивали изменения числа и размеров лимфоидных узелков, количества бокаловидных клеток и продукции ими высокосульфатированных и нейтральных муцинов. Выявлено статистически значимое увеличение площади агрегированных лимфоидных узелков (бляшек) и числа отдельных лимфоидных узелков в них. Количество бокаловидных клеток и содержание в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов статистически значимо не изменялись. Таким образом, интрагастральное введение пробиотического штамма *Lactobacillus plantarum* в течение 21 дня не оказывает влияния на цитофизиологическое состояние бокаловидных клеток, но стимулирует локальный компартмент иммунной системы ободочной кишки.

**Ключевые слова:** пробиотик, ободочная кишка, иммунная система, эпителиальный барьер

По сравнению с другими барьерными органами толстая кишка максимально заселена микрофлорой [7]. Микрофлора во многом определяет морфофункциональное состояние иммунной системы, ассоциированной со слизистой оболочкой, участвует в регуляции моторики, секреции и всасывания, а также продуцирует ряд биологически активных веществ – нейромедиаторы, витамины, короткоцепочечные жирные кислоты [11]. В связи с этим в клинике для лечения ряда заболеваний широко используются пробиотики и другие препараты микробного происхождения. Тем не менее до сих пор нет доказательных методов оценки влияния препаратов этого ряда на структурные изменения толстой кишки.

Первым барьером толстой кишки, защищающим внутреннюю среду организма от бактерий и повреждающих агентов, является продуцируемая бокаловидными клетками слизи. Слизь формирует два слоя: внутренний и внешний. Внутренний слой слизи плотный и непроницаем для бактерий, внешний – более рыхлый, обильно заселен бактериями и служит для них источником питания. Основными структурными компонентами слизи являются муцины – высокогликозилированные гликопротеины [12]. На основе биохимических свойств

периферических регионов гликанов муцины делятся на нейтральные и кислые, а кислые – на сульфатированные (сульфомуцины) и несulfатированные (сиаломуцины) [5, 6]. В толстой кишке в норме преобладают кислые муцины, которые, как предполагается, лучше, чем нейтральные, защищают от бактериальной транслокации, так как первые, особенно сульфатированные, менее подвержены разрушению бактериальными гликозидазами [6]. Можно предположить, что применение пробиотиков влияет не только на количественный и качественный состав микрофлоры, но и на продукцию и биохимические свойства слизи, а также на процессы дифференцировки эпителиальных клеток. В связи с тем, что «первичная обработка» антигенов, поступающих из просвета органа, и их презентация Т-лимфоцитам в толстой кишке происходят в агрегированных и одиночных лимфоидных узелках [9], можно предположить, что пробиотики оказывают влияние и на локальный компартмент иммунной системы.

Лактобациллы – важные компоненты резидентной микрофлоры человека и животных, они обладают выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных и условно патогенных микроорганизмов,

оказывают иммуномодулирующее и противоопухолевое действие, синтезируют ряд витаминов и биологически активных веществ, в связи с чем рассматриваются как перспективные пробиотики [1]. Вид *Lactobacillus plantarum* является одним из основных компонентов кишечной микрофлоры человека, он успешно колонизирует кишечник крыс, конкурируя с *Escherichia coli* и оказывая иммуностимулирующий эффект [8].

Целью исследования была оценка цитофизиологических изменений бокаловидных клеток и структуры лимфоидных узелков ободочной кишки при воздействии пробиотика *Lactobacillus plantarum*.

### Материалы и методы

Исследование проводили на половозрелых самцах крыс Спрейг-Дуули массой тела 100–120 граммов. Животные были получены из питомника РАН «Пушино». Крыс содержали по пять голов в клетке при естественном освещении, комнатной температуре и свободном доступе к воде и корму («Корм для содержания лабораторных животных» ПК-120-1, ГОСТ Р50258-92) в соответствии с Правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), утвержденными Минздравом СССР 6 июля 1973 года. Индивидуально меченные животные были разделены на две группы по 10 голов – контрольную и опытную. Животным опытной группы в течение 21 дня ежедневно интрагастрально вводили разведенную в воде лиофильно высушенную культуру штамма *Lactobacillus plantarum* в дозе 0,5 мл на крысу (108 КОЕ). Крысам контрольной группы по той же схеме вводили физиологический раствор (0,9% водный раствор NaCl, 0,5 мл на крысу).

На 21-е сутки животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира, забирали ободочную кишку. С целью четкой визуализации агрегированных лимфоидных узелков у пяти животных из каждой группы на толстую кишку накладывали лигатуры, вводили в ее просвет 2% водный раствор уксусной кислоты, фиксацию проводили при температуре +4°C в течение 18–20 часов, кишку вскрывали по брыжейке, расправляли на бумаге черного цвета и фотографировали с использованием стереомикроскопа Stereo Zoom Microscope с фотокамерой Premiere SMZ-05 (C&A Scientific, США). На полученных цифровых фотографиях при помощи морфометрической программы Image-Pro Plus 6.0 определяли число агрегированных лимфоидных узелков на стандартной площади ободочной кишки (1 см<sup>2</sup>), их площадь и число лимфоидных узелков в бляшке. Ободочную кишку пяти животных из каждой группы фиксировали в жидкости Буэна, изготавливали гистологические срезы, которые одновременно окрашивали альциановым синим pH 1,0 (высокосульфатированные муцины) и проводили ШИК-реакцию (нейтральные муцины); на цифровых микрофотографиях, полученных с помощью микроскопа Axioplan 2 imaging (Carl Zeiss, Германия)

при ×200 и одинаковых условиях освещения, подсчитывали число бокаловидных клеток на единицу площади эпителиальной выстилки и интенсивность окрашивания в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов. Интенсивность окрашивания определяли с помощью программы Fiji и рассчитывали как средний десятичный логарифм отношения яркости фона к яркости точки объекта, нормированный на яркость окрашивания соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки. Также срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 6.0, для сравнения групп использовали критерий Манна–Уитни, статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты

При макроскопическом морфометрическом исследовании лимфоидных узелков в стенке ободочной кишки было выявлено статистически значимое увеличение площади их скоплений (бляшек) и числа отдельных лимфоидных узелков в них (рис. 1). Число бляшек на единицу площади стенки кишки не изменялось (табл. 1).

При микроскопическом исследовании продольных срезов ободочной кишки у крыс контрольной группы и после курса интрагастрального введения пробиотика на качественном уровне различия не выявлены: эпителиальная выстилка была сохранена на всем протяжении



Рис. 1. Макропрепарат ободочной кишки самца крысы Спрейг-Дуули, фиксированной в 2% водном растворе уксусной кислоты. Видны агрегированные лимфоидные узелки

Структурные изменения агрегированных лимфоидных узелков в стенке ободочной кишки у крыс Спрейг-Доули при воздействии пробиотика *Lactobacillus plantarum*

Параметры	Экспериментальные группы, Ме (25;75)		Статистическая значимость различий (U-критерий Манна–Уитни)
	контроль	пробиотик	
Число бляшек на 1 см <sup>2</sup> кишки	0,17 (0,17;0,25)	0,15 (0,13;0,15)	0,100
Площадь бляшки, см <sup>2</sup>	0,08 (0,05;0,08)	0,12 (0,11; 0,14)	0,006
Число узелков в бляшке	8 (7;10)	14 (13;16)	0,006

слизистой оболочки, крипты глубокие с узким просветом, в собственной пластинке слизистой оболочки и подслизистой основе выявлялось небольшое число равномерно распределенных клеточных элементов – фибробластов, фиброцитов, лимфоцитов и единичных гистиоцитов, мышечная пластинка представлена 1–2 слоями гладкомышечных клеток. Лимфатические сосуды были с узким щелевидным просветом. Выявлялись лимфоидные узелки, часть их была со светлыми центрами. Мышечная оболочка состояла из кольцевого и продольного слоев гладкомышечных клеток. В подслизистой основе и мышечной оболочке выявлялись четко очерченные нервные ганглии. Серозная оболочка была представлена тонким слоем рыхлой волокнистой соединительной ткани и выстлана плоским мезотелием (рис. 2 А, Б).

На препаратах, окрашенных альциановым синим и с ШИК-реакцией, по всей глубине крипт выявлялись бокаловидные клетки (рис. 2 В–Е). По данным морфометрического исследования, число бокаловидных клеток и содержание в них высокосульфатированных и нейтральных муцинов статистически значимо не изменялось (табл. 2).

### Обсуждение

Данные о влиянии пробиотика *Lactobacillus plantarum* на морфологические изменения ободочной кишки здоровых крыс Спрейг-Доули получены нами впервые. При разработке пробиотических лекарственных средств и проверке их качества оцениваются такие по-

казатели как подлинность и отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов – соответствие заявленного состава микроорганизмов в препарате входящим в его состав, специфическая активность – определение количества жизнеспособных организмов в одной дозе препарата, кислотообразования и антагонистической активности по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам и специфическая безвредность – определение летальности либо интоксикации у лабораторных животных при введении одной или более человеческих доз препарата [3]. Влияние пробиотиков на органы на системном уровне не исследовано. Изучение эффективности пробиотических препаратов при различных заболеваниях также проводится без контроля влияния препарата на здоровый организм и оценивается только по исчезновению клинических симптомов, наступлению ремиссии и снижению частоты рецидивов [2, 4].

Наблюдаемое нами увеличение числа и размеров лимфоидных узелков в ободочной кишке указывает на иммуностимулирующее действие *Lactobacillus plantarum*. Показано, что лактобациллы вызывают увеличение концентрации секреторного IgA в кишечном содержимом и числа IgA-продуцирующих клеток в слизистой оболочке кишечника, бронхов и молочных желез, повышение уровня IgG в сыворотке крови, изменяют экспрессию толл-подобных рецепторов (TLR), стимулируют продукцию IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL10, IL6, GM-CSF в культуре мононуклеаров периферической крови человека [10].

Гистофизиологические изменения бокаловидных клеток в эпителиальной выстилке ободочной кишки у крыс Спрейг-Доули при воздействии пробиотика *Lactobacillus plantarum*

Параметры	Экспериментальные группы, Ме (25;75)		Статистическая значимость различий (U-критерий Манна–Уитни)
	контроль	пробиотик	
Число бокаловидных клеток на 1 мм <sup>2</sup> эпителия	2209 (1911; 2784)	2226 (2100; 2475)	0,624
Альциановый синий, интенсивность окрашивания, у.е.	0,236 (0,219; 0,251)	0,249 (0,233; 0,254)	0,462
ШИК-реакция, интенсивность окрашивания, у.е.	0,268 (0,264; 0,282)	0,262 (0,253; 0,263)	0,086

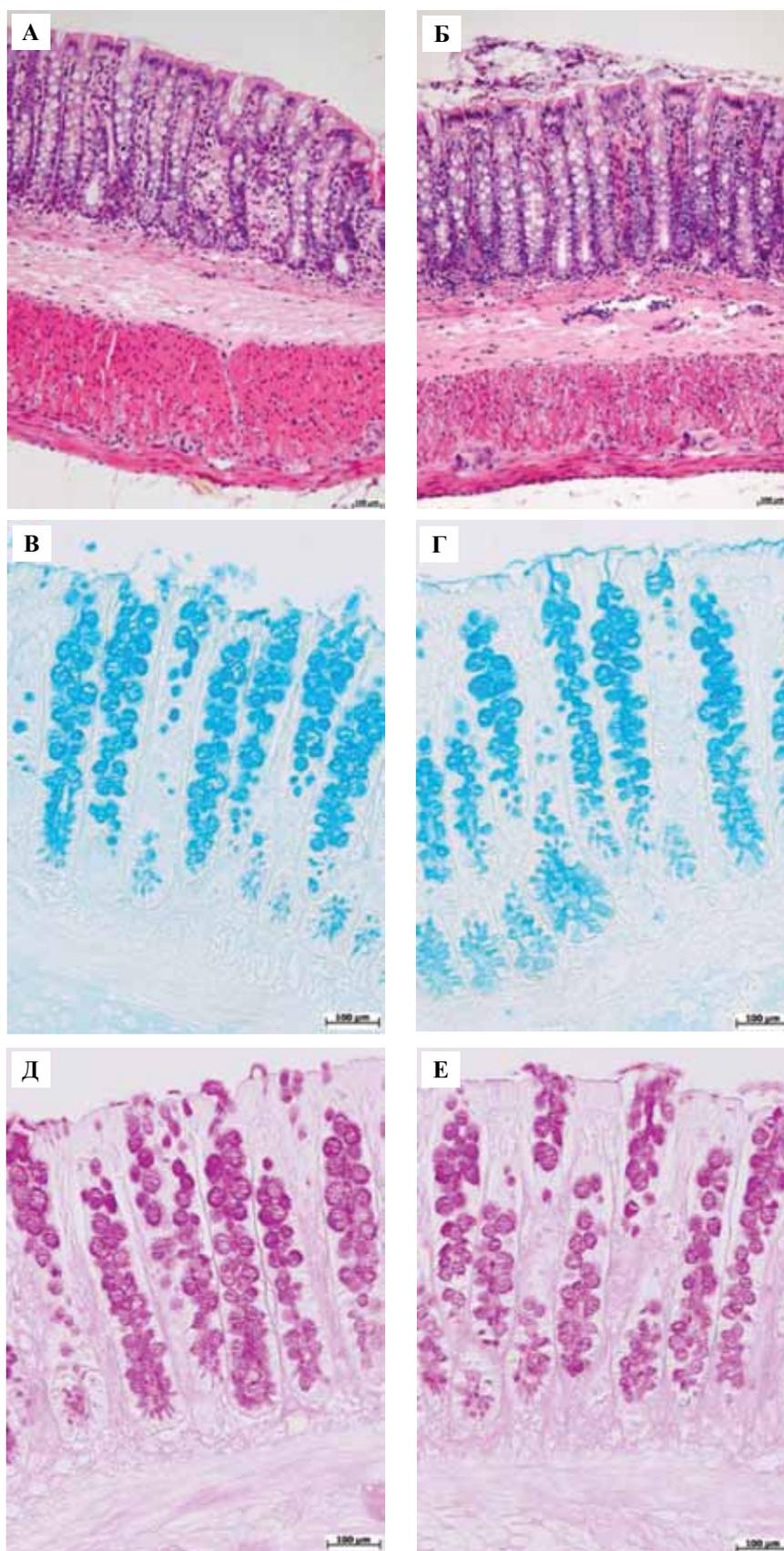


Рис. 2. Дистальный отдел ободочной кишки самцов крыс Спрейг-Доули контрольной группы (А, В, Д) и при воздействии пробиотика *Lactobacillus plantarum* (Б, Г, Е). Окраска гематоксилином и эозином (А, Б), альциановым синим (В, Г) и ШИК-реакция (Д, Е)

Отсутствие изменений числа бокаловидных клеток и содержания в них нейтральных и высокосульфатированных муцинов указывает на сохранение структурной и функциональной целостности эпителиального барьера ободочной кишки. В толстой кишке у мышей с первичным дисбиотическим состоянием, вызванным приемом антибиотиков, показано достоверное увеличение толщины слизистой оболочки, увеличение числа нейтрофилов в собственной пластинке слизистой оболочки и увеличение объемной доли бокаловидных клеток [2].

### Выводы

Интрагастральное введение пробиотического штамма *Lactobacillus plantarum* в течение 21 дня не оказывает влияния на цитофизиологическое состояние бокаловидных клеток, но стимулирует локальный компартмент иммунной системы, вызывая увеличение числа лимфоидных бляшек и количества отдельных лимфоидных узелков в них.

### Литература/References

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. 2003. № 4. С. 50–58. [Glushanova N.A. Biologicheskie svoystva lactobacill // Bulletin` sibirskoy mediciny. 2003. V. 4. P. 50–58. (In Russ.)].
2. Овчарова А.Н. Морфологическая характеристика тонкой и толстой кишки при экспериментальном первичном дисбиозе и его коррекции пробиотиками: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2012. 21 с. [Ovcharova A.N. Morphological characteristics of the small intestine and colon in experimental primary dysbiosis and its correction with probiotics: Diss., M., 2012. 21 p. (In Russ.)].
3. Осипова И.Г., Евлашкина В.Ф., Давыдов Д.С., Саканян Е.И. Общие фармакопейные статьи на препараты пробиотики для государственной фармакопей РФ XIII издания – первый опыт в мировой фармакопейной практике // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 6–2. С. 272–276. [Osipova I.G., Evlashkina V.F., Davydov D.S., Sakanjan E.I. General monographs on probiotics

- preparations for state pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition – first experience in the world pharmacopoeia practice // International journal of applied and fundamental research. 2016. V. 6–2. P. 272–276. (In Russ.)].
4. Полуэктова Е.А., Сидорина Ю.О., Кучумова С.Ю., Королев А.В., Шифрин О.С., Ивашкин В.Т. Обоснование применения и оценка эффективности пробиотиков у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2015. № 2. С. 58–68. [Poluektova Ye.A., Sidorina Yu.O., Kuchumova S.Yu., Korolev A.V., Shifrin O.S., Ivashkin V.T. Substantiation of application and estimation of efficacy of probiotics at inflammatory bowel diseases // Russian journal of gastroenterology, hepatology, coloproctology. 2015. V. 2. P. 58–68. (In Russ.)].
  5. Corfield A.P., Carroll D., Myerscough N., Probert C.S. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease // Front Biosci. 2001; 6:D1321–57.
  6. Deplancke B., Gaskins H.R. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer // Am J Clin Nutr. 2001;73(6):1131–41.
  7. Geremia A., Biancheri P., Allan P., Corazza G.R. et al. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease // Autoimmun Rev. 2014;13(1):3–10.
  8. Herías M.V., Hessle C., Telemo E., Midtvedt T. et al. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats // Clin Exp Immunol. 1999;116(2): 283–90.
  9. Izcue A., Coombes J.L., Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation // Immunol Rev. 2006;212:256–71.
  10. Kembang T.S., Kapila S., Shanmugam V.P., Kapila R. Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system // J Appl Microbiol. 2014;117(2):303–19.
  11. Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R. et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions // Science. 2012;336(6086):1262–7.
  12. Pelaseyed T., Bergström J.H., Gustafsson J.K., Ermund A. et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system // Immunol Rev. 2014;260(1):8–20.

## MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE COLONIC MUCOSA IN THE SPRAGUE-DAWLEY RATS UNDER EFFECT OF PROBIOTICS *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

N.A. Zolotova, Yu.E. Kozlovsky, E.A. Tikhonov,  
O.V. Makarova, G.V. Kozlovskaya, N.F. Chertovich

Oral probiotics are widely used in clinical practice. However, there are still no evident methods for evaluating their impact on the structural changes in the colon. The aim of the work was to evaluate the cytophysiological changes in goblet cells and the structure of colonic lymphoid nodules under the influence of probiotic *Lactobacillus plantarum*. Male Sprague-Dawley rats received daily intragastrical injections of 108 CFU of *Lactobacillus plantarum*. Changes in the number and size of lymphoid nodules, the number of goblet cells and the production of sulfated and neutral mucins in the colon were evaluated after the sacrifice of the animals. A statistically significant increase in the area of aggregated lymphoid nodules and the number of individual lymphoid nodules within them was revealed. The number of goblet cells and the content of highly

sulfated and neutral mucins did not change significantly. Thus, intragastric administration of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* for 21 days had no effect on the cytophysiological state of goblet cells but lead to stimulation of the local compartment of the immune system.

*Key words:* probiotic, colon, immune system, epithelial barrier

### Информация об авторах

Золотова Наталья Александровна – кандидат биологических наук, исполняющая обязанности научного сотрудника лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 128 96 82. E-mail: natashazltv@gmail.com

Козловский Юрий Евгеньевич – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией инфекционной патологии и молекулярной микробиологии НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120 42 83. E-mail: kyegene@gmail.com

Тихонов Евгений Александрович – младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии человека НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 128 68 29. E-mail: genebio@mail.ru

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

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120 80 65. E-mail: makarov.olga2013@yandex.ru

Козловская Галина Викторовна – научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микробиологии НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120 42 83. E-mail: galinako48@yandex.ru

Чертович Николай Федорович – научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микробиологии НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120 42 83. E-mail: nfch18@gmail.com

*Материал поступил в редакцию 18 марта 2018 года*

# ЭНДОГЕННЫЕ И ЭКЗОГЕННЫЕ ИСТОЧНИКИ РЕПАРАЦИИ МИОКАРДА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Т.В. Липина<sup>1</sup>, А.В. Комова<sup>1</sup>, С.Ю. Сосновская<sup>1</sup>, Н.В. Кошелева<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

<sup>2</sup> ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

<sup>3</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва

В настоящем обзоре предпринята попытка систематизировать данные литературы последнего десятилетия о восстановлении сердечной мышцы в норме и при патологии. Рассмотрены основные характеристики эндогенных стволовых клеток сердца, проведен сравнительный анализ перспектив клеточной терапии в восстановлении миокарда.

*Ключевые слова:* стволовые клетки, регенерация, миокард, кардиомиоциты, клеточная терапия

Несмотря на успехи в развитии терапии сердечно-сосудистых заболеваний, именно нарушения работы сердца являются ведущей причиной смерти населения во всем мире.

Регенеративная медицина разрабатывает подходы для лечения пациентов, страдающих сердечной недостаточностью. Клеточные и тканеинженерные продукты должны пройти проверку безопасности и эффективности в доклинических и клинических исследованиях. К сожалению, часто конструкции с аллогенными клетками плохо приживаются, может нарушаться дифференцировка донорских клеток [4]. С развитием технологии репрограммирования клеток появилась возможность получать кардиомиоциты (КМЦ) из соматических клеток, прежде всего для разработки новых лекарственных средств и инновационных методов терапии [3].

С начала 2000-х годов активно проводятся научные и прикладные исследования с целью выявления возможности терапии поврежденного сердца с помощью различных типов стволовых клеток (СК), как изначально населяющих сердце, так и из других источников [2, 5].

В настоящем обзоре рассмотрены основные эндогенные источники восстановления сердечной мышцы, проанализированы результаты последнего десятилетия по клеточной терапии патологии миокарда.

## 1. Резидентные стволовые клетки сердца

В сердце взрослых млекопитающих находятся резидентные СК, способные к кардиомиогенной дифференцировке.

В 1990-е годы было показано, что КМЦ млекопитающих в зрелом возрасте могут пройти кариокинез и цитокинез [8]. Недавние исследования выявили, что

обновление кардиомиоцитов у млекопитающих, включая человека, происходит в течение всей жизни, хотя оценки скорости воспроизведения КМЦ резко различаются [18].

Основное доказательство регенерации КМЦ у людей было получено при анализе изотопа  $C^{14}$ . Йонас Фрисен и его коллеги из Стокгольма разработали метод определения «даты рождения» КМЦ в организме человека оценкой скорости «оборота» радиоактивного углерода путем измерения содержания  $C^{14}$ , который встраивался в ДНК клеток [20]. Их данные показали, что новые КМЦ образуются в миокарде человека со скоростью примерно 1,5% в год в возрасте 25 лет, на протяжении жизни этот процент существенно снижается [11].

В настоящее время выделяют ниши СК сердца, в которых они окружены специфическим набором факторов и где гемодинамическая нагрузка минимальна, в частности это верхушка сердца и предсердия [13]. Обсуждаются факторы и условия мобилизации клеток из этих ниш. Считается, что для мультипотентных клеток, не склонных покидать нишу, помимо c-kit рецептора также характерно наличие Notch1, тогда как маркеры c-Met и рецептор EphA2 присущи клеткам, которые склонны мигрировать из ниши; присутствие IGF-2 на сердечных СК указывает, что эти клетки уже высокочувствительны к сигналам индукции апоптоза [13].

Немаловажной практической задачей является получение резидентных СК сердца в достаточном количестве. Одной из последних разработок в этой области стал метод наращивания резидентных сердечных СК, полученных из ушка предсердия человека *ex vivo* в культурах эксплантатов ткани с последующей иммуномагнитной селекцией [1]. Сортировка и затем масштабирование малочисленной популяции этих СК позволяют из ограниченного размера образца миокарда

получать достаточные для последующей терапии объемы клеток.

Предполагают, что существующие клетки сердца и присутствующие там СК могут делиться как в физиологических условиях, так и в ответ на нагрузку, которая дополнительно стимулирует сердечные СК к дифференцировке [4].

### 1.1. Стволовые клетки сердца, экспрессирующие *c-kit*<sup>+</sup>

В настоящее время самая изученная популяция СК сердца – популяция *c-kit* позитивных клеток, которые экспрессируют транскрипционные факторы Nkx2.5, GATA4, Mef2, играющие роль в последующей дифференцировке, но в то же время не экспрессируют маркеры дифференцированных клеток (*Lin*<sup>-</sup>). Считается, что сердечные *c-kit*<sup>+</sup> клетки являются СК сердца с потенциалом к дифференцировке в КМЦ, эндотелиальные и гладкомышечные клетки *in vitro* и после травмы сердца. Клетки *Lin*<sup>-</sup> *c-kit*<sup>+</sup> были обнаружены в небольших кластерах в интерстиции между хорошо дифференцированными КМЦ и имели морфологию, свойственную для недифференцированных клеток. Также многие из этих клеток экспрессировали Ki67 маркер, который свидетельствует о том, что клетка проходит клеточный цикл или недавно была в нем. Тем не менее в 2015 году Sultana et al. [19] опубликовали данные, согласно которым *c-kit* редко коэкспрессируется с кардиомиогенным маркером Nkx2.5 или сердечным тропонином T, а вместо этого *c-kit* преимущественно маркирует популяцию эндотелиальных клеток в сердцах эмбрионов и взрослых организмов. После острого повреждения сердца *c-kit*<sup>+</sup> клетки сохраняли признаки своей эндотелиальной природы и не становились миогенными предшественниками или КМЦ.

В клинических испытаниях трансплантация *c-kit*<sup>+</sup> клеток в зону инфаркта практически не оказала терапевтического эффекта [28]. Есть данные о том, что изолированные *c-kit*<sup>+</sup> клетки, культивируемые *in vitro* в суспензии, формируют кардиосферы – сферические кластеры из множества мелких СК сердца, представляющих популяцию мультипотентных клеток с определенными характеристиками. Применение таких клеток в терапии миокарда приведено в таблице. Диссоциация кардиосфер перед инъекцией в зону повреждения на отдельные клетки разрушает межклеточные контакты, снижает долю белков внеклеточного матрикса и способности клеток к адгезии, что негативно влияет на приживление трансплантатов и их функциональную эффективность [11].

### 1.2. Стволовые клетки сердца, экспрессирующие *Sca-1*

Первоначально СК сердца, экспрессирующие *Sca-1*, были выделены из сердца мыши. Они могут дифференцироваться в отдельные линии клеток таких органов

как скелетные мышцы, печень, простата, молочная железа *in vitro*, эта способность сохраняется даже после длительного культивирования в монослое [11]. Установлено, что *Sca-1*<sup>+</sup> клетки могут мигрировать в поврежденные участки миокарда. Кроме того, из ткани сердца взрослых особей были выделены *Sca-1*<sup>+</sup> клетки, которые также экспрессировали GATA4 и *Csx/Nkx-2.5*, то есть относились к линии КМЦ [3].

Wang et al. в 2014 году [25] показали, что способность *Sca-1*<sup>+</sup> клеток к кардиомиогенной дифференцировке сохраняется в течение долгосрочного культивирования *in vitro*. Они изолировали *Sca-1*<sup>+</sup> клетки из постнатального сердца мыши и культивировали их в течение длительного времени *in vitro*, периодически тестируя на пассажах пролиферативную способность и стволовость этих клеток. В целом, полученные из сердца *Sca-1*<sup>+</sup> клетки демонстрировали характеристики сердечных СК – долговременную способность к размножению *in vitro*, неопухолегенное существование *in vivo*, стойкую экспрессию кардиоспецифичных и стволовых маркеров, а также мультипотентную дифференцировку в кардиальные клеточные линии.

Таким образом, экспрессирующие *Sca-1* СК сердца, вероятно, участвуют в обновлении КМЦ взрослого организма [3], но пока остается неясным, являются ли клетки этой популяции тканеспецифичными предшественниками, СК или они ассоциированы с какой-то тканью и относятся к гемопоэтическим, мезенхимальным, эндотелиальным предшественникам. Немаловажно подчеркнуть, что в сердце крупных млекопитающих и человека не идентифицируют СК с маркером *Sca-1*, тогда как у мышей отмечали почти 100% коэкспрессию *Sca-1* и *c-kit* на прогениторных клетках в миокарде [12].

### 1.3. Стволовые клетки сердца, экспрессирующие *Isl1*

Предполагают, что фактор транскрипции *Isl1* маркирует клеточную популяцию, участвующую в формировании сердца у эмбриона, включая большинство клеток правого желудочка, предсердий, устья крупных артерий, а также специфические области левого желудочка. Популяция таких клеток-предшественников остается в сердце эмбриона мыши после его образования, но число клеток с данным маркером постепенно уменьшается с увеличением возраста плода. Кластеры *Isl1*<sup>+</sup> кардиобластов у взрослых сохраняются в обоих предсердиях. Локализация *Isl1*<sup>+</sup>-предшественников в определенных сегментах сердца схожа для мыши, крысы и человека [10]. Отсутствие клеток, экспрессирующих *Isl1*<sup>+</sup>, приводит к патологии сердца [7].

## 2. Клеточная терапия патологии сердца

Первые подходы к тканевой терапии миокарда были связаны с получением его так называемых заплаток. Функционально активные фрагменты мышечной ткани можно получить *in vitro* из КМЦ или скелетных миобластов, но после трансплантации, к сожалению, такие

Доклинические исследования терапии заболеваний сердца популяциями стволовых клеток сердца

Используемые клетки	Нозология/ объект	Способ введения клеток	Механизм действия введенных клеток	Результат	Источник
c-kit <sup>+</sup> КМЦ человека	ИМ / мышь, крыса	ИМК	Дифференцировка в КМЦ, эндотелий и гладкие миоциты	Улучшение функции желудочков	[8]
ckit <sup>+</sup> сердечные СК мыши	ОСН / мышь	ВВ	Регенерация сердца, дифференцировка в КМЦ	Улучшение сокращения левого желудочка	[26]
Кардиосферы человека (1×10 <sup>5</sup> на инъекцию)	ИМ / мышь	ИМК	Секреция VEGF, HGF и IGF; ↓ скорости апоптоза, улучшение устойчивости тканей к ишемии; дифференцировка в КМЦ, эндотелий и гладкие миоциты	Улучшение фракции выброса левым желудочком	[12]
Кардиосферы человека (10 сфер на животное)	ИМ / мышь	ИМК	Дифференцировка в КМЦ, эндотелий и гладкие миоциты	Улучшение фракции выброса левым желудочком	[20]
Кардиосферы крысы	Реперфузия ишемии / крыса	ИК	Пролиферация эндогенных сердечных СК; дифференцировка в КМЦ, эндотелий и гладкие миоциты	Улучшение функционирования левого желудочка; ↓ фиброза	[26]
Кардиосферы мыши	ИМ / мышь	ИМК	Стимуляция деления эндогенных КМЦ; дифференцировка в КМЦ, эндотелий и гладкие миоциты	↓ размера рубца; улучшение функционирования сердца, ↑ жизнеспособности миокарда	[15]
Кардиосферы крысы	ИМ / крыса	ИМК	↑ экспрессии влияющих на регенерацию факторов роста: VEGF, HGF и IGF-1; стимуляция ангиогенеза; ↓ воспалительной реакции	↓ размера рубца и содержания коллагена; ↑ жизнеспособности миокарда; ↑ функции левого желудочка	[23]

ВВ – внутривенно, ИК – интракоронарно, ИМ – инфаркт миокарда, ИМК – интрамиокардиально

ОСН – острая сердечная недостаточность

↑ – увеличение, ↓ – снижение

конструкты не способны к электромеханическому объединению с миокардом. Тканеинженерные конструкты на основе синтетических или естественных носителей, заселенных клетками либо дополненных факторами роста, приживаются успешнее, а также могут быть использованы для стимуляции эндогенных механизмов безрубцового восстановления [24]. Тем не менее трансплантация сформированных фрагментов миокарда может привести к аритмии, поэтому в последнее время активнее разрабатывают подходы к терапии патологии сердца единичными клетками или даже биоактивными продуктами их секреции.

С использованием разных популяций СК сердца и СК из различных источников были проведены доклинические испытания, а также изучены механизмы действия разных типов клеток. Во всех экспериментальных сериях происходило улучшение работы сердца (таблица). Далее представлена информация об основных типах клеток, используемых в терапии патологии сердца.

### 2.1. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)

Экспериментально уже в 2005 году Xue et al. [28] показали, что при особых условиях культивирования ЭСК человека могут дифференцироваться в КМЦ. При трансплантации КМЦ, полученных из ЭСК человека *ex vivo*, морским свинкам донорские клетки интегрировались в миокард реципиента с сохранением функциональной активности, также такие КМЦ проявляли ритмическую электрическую и сократительную активность *in vitro*. Аналогичным образом, функциональный пейсмекер, полученный из ЭСК человека, может быть имплантирован в левый желудочек *in vivo*. Детальное оптическое картирование эпикардиальной поверхности сердец морских свинок с трансплантированными КМЦ, полученными из ЭСК человека, подтвердило успешное распространение деполяризации мембраны от места трансплантации в окружающий миокард [27].

При этом такой метод лечения характеризуется рядом проблем: во-первых, лишь малая часть полученных

указанным способом КМЦ обладает врожденной сократительной способностью, во-вторых, получение ЭСК связано с разрушением эмбриона человека, в-третьих, трансплантация ЭСК может приводить к развитию тератомы или вызывать иммунный ответ реципиента [2]. Кроме того, механизм дифференцировки этих клеток в деталях еще не выяснен [11], поэтому сейчас остро встает вопрос о поиске более доступных источников СК с более понятным и управляемым механизмом дифференцировки.

## 2.2. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)

С помощью ИПСК в результате репрограммирования соматических клеток могут быть получены КМЦ. Несмотря на то, что терапия сердца мыши с ишемической болезнью сердца аллогенными ИПСК была успешной и поврежденные функции сердца восстанавливались, в целом этот метод также обладает рядом недостатков, таких как низкий выход ИПСК при их получении, низкая эффективность их дифференцировки в КМЦ, возможность возникновения опухоли и иммунного отторжения [3].

Клетки с индуцированной плюрипотентностью обеспечивают индивидуализацию, или пациентоспецифичность, что очень важно в перспективе при разработке подходов к персонализированной клеточной терапии [2]. ИПСК могут дифференцироваться и в незрелые КМЦ [20]. К настоящему времени получены партеногенетические СК из неоплодотворенных ооцитов мыши. Данную культуру рассматривают в качестве альтернативного источника плюрипотентных клеток для клеточной терапии с важным отличительным признаком – гомозиготностью [6].

## 2.3. Стволовые клетки трофобласта

Стволовые клетки трофобласта (ТСК) (трофэктодермы бластоцист) обладают меньшим дифференцировочным потенциалом, чем плюрипотентные СК, но большим, чем СК взрослого организма. Показана дифференцировка ТСК в КМЦ и клетки сосудов *in vitro* [9].

Недавно в сравнительном исследовании свойств ТСК и мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) при моделировании инфаркта миокарда окклюзией коронарной артерии у мышей было выявлено, что ТСК обладают рядом преимуществ по сравнению с ММСК после интрамиокардиального введения клеток [14]. Через 3 недели после операции как ТСК, так и ММСК предохраняли левый желудочек от ремоделирования, при введении обоих типов клеток не было выявлено образование опухолей. При этом ТСК превосходят ММСК по следующим параметрам: количество клеток в миокарде через 3 недели после инфаркта, способность трансдифференцировки в КМЦ и эндотелиоциты, усиление пролиферации эндогенных КМЦ.

## 2.4. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (ММСК)

Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки являются одними из самых удобных СК для использования, так как они, с одной стороны, могут быть легко, без вреда здоровью, выделены из разнообразных тканей взрослого организма – костного мозга, жировой ткани, стромы пуповины и пуповинной крови, а с другой – практически не мутируют при длительном культивировании и последующей дифференцировке в разные производные – адипоциты, остеобласты, хондроциты, клетки нервной и мышечной (миобласты и КМЦ) тканей [12, 21]. ММСК подавляют воспалительные и иммунные реакции, создавая благоприятную среду для приживления трансплантатов. Они могут ингибировать дифференцировку моноцитов, регулируют экспрессию молекул зрелых дендритных клеток, подавляя активацию Т-клеток. Кроме того, ММСК регулируют функции макрофагов [4].

Разрабатываемое терапевтическое использование данного типа клеток основывается на том, что ММСК обладают мощным паракринным действием на окружающие клетки за счет синтеза и секреции разных факторов роста (например, VEGF, IGF-1 и т.д.), цитокинов, стимулирующих другие клетки, в том числе резидентные СК, к делению и дифференцировке. ММСК замедляют апоптоз клеток сердца, способствуют реконструированию внеклеточного матрикса и подавляют реакции воспаления [12]. При трансплантации ММСК они проявляют хоуминг и мигрируют в поврежденную зону, влияя на близлежащие от места поражения клетки [2].

## 2.5. Экзосомы и синтетические микрочастицы

Новым экспериментальным подходом к преодолению проблем, связанных с применением в медицине СК, может стать использование экзосом, секретируемых СК, или даже синтетических микрочастиц, построенных из мембран, в которые заключены особые биосовместимые и биodeградируемые полимеры, например полиэфирные полилактидгликолида – PLGA, с секретом СК. У мышей после инфаркта миокарда подобные синтетические бесклеточные конструкции улучшали функционирование сердечной мышцы наравне с инъекцией СК, при этом не наблюдали такие негативные последствия как туморогенность и иммуногенность [22]. Одним из перспективных подходов к регуляции регенерации миокарда становится также применение микроРНК. В частности, было продемонстрировано, что они способствуют уменьшению зоны фиброза при гипертрофии, вызванной перегрузкой сердца давлением [16, 17].

## Заключение

Терапия нарушений сердечно-сосудистой системы и патологии сердца стволовыми клетками является перспективной, стремительно развивающейся обла-

стью исследований. Проведенные эксперименты на животных уже продемонстрировали эффективность клеточной трансплантологии для восстановления поврежденного сердца после инфаркта миокарда. Безусловно, необходимы усовершенствование методов выделения и идентификации стволовых клеток, изучение молекулярных механизмов дифференцировки, приживаемости, пролиферации и комплексный анализ других воздействий, способных повысить эффект клеточной терапии, чтобы в будущем сделать ее рутинной процедурой в кардиологии.

*Исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-30066).*

### Литература/References

1. Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Макаревич П.И. Получение и характеристика прогениторных клеток сердца из миокарда ушка правого предсердия // Цитология. 2016. № 5, Т. 58. С. 340–348. [Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Rubina K.A., Syssoeva V.Y., Makarevich P.I. The preparation and characterization of progenitor heart cells from the myocardium of the right atrium // Tsitologia. 2016. V. 5, No 58. P. 340–348 (In Russ.)].
2. Коноплянников М.А., Кальсин В.А., Аверьянов А.В. Стволовые клетки для терапии ишемической болезни сердца: достижения и перспективы // Клиническая практика. 2012. № 3, Т. 3 С. 63–77. [Konoplyannikov M.A., Kalsin A.V., Averianov A.V. Stem cells for therapy of ischemic heart disease: achievements and prospects // Klinicheskaya praktika. 2012. V. 3, No 3 P. 63–77 (In Russ.)].
3. Новосадова Е.В., Гривенников И.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: от получения до применения в биохимических и биомедицинских исследованиях // Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 3–38. [Novossadova E.V., Grivennikov I.A. Induced pluripotent stem cells: from receipt until use in biochemical and biomedical research // Uspehi biologicheskoi khimii. 2014. No 54. P. 3–38 (In Russ.)].
4. Пальцев М.А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. М.: Медицина, 2009. 455 с. [Paltsev M.A. Stem cell Biology and cell technology. M.: Meditsina, 2009. 455 p. (In Russ.)].
5. Cahill T.J., Choudhury R.P., Riley P.R. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics // Nat Rev Drug Discov. 2017;16(10):699–717.
6. Didié M., Galla S., Muppala V., Dressel R. et al. Immunological properties of murine parthenogenetic stem cell-derived cardiomyocytes and engineered heart muscle // Front Immunol. 2017;8:955. doi: 10.3389/fimmu.2017.00955.
7. Ellison G.M., Vicinanza C., Smith A.J., Aquila I. et al. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration // Cell. 2013;154(4):827–42.
8. Goutans M.R., Doevendans P.A., Chamuleau S.A., Joost P. Cardiac Stem Cell Treatment in Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies // Circ Res. 2016;118(8):1223–32.
9. Kara R.J., Bolli P., Karakikes I., Matsunaga I. et al. Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation // Circ Res. 2012;110(1):82–93.
10. Laugwitz K.L., Moretti A., Lam J., Gruber P. et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages // Nature. 2007;446(7138):934.
11. Lee R.T., Garbern J.C., Richard T. Cardiac Stem Cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration // Cell stem cell. 2013;12(6):689–98.
12. Leite C.F., Almeida T.R., Lopes C.S., Dias da Silva V. Multipotent stem cells of the heart—do they have therapeutic promise? // Front Physiol. 2015;6:123.
13. Leri A., Rota M., Hosoda T., Goichberg P. et al. Cardiac stem cell niches // Stem Cell Res. 2014;13(3):631–46.
14. Li G., Chen J., Zhang X., He G. Cardiac repair in a mouse model of acute myocardial infarction with trophoblast stem cells // Sci Rep. 2017;7:44376. doi: 10.1038/srep44376.
15. Li T.S., Cheng K., Malliaras K., Smith R.R. et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells // J Am Coll Cardiol. 2012;59(10):942–53.
16. Matkovich S.J., Wang W., Tu Y., Eschenbacher W.H. et al. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts // Circ Res. 2010;106(1):166–75.
17. Meder B., Katus H.A., Rottbauer W. Right into the heart of microRNA-133a // Genes Dev. 2008;22(23):3227–31.
18. Murry C.E., Michael A., Laflamme M.A. Heart Regeneration // Nature. 2011;473(7347):326–35.
19. Sultana N., Zhang L., Yan J., Chen J. et al. Resident C-Kit(+) cells in the heart are not cardiac stem cells // Nat Commun. 2015;6:8701.
20. Simpson D.L., Mishra R., Sharma S., Goh S.K. et al. A strong regenerative ability of cardiac stem cells derived from neonatal hearts // Circulation. 2012;126(11):46–53.
21. Singh A., Singh A., Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010–2015) // Stem Cell Res Ther. 2016;7(1):82. doi: 10.1186/s13287-016-0341-0.
22. Tang J., Shen D., Caranasos T.G., Wang Z. et al. Therapeutic microparticles functionalized with biomimetic cardiac stem cell membranes and secretome // Nat Commun. 2017; 8:13724.
23. Tang X.L., Rokosh G., Sanganalmath S.K., Yuan F. et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction // Circulation. 2010;121(2):293–305.
24. Tzahor E., Poss K.D. Cardiac regeneration strategies: Staying young at heart // Science. 2017;356(6342):1035–9.
25. Wang H., Chen H., Feng B., Wang X. et al. Isolation and characterization of a Sca-1+/CD31- progenitor cell lineage derived from mouse heart tissue // BMC Biotechnol. 2014;14:75.
26. Xu J., Lian W., Li L., Huang Z. Generation of induced cardiac progenitor cells via somatic reprogramming // Oncotarget. 2017;8(17):29442–57.

27. Xue T., Cho H.C., Akar F.G., Tsang S.Y. et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: Insights into the development of cell based pacemakers // *Circulation*. 2005; 111:11–20.
28. Yellamilli A., van Berlo J.H. Cardiac Side Population Cells in Cardiac Regeneration // *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:102.

## ENDOGENOUS AND EXOGENOUS SOURCES OF CARDIAC REPAIR IN MAMMALS

*T.V. Lipina, A.V. Komova, S.Y. Sosnovskaya, N.V. Kosheleva*

The present article attempts to systematize the data on cardiac regeneration under normal and pathological conditions obtained in the past decade. The key features of cardiac stem cells have been reviewed and the prospects of myocardium regeneration have been analyzed.

*Key words:* stem cells, regeneration, myocardium, cardiomyocytes, cell therapy

### Информация об авторах

Липина Татьяна Владимировна – кандидат биологических наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Телефон 8 916 920 26 49. E-mail: tlipina@mail.ru

Комова Анастасия Валерьевна – бакалавр кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Телефон 8 909 967 87 24. E-mail: komova1305@yandex.ru

Сосновская София Юрьевна – бакалавр кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Телефон 8 985 633 53 88. E-mail: sosnovskaya.sofiya.2014@post.bio.msu.ru

Коселева Настасья Владимировна – кандидат биологических наук, доцент кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник НИИ общей патологии и патофизиологии, старший научный сотрудник Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования.

Адрес: 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8. Телефон 8 985 240 72 43. E-mail n\_kosheleva@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 8 мая 2018 года*

# МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРУШЕНИЯ РЕПАРАЦИИ МИОМЕТРИЯ ПОСЛЕ КЕСАРЕВА СЕЧЕНИЯ

*К.А. Рогов, Н.Б. Тихонова, М.Н. Болтовская, А.П. Милованов*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Обзор современных клинических и экспериментальных данных о причинах нарушения формирования рубца миометрия после кесарева сечения. Показаны индивидуальные причины нарушения репаративных процессов. Среди них выявлена роль медиаторов, цитокинов и полиморфизм некоторых генов рецепторов, определяющих стимуляцию или угнетение пролиферации паренхиматозных и мезенхимальных клеток, синтеза элементов экстрацеллюлярного матрикса. В нарушении репарации помимо причин, связанных с послеоперационной ишемией миометрия и воспалением, имеют значение фенотипические особенности и иммунный статус беременной женщины. Эти факторы могут оказать существенное влияние на созревание, формирование и ремодуляцию рубца миометрия.

*Ключевые слова:* кесарево сечение, рубец миометрия, нарушения репарации, гистология, иммуногистохимия, молекулярная биология

Неуклонный рост частоты операции кесарева сечения (КС) в мире сопровождается увеличением числа беременных с рубцом на матке. Каждое третье КС является повторным [1, 33]. Частота КС в России в среднем составляет 27%, а в перинатальных центрах достигает 30–40% [4]. Наличие рубца в миометрии повышает вероятность осложнений беременности и родов вплоть до разрыва матки, что требует особого внимания акушеров при предродовой подготовке и ведении родов [17]. Выбор тактики родоразрешения во многом определяется состоянием маточного рубца – степенью зрелости и качеством заживления.

На заживление миометрия оказывает влияние множество факторов, в том числе экстрагенитальные и гинекологические заболевания, течение беременности, техника выполнения операции КС, включая методы рассечения и ушивания раны, характеристики шовного материала, течение послеоперационного периода [15, 22]. Полноценность послеоперационного рубца и степень его зрелости во многом определяются сроками наступления повторной беременности, внутриматочными вмешательствами, фенотипом и генотипическими особенностями соединительной ткани. В акушерской практике определены методы операции КС, создающие оптимальные условия регенерации миометрия: поперечный разрез в нижнем маточном сегменте, использование викрила в качестве шовного материала. Обсуждаются методы ушивания послеоперационной раны, обеспечивающие надежный гемостаз и анатомическую репозицию структуры миометрия [8].

Тем не менее хирургическая техника не единственный элемент, определяющий быстроту и качество заживления раны матки. Нарушение процессов созревания и ремоделирования рубцов, механизмы дезорганизации соединительной ткани могут быть связаны с иммунопатологическими процессами, влиянием ишемии или нарушением гормональной регуляции.

## **Клинические исследования состояния рубца**

Важнейший фактор в определении тактики предродовой подготовки и ведения родов после перенесенного КС – оценка состоятельности рубца на матке. Из неинвазивных методов оценки наиболее информативна ультразвуковая диагностика, доступная на разных этапах последующей беременности. Комбинация абдоминального и вагинального сонографического исследования дает возможность оценить толщину и протяженность рубца, выраженность фиброза и степень васкуляризации. Именно эти характеристики позволяют акушерам учесть вероятный риск разрыва матки и определить сроки и тактику ведения родов. Угроза разрыва матки резко возрастает при истончении рубца. Многие исследователи считают критическими его толщину менее 2,5–3 мм, наличие фиброза и высокую васкуляризацию. Вместе с тем ультразвуковые исследования не всегда достаточны для оценки качества рубца и прогнозирования его прочностных свойств [11, 25].

Наиболее ценная информация о состоянии рубца, характеризующая его полноценность и степень зрелости, может быть получена при морфологических исследованиях иссеченных рубцов после планового

или экстренного КС, а также маток, удаленных при их разрыве. В настоящее время установлен ряд характеристик маточных рубцов, на основании которых рубцы разделяют на полноценные и неполноценные.

Полное восстановление структуры миометрия после КС встречается у женщин крайне редко. При рестиитуции сочетаются процессы восстановления гладких мышц и разрастания соединительной ткани. Даже при максимально эффективной рестиитуции миометрия формируется фиброзно-мышечный рубец [12, 20, 21].

Сформировавшийся рубец принято считать полноценным, если его область либо не визуализируется, либо имеет вид сероватой фиброзно-мышечной ткани толщиной не менее 3–5 мм. При гистологическом исследовании такие рубцы представлены гипертрофированными гладкомышечными клетками, занимающими около 90% площади рубца, с очагами фиброза в виде узких прослоек зрелой соединительной ткани между пучками гладкомышечных клеток, а также вокруг кровеносных сосудов. Прослойки соединительной ткани содержат небольшое количество зрелых сосудов, некоторые из них могут быть с утолщенными стенками (рис. 1 А). В зрелом рубце не должны выявляться полиморфноядерные лейкоциты и макрофаги, лимфоцитарная инфильтрация минимальная. Пограничная зона миометрия может характеризоваться дистрофическими изменениями и мелкоочаговыми свежими кровоизлияниями (даже после планового проведения операции).

Неполноценным считается рубец на матке, представленный узкой полоской белесовато-серой фиброзной ткани толщиной менее 3 мм. Иногда истонченная стенка матки в области рубца имеет толщину 1,5–2 мм и меньше, порой с пролабированием плодного пузыря. При гистологическом исследовании выявляют поля фиброзной ткани с участками гиалиноза, прослойками волокнистой и рыхлой соединительной ткани. Среди фиброзной ткани в рубце и прилежащем миометрии отмечают разобщенные пучки гладкомышечных клеток в состоянии атрофии или дистрофии (рис. 1 Б, В, Г). В незрелом рубце могут быть обнаружены отек и выраженная воспалительная инфильтрация, которая распространяется на прилежащий миометрий, обилие мелких сосудов с пролиферацией эндотелия. Повышенная объемная плотность микрососудов отмечена на груборубцовых участках [2, 4, 8].

О сроках созревания рубца миометрия и его ремодуляции нет единого мнения. Большинство акушеров полагают, что полноценный зрелый рубец миометрия может сформироваться через 2–2,5 года после КС, выполненного поперечным разрезом в нижнем маточном сегменте. К этому времени исчезают воспалительные изменения и наступает окончательная ремодуляция рубца [5, 19]. По данным С. Wu et al. [38], полное созревание и стабилизация рубца происходят после 3 лет. К этому времени в зоне рубца исчезают отек интерстиция и лейкоцитарная инфильтрация, лимфоциты немногочисленны, выявляются зрелые сосуды, гипер-

трофия гладкомышечных клеток достигает максимальных значений [38].

Акушерами выработаны критерии, при которых самостоятельные роды считаются безопасными. Риск разрыва матки в родах остается наиболее высоким, если толщина рубца меньше критической – 2,5 мм [23, 35, 36]. Разрывы матки при наличии рубцов чаще возникают при экстренном, чем при плановом КС, особенно в условиях стимуляции родовой деятельности. Одной из причин угрозы разрыва матки при наличии рубцов миометрия А. Malvasi et al. [30] считают уменьшение нервных волокон, пониженное количество нейротензина, нейропептида Y (NPY) и продукта гена протеина (PGP)9.5 в пузырно-маточном пространстве при повторных экстренных КС у женщин с рубцами на матке. Авторы предполагают связь выявленных изменений с послеоперационной денервацией этой зоны.

Вагинальные роды при наличии рубца на матке могут сопровождаться осложнениями. На участках, пограничных с рубцом, дистрофические изменения миометрия выражены по сравнению как с отдаленными участками, так и с самой рубцовой тканью. На пограничных участках и происходит отрыв гладкомышечной ткани от рубца, а не расслоение или разрыв рубцовой ткани [7]. В этих условиях Е. Grossetti et al. [24] считают опасной стимуляцию родов, особенно при использовании простагландинов. Вместе с тем К. Ofir et al. [31], сравнивая факторы риска и локализацию разрывов матки, показали, что при осложненных родах последние происходят в нижнем маточном сегменте с одинаковой частотой у рожениц как с полноценным рубцом после КС, так и без такового.

### Механизмы регенерации миометрия

Процесс регенерации миометрия – это сложный каскад биохимических событий и клеточных взаимодействий, участниками которых являются иммунные клетки, фибробласты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки и их клеточ-предшественники, а также компоненты экстрацеллюлярного матрикса. В регуляции процессов заживления ран миометрия после КС важную роль играют факторы роста и медиаторы воспаления. Чрезмерная или сниженная экспрессия факторов роста, вовлеченных в процесс репарации, может представлять специфические особенности пациентки, повышающие риск нарушений рубцевания матки после КС [19, 23, 34]. Имеющиеся клинические и экспериментальные данные о различиях формирования рубцов миометрия после КС позволяют считать процессы рубцевания гетерогенными, определяемыми в значительной мере генетически детерминированным фенотипом. А.Е. Доросевич и соавт. [2] при морфологическом исследовании миометрия нижнего маточного сегмента при абдоминальном родоразрешении у первобеременных женщин обнаружили в каждом пятом наблюдении выраженные дистрофические изменения гипертрофированных миоцитов, рыхлую соединительную ткань

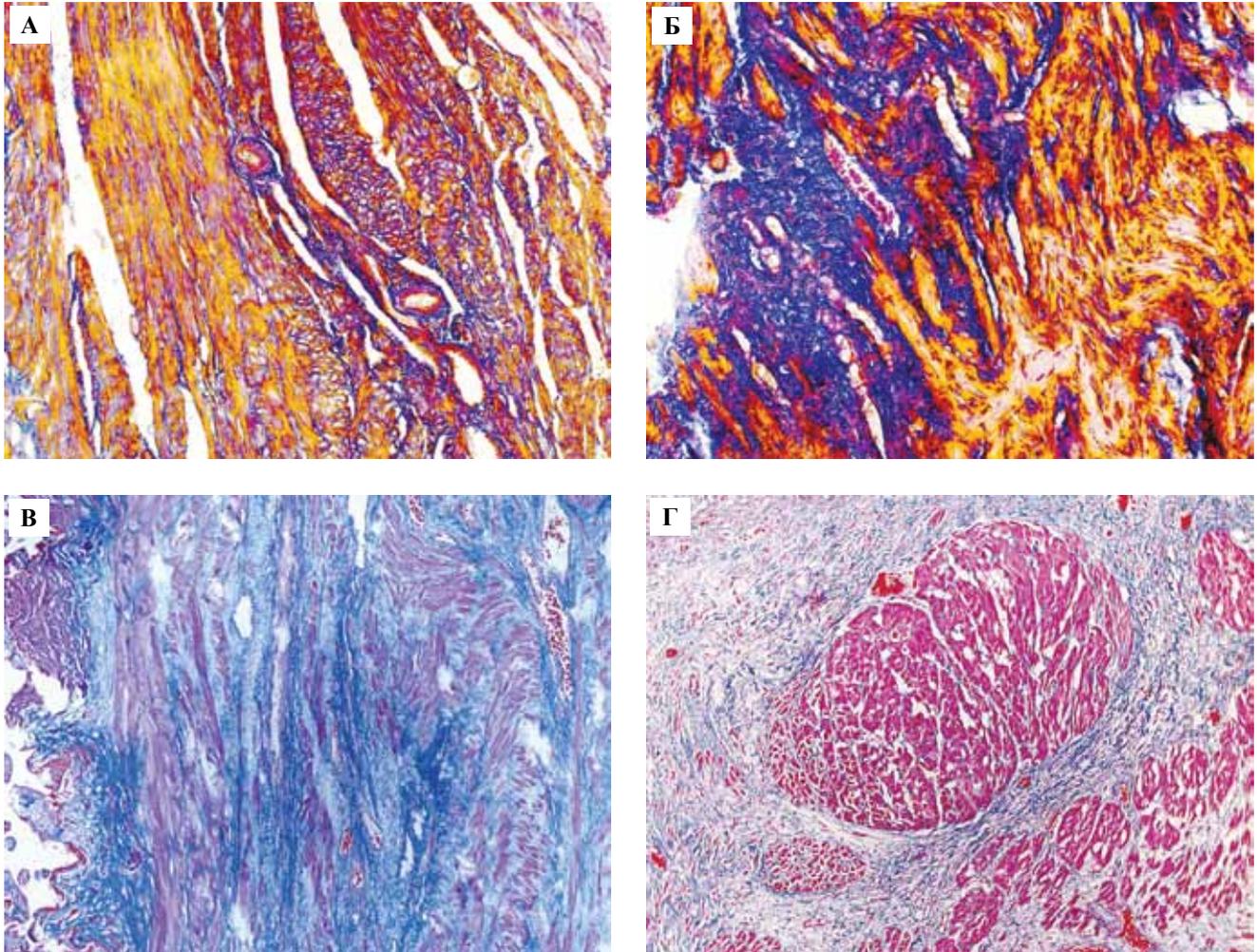


Рис. 1. Различные формы рубца на матке после кесарева сечения (окраска азокармином по Маллори).

А – полноценный рубец с небольшими голубоватыми вкраплениями соединительной ткани в межмышечных прослойках и вокруг сосудов,  $\times 100$

Б – неполноценный рубец, внедрение соединительной ткани в пучки миоцитов,  $\times 100$

В – неполноценный рубец, фиброзная ткань с атрофией миоцитов,  $\times 65$

Г – неполноценный рубец, изоляция мышечного пучка рыхлой соединительной тканью,  $\times 65$

между пучками миоцитов. У этих пациенток не наблюдалась экспрессия ламинина, проявлялась умеренная и интенсивная диффузная экспрессия коллагена IV типа, в гладкомышечных клетках отмечалась сниженная неравномерная экспрессия десмина. Обнаруженные десмопластические изменения в строении миометрия позволили авторам предположить возможное формирование соединительнотканного рубца с выраженными процессами склероза и гиалиноза. Изучая механизмы репарации в формирующемся рубце нижнего маточного сегмента, D.D. Lofrumento et al. [29] исследовали цитокины, которые участвуют в механизмах заживления, и показали, что повышение соотношения изоформ  $\beta 1/\beta 3$  трансформирующего фактора роста уменьшает рубцевание и фиброз. Измененная экспрессия фактора роста соединительной ткани может быть связана с аномальным формированием рубца матки. Снижение или отсутствие экспрессии основного фактора роста

фибробластов сопровождается снижением выработки и отложения коллагена. На полноценность регенерации гладкомышечных клеток миометрия влияет снижение экспрессии фактора некроза опухоли, фактора роста сосудистого эндотелия и тромбоцитарного фактора роста. При разрывах матки F. Pollio et al. [32] отметили высокое содержание коллагена, уменьшение трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , снижение фактора роста соединительной ткани, увеличение основного фактора роста фибробластов и незначительное повышение фактора некроза опухоли, факторов роста сосудистого эндотелия и роста тромбоцитов. Полученные данные позволили авторам предположить, что разрывы матки могут быть связаны с влиянием изменений экспрессии цитокинов и факторов роста на процессы рубцевания.

Фибриллярные коллагены, в основном коллаген I типа, составляют основную часть соединительной ткани и имеют большое значение в процессе зажив-

ления ран. Накопление коллагена зависит не только от уровня синтеза, но и от уменьшения его деградации. Формирование и ремоделирование соединительной ткани происходят при активном участии матриксных металлопротеиназ (ММП). В группу ММП-1 входят интерстициальные коллагеназы, расщепляющие коллаген I, III и IV типа (возможно, влияющие на их соотношение). Регуляция активности коллагеназ и проколлагеназ (их активация и ингибирование) – тоже важный фактор репаративной регенерации миомерия. Повышенная экспрессия ММП-9 и несбалансированность ее экспрессии с показателями тканевого ингибитора металлопротеиназы TIMP-1 указывают на нарушение регенерации миомерия при формировании маточного рубца после КС [27].

Нарушения формирования рубца миомерия после КС с развитием его несостоятельности могут быть обусловлены индивидуальными особенностями женщин, проявляющимися дефектами синтеза, катаболизма и в конечном счете ремодуляцией соединительной ткани. В значительной мере подобные дефекты определяются различными проявлениями дисплазии соединительной ткани приобретенного или генетически детерминированного характера, способными нарушать репаративные процессы в миомерии [3, 9].

При дифференцированной дисплазии соединительной ткани, включающий синдромы Элерса–Данлоса, Марфана, несовершенного остеогенеза, выявлены мутации генов, кодирующих синтез и пространственную организацию белков экстрацеллюлярного матрикса – коллагена, фибрина, эластина. После проведенного КС у пациенток с синдромами Элерса–Данлоса, Марфана наблюдали замедленную репарацию раны с образованием неполноценного атрофического рубца [16]. У пациенток, страдающих несовершенным остеогенезом, рубцами миомерия после КС, осложненных разрывом матки при последующей беременности, отмечено снижение количества общего коллагена в миомерии, повышение экспрессии тромбоцитарного фактора роста и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в гладкомышечных клетках [28]. Весьма обширную группу представляют пациентки с клиническими проявлениями синдрома недифференцированной дисплазии соединительной ткани, частота выявления которого колеблется в пределах 26–80% в популяции [3]. При исследовании рубцов матки при плановом повторном КС у пациенток с недифференцированной дисплазией соединительной ткани обнаружен полиморфизм генов рецепторов эстрогена (ER $\alpha$  и ER $\beta$ ), ММП-9, ламинина, VEGF. При иммуногистохимических исследованиях отмеченные изменения сочетались с дисбалансом продукции коллагена I и III типа (повышение количества коллагена III типа), уменьшением экспрессии ER $\alpha$ , коллагена IV типа, ламинина, фибулина-5, матриксного белка LOXL-1, участвующего в поперечной сшивке полипептидных цепей коллагена, VEGF, ионного каналаобразующего белка в гладкомышечных клетках,

тканевых ингибиторов металлопротеиназ (TIMP-1 и TIMP-2) и повышением экспрессии ММП-9 [1, 4, 13, 26, 39].

Описанные особенности репарации миомерия приводят к развитию ишемии и дезорганизации соединительной ткани, а в итоге к неполноценности рубца. Рубцовая ткань матки при недифференцированных формах дисплазии соединительной ткани характеризовалась мукоидными и фибриноидными изменениями вплоть до некроза, нарушением продукции эластина, фрагментации его волокон и снижением уровня ангиогенеза. Среди рубцовой ткани с истончением рубца были обнаружены лейкоцитарная инфильтрация и гематомы, обтурирующие микротромбы и сладжи сосудов микроциркуляторного русла с набуханием эндотелия [1].

Таким образом, имеющиеся клинические данные о различиях формирования рубцов миомерия после КС позволяют считать процессы рубцевания гетерогенными, определяемыми в значительной мере генетически детерминированным фенотипом.

### Экспериментальные исследования созревания рубца матки

Ограниченные возможности морфологического изучения формирования рубцов миомерия у человека – существенное препятствие к пониманию тонких механизмов и динамики репаративных процессов, поэтому важно исследование этих процессов на экспериментальных моделях. Моделирование рубцевания миомерия после КС и оценку его прочностных свойств проводили на разных лабораторных животных.

Установлено, что рубец матки у крыс состоит из плотной соединительной ткани, нередко с признаками гиалиноза, и содержит множество сосудов. Выделяют два типа рубца – тонкий, в котором соединительнотканые элементы чередуются с миоцитами, и толстый, представляющий хаотично расположенные коллагеновые волокна с атрофией миоцитов. Рубцы матки у рожавших и нерожавших самок имеют одинаковую структуру, но есть ряд отличий в зоне миомерия, прилегающих к ткани рубца. Так, в пограничных зонах рубца у рожавших животных чаще обнаруживаются признаки крововизлияний, повышенная инфильтрация лейкоцитами и макрофагами и кисты разного размера [7].

Чрезвычайно важные, на наш взгляд, результаты получили C.S. Buhimschi et al. [19]. В экспериментах была исследована динамика формирования рубцов матки после КС у мышей двух линий с различным потенциалом репаративной регенерации – очень высоким (MRL) и меньшим (C57B1/6). Гистологическое и ИГХ исследование показали, что на 3-и сутки после КС формирование рубца у самок MRL характеризуется меньшим объемом грануляционной ткани, выраженным воспалительным процессом, более высокой митотической активностью миомерия. На 5-е сутки у самок обеих линий делящиеся клетки обнаруживали около раневой зоны между пучками гладкомышечных

волокон, начиная с 15-го дня выявляли пролиферацию гладкомышечных клеток, указывающую на миогенную дифференцировку. У самок MRL наблюдали ускоренное созревание коллагена, гистоархитектоника миометрия полностью восстанавливалась на 60-е сутки, тогда как у самок C57B1/6 хирургические швы все еще были видны у трех из пяти животных.

На экспериментальных моделях разрабатываются подходы к улучшению репарации миометрия после КС. Так, новосибирские исследователи при лигировании рогов матки вводили в формирующийся рубец миометрия мезенхимальные стволовые клетки костного мозга. Авторы отметили повышение прочностных свойств (растяжимости) маточных рубцов и четкую тенденцию к ускорению репаративных процессов в матке крыс при рубцовом ее изменении по сравнению с животными, у которых клеточные технологии не применяли. Отмеченные изменения происходили за счет возрастания числа новообразованных сосудов в рубце [6, 10]. В работе А.Н. Стрижакова и соавт. [14] показаны снижение воспалительной реакции и избыточного развития соединительной ткани, активация неоангиогенеза, макрофагальной активности и местного иммунитета в тканях матки при использовании фибринового криопреципитата у кроликов. При стимуляции репаративной регенерации у крыс подкожным введением рекомбинантного гормона роста человека было показано, что через 30 и 40 дней после операции КС и на 19-е сутки повторной беременности у самок, получавших гормон роста, рубцы после КС были толще, менее клеточными и более прочными, чем у самок контрольной группы. По мнению авторов, этот эффект обусловлен усилением продукции коллагена, высокое содержание которого сохраняется на протяжении следующей беременности [18].

J. Wang et al. [37] обнаружили у крыс на фоне энтерального введения пептидов коллагена к 21-му дню после операции КС большую прочность рубца матки и усиление васкуляризации в миометрии в зоне рубца по сравнению с контролем.

## Заключение

Репаративная регенерация миометрия после кесарева сечения включает восстановление гладких мышц и разрастание соединительной ткани, причем при полноценной регенерации доля соединительной ткани не превышает 10–15%. Зрелый стабильный рубец миометрия у женщин формируется через 2,5–3 года после операции. Формирование рубца миометрия – сложный процесс, включающий воспаление, образование и ремодуляцию тканей, в котором участвуют иммунные, гладкомышечные, эндотелиальные и стромальные клетки, экстрацеллюлярный матрикс, цитокины, факторы роста, металлопротеиназы и другие биологически активные соединения. Нарушения репарации миометрия с формированием неполноценного рубца при исключении послеоперационного ишемического фактора и местной инфекции могут быть обусловлены рядом

причин, таких как мутации генов, иммунный статус и гормональный фон, влияющие на межклеточные взаимодействия. В связи с актуальностью проблемы несостоятельности рубца матки в настоящее время все большее значение приобретают экспериментальные исследования, направленные на выявление клеточных и молекулярно-биологических механизмов нарушений репаративной регенерации миометрия после кесарева сечения и разработку подходов к оптимизации формирования рубца.

## Литература/References

1. Демура Т.А., Коган Е.А., Донников А.Е., Кан Н.Е., Кесова М.И., Мартынов А.И., Болотова О.В., Сухих Г.Т. Клинико-морфологическая и молекулярно-генетическая характеристика миометрия при несостоятельности рубца матки после кесарева сечения у женщин с признаками недифференцированной формы дисплазии соединительной ткани // Архив патологии. 2012. Т. 74, № 3. С. 18–21. [Demura T.A., Kogan E.A., Donnikov A.E., Kan N.E., Kesova M.I., Martynov A.I., Bolotova O.V., Sukhikh G.T. Clinico-morphological and molecular-genetic characteristic of the miometrium with failure of the uterine scar after the cesarean section at women with undifferentiated forms of connective tissue dysplasia // Arkhiv pathology. 2012. V. 74, No 3. P. 18–21. (In Russ.)].
2. Доросевич А.Е., Густоварова Т.А., Иванян А.Н., Бехтерева И.А. Морфологические и иммуногистохимические особенности состояния рубца на матке после кесарева сечения // Российский вестник акушера-гинеколога. 2007. Т. 7, № 4. С. 7–13. [Dorosevich A.E., Gustovarova T.A., Ivanyan A.N., Bekhtereva I.A. Morphological and immunohistochemical features of the state of an uterine scar after cesarean section // Rossiyskiy vestnik acushera- ginecologa // 2007. V. 7, No 4. P. 18–21 (In Russ.)].
3. Кадурин Т.И., Горбунова В.Н. Дисплазия соединительной ткани. СПб.: Невский диалект, 2009. 701 с. [Kadurina T.I., Gorbunova V.N. Displaziya of connective tissue. SPb.: Nevskiy dialekt, 2009. 701 p. (In Russ.)].
4. Кан Н.Е., Тютюник В.Л., Ломова Н.А., Донников А.Е., Долгушина Н.В. Роль молекулярно-генетических факторов в формировании рубца матки после кесарева сечения // Доктор.Ру. 2017. Т. 132, № 3. С. 16–19. [Kan N.Ye., Tyutyunnik V.L., Lomova N.A., Donnikov A.Ye., Dolgushina N.V. The role of molecular Genetic factors in the development of uterine scar after cesarean section // Doctor.Ru. 2017. V. 132, No 3. P. 16–19. (In Russ.)].
5. Краснополяский В.И., Логутова Л.С., Буянова С.Н. Несостоятельный рубец на матке после кесарева сечения: причины формирования и лечебная тактика // Акушерство и гинекология. 2013. № 12. С. 28–33. [Krasnopolskiy V.I., Logutova L.S., Buyanova S.N. Nesostoyatelnyy rubets na matke posle kesareva cecheniya: prichiny formirovaniya i lechbnaya taktika // Akusherstvo i ginecologiya. 2013. V. 12. P. 28–33. (In Russ.)].
6. Майбородин И.В., Якимова Н.В., Матвеева В.А., Пекарев О.Г., Майбородина Е.И., Пекарева Е.О., Ткачук О.К. Морфологический анализ результатов введения аутологичных стволовых стромальных клеток костномозгового происхождения в рубец матки крыс // Морфология. 2010.

- Т. 138, № 6. С. 47–55. [Maiborodin I.V., Yakimova N.V., Matveyeva V.A., Pekarev O.G., Maiborodina Ye.I., Pecareva Ye.O., Tkachiuk O.K. Morphological stem cells into the uterine scar in rats // Morphology. 2010. V. 6., No 138. P. 47–55. (In Russ.)].
7. Майбородин И.В., Пекарев О.Г., Якимова Н.В., Пекарева Е.О., Майбородина В.И., Перминова Е.И. Особенности строения матки после родов у крыс с рубцом миометрия // Морфология. 2015. Т. 147, № 2. С. 49–53. [Maiborodin I.V., Pekarev O.G., Yakimova N.V., Pekareva Ye.O., Maiborodina V.I., Perminova Ye.I. The peculiarities of uterine structure after delivery in rats with the myometrial scar // Morphology. 2015. V. 2, No 147. P. 49–53. (In Russ.)].
  8. Михалева Л.М., Галина Т.В., Маркарян Н.М., Люшина И.В., Комлева Р.А. Клинико-морфологические особенности рубцов на матке после операции кесарева сечения по методикам Гусакова и Штарка // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. № 2. С. 4–10. [Mikhaleva L.M., Galina T.V., Marcaryan N.M., Lyushina I.V., Komleva R.A. Clinical and morphological aspects of uterine scar after cesarean section by Gusakov's and Stark's techniques // Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya. 2016. V. 2. P. 4–10 (In Russ.)].
  9. Нечаева Г.И., Викторова И.А., Друк И.Н. Дисплазия соединительной ткани: распространенность, фенотипические признаки, ассоциации с другими заболеваниями // Врач. 2006. № 1. С. 19–23. [Nechaeva G.I., Viktorova I.A., Druk I.N. Displaziya soedinitel'noy tkani: rasprostranennost' fenotipicheskie priznaki, assotsiatsii s drugimi zabolevaniyami // Vrach. 2006. V. 1. P. 19–23. (In Russ.)].
  10. Пекарев О.Г., Майбородин И.В., Поздняков И.М., Пекарева Е.О., Аникеев А.А. Экспериментальное обоснование применения клеточных технологий в коррекции рубца миометрия // Акушерство и гинекология. 2016. № 8. С. 79–85 [Pekarev J.G., Maiborodin I.V., Pozdnyakov I.M., Onoprienko N.V., Pekareva Ye.O., Anikeev A.A. Eksperimental'noe obosnovanie primeneniya kletochnykh tekhnologii v korrektsii rubtsa miometriya // Akusherstvo i ginekologiya. 2016. V. 8. P. 79–85. (In Russ.)].
  11. Приходько А.М., Баев О.Р., Луньков С.С., Еремина О.В., Гус А.И. Возможности методов оценки состояния стенки матки после операции кесарева сечения // Акушерство и гинекология. 2013. № 10. С. 12–16. [Prikhod'ko A.M., Baev O.R., Lun'kov S.C., Eremina O.V., Gus A.I. Vozmozhnosti metodov otsenki sostoyaniya stenki matki posle operatsii kesareva secheniya // Akusherstvo i ginekologiya. 2013. V. 10. P. 12–16. In Russ.)].
  12. Ретина М.М. О казуистике разрывов матки при беременности после операции кесарева сечения // Акушерство и гинекология. 1955. № 6. С. 61–62. [Repina M.M. O kazuistike razryvov matki pri beremennosti posle operatsii kesareva secheniya // Akusherstvo i ginekologiya. 1955. V. 6. P. 61–62. (In Russ.)].
  13. Сухих Г.Т., Донников А.Е., Кесова М.И., Кан Н.Е., Козан Е.А., Демуря Т.А., Климанцев И.В., Амирасланов Э.Ю., Санникова М.В., Ломова Н.А., Сергунина О.А., Абрамов Д.Д., Кадочникова В.В., Трофимов Д.Ю. Взаимосвязь полиморфизма генов цитокинов с состоянием рубца матки после кесарева сечения // Акушерство и гинекология. 2012. № 4–2. С. 16–20. [Sukhikh G.T., Donnikov A.E., Kesova M.I., Kan N.E., Kogan E.A., Demura T.A., Klimantsev I.V., Amiraslanov E.Yu., Sannikova M.V., Lomova N.A., Sergunina O.A., Abramov D.D., Kadochnikova V.V., Trofimov D.Yu. Vzaimosvyaz' polimorfizma genov Tsitokinov s sostoyaniem rubtsa matki posle kesareva srcheniya // Akusherstvo i ginekologiya. 2012. V. 4–2. P. 16–20. (In Russ.)].
  14. Стрижаков А.Н., Пауков В.С., Чурганова А.А., Соломахина М.А., Кириллов Ю.А., Герасимов А.Н., Буданов П.В., Рыбин М.В. Новый метод повышения качества рубца на матке после кесарева сечения // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2013. Т. 12, № 1. С. 9–15. [Strizhakov A.N., Paukov V.S., Churganova A.A., Solomakhina M.A., Kirillov Yu.A., Gerasimov A.N., Budanov P.V., Rybin M.V. A new method of enhancing the quality of a uterine scar after caesarean section // Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii. 2013. V. 12, No 1. P. 9–15. (In Russ.)].
  15. Щукина Н.А., Благина Е.И., Баринова И.В. Причины формирования и методы профилактики несостоятельного рубца на матке после кесарева сечения // Альманах клинической медицины. 2015. № 37. С. 85–92. [Shchukina N.A., Blagina U.I., Barinova I.V. Prichiny formirovaniya i metody profilaktiki nesostoyatel'nogo rubtsa na matke posle kesareva secheniya // Al'manakh klinicheskoi meditsiny. 2015. V. 37. P. 85–92. (In Russ.)].
  16. Юдаева Л.С., Макацария А.Д. Ведение беременности и родов у больных с мезенхимальными дисплазиями (синдромами Марфана, Элерса–Данло, Рендю–Вебера–Ослера) // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2008. Т. 7. № 1. С. 16–20 [Yudaeva L.S., Makatsaria A.D. Pregnancy and delivery in patients with congenital diseases of the connective tissue (Marfan's, Ehlers–Danlo's, Rendu–Weber–Osler's syndromes) // Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii. 2008. V. 7. No 1. P. 16–20. (In Russ.)].
  17. Betran A.P., Ye J., Moller A.B., Zhang J. et al. The increasing trend in caesarean section rates: global, regional and national estimates: 1990–2014 // PLoS ONE Plos one. 2016;Feb;11(2):e0148343. doi: 10.1371/journal.pone.0148343. eCollection 2016.
  18. Bowers D., McKenzie D., Dutta D., Wheelless C.R. et al. Growth hormone treatment after cesarean delivery in rats increases the strength of the uterine scar // Am J Obstet Gynecol. 2001. Sep;185(3):614–17.
  19. Buhimschi C.S., Zhao G., Sora N., Madri J.A. et al. Myometrial wound healing post-cesarean delivery in the MRL/MpJ mouse model of uterine scarring // Am J Pathol. 2010; Jul;177(1):197–207.
  20. Cass D.L., Adzick N.S. Fetal wound repair renaissance // Oral Maxillofacial Surg Clin. 1996;8:535–46.
  21. Darby I.A., Hewitson T.D. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis // Int Rev Citol. 2007;257:143–79.
  22. Dosedla E., Calda P. Can the final sonographic assessment of the cesarean section scar be predicted 6 weeks after the operation // Taiwan J Obstet Gynecol. 2016;55(5):718–20.
  23. Gantwerker E.A., Hom D.B. Skin: histology and physiology of wound healing // Clin Plast Surg. 2012;39(1):85–97.
  24. Grossrti E., Vardon D., Creveuil C., Herlicoviez M. et al. Rupture of the scarred uterus // Acta Obstet Gynecol Scand. 2007;86(5):572–8.

25. *Indraccolo U., Scutiero G., Matteo M., Masticci A.L. et al.* Correlations between sonographically measured and actual incision site thickness of lower uterine segment after repeated caesarean section // *Minerva Ginecol.* 2015;Jun:667(3):225–29.
26. *Johansson M., Arlestig L., Moller B., Smedby T. et al.* Oestrogen receptor (alpha) gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus // *Am Rheum Dis.* 2005;64(11):1611–17.
27. *Li Q., Guo S., Liu D., Feng S. et al.* Correlation of the expressions of MMPs-9, TIMP-1, TIMP-2 with caesarean section scar // *Nan Fang Yi Ke Xue Xue Bao.* 2012;Sep:32(9):1336–40.
28. *Di Lieto A., Pollio F., De Falco V., Mascolo M. et al.* Collagen content and growth factor immunoreexpression in uterine lower segment of type IA osteogenesis imperfecta: Relationship with recurrent uterine rupture in pregnancy // *Am J Obstet Gynecol.* 2003;Aug:189(2):594–600.
29. *Lofrumento D.D., Di Nardo M.A., De Falco M., Di Lieto A.* Uterine Wound Healing: A complex process mediated by proteins and peptides // *Curr Protein Pept Sci.* 2016; 8(2):125–8.
30. *Malvasi A., Cavalotti C., Gustapane S., Giacci F. et al.* Neurotransmitters and neuropeptides expression in the uterine scar after caesarean section // *Curr protein pept sci.* 2016;18(2):175–80.
31. *Ofir K., Sheiner E., Levy A., Katz M., Mazor M.* Uterine rupture: differences between a scarred and an unscarred uterus // *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(2):425–29.
32. *Pollio F., Staibano S., Mascolo M., Salvatore G. et al.* Uterine dehiscence in term pregnant patients with one previous caesarean delivery: growth factor immunoreexpression and collagen connect in the scarred lower uterine segment // *Am J Obstet Gynecol.* 2006;Feb:6194(2):527–34.
33. *Smith D., Stinger E., Vladutiu C.J., Zink A.N., Strauss R.* Risk of uterine rupture among women attempting vaginal birth after caesarean with an unknown uterine scar // *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(1):80.e1–5.
34. *Shibuya M.* VEGF-VEGFR signal in health and disease // *Biomol Ther (Seul).* 2014;22(1):1–9.
35. *Tzankova V., Nicolov A., Pirnareva E.* Uterine scar after caesarean section – predicting the risk of uterine rupture and decision on the way of delivery // *Akush Ginecol (Sofia).* 2014;53(4):29–32.
36. *Uharček P., Breštansky A., Ravinger J., Manova A. et al.* Sonographic assessment of lower uterine segment thickness at term in women with previous caesarean delivery // *Arch Ginecol Obstet.* 2015;292(3):609–12.
37. *Wang J., Xu M., Zhao M., Zhang Z. et al.* Oral administration of marine collagen peptides from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) improves wound healing following caesarean section in rats // *Food Nutr Res.* 2015;May:13;59:264–11.
38. *Wu C., Chen X., Mei Z., Zhou J. et al.* A preliminary study of uterine scar tissue following caesarean section // *Perinat Med.* 2017. doi: 10.1515/jpm-20160347.
39. *Yellon S.M., Burns A.E., See J.L. et al.* Progesterone withdrawal promotes remodeling processes in the nonpregnant mouse cervix // *Biol Reprod.* 2009;81(1):1–7.

## MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THE DISTURBANCES OF THE REPAIR MYOMETRIAL AFTER CESAREAN SECTION

*K.A. Rogov, N.B. Tikhonova, M.N. Boltovskaya, A.P. Milovanov*

Current clinical and experimental data on the causes of impaired scar formation in myometrium after caesarean section are reviewed. The individual causes of abnormalities in tissue repair are shown. Among them, the role of mediators, cytokines and polymorphism of some gene receptors is revealed determining the stimulation or inhibition of proliferation of parenchymal and mesenchymal cells and the synthesis of the extracellular matrix. In addition to the causes associated with postoperative myocardial ischemia and inflammation, phenotype and immune status of pregnant women is of importance in abnormal reparation. These factors can have a significant effect on maturation, formation and remodeling of myometrial scars. *Key words:* caesarean section, scar myometry, violation of reparation, histology, immunohistochemistry, molecular biology

### Информация об авторах

Рогов Константин Аркадьевич – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 926 235 83 75. E-mail: karogov@mail.ru

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

Болтовская Марина Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией патологии репродукции НИИ морфологии человека

Адрес: Москва, 117418, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 128 87 01. E-mail: morfolhum@mail.ru

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

Адрес: 117418, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 129 55 01. E-mail: morfolhum@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 11 апреля 2018 года*

# МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА

*А.А. Веревкин<sup>1</sup>, А.А. Славинский<sup>1</sup>, Е.Д. Космачева<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар

<sup>2</sup>ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар

Рассмотрены основные морфологические признаки, характеризующие клеточное и гуморальное отторжение трансплантированного сердца, а также возможные гистологические изменения в эндомикардиальном биоптате, требующие дифференциальной диагностики с отторжением (ишемическое повреждение миокарда, рубцы вследствие биопсии, эффект Квилти, инфекционные поражения и посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания). Изложены современные представления о неинвазивной диагностике реакции отторжения. Несмотря на большое число исследований, проблема патогистологической диагностики отторжения по-прежнему остается актуальной. Требуют уточнений и расширения доказательной базы критерии антителоопосредованного и смешанного отторжения, а также эффективность неинвазивных методов, таких как ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография и молекулярно-генетическая диагностика.

*Ключевые слова:* отторжение трансплантированного сердца, эндомикардиальная биопсия, клеточное отторжение, антителоопосредованное отторжение, неинвазивная диагностика отторжения сердца

Заболевания сердечно-сосудистой системы выступают основной причиной инвалидизации и смерти в развитых странах. Закономерный исход большой доли таких заболеваний – хроническая сердечная недостаточность [6]. Единственным эффективным способом лечения пациентов с терминальными стадиями сердечной недостаточности в настоящее время служит трансплантация сердца (ТС) [4, 8]. Уже через год после первой успешной пересадки, осуществленной в 1967-м Кристианом Барнардом, по всему миру было выполнено около 100 подобных операций [10]. Ежегодно в мире делают свыше 5500 ТС, причем это число год от года увеличивается [1, 4].

К настоящему времени достигнут существенный прогресс в наблюдении и лечении пациентов с трансплантированным сердцем, позволивший обеспечить длительные сроки выживания после операции и высокие показатели качества жизни реципиентов [35]. При этом острое клеточное и гуморальное (антителоопосредованное) отторжение, болезнь коронарных артерий (васкулопатия) трансплантированного сердца по-прежнему служат главными причинами потери трансплантата на ранних и отдаленных сроках после операции, а диагностика указанных осложнений базируется на результатах инвазивных методов – эндомикардиальной биопсии (ЭМБ) и коронароангиографии. Прогнозирование и ранняя, доклиническая

диагностика осложнений у пациентов с трансплантированным сердцем на основе неинвазивных (малоинвазивных) технологий остаются предметом интенсивных исследований. Тем не менее для верификации отторжения трансплантированного сердца (ОТС) применяется именно эндомикардиальная биопсия – манипуляция, впервые осуществленная в 1958 году американскими хирургами Вайнбергом и Лайнфилдом [2, 36].

Многочисленные исследования последних лет направлены на разработку и совершенствование гистологических критериев клеточного и антителоопосредованного отторжения, дифференциальную диагностику патоморфологических находок, не связанных с реакцией отторжения (ишемическое повреждение миокарда, рубцы, эффект Квилти, инфекционные поражения и посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания). Кроме того, активно разрабатываются методы неинвазивной диагностики ОТС с использованием ультразвуковой, магнитно-резонансной томографии (МРТ) и молекулярной генетики.

## **Патогистологические признаки острого клеточного отторжения**

Клеточное отторжение трансплантата (acute cellular rejection, ACR) – наиболее частая и хорошо изученная форма иммунопатологического процесса. Впервые это состояние было описано еще в 1967 году у одного из

первых пациентов, подвергшихся пересадке сердца [10]. В эндокардиальных биоптатах пациентов с клеточным отторжением трансплантата присутствуют воспалительный инфильтрат и повреждение кардиомиоцитов. Инфильтрат состоит преимущественно из лимфоцитов, а также макрофагов и единичных эозинофилов [16]. Наличие нейтрофилов (за исключением самой тяжелой формы отторжения) свидетельствует о другом процессе, не связанном с клеточным отторжением, таком как заживающее ишемическое повреждение, антителоопосредованное (гуморальное) отторжение или инфекция. Плазматические клетки также обычно нехарактерны для клеточного отторжения и говорят об эффекте Квилти или лимфолиферативном процессе [23].

Важным, но подчас трудно поддающимся идентификации признаком клеточного отторжения служит повреждение кардиомиоцитов, изначально названное их некрозом. Гибель клеток может свидетельствовать о наиболее выраженном клеточном отторжении; нелетальное повреждение кардиомиоцитов при более мягком отторжении часто характеризуется миоцитоллизом без развития некроза сократительного пучка [11]. Особенности клеточной смерти включают просветление саркоплазмы и ядер с расширением последних и появлением в них заметных ядрышек. Поврежденный кардиомиоцит зачастую окружается воспалительными клетками (прежде всего лимфоцитами), что визуально определяется как клетка с зубчатыми краями. Эффективнее всего эти изменения выявляются при исследовании серийных срезов. Следует также отметить, что миоцитоллиз можно наблюдать как при раннем, так и при позднем ишемическом поражении [15]. В зависимости от того, насколько выражены описанные изменения, выделяют четыре степени тяжести клеточного отторжения [30].

*Степень 0R* (признаки острого клеточного отторжения отсутствуют). Ни мононуклеарный (лимфоцитарно-макрофагальный) инфильтрат, ни повреждение кардиомиоцитов при этой степени тяжести в миокарде выявить не удается.

*Степень 1R* (слабое клеточное отторжение). Эта форма может проявлять себя двумя способами: 1) в интерстиции и периваскулярном пространстве расположены отдельные мононуклеары (лимфоциты, макрофаги); они не деформируют контур кардиомиоцитов, не вызывают их повреждение и в целом не нарушают структуру миокарда и 2) имеется один очаг лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации и ассоциированное с ним повреждение кардиомиоцитов.

*Степень 2R* (умеренно выраженное клеточное отторжение). В миокарде присутствуют два очага и более мононуклеарной инфильтрации и связанного с ними повреждения кардиомиоцитов. Нередко при таком отторжении в срезе обнаруживаются и нейтрофилы. Фокусы могут локализоваться как в одном, так и в разных фрагментах биопсии, а между ними находится неповрежденный миокард.

*Степень 3R* (тяжелое клеточное отторжение). Воспалительный процесс приобретает диффузный характер, инфильтрат может быть либо мононуклеарным, либо нейтрофильным. В процесс всегда вовлечено большинство фрагментов биопсии, хотя интенсивность поражения в них может быть разной. Очаги повреждения кардиомиоцитов сливаются друг с другом. В случае наиболее тяжелой реакции отторжения к описанным патологическим процессам присоединяются диффузный отек, кровоизлияния в строму и васкулит [3, 30].

## Патоморфология

### антителоопосредованного отторжения

Значительные успехи в развитии иммуносупрессивной терапии привели к снижению частоты острого клеточного отторжения, поэтому внимание исследователей было сосредоточено на явлении, названном гуморальным, или антителоопосредованным отторжением (antibody-mediated rejection, AMR). В качестве самостоятельного вида отторжения оно было признано только при пересмотре критериев диагностики Международного общества трансплантации сердца и легких в 2005 году [28].

Основными гистологическими признаками AMR считаются отек интерстиция, активация эндотелиальных клеток, а также наличие интраваскулярных макрофагов и депозитов иммуноглобулинов (прежде всего IgG) и компонентов комплемента (C3d, C4d, C1) в стенке сосуда и в периваскулярном пространстве [12]. Наряду с патоморфологическими изменениями для данного процесса характерно появление донор-специфических антител в плазме крови, выявляемых серологическими методами [29]. На сегодняшний день принята следующая классификация антителоопосредованного отторжения [14]:

- rAMR 0: как патоморфологические, так и иммунологические признаки отторжения отсутствуют;
- rAMR 1 (H+): имеются только патогистологические изменения, в то время как титр антител к донорским антигенам не повышен;
- rAMR 1 (I+): в данном случае, наоборот, гистологические признаки повреждения миокарда выявить не удается, а вот результат иммунологических исследований оказывается положительным (в крови определяется повышенный титр иммуноглобулинов к кардиоспецифическим антигенам донора);
- rAMR 2: для этой степени характерно уже наличие как иммунологических, так и гистологических признаков реакции отторжения;
- rAMR 3: тяжелое антителоопосредованное отторжение, оно характеризуется интерстициальными кровоизлияниями, деструктивным капилляритом, наличием смешанноклеточного инфильтрата, кардиопикнозом и кардиорексисом кардиомиоцитов и выраженным отеком. Показана взаимосвязь между третьей степенью тяжести AMR и глубокой

дисфункцией трансплантата с плохим прогнозом для пациента [26].

### Смешанное клеточногуморальное отторжение

Само по себе наличие смешанного отторжения не вызывает удивления, с учетом того, что иммунный ответ зачастую реализуется с участием одновременно клеточного и гуморального звена. Многочисленные исследования выявляли в эндомикардиальных биоптатах сочетание признаков слабого клеточного отторжения (1R) и AMR. Более высокие степени ACR (2R и 3R) и гуморальное отторжение, встречающиеся в одном биоптате, – явление гораздо более редкое [33]. Вопрос диагностики смешанного отторжения изучен не до конца. Основная причина заключается в том, что большинство исследователей, занимающихся изучением AMR, рассматривают наличие у пациента клеточного отторжения в качестве критерия исключения [24]. Еще одним немаловажным фактором служит то, что более выраженное ACR может скрыть признаки гуморального процесса. Согласно рекомендациям Международного общества трансплантации сердца и легких (ISHLT), для диагностики смешанного процесса следует последовательно определять в биоптате явления клеточного и гуморального отторжения, причем в первом случае не рекомендуется прибегать к иммуногистохимическим методам, ограничившись лишь рутинным исследованием [14].

### Гистологические находки, не связанные с реакцией отторжения

*Раннее (интраоперационное) ишемическое повреждение* возникает непосредственно до и во время операции и приходится на так называемое время облигатной ишемии. В этот период осуществляется сперва изъятие, а затем имплантация донорского органа. Усугубляют этот процесс гипотензия, связанная с дисфункцией донорского органа, кровопотеря в ходе операции и продолжительная терапия инотропными средствами [17]. Ишемическое повреждение сопровождается прежде всего некрозом сократительного пучка или коагуляционным некрозом кардиомиоцитов, зачастую с их вакуолизацией. Также нередко в процесс вовлекается эндокард [30, 34].

По мере заживления биопсии могут содержать смешанноклеточный воспалительный инфильтрат, состоящий из нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов и эозинофилов, и именно в этот момент может возникнуть путаница с острым отторжением. Выявляется данное повреждение чаще всего в ранних плановых биопсиях (в первые шесть недель после операции). Основным отличием от реакции отторжения служит взаимосвязь между степенью повреждения кардиомиоцитов и выраженностью инфильтрации. В случае отторжения массивный инфильтрат соседствует со значительным повреждением кардиомиоцитов, тогда как в очагах ишемического повреждения связь обратная. Если же

клеточный компонент при ишемическом повреждении представлен нейтрофилами, это создает определенные трудности в дифференциальной диагностике с антителопосредованным отторжением [13].

*Позднее ишемическое повреждение (вследствие болезни коронарных артерий).* Оценить изменения в коронарных артериях в ходе эндомикардиальной биопсии не представляется возможным, поскольку в область биопсии никогда не попадают артерии, достаточно крупные для такой оценки [38]. И все-таки описываемые вторичные изменения кардиомиоцитов, такие как микроинфаркты или вакуолярная дистрофия, помогают установить причину поздней сердечной недостаточности. Кроме того, способность распознавать позднее ишемическое повреждение необходима для дифференциальной диагностики с другими потенциально излечимыми состояниями, такими как клеточное отторжение и посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания [15, 28, 37].

*Эффект Квилти.* Узловые эндокардиальные лимфоцитарные инфильтраты, или эффект Квилти, встречаются примерно в 10–20% эндомикардиальных биоптатов после трансплантации. Свое название эффект получил по фамилии пациента (Quilty), у которого впервые был обнаружен. В классификации Международного общества трансплантации сердца и легких 1990 года (ISHLT, 1990) различали подтипы Quilty A (в том случае, если инфильтрат был ограничен эндокардом) и Quilty B (если инфильтрат распространяется на подлежащий миокард и наблюдается ассоциированное повреждение кардиомиоцитов) [31]. Тем не менее деление указанного эффекта на подтипы не имело клинического значения, поэтому в новой классификации ISHLT от них решено было отказаться.

Взаимосвязь эффекта Квилти и острого клеточного отторжения, если таковая вообще существует, по-прежнему неизвестна [18]. Традиционно считается, что обнаружение в биоптате названного эффекта не требует усиления иммуносупрессивной терапии. Дифференциальная диагностика эффекта Квилти и острого клеточного отторжения не вызывает затруднений в том случае, если последний ограничен лишь эндокардом [21].

### Неинвазивные методы диагностики ОТС

Несмотря на то, диагностика отторжения базируется на эндомикардиальной биопсии, тенденция последних лет состоит в поиске неинвазивных методов, позволяющих верифицировать это состояние. Причинами служат, с одной стороны, риск развития серьезных осложнений (перфорация стенки желудка, тромбоэмболия легочной артерии, аритмии) при проведении ЭМБ, а с другой – тот факт, что в зону биопсии не всегда попадает пораженный участок миокарда [2]. На сегодняшний день перспективными представляются использование методов ультразвуковой и лучевой диагностики, серологических исследований крови, а также молекулярно-генетический анализ.

Ультразвуковая диагностика реакции отторжения основана в первую очередь на оценке так называемой функциональной геометрии левого желудочка. Так, по данным ряда авторов, при эхокардиографии пациентов с ОТС выявляются уменьшение сферичности левого желудочка [27], а также асинхронизм сокращения отдельных участков (по-видимому, охваченных наиболее выраженным воспалительным процессом) и неоднородные показатели региональной фракции выброса [7]. Методика двухмерного отслеживания пятен (ДОП, или *Speckle tracking echocardiography*), позволяющая визуализировать деформацию отдельных волокон миокарда, дает возможность диагностировать болезнь коронарных артерий пересаженного сердца. Также при этом методе существенное снижение пикового продольного стрейна свидетельствует о нарушении эластических свойств миокарда, что указывает на развитие клеточного или гуморального отторжения сердечного трансплантата [5].

Лучевые методы исследования используются для диагностики отторжения трансплантированного сердца и носят вспомогательный характер. Компьютерная томография с контрастированием на основе гадолиния рассматривается многими учеными как перспективный диагностический инструмент [25]. Связано это с возможностью солей гадолиния накапливаться на участках необратимого повреждения миокарда, таких, как некроз или фиброз. Еще одно перспективное направление – использование в качестве контраста вещества, которое называется перфлюорокарбон (15-фтор-краун-эфир), сложного гетероциклического органического соединения, способного избирательно депонироваться в иммунокомпетентных клетках, прежде всего моноцитах. Сравнение результатов МРТ при контрастировании перфлюорокарбоном с данными эндомикардиальной биопсии говорит о высокой точности описанного неинвазивного метода [19].

В диагностике ОТС применяются и серологические методы. В некоторых исследованиях продемонстрирована взаимосвязь между иммунопатологическими реакциями в миокарде и сывороточным уровнем разных биомаркеров, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), рецептора фактора некроза опухолей (CD40) и ряда других. Концентрация указанных веществ в плазме крови измеряется, как правило, с помощью проточных флуоресцентных анализаторов [32]. Тем не менее существенным недостатком данной методики служит низкая специфичность получаемых результатов (уровень биомаркеров может повышаться и при других иммунопатологических процессах, не связанных с реакцией отторжения) [9]. В связи с этим основным направлением исследований серологических признаков ОТС можно назвать выработку профиля биомаркеров, однозначно говорящих о процессе в миокарде.

Ряд исследований показывает эффективность в распознавании ОТС методики молекулярно-генетической

диагностики. В настоящее время установлено свыше 20 генов, повышение экспрессии которых связано с развитием реакции отторжения [22]. Материалом для исследования в данном случае служит лейкоцитарная взвесь, получаемая из периферической крови реципиента. Определение экспрессии генов осуществляется с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Несомненное преимущество данного метода – его безопасность (процедура получения биоматериала неинвазивна и поэтому исключает риск развития тяжелых осложнений). Кроме того, указанный метод позволяет прогнозировать развитие отторжения задолго до формирования гистологических изменений в миокарде и тем более развернутой клинической картины [20].

### Заключение

Несмотря на большое число исследований, посвященных морфологической диагностике отторжения трансплантированного сердца, существует ряд вопросов, требующих дальнейшего изучения. Так, остается открытым вопрос о составе панели антител для иммуногистохимической верификации клеточного отторжения. Значительный успех достигнут в диагностике антителоопосредованного процесса, однако необходимы дальнейшие исследования, направленные на уточнение и улучшение воспроизводимости его критериев, а также выявление ранних признаков данного вида отторжения. Более детальному изучению стоит также подвергнуть случаи смешанной клеточного-гуморальной реакции, диагностика которой в настоящее время представляет определенные трудности. И наконец, нужно уделить внимание дифференциации отторжения трансплантированного сердца и различных процессов, не связанных с отторжением, таких как эффект Квилти, а также раннее и позднее ишемическое повреждение. Хотя эндомикардиальная биопсия и остается золотым стандартом диагностики отторжения, безусловно перспективные неинвазивные методы, основанные на применении ультразвука, серологических проб, МРТ и молекулярно-генетического исследования, могут применяться в качестве дополнительных методов верификации.

### Литература/References

1. *Барбухатти А.О., Космачева Е.Д., Кижватова Н.В. и др.* Первый опыт трансплантации сердца в Краснодарском крае // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2014. Т. 14, № 3. С. 42–47. [*Barbukhatti K.O., Kosmacheva E.D., Kizhvatoва N.V. et al.* First experience with heart transplantation in Krasnodar region // *Vestnik transplanologii i iskustvennykh organov.* 2014. V. 14, No 3. P. 42–47 (In Russ., English abstract)].
2. *Васичкина Е.С., Митрофанова Л.Б., Татарский Р.Б., Лебедев Д.С.* Эндомикардиальная биопсия у взрослых и детей // Вестник аритмологии. 2014. № 76. С. 37–40. [*Vasichkina E.S., Mitrofanova L.B., Tatarsky R.B., Lebedev D.S.* Endocardial biopsy in adults and pediatric patients // *Vestnik aritmologii.* 2014. V. 76. P. 37–40 (In Russ., English abstract)].

3. *Веревкин А.А., Славинский А.А., Космачева Е.Д., Ставечук Т.В.* Патоморфологические признаки повреждения миокарда при отторжении трансплантированного сердца // Кубанский научный медицинский вестник. 2017. Т. 24, № 6. С. 27–31. [*Verevkin A.A., Slavinskiy A.A., Kosmacheva E.D., Stavenchuk T.V.* Morphologic signs of myocardium lesion in transplanted heart rejection // *Kubanskiy nauchnyy medicinskiy vestnik*. 2017. V. 24. No 6. P. 27–31 (In Russ., English abstract)]. doi: 10.25207/1608-6228-2017-24-6-17-21.
4. *Готье С.В., Шевченко А.О., Кормер А.Я., Понцов В.Н., Шевченко О.П.* Перспективы улучшения отдаленных результатов трансплантации сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2014. Т. 16, № 3. С. 23–30. [*Gautier S.V., Shevchenko A.O., Kormer A.Ya., Poptsov V.N., Shevchenko O.P.* Prospects to improve long-term outcomes of cardiac transplantation // *Vestnik transplantologii i iskustvennykh organov*. 2014. V. 16, No 3. P. 23–30 (In Russ., English abstract)].
5. *Ставечук Т.В., Космачева Е.Д., Славинский А.А., Чуприненко Л.М., Шелестова И.А., Барбухатти К.О., Порханов В.А.* Роль методики speckle-tracking echocardiography на стадии субклинического отторжения сердечного трансплантата // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2015. Т. 17, № 4. С. 24–32. [*Stavenchuk T.V., Kosmacheva E.D., Slavinsky A.A., Chuprinenko L.M., Shelestova I.A., Barbuhaty K.O., Porkhanov V.A.* The role of speckle-tracking echocardiography technique at the stage of subclinical heart transplant rejection // *Vestnik transplantologii i iskustvennykh organov*. 2015. V. 17, No 4. P. 24–32 (In Russ., English abstract)]. doi: 10.15825/1995-1191-2015-4-24-32.
6. *Фролова Э.Б., Яушев М.Ф.* Современное представление о хронической сердечной недостаточности // Вестник современной клинической медицины. 2013. Т. 6, № 2. С. 87–92. [*Frolova E.B., Yaushev M.F.* Current understanding of chronic heart failure // *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny*. 2013. V. 6, No 2. P. 87–92 (In Russ., English abstract)].
7. *Чумарная Т.В., Алуева Ю.С., Кочмашева В.В., Климушева Н.Ф., Иофин А.И., Быков А.Н.* Функциональная геометрия левого желудочка у пациентов после ортотопической трансплантации сердца в раннем послеоперационном периоде // Трансплантология. 2016. № 2. С. 9–15. [*Chumarnaya T.V., Alueva Yu.S., Kochmasheva V.V., Klimusheva N.F., Iofin A.I., Bykov A.N.* Functional geometry of the left ventricle in patients after orthotopic heart transplantation in the early postoperative period // *Transplantologiya*. 2016. V. 2. P. 9–15 (In Russ., English abstract)].
8. *Шумаков В.И.* Достижения и перспективы развития трансплантологии и искусственных органов в России // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2005. № 3. С. 6–9. [*Shumakov V.I.* Current status and advances in the field of transplantology and artificial organs in Russia // *Vestnik transplantologii i iskustvennykh organov*. 2005. V. 3. P. 6–9 (In Russ.)].
9. *Aharinejad S., Krenn K., Zuckermann A., Schäfer R., Gmeiner M., Thomas A. et al.* Serum matrix metalloproteinase-1 and vascular endothelial growth factor- $\alpha$  predict cardiac allograft rejection // *Am J Transplant*. 2009;9(1):149–59. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02470.x.
10. *Barnard C.N.* Comments on the first human-to-human heart transplant. 1993 // *Cardiovasc J S Afr*. 2001;12(4):192–4.
11. *Baroldi G., Silver M.D., De Maria R., Parolini M., Turillazzi E., Fineschi V.* Frequency and extent of contraction band necrosis in orthotopically transplanted human hearts. A morphometric study // *Int J Cardiol*. 2003;88(2–3):267–78.
12. *Behr T.M., Feucht H.E., Richter K. et al.* Detection of humoral rejection in human cardiac allografts by assessing the capillary deposition of complement fragment C4d in endomyocardial biopsies // *J Heart Lung Transplant*. 1999;18(9):904–12.
13. *Berry G.J., Angelini A., Burke M.M. et al.* The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005–2011) // *J Heart Lung Transplant*. 2011;30:601–11.
14. *Berry G.J., Burke M.M., Anderson C. et al.* The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation // *J Heart Transplant*, 2013;(32)12:1147–61.
15. *Brunner-LaRocca H.P., Sutsch G., Schneider J.* Natural course of moderate cardiac allograft rejections (International Society of Heart and Lung Transplantation Grade 2) early and late after transplantation // *Circulation* 1996;94:1334–8.
16. *Cipullo R., Finger M.A., Neto J.M.R., Contreras C.M., Nádia Van Geen Poltronieri, de Moura Barros Zamorano M. et al.* Vasculitis and Eosinophils in Endomyocardial Biopsies as Rejection Predictors in Heart Transplantation // *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(2):163–70.
17. *Fyfe B., Loh E., Winters G.L. et al.* Heart transplantation-associated perioperative ischemic myocardial injury: morphological features and clinical significance // *Circulation*. 1996;93:1133–40.
18. *Hiemann N.E., Knosalla C., Wellnhofer E., Lehmkuhl H.B., Hetzer R., Meyer R.* Quilty in biopsy is associated with poor prognosis after heart transplantation // *Transpl Immunol*. 2008;19(3–4):209–14.
19. *Hitchens T.K., Ye Q., Eytan D.F., Janjic J.M., Ahrens E.T., Ho C.* 19F MRI detection of acute allograft rejection with in vivo perfluorocarbon labeling of immune cells // *Magn Reson Med*. 2011;65(4):1144–53. doi: 10.1002/mrm.22702.
20. *Hollander Z., Chen V., Sidhu K., Lin D., Ng R.T., Balshaw R.* Predicting acute cardiac rejection from donor heart and pre-transplant recipient blood gene expression // *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(2):259–65. doi: 10.1016/j.healun.2012.11.008.
21. *Joshi A., Masek M.A., Brown B.W.* Quilty revisited: a 10-year perspective // *Hum Pathol*. 1995;26:547–57.
22. *Knecht K.R., MacLeod S.L., Hobbs C.A., Li M., Morrow W.R.* Gene expression profiling in pediatric heart transplant rejection // *Int J Cardiol*. 2013;168(5):5052–3. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.07.211.
23. *Kumarasinghe G., Lavee O., Parker A., Nivison-Smith I., Miliken S., Dodds A.* Post-transplant lymphoproliferative disease in heart and lung transplantation: Defining risk and prognostic factors // *J Heart Lung Transplant*. 2015;34(11):1406–14.
24. *Loupy A., Cazes A., Guillemain R.* Very late heart transplant rejection is associated with microvascular injury, complement deposition and progression to cardiac allograft vasculopathy // *Am J Transplant*. 2011;11:1478–87.

25. Nowak J., Wasilewski J., Reichman-Warmusz E., Spinczyk B., Głowacki J., Miszański-Jamka K. The relationship between late gadolinium enhancement imaging and myocardial biopsy in the evaluation of chronic heart failure patients with suspected myocarditis // *Kardiochir Torakochirurgia Pol.* 2014;11(4):404–8. doi: 10.5114/kitp.2014.47340.
26. Patel J.K., Kobashigawa J.A. Improving survival during heart transplantation: diagnosis of antibody-mediated rejection and techniques for the prevention of graft injury // *Future Cardiol.* 2012;8:623–35.
27. Qin X.J., Li H., You J., Lv Q., Zhang J., Gao H.J. Left ventricle geometry remodeling after heart transplantation: a two-dimensional ultrasound study // *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2013;33(6):892–6. doi: 10.1007/s11596-013-1217-5.
28. Reed E.F., Demetris A.J., Hammond E. Acute antibody-mediated rejection of cardiac transplants // *J Heart Lung Transplant.* 2006;25:153–9.
29. Smith R.N., Broussard N., Grazette L. C4d deposition in cardiac allografts correlates with alloantibody // *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:1202–10.
30. Stewart S., Winters G. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection // *J Heart Lung Transplant.* 2005;24:1710–20.
31. Szymanska S., Grajkowska W., Sobieszczanska-Malek M., Zielinski T., Pyzlak M., Pronicki M. Prevalence of the Quilty effect in endomyocardial biopsy of patients after heart transplantation – from cellular rejection to antibody-mediated rejection? // *Pol J Pathol.* 2016;67(3):216–20. doi: 10.5114/pjp.2016.63772.
32. Taimeh Z., Loughran J., Birks E.J., Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure // *Nat Rev Cardiol.* 2013;10(9):519–30. doi: 10.1038/ncardio.2013.94.
33. Tavora F., Munivenkatappa R., Papadimitriou J. Endothelitis in cardiac allograft biopsy specimens: possible relationship to antibody-mediated rejection // *J Heart Lung Transplant.* 2011;30:435–44.
34. Taylor D.O., Yowell R.L., Houry A.G., Hammond E.H., Rendlund D.G. Allograft coronary artery disease: clinical correlations with circulating anti-HLA antibodies and the immunohistopathologic pattern of vascular rejection // *J Heart Lung Transplant.* 2000;19:518–21.
35. Urbanowicz T., Baszyńska-Wachowiak H., Ligowski M., Straburzyńska-Migaj E., Misterski M., Jemielity M. Comparison of conventional tacrolimus versus prolong release formula as initial therapy in heart transplantation // *Ann Transplant.* 2014;19:295–99. doi: http://dx.doi.org/10.20883/jms.2016.125
36. Weinberg M., Fell E.H., Lynfield J. Diagnostic biopsy of the pericardium and myocardium // *AMA Arch Surg.* 1958;76:825–9.
37. Winters G.L., Schoen F.J. Graft arteriosclerosis-induced myocardial pathology in heart transplant recipients: predictive value of endomyocardial biopsy // *J Heart Lung Transplant.* 1997;16:985–91.
38. Young J.B. Perspectives on cardiac allograft vasculopathy // *Curr Atheroscler Rep.* 2000;2:259–71.

## MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF THE TRANSPLANTED HEART REJECTION

*A.A. Verevkin, A.A. Slavinskiy, E.D. Kosmacheva*

The article deals with the main morphological features of cellular and antibody-mediated rejection of the transplanted heart as well as histological changes in endomyocardial biopsy requiring differential diagnosis with rejection (i.e. ischemic myocardial damage, post-biopsy scars, Quilty effect, infectious lesions and post-transplant lymphoproliferative diseases). Current view on the non-invasive rejection diagnostics is presented. Despite a large number of studies, the problem of pathohistological diagnosis of rejection is still actual. The criteria for antibody-mediated and mixed rejection as well as the effectiveness of non-invasive methods, such as ultrasound, magnetic resonance imaging and molecular genetic diagnostics, should be clarified, and the evidence base should be expanded.

**Key words:** transplanted heart rejection; endomyocardial biopsy; cellular rejection; antibody-mediated rejection; non-invasive heart rejection diagnostics

### Информация об авторах

Веревкин Александр Александрович – ассистент кафедры патологической анатомии Кубанского государственного медицинского университета.

Адрес: 350063 Краснодар, ул. Митрофана Седина, д. 4. Телефон 8 (964) 934 30 06. E-mail: vilehand@bk.ru

Славинский Александр Александрович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Кубанского государственного медицинского университета.

Адрес: 350063 Краснодар, ул. Митрофана Седина, д. 4. Телефон 8 (861) 252 87 81. E-mail: pathology.kgmu@mail.ru

Космачева Елена Дмитриевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой терапии № 1 факультета повышения квалификации и последипломной переподготовки специалистов Кубанского государственного медицинского университета, заместитель главного врача по медицинской части НИИ – Краевая клиническая больница № 1 имени профессора С.В. Очаповского.

Адрес: 350901 Краснодар, ул. 1 Мая, д. 167. Телефон 8 (861) 252 77 41. E-mail: kosmachova\_h@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 27 марта 2018 года*

# МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДОСТОВЕРНОГО КЛИНИКО-ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ЛЕТАЛЬНЫХ ИСХОДОВ

*О.В. Подобед, В.Л. Коваленко*

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск

Предпринята попытка унификации клинико-патологоанатомического анализа с целью повышения его достоверности путем применения единых методологических и технологических подходов. Ретроспективное изучение 500 летальных случаев выявило расхождения заключительного клинического и патологоанатомического диагнозов по основному заболеванию в 23,8% наблюдений. В то же время проведенный с позиций предотвратимой смертности анализ показал, что смерть 81,6% пациентов была предотвратима. Наряду с выявлением общепринятых дефектов оказания медицинской помощи эффективный клинико-патологоанатомический анализ должен включать коллегиальную оценку предотвратимости летального исхода с определением групп предотвратимых причин смерти (А, В и С), а также расчет индекса предотвратимости смерти как интегрального показателя качества медицинской помощи.

*Ключевые слова:* клинико-патологоанатомический анализ, летальный исход, методология, индекс предотвратимости летальных исходов

Основными задачами клинико-патологоанатомического анализа являются установление определенного диагноза болезни и причины смерти и оценка качества медицинской помощи (КМП) путем выявления дефектов диагностики и лечения и их причин. Танатологический анализ должен осуществляться в каждом случае летального исхода, поэтому к его проведению необходимо разработать единые подходы, которые следует использовать в работе как патологоанатомов, так и судебно-медицинских экспертов. Отмена вскрытия также не может исключать тщательного анализа причины летального исхода. Между тем проведение клинико-патологоанатомических параллелей и сопоставлений во врачебной практике в последние годы крайне затруднено в связи с изменением законодательной и нормативной базы, а также неоднозначностью определений понятий и трактовок сущности болезни и причины смерти, результатов оценки КМП в современной научной литературе [1]. Одной из причин этих явлений следует считать игнорирование при создании новых документов стандартизации методологических и методических подходов, разработанных советскими и российскими патологами.

С методологических позиций познание болезни и причины летального исхода должны базироваться на положениях общей патологии человека: 13 принципах и законах диалектического метода познания, включая законы перехода количества в качество и рекомбинант-

ных преобразований; учении о диагнозе в медицине и его логике, нозологии, семиотике, в том числе учении об общепатологических процессах [2, 6, 8, 9]. При этом прозектор осуществляет диагностический процесс, слагаемыми которого являются составление предположительного (возможного) диагноза, дифференциальная диагностика, формулирование окончательного диагноза [10]. Заключением его становится переход от абстрактно формального диагноза болезни к конкретному (диагнозу больного). Именно семиотический анализ симптомов заболевания позволяет патологоанатому объединять симптомы в синдромы, а на основании последних поставить предварительный патологоанатомический диагноз. В свою очередь, дифференциальный диагноз должен быть проведен им, исходя из ведущего синдрома, с применением перекрестного метода и поочередной дифференциацией всех синдромов для проверки достоверности и правильности результата. Оформление окончательного патологоанатомического диагноза требует, как правило, проведения дополнительных исследований и логического обоснования.

Наиболее полного раскрытия и рационализации врачебного мышления в ходе решения диагностической задачи (в процессе проведения клинико-патологоанатомического анализа) можно достичь лишь при использовании законов логики: тождества, противоречия, исключенного третьего и достаточного основания. Их применение имеет ведущее значение для обеспечения

достоверности мыслительного процесса. Однако по мере приобретения значительного практического опыта прозектор создает, развивает и накапливает профессиональную интуицию. Согласно классическому определению, интуиция (*ср.-век. лат. intuitio*, от *intueor* – пристально смотрю) – это постижение истины путем непосредственного ее усмотрения без обоснования с помощью доказательства; субъективная способность выходить за пределы опыта путем мысленного схватывания («озарения») или обобщения в образной форме непознанных связей, закономерностей [7].

На практике сложно представить себе диагностический либо аналитический процесс, основанный только на логике или только на интуиции. Опытный и квалифицированный врач пользуется логико-интуитивным методом, позволяющим ему проводить диагностику и клинко-анатомические сопоставления и параллели качественно, в короткий промежуток времени и с оптимальным для конкретного случая привлечением дополнительных материальных ресурсов.

В методическом плане анализ летального исхода вне зависимости от рода смерти, приемов верификации ее причины опирается на нозологический принцип формулировки диагноза и положения Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Безусловно, высокая частота би- и мультикаузального генезов смерти усложняет клинко-патологоанатомический анализ. Это предопределяет его проведение на основе принципов современного кондиционализма [3, 4].

Клинко-патологоанатомический (танатологический) анализ должен дать ответы на следующие вопросы:

- 1) каков генез летального исхода (моно-, би-, мультикаузальный)?
- 2) какая нозологическая форма (эквивалент нозологической формы) явилась первоначальной причиной смерти (основным заболеванием)?
- 3) какие нозологические формы (их эквиваленты) могут быть оценены как коморбидные заболевания?
- 4) какие патологические процессы (как правило, синдромы) послужили осложнениями основного заболевания с выделением ведущего смертельного осложнения и непосредственной причины смерти?
- 5) каков тип терминального состояния (механизма смерти), обусловившего наступление летального исхода?

б) какие дефекты оказания медицинской помощи (ДОМП) были допущены и каковы их причины и роль в наступлении летального исхода?

С технологических позиций при танатологическом анализе, на наш взгляд, целесообразно применять схему, предложенную И.В. Тимофеевым в 2014 году. При этом в связи с последующим утверждением Российским обществом патологов клинических рекомендаций «Правила формулировки патологоанатомического диагноза» потребовалась ее принципиальная доработка (рис.).

Кроме того, в ходе клинко-патологоанатомического (танатологического) анализа должно быть проведено сличение заключительного клинического и патологоанатомического диагнозов, выявлены ДОМП и их причины, а также осуществлена оценка предотвратимости или непредотвратимости летального исхода.

Первоначальное суждение о диагнозе и причине смерти, ДОМП и КМП высказывается патологоанатомом и выносится подкомиссией врачебной комиссии по изучению летальных исходов (ПИЛИ), лечебно-контрольной комиссией (ЛКК) и (или) клинко-патологоанатомической конференцией (КПАК) на основе коллегиального клинко-патологоанатомического анализа при проведении первичного патологоанатомического исследования (первичная экспертиза). Постановка точного (определенного) патологоанатомического диагноза и достоверное выявление ДОМП могут потребовать проведения повторного патологоанатомического исследования по инициативе любого потребителя патологоанатомических услуг (пациента, его родственника или законного представителя; лечащего врача, врачебной комиссии (консилиума); патологоанатома, осуществлявшего первичное патологоанатомическое исследование; руководителя (его заместителя) медицинской организации или территориального органа управления здравоохранением). В такой ситуации проводится повторная патологоанатомическая экспертиза.

На основании изложенных выше принципов нами проведен ретроспективный и проспективный клинко-патологоанатомический анализ в 500 случаях ненасильственной смерти взрослых по материалам Челябинского областного патологоанатомического бюро и клиники Южно-Уральского государственного медицинского университета за 2014–2015 годы. Сре-



Рис. Принципиальная модифицированная схема клинко-патологоанатомического (танатологического) анализа при любом варианте летального исхода

ди умерших были 284 мужчины и 216 женщин, средний возраст которых составил  $56 \pm 7,4$  и  $59,4 \pm 7,5$  года, соответственно. Танатологический анализ позволил установить, что генез болезни и смерти чаще всего являлся би- и мультикаузальным (288 случаев – 57,6%). С целью анализа ведущих ДОМП нами определялся показатель расхождения заключительного клинического и патологоанатомического диагнозов по основному заболеванию с учетом всех нераспознанных коморбидных болезней. Учитывались также расхождения диагнозов по ведущему смертельному осложнению при совпадении их по основному заболеванию с установлением категорий и причин. Расхождения диагнозов по основному заболеванию выставлены в 119 случаях (23,8%). В 92 наблюдениях (18,4%) они отнесены к категории II, в 16 (3,2%) – к категории III, еще в 11 случаях (2,2%) – к категории I. Среди причин, приведших к ошибочной диагностике, преобладали субъективные (91 случай – 18,2%). Расхождения диагнозов по ведущему смертельному осложнению зарегистрированы в 28 наблюдениях (5,6%), при этом также преобладали расхождения категории II (18 случаев – 3,6%), допущенные по субъективным причинам. К категории III были отнесены лишь пять из них (1%). Другие дефекты диагностики, преимущественно поздняя госпитализация, запоздалая диагностика основного заболевания или смертельного осложнения, отмечены в 24 случаях (4,8%).

Кроме того, нами проведены клиничко-патологоанатомические сопоставления с использованием основных положений учения о предотвратимой смертности. Использовалась градация предотвратимых причин смерти в зависимости от субъекта управления этими причинами: группа А – возможность реализации профилактических мероприятий только силами системы здравоохранения, группа В – возможность реализации профилактических мероприятий силами системы здравоохранения с привлечением других ведомств и общественных организаций, группа С – возможность реализации профилактических мероприятий силами системы здравоохранения при условии изменения государственной политики в области охраны здоровья [5]. Результатом анализа явилось отнесение 90 случаев (18%) к предотвратимой смерти группы А, по 159 случаев (31,8%) – к группам В и С, а 92 наблюдений (18,4%) – к предотвратимой смерти. Таким образом, индекс предотвратимости летальных исходов, предложенный нами в 2014 году [1], составил 81,6%.

Патологоанатомическая реэкспертиза выявила также дефекты в весьма значительном количестве аутопсий (64%). Число их на одну аутопсию варьировало от одного до трех. Наиболее частыми были превышение сроков оформления протоколов патологоанатомического вскрытия (26%), серьезные логические ошибки, повлекшие за собой пересмотр патологоанатомического диагноза (20%), дефекты сличения заключительного клинического и патологоанатомического диагнозов

по основному заболеванию или ведущему смертельному осложнению (16%). Кроме того, достаточно распространенными оказались дефекты заполнения медицинского свидетельства о смерти (12%), использование нестандартной терминологии и групповых понятий (10%).

### Заключение

Эффективность реализации стратегических направлений деятельности государственных структур, органов местного самоуправления, общественных профессиональных сообществ по улучшению здоровья населения отражена в указах президента и распоряжениях правительства за последние пять лет. Она базируется на учете прежде всего динамики показателей ожидаемой продолжительности жизни, коэффициента общей смертности, а также оценке качества оказания медицинской помощи. В связи с этим особое значение приобретает изучение причин смертности и летальности на основе унифицированных подходов к их оценке для решения поставленных задач в сфере охраны здоровья населения. Это возможно лишь при четком соблюдении принципов современного кондиционализма и рекомендаций Международной классификации болезней 10-го пересмотра. Полагаем, что в этом плане в практической деятельности врачей разных специальностей может быть применена схема танатологического анализа, представленная в нашей статье. Обращаем внимание на тот факт, что при клиничко-патологоанатомических сопоставлениях выявленные дефекты оказания медицинской помощи следует оценивать с позиций учения о предотвратимой смертности.

Наш опыт показал также необходимость и эффективность повторного танатологического анализа, который может служить методом контроля качества не только клинической, но и патологоанатомической диагностики.

### Литература/References

1. Коваленко В.Л., Пальцев М.А., Аничков Н.М., Подобед О.В., Маслов Р.С. Законодательные и нормативные основы регулирования порядка проведения патологоанатомических вскрытий трупов. Оценка (экспертиза) качества медицинской помощи на основе клиничко-патологоанатомических параллелей и сопоставлений: Учебное пособие. Челябинск: Изд-во ЮУГМУ, 2014. 99 с. [Kovalenko V.L., Paltsev M.A., Anichkov N.M., Podobed O.V., Maslov R.S. Legislative and regulatory framework for regulating the procedure for post mortem autopsy. Assessment (examination) of the quality of medical care on the basis of clinical and pathological parallels and comparisons: Textbook. Chelyabinsk: Izd-vo YuUGMU, 2014. 99 s. (In Russ.).]
2. Лушников Е.Ф. Методы и методология патологической анатомии // Архив патологии. 2016. № 5. С. 50–55. [Lushnikov E.F. Methods and methodology of pathological anatomy // Arkhiv patologii. 2016. V. 5. P. 50–55. (In Russ.).]

3. *Медведев Ю.А.* Кондиционализм и формулировка причин смерти // Архив патологии. 2005. № 2 С. 60–64. [*Medvedev Yu.A.* Conditionalism and the formulation of the causes of death // *Arkhiv patologii*. 2005. V. 2. P. 60–64. (In Russ.)].
4. *Медведев Ю.А., Тимофеев И.В.* Танатологический анализ для врачебной практики: Учебное пособие. СПб.: ГПАБ, 2015. 107 с. [*Medvedev Yu.A., Timofeev I.V.* Thanatological analysis for medical practice: Textbook. SPb.: GPAB, 2015. 107 s. (In Russ.)].
5. *Михайлова Ю.В.* Предотвратимая смертность в России и пути ее снижения. М.: ЦНИИОИЗ, 2006. 308 с. [*Mikhailova Yu.V.* Preventable mortality in Russia and ways to reduce it. M.: TsNIOIZ, 2006. 308 s. (In Russ.)].
6. *Петленко В.И., Струков А.И., Хмельницкий О.К.* Детерминизм и теории причинности в патологии. М.: Медицина, 1978. 260 с. [*Petlenko V.I., Strukov A.I., Khmelnitsky O.K.* Determinism and theories of causality in pathology. M.: Meditsina, 1978. 260 s. (In Russ.)].
7. Прохоров А.М., ред. Большой энциклопедический словарь. 2-е изд. М.–СПб.: Большая российская энциклопедия; Норинт, 2000. 1434 с. [*Prokhorov A.M.*, ed. Great encyclopedic dictionary. 2nd ed. M.–SPb.: Bol'shaya russijskaya ehnciklopediya; Norint, 2000. 1434 s. (In Russ.)].
8. *Саркисов Д.С.* Очерки истории общей патологии. М.: Медицина, 1993. 509 с. [*Sarkisov D.S.* Essays on the history of general pathology. M.: Meditsina, 1993. 509 s. (In Russ.)].
9. *Серов В.В.* Общепатологические подходы к познанию болезни. М.: Медицина, 1999. 302 с. [*Serov V.V.* General pathological approaches to cognition of the disease. M.: Meditsina, 1999. 302 s. (In Russ.)].
10. *Тарасов К.Е., Великов В.К., Фролова А.И.* Логика и семиотика диагноза. М.: Медицина, 1989. 272 с. [*Tarasov K.Ye., Velikov V.K., Frolova A.I.* Logic and semiotics of diagnosis. M.: Meditsina, 1982. 272 s. (In Russ.)].

## METHODOLOGICAL AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF A RELIABLE CLINICAL AND PATHOLOGICAL ANALYSIS OF LETAL OUTCOMES

*O. V. Podobed, V. L. Kovalenko*

An attempt has been made to unify clinical and pathological analysis with the purpose of increasing its reliability by applying uniform methodological and technological approaches. A retrospective study of 500 lethal cases revealed discrepancies in the final clinical and pathological diagnoses for the underlying disease in 23.8% of cases. At the same time, analysis from the perspective of preventable mortality showed that 81.6% of deaths were preventable. Along with the identification of conventional medical care defects, the effective clinical and pathological analysis should include a collegial assessment of the predictability of the lethal outcome with the definition of groups of preventable causes of death (A, B and C) and the calculation of the death prevention index as an integral measure of the quality of care.

*Key words:* clinical and pathological analysis, lethal outcome, methodology, death prevention index

### Информация об авторах

Подобед Ольга Вячеславовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии и судебной медицины Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64. Телефон 8 912 776 9279. E-mail: podobed.olga2013@yandex.ru

Коваленко Владимир Леонтьевич – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии и судебной медицины Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64. E-mail: 9028988974@mail.ru

*Материал поступил в редакцию 22 ноября 2017 года*

### ОТ РЕДАКЦИИ

**К статье О.В. Подобед и В.Л. Коваленко «Методологические и технологические аспекты достоверного клинко-анатомического анализа летальных исходов»**

Статья поднимает актуальные и злободневные вопросы клинко-анатомического анализа летальных исходов, которые остро востребованы клинической практикой, но по поводу которых, к сожалению, до настоящего времени не достигнут общий консенсус. Отсутствует полноценная нормативно-правовая база участия патологоанатомов в клинко-экспертной работе, особенно с учетом того, что, хотя врач-патологоанатом и не является экспертом, но должен констатировать совпадение или расхождения диагнозов. Давно критикуется объективность и целесообразность выделения категорий расхождения диагнозов, не нашла признания возможность оценки предотвратимости летального исхода, причем это является функцией не патологоанатома, а клинко-экспертной комиссии медицинской организации или соответствующего эксперта. Также дискусионны и некоторые другие положения авторов. Следует приветствовать, что они ставят на повестку дня обсуждение этих вопросов, но рекомендовать их к применению в повседневной работе преждевременно, пока они не будут урегулированы нормативными документами.

# УНИФИЦИРОВАННАЯ ФОРМУЛИРОВКА КЛИНИЧЕСКОГО И ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОГО (СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОГО) ДИАГНОЗОВ И ИХ СОПОСТАВЛЕНИЕ

*И.В. Дмитриев<sup>2</sup>, А.Е. Доросевич<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск

<sup>2</sup> ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии» Департамента Смоленской области по здравоохранению, Смоленск

Проведен анализ проблемы формулировки клинических и патологоанатомических диагнозов и их сопоставления. Отмечена нарастающая тенденция к все более сложному и неоднозначному оформлению клинического и патологоанатомического (судебно-медицинского) диагнозов. Предложено написание всех видов диагноза на основе терминов Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Унификация формулировки диагнозов значительно упростит введение клинических рекомендаций, аккредитацию специалистов, позволит производить машинную обработку медицинской документации, а процесс сопоставления диагнозов станет понятным врачам разных специальностей.

*Ключевые слова:* диагноз, формулировка, сопоставление, МКБ-10

Оказание качественной медицинской помощи в настоящее время выходит на первое место среди задач, решаемых здравоохранением. Для выявления и предупреждения дефектов оказания медицинской помощи существует ряд структур, в том числе система внутриведомственного контроля. Задача ее – тщательно, поэтапно анализировать причины возникновения дефектов оказания медицинской помощи и устранять саму возможность их появления в дальнейшем. Одним из элементов этой системы является сопоставление клинического и патологоанатомического диагнозов. Результаты сопоставления диагнозов обсуждаются на комиссиях по изучению летальных исходов и клинико-анатомических конференциях. В связи с этим существенную роль играют те особенности, которые возникают во время самого процесса сопоставления диагнозов. Собственно говоря, методики сличения диагнозов нет ни в одном приказе Минздрава России. Ранее сопоставляли только рубрику диагноза «основное заболевание», но в приказе Минздрава России от 06.06.2013 № 354н написано: «Для выявления расхождения заключительного клинического диагноза и патологоанатомического диагноза, а также дефектов оказания медицинской помощи производится сопоставление заключительного клинического диагноза и патологоанатомического диагноза в части установленных: основного заболевания, осложнений основного заболевания, сопутствующих заболеваний».

Это правильно. Ведь лечить надо больного, а не только его основное заболевание. Сопоставление диагнозов в случаях монокаузальной структуры диагноза провести относительно несложно, но как быть при полипатии у пожилых пациентов с массой сопутствующих заболеваний? А таких случаев подавляющее большинство. Таким образом, например, без указания диагноза «хронический поверхностный гастрит» (по Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) код К 29.3) даже в рубрике «сопутствующие заболевания» клиницист, в соответствии с буквой приказа, получит расхождение в 100% случаев, так как приказ не делает оговорку на наличие, формулировку конкретных нозологических форм, их число и степень выраженности, не говоря уж об осложнениях и сопутствующих заболеваниях. Казалось бы, в данной ситуации может помочь методическая литература. Существует много хороших методических рекомендаций и справочников по составлению и сопоставлению диагнозов [1]. Эти клинические рекомендации, хотя и не являются приказами Минздрава России, имеют определенную юридическую силу согласно ч. 2 ст. 64 и ч. 2 ст. 76 Федерального закона № 323-ФЗ от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Однако меньшая, чем у приказов, юридическая сила и многочисленность рекомендаций (кстати, очередные рекомендации не отменяют предыдущие) является не-

готивным моментом, так как клиницисты могут при сопоставлении диагнозов сослаться на другие рекомендации и будут правы. Если попросить нескольких квалифицированных патологоанатомов из разных отделений поставить патологоанатомический диагноз после некропии, например, в случае сахарного диабета у пожилого пациента, то можно с уверенностью ожидать нескольких вариантов его написания. И все они будут иметь право на существование, хотя и в этом процессе возможны варианты [5].

Предположим, что хирург «сконструировал» диагноз согласно всем требованиям, но написал он его в клинических терминах и по клиническим классификациям, и получается, что нужен утвержденный Минздравом России словарь синонимов для перевода клинических терминов в патологоанатомические или судебно-медицинские. А этих синонимов может быть несколько или не быть вообще. Но ведь есть еще письма Минздрава России, в частности письмо от 14.03.2013 № 13-7/10/2-1691 «Об особенностях кодирования некоторых заболеваний класса IX МКБ-10», в котором в п. 2.2.5 сказано: «В случае смерти от острого или повторного инфаркта миокарда следует помнить, что не все случаи инфарктов миокарда кодируются I21–I22: при сочетании острого или повторного инфаркта миокарда со злокачественным новообразованием, сахарным диабетом или бронхиальной астмой первоначальной причиной смерти считают эти заболевания, а инфаркты миокарда – их осложнениями (МКБ-10, т. 2, с. 75), данные сочетания должны быть правильно отражены в заключительном посмертном диагнозе». Тут не только клиницисты, но и патологоанатомы с судебно-медицинскими экспертами задумаются. Причем в судебно-медицинской практике при общем согласованном с патологоанатомами подходе к формулировке диагнозов [2, 3] все же имеются некоторые особенности написания судебно-медицинского и патологоанатомического диагнозов. Поэтому в большинстве работ звучат мысли об унификации и стандартизации диагнозов.

Все написанное выше – не чисто теоретические размышления, ведь расхождение диагнозов влечет за собой существенные разноплановые последствия и потери. Во-первых, финансовые. Деньги на обследование пациента и лечение не той патологии потрачены зря. Страховые организации штрафуют больницы за вторую и третью категории расхождения диагнозов. Во-вторых, процессуальные. Тут речь идет о работе правоохранительных органов, если родственники требуют привлечь к ответственности врачей, узнав о расхождении диагнозов. В-третьих, административные. Руководители медицинских учреждений вынуждены заниматься не организацией лечебного процесса, а разбором данных случаев, отвечать на всевозможные запросы и работать с комиссиями по проверке жалоб из разных ведомств. И наконец, психологические. Родные всю жизнь будут считать медицинских работников виновными в смерти

близкого человека, а врачу, даже если он не виноват, трудно продолжать спокойно работать.

Казалось бы, когда мы ставим диагноз, то чем более подробным он будет, тем лучше больному, так как его хорошо обследовали и он получит нужное лечение в соответствии со всей выявленной у него патологией. Такой подход называется «индивидуальная персонализированная медицина», и эти красивые слова уже появились не только в отчетах, но и в названиях лечебных учреждений. Вот только клиницисты, да и патологоанатомы не очень радуются, так как на практике, с учетом всех изданных приказов и рекомендаций относительно оформления диагноза, все равно остается непонятным, до какой степени его надо детализировать. Кстати, гематомы после инъекций – тоже осложнения, связанные с лечением, но часто ли мы видим их в диагнозах? Их отсутствие тоже считать расхождением? Но, с другой стороны, если больной в коме, а гематомы у него по передней поверхности локтевых суставов после травм и будет нужна их судебно-медицинская оценка? Получается, что детализировать все-таки надо, но как при этом производить сопоставление диагнозов, чтобы учесть все мелкие терминологические детали и особенности конструкции диагноза при разных нозологических формах и их сочетаниях и не нарушить инструкции, письма, рекомендации и приказы? Если проводить сопоставление диагнозов по приказу Минздрава России от 06.06.2013 № 354н, мы получим расхождение диагнозов почти в 100% случаев. Но ведь цель – выявить дефекты диагностики, лечения и устранить их, а добиться этого можно только при спокойном, аргументированном диалоге с клиницистами, которым все сложнее становится понимать патологоанатомов и судебно-медицинских экспертов и логику сопоставления диагнозов из-за увеличения количества рубрик (например, наличие фонового заболевания у сочетанных заболеваний с возможными несколькими правильными вариантами написания диагнозов). Это подтверждают и цифры. Например, в Московской области значительно увеличилось число расхождений диагнозов с неправильным построением заключительного клинического диагноза: 47 – в 2012 году (9,5%), 94 – в 2013 году (18,3%), 143 случая в 2014 году (22,5%) [6].

Чтобы наличие расхождения либо совпадения диагнозов не зависело от установок определенной медицинской школы, вольной интерпретации патологоанатомом или судебно-медицинским экспертом разных рекомендаций и еще ряда субъективных факторов, необходимо данный процесс стандартизировать, то есть упростить и более детально прописать процедуру конструирования и сопоставления диагнозов. Эта мысль и ранее звучала в ряде рекомендаций: «Принципы (единые требования) формулировки заключительного клинического и патологоанатомического диагнозов едины: нозологический, соответствие Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10), дополнительная интранозологическая характеристика,

патогенетический, структурность с унифицированными рубриками, фактическая, логическая обоснованность и достоверность. Диагноз – один из важнейших объектов стандартизации в здравоохранении, а стандартизация – основа управления качеством медицинских услуг. Без внедрения в практику унифицированных стандартов по формулировке диагнозов невозможны объективные сертификация, аккредитация и лицензирование специалистов и медицинских организаций» [7]. И вероятно, одним из путей уменьшения числа расхождений диагнозов, связанных с их неправильной конструкцией или терминологическими формулировками патологических процессов, является написание всех видов диагнозов только в терминах МКБ-10 с соответствующими кодами. При этом большинство действующих нормативных документов сохранит свою силу, хотя, возможно, некоторым и потребуются новая редакция. Данный процесс уже успешно развивается в отношении оформления медицинских свидетельств о смерти, а 10 лет назад никто об этом даже не задумывался.

При написанном только в терминах МКБ-10 диагнозе в каждой рубрике «основное заболевание» или «фоновое, конкурирующее, сочетанное заболевание» (при коморбидных заболеваниях или полипатии) предлагается писать и, соответственно, сопоставлять не более одной нозологической формы с кодами МКБ-10. В рубрике «осложнения» предлагается писать и, соответственно, сопоставлять не более трех главных осложнений с кодами МКБ-10. В рубрике «сопутствующие заболевания» предлагается писать и, соответственно, сопоставлять не более трех нозологических форм с кодами МКБ-10. Именно три – если больше, мы опять запутаемся в процедуре сопоставления и ее статистическом анализе. При этом сопоставление диагнозов станет чисто техническим процессом с понятными правилами, который в дальнейшем может в простых случаях осуществлять и компьютер, просто сравнив коды. Исключение из данного правила может быть только одно: в МКБ-10 нет кода для того состояния, которое диагностировал клиницист. Это возможно, но будет редко. Коды МКБ-10 в диагнозах ставят и сейчас, но часто они не соответствуют текстовой части либо их сложно интерпретировать при плохо рубрифицированном или небрежно оформленном диагнозе. Вероятно, главным аргументом против написания всех диагнозов в терминах МКБ-10 будет то, каким образом все многообразие патологии больного в диагнозе, который занимает нередко половину листа формата А4, вместить в прокрустово ложе нескольких стандартных предложений МКБ-10 и главное, зачем. Переход к методике написания диагноза в унифицированных терминах МКБ-10 должен быть поэтапным. На первом этапе можно начать писать только посмертные клинические диагнозы и патологоанатомические диагнозы лишь в терминах МКБ-10. Есть надежда, что и сама МКБ будет постепенно детализироваться и приближаться к

медицине, отдаляясь от чистой статистики. Понятно, что все многообразие ситуаций в реальной медицинской практике в терминах МКБ-10 невозможно отразить, поэтому в посмертном эпикризе лечащий врач и патологоанатом в клинко-патологоанатомическом эпикризе должны будут расшифровать подробно и поэтапно каждую рубрику диагноза в приемлемых для них терминах. При этом они обоснуют и сам диагноз, и необходимость выполнения определенных действий относительно состояния пациента и исхода его заболевания, что, в общем-то, и должно быть целью написания эпикриза. Есть определенные опасения, что клинический диагноз при этом подходе может полностью исчезнуть, но при правильном механизме реализации этого не должно произойти. Ведь понятно, что клинический диагноз несет в себе массу функций: это и огромный пласт знаний на современном этапе, и возможность совершенствовать клиническое мышление, и показатель профессионализма врача и степени обследования больного, и еще много других. Все это сохранится, просто перейдет в посмертный эпикриз, а после некропии в клинко-анатомический эпикриз и даже еще больше детализируется [4], так как врач должен будет обосновать все термины диагноза. Возможно, появятся документы, регламентирующие написание эпикриза с официальными образцами эпикризов разного типа. Эпикриз в настоящее время является кратким изложением истории болезни, но никак не анализом состояния больного с обоснованием диагноза. Переход на диагнозы только в терминах МКБ-10 существенно упростит применение стандартов лечения и клинических рекомендаций, оценку их эффективности, оформление группы инвалидности, статистическую и научную обработку, финансовые расчеты и т.д. Видимо, при написании диагнозов в терминах МКБ-10 из медицины постепенно, к сожалению, будет уходить искусство, но его заменят клинические рекомендации, стандарты качества оказания медицинской помощи и системы поддержки принятия врачебного решения, которые вместе с интеллектом врачей позволят грамотно лечить большинство наших граждан. На начальном этапе эти процедуры потребуют большего времени от врача, но это с лихвой компенсируется его значительно увеличившейся юридической защищенностью. В интересах больного и своих собственных врачи-клиницисты, патологоанатомы и судебно-медицинские эксперты должны заговорить на одном языке. Хотя, несомненно, этот процесс после его законодательного утверждения займет не один год.

### Заключение

С учетом всего изложенного выше целесообразно начать процесс обсуждения предложения написания заключительного клинического и патологоанатомического или судебно-медицинского диагнозов исключительно в терминах МКБ-10 и в обычной практической работе только их сопоставлять.

При положительной оценке данных предложений желательно их закрепить уже законодательно в приказе Министерства здравоохранения.

### Литература/References

1. *Зайратьянц О.В., Кактурский Л.В.* Формулировка и сопоставление клинического и патологоанатомического диагнозов. М.: Медицинское информационное агентство, 2011. 576 с. [*Zajrat'janc O.V., Kakturskij L.V.* Formulation and comparison of clinical and pathoanatomical diagnoses. M.: Medicinskoe informacionnoe agentstvo. 2011. 576 s. (In Russ.)].
2. *Зайратьянц О.В., Кактурский Л.В., Мальков П.Г.* Современные требования к формулировке диагноза в соответствии с законодательством Российской Федерации и международной статистической классификации болезней 10-го пересмотра // Судебная медицина. 2015. № 1. С. 14–20. [*Zajrat'janc O.V., Kakturskij L.V., Mal'kov P.G.* Modern requirements for the definition of the diagnosis according to the national law and international statistical classification of icd-10 // *Sudebnaya medicina*. 2015. V. 1. P. 14–20. (In Russ.)].
3. *Клевно В.А., Кучук С.А., Лысенко О.В. и др.* Судебно-медицинский диагноз: Руководство / Под ред. В.А. Клевно. М.: Ассоциация СМЭ, 2015. [*Klevno V.A., Kuchuk S.A., Lysenko O.V. et al.* Forensic medical diagnosis: a guide under edition by V.A. Klevno. M.: Associacija SMJe, 2015. (In Russ.)]
4. *Клевно В.А., Кучук С.А., Жулин С.А.* Клинико-анатомический эпикриз в экспертной практике // Судебная медицина. 2016. № 1. С. 21–24. [*Klevno V.A., Kuchuk S.A., Zhulin S.A.* Clinical-anatomical Epicrisis in Forensic Medical Expert Practice // *Sudebnaya meditsina*. 2016. V. 1. P. 21–24. (In Russ.)].
5. *Ковалев А.В., Шмаров Л.А., Теньков А.А.* Достоверные и вероятные выводы в заключениях судебно-медицинских экспертов // Судебно-медицинская экспертиза. 2016. № 1. С. 60–64. [*Kovalev A.V., Shmarov L.A., Ten'kov A.A.* The reliable and plausible conclusions in the decisions of the forensic medical experts // *Sudebno-medicinskaja jekspertiza*. 2016. V. 1. P. 60–64. (In Russ.)].
6. *Кучук С.А., Клевно В.А.* Сопоставление судебно-медицинского и клинического диагнозов – инструмент повышения качества медицинской помощи // Судебная медицина. 2015. № 1. С. 22–24. [*Kuchuk S.A., Klevno V.A.* Comparison of clinical and forensic diagnosis is an instrument of increasing quality of health care // *Sudebnaya meditsina*. 2015. V. 1. P. 22–24. (In Russ.)].
7. *Пальцев М.А., Автандилов Г.Г., Воробьев С.Л., Зайратьянц О.В., Кактурский Л.В., Коваленко В.Л., Ковальский Г.Б., Мишнев О.Д., Никонов Е.Л., Полянко Н.И., Рыбакова М.Г., Кокишаров В.Н.* Правила формулировки диагноза. Часть. 2. М.: Росздравнадзор, ММА им. И.М. Сеченова, МГМСУ, НИИ морфологии человека РАМН, 2006. С. 62. [*Pal'cev M.A., Avtandilov G.G., Vorob'ev S.L., Zajrat'janc O.V., Kakturskij L.V., Kovalenko V.L., Koval'skij G.B., Mishnev O.D., Nikonov E.L., Poljanko N.I., Rybakova M.G., Koksharov V.N.* Rules of the formulation of the diagnosis. Part. 2. M.: Roszdravnadzor, MMA im. I.M. Sechenova, MGMSU, NII morfologii cheloveka RAMN, 2006. 62 p. (In Russ.)].

## UNIFIED CLINICAL AND PATHOLOGIC (FORENSIC) DIAGNOSING AND COMPARISON OF DIAGNOSES

*I.V. Dmitriev, A.E. Dorosevich*

The analysis of problems in clinical and pathological diagnosing and of comparison the diagnoses was performed. There is a growing trend of more and more complex and ambiguous registration of clinical and pathologic (forensic) diagnoses. In this article, we suggest diagnosing based on the terms of the International Classification of Diseases of the 10th revision (ICD-10). Unification of the determining of diagnoses will greatly simplify the introduction of clinical recommendations, the accreditation of specialists will allow the computer processing of medical documentation, and diagnoses matching process becomes clear to physicians of different specialties.

*Key words:* diagnosis, diagnosing, comparison, ICD-10

### Информация об авторах

Дмитриев Игорь Владимирович – кандидат медицинских наук, заведующий научно-исследовательской лабораторией Смоленского областного института патологии Департамента Смоленской области по здравоохранению.

Адрес: 214018, Смоленск, проспект Гагарина, д. 27. Телефоны: 8 (4812) 38 31 02, 8 906 667 36 76. E-mail: igdm63@yandex.ru

Доросевич Александр Евдокимович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Смоленского государственного медицинского университета.

Адрес: 214000, Смоленск, ул. Тенишевой, д. 9. Телефон 8 (4812) 38 34 71. E-mail: oguzsoip@yandex.ru

*Материал поступил в редакцию 30 октября 2017 года*

# ПАМЯТИ ЮРИЯ ИВАНОВИЧА ДЕНИСОВА-НИКОЛЬСКОГО (15.05.1932 – 27.01.2018)



Морфологическое сообщество России понесло тяжелую утрату – 27 января 2018 года ушел из жизни выдающийся советский и российский ученый, организатор медицинской науки, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ Юрий Иванович Денисов-Никольский.

Ю.И. Денисов-Никольский родился 15 мая 1932 года в Баку. Окончив в 1956 году Военно-медицинскую академию им. С.М. Кирова в Ленинграде, он продолжил службу в рядах советской армии, в 1959-м вернулся в Военно-медицинскую академию адъюнктом кафедры анатомии человека и в 1963-м защитил кандидатскую диссертацию на тему «Состояние внутриорганного кровеносного русла тазовой конечности кролика при развитии коллатерального кровообращения». После переезда в Москву работал ассистентом кафедры нормальной анатомии Университета дружбы народов, ученым секретарем НИИ морфологии человека АМН СССР (1964–1970). С 1970 года научно-практическая деятельность Ю.И. Денисова-Никольского была связана с Научно-исследовательским и учебно-методическим центром биомедицинских технологий ФГБНУ ВИЛАР.

Воспитанный морфологической школой члена-корреспондента АМН СССР Б.А. Долго-Сабурова, продолжая традицию своих учителей – видных отечественных анатомов и морфологов А.П. Авцына, Д.А. Жданова, А.В. Русакова, Ю.И. Денисов-Никольский стал крупным специалистом в области функциональной анатомии опорно-двигательного аппарата. Он внес огромный вклад в развитие фундаментальных и прикладных исследований функциональной и возрастной морфологии костно-суставного аппарата, биомеханики, биоимплантологии и биоматериаловедения, создал одну из лучших в России школ остеологии и руководил новым направлением «Репродукция клеток, тканей и биопротезирование». Многие ученики Юрия Ивановича стали известными учеными – докторами наук, профессорами, заслуженными деятелями науки РФ и успешно трудятся в России и за рубежом.

С 1970 года Ю.И. Денисов-Никольский участвовал в разработке проблем анатомии, связанных с длительным сохранением биоструктур и биообъектов, и в 1986-м защитил докторскую диссертацию на тему «Морфологическая характеристика сохранности костей бальзамированных тел и определяющие ее факторы». Полученные в этом направлении научно-практические данные успешно используются при проведении специальных работ в нашей стране и в мире.

Признанием выдающегося вклада в развитие отечественной и мировой медицинской науки стали присвоение Ю.И. Денисову-Никольскому звания профессора (1988), заслуженного деятеля науки РФ (1997), избрание членом-корреспондентом Академии медицинских наук СССР (1991), действительным членом Российской академии медицинских наук (2000), Российской академии наук (2013), почетным академиком ряда зарубежных академий.

Ю.И. Денисов-Никольский проводил большую научно-общественную работу, пользовался огромным авторитетом и признанием среди морфологов нашей страны и сопредельных государств. Он избирался генеральным секретарем Международной ассоциации морфологов, являлся членом президиума Научного медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов. За достижения в развитии отечественной морфологии был награжден юбилейной медалью НМОАГЭ «За большие заслуги в морфологии» (2006). Юрий Иванович был заместителем главного редактора издания трудов НИЦ БМТ «Биомедицинские технологии» и членом редакционных коллегий журналов «Клиническая и экспериментальная морфология», «Морфология», «Технологии живых систем», «Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова».

Заслуги академика Ю.И. Денисова-Никольского в реализации приоритетных научно-практических работ и подготовке научных кадров получили высокую отечественную и международную оценку. Он был награжден орденами СССР «Знак Почета» (1973), Дружбы народов (1976), Трудового Красного Знамени (1986) и пятью медалями, орденом «Герой труда» (1999) и двумя медалями Социалистической Республики Вьетнам, орденом «Золотая стрела за достижения» (1987) Республики Гайана.

Морфологическое сообщество навсегда сохранит светлую память о выдающемся ученом и организаторе российской науки, ярком, талантливом человеке, достойном сыне Отечества.

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

## Х ПЛЕНУМ РОССИЙСКОГО ОБЩЕСТВА ПАТОЛОГОАНАТОМОВ

25–26 мая 2018 года в Москве на базе Научно-исследовательского института морфологии человека прошел X пленум президиума Российского общества патологоанатомов (РОП) «Развитие традиций отечественной патологической анатомии в современных условиях». В работе пленума приняли участие члены президиума и совета старейшин РОП, а также специалисты из 41 города России. В рамках пленума состоялись два пленарных заседания и круглый стол.

Первое пленарное заседание было посвящено формированию консенсуса профессионального сообщества в интерпретации биопсий при важнейших заболеваниях человека. С ведущим докладом по этому вопросу выступил А.В. Кононов, предложивший на примере изучения предрака и рака желудка разработку унифицированных подходов к терминологии, классификации и морфологической диагностике заболеваний. Эти положения конкретизированы в докладах, посвященных патологоанатомической диагностике заболеваний желудочно-кишечного тракта (Л.М. Михалева, А.Г. Шиманская), опухолей шейки матки (К.А. Павлов). А.М. Ковригина акцентировала внимание на необходимости создания референсных центров для обеспечения должного качества патологоанатомической диагностики на современном технологическом уровне. О.В. Зайратьянц, С.И. Мозговой, Д.А. Жакота, Е.Л. Туманова осветили вопросы совершенствования системы непрерывного медицинского образования как ведущего фактора в кадровом обеспечении патологоанатомической службы.

Второе пленарное заседание было посвящено вопросам правоприменительной практики и путям оптимизации патологоанатомической службы в современных условиях. О.Д. Мишнев в своем докладе подчеркнул основные заслуги И.В. Давыдовского в

создании клинко-анатомического направления в отечественной патологической анатомии и отметил насущную необходимость сохранения лучших традиций нашей специальности и возрождения полноценных клинко-анатомических конференций.

Ф.Г. Забозлаев проанализировал вопросы совершенствования законодательного и нормативного регулирования деятельности патологоанатомической службы, в частности, остановился на имеющихся дефектах и противоречиях в регламентирующих документах. Одним из ярких примеров этого может служить исчезновение из новых приказов Минздрава России по патологоанатомической службе даже упоминания о клинко-анатомических конференциях.

О.В. Зайратьянц рассмотрел острые вопросы несовершенства существующей законодательной базы и изданных нормативных документов, касающихся патологоанатомических вскрытий. Колоссальный объем вскрытий, производимых в нашей стране, не используется как ценнейший банк данных для анализа причин смертности, оценки качества медицинской помощи и ее дефектов. Штрафные санкции за расхождение клинического и патологоанатомического диагнозов



практически девальвировали экспертную функцию патологоанатомической службы. Олег Вадимович подробно остановился на проблемах нормативно-правовой базы, клинко-экспертной работы, кадровых проблемах службы, на вопросах искажения статистической отчетности.

М.Г. Рыбакова на опыте работы патологоанатомической службы Северо-Западного федерального округа обратила внимание на трудности, препятствующие ее нормальной деятельности. Во многом это связано с тем, что на этапе подготовки нормативных документов они не подвергались широкому обсуждению в профессиональном сообществе. Отсюда огрехи в регламентирующих документах, как, например, выделение в приказе Минздрава России первой категории вскрытия (без микроскопического исследования), в то время как в федеральном законе указано, что микроскопическое исследование является неотъемлемой частью патологоанатомического вскрытия.

О.О. Орехов в докладе «Проблемы правового регулирования организации клинко-экспертной работы при проведении посмертных исследований» остановился на вопросах деятельности врачебных комиссий, проведения клинко-патологоанатомических конференций и комиссий по изучению летальных исходов.

А.В. Лосев в докладе «Минусы и плюсы децентрализованной патологоанатомической службы» охарактеризовал основные трудности при проведении прижизненных и посмертных патологоанатомических исследований в патологоанатомических отделениях в системе подчиненности лечебным учреждениям. К ним относятся административное давление, отсутствие централизованного снабжения расходными материалами, финансовое обеспечение по остаточному принципу и др.

А.В. Блохин поделился опытом работы в Тамбовском областном патологоанатомическом бюро. Централизация службы в бюро привела к увеличению числа вскрытий в регионе, а концентрация прижизненных морфологических исследований существенно повысила их качество. Бюджет бюро при переходе на новую систему финансирования увеличился более чем в два раза. Централизация службы представляется целесообразной в решении кадровых, материальных, логистических вопросов.

Второй день работы пленума прошел в рамках круглого стола «Дискуссионные вопросы оптимизации патологоанатомической службы». В обсуждении приняли участие В.С. Пауков, А.Е. Доросевич, Л.М. Михалева, Г.А. Франк, А.В. Лосев, О.О. Орехов, О.В. Паклина, О.В. Зайратьянц, И.В. Шапошникова, Н.А. Савелов, А.М. Ковригина, В.А. Цинзерлинг, П.Г. Мальков, Л.В. Кактурский, С.Н. Ивченко, Т.А. Федорина. Дискуссия велась в острой форме с концентрацией вопросов на нерешенных проблемах. Выступавшие отметили необходимость консолидации усилий по дальнейшему развитию Российского общества патологоанатомов, ор-



ганизации референсных центров и рабочих групп специалистов, созданию стандартов и протоколов морфологического исследования, подготовке молодых кадров врачей-патологоанатомов и лаборантов-гистологов.

*Л.В. Кактурский,  
президент Российского общества  
патологоанатомов  
А.И. Щеголев,  
генеральный секретарь Российского общества  
патологоанатомов*

КОМПЛЕКСНОЕ РЕШЕНИЕ  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ  
**ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ  
ПРОЦЕССОВ  
ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ  
ЗАБОЛЕВАНИЯХ**  
**RHENOPTICS™**



**NEW** МУЛЬТИПЛЕКСНЫЕ  
ТЕХНОЛОГИИ В  
ПАТОМОРФОЛОГИИ

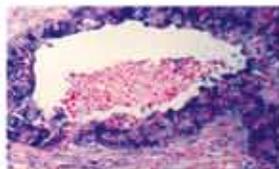
Наборы реагентов TSA® и Opal™

- Усиление сигнала от 10 до 100 раз на основе технологии TSA® (Tyramide Signal Amplification) в иммуногистохимии и гибридизации *in situ*
- Работа с несколькими антителами на одном препарате независимо от видового происхождения антител
- Наборы реагентов Opal™ для определения от 3 до 6 маркеров на одном препарате одновременно
- Работа с гистологическими и цитологическими препаратами, с тканями человека и экспериментальных животных

Препарат ткани легкого.  
Окрашивание p53 (ISH)  
без использования технологии TSA



Препарат ткани легкого.  
Окрашивание p53 (ISH)  
с использованием набора TSA plus DNP



Визуализация и обработка  
результатов анализа.

Автоматические платформы  
Mantra™, Vectra®3, inForm®

- Автоматическое распознавание участков различных типов ткани на препарате
- Автоматическое фенотипирование клеток с использованием мультиплексных технологий анализа
- Просмотр результатов флуоресцентного окрашивания в виде гистологических препаратов в светлом поле



реклама

Авторизованный дистрибьютор PerkinElmer (США) в России – ООО «БиоЛайн»



**ООО «БиоЛайн»**  
197101, Россия,  
Санкт-Петербург  
пер. Пинский, д. 3, лит. А  
тел.: (812) 320 49 49,  
факс: (812) 320 49 40  
e-mail: main@bioline.ru  
www.bioline.ru

Москва, тел.: (800) 555 49 40  
Новосибирск, тел.: (383) 227 09 63  
Екатеринбург, тел.: (343) 287 32 49  
Владивосток, тел.: (423) 201 18 08  
Нижний Новгород, тел.: (831) 278 61 47  
Ростов-на-Дону, тел.: (863) 268 99 32  
Казань, тел.: (843) 570 66 88  
Самара, тел.: (846) 246 06 54

Единый бесплатный  
номер сервисной  
службы для всех  
регионов России:

8 800 333 00 49