

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2226-5988

№ 3 (27) / 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
www.morfolhum.ru

Тираж 500 экземпляров

Издательство
«Группа МДВ»

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>В.Н. Сальков, Д.Н. Воронков, Р.М. Худоерков</i>
Морфометрические показатели структур
вентральной области в компактной части
черного вещества головного мозга
при болезни Паркинсона</p> | 4 | <p><i>V.N. Sal'kov, D.N. Voronkov, R.M. Khudoerkov</i>
Morphometric characteristics of the ventral region
in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's
disease</p> |
| <p><i>К.А. Кутукова, М.В. Иванов</i>
Изменения соматодендритной структуры
шиповых нейронов хвостатого ядра человека
при старении</p> | 9 | <p><i>K.A. Kutukova, M.V. Ivanov</i>
Altered somatodendritic structure of spiny neurons
in caudate nucleus in aging humans</p> |
| <p><i>А.А. Каниболоцкий, П.О. Свищева, О.В. Макарова</i>
Клинико-морфологический анализ
различных форм острого аппендицита
в зависимости от возраста и пола</p> | 14 | <p><i>A.A. Kanibolotskiy, P.O. Svishcheva, O.V. Makarova</i>
Clinical morphological analysis of various forms
of acute appendicitis depending on age and gender</p> |
| <p><i>М.И. Штаут, Л.Ф. Курило</i>
Половые особенности хронологии и динамики
дифференцировки гонад и гамет человека</p> | 18 | <p><i>M.I. Shtaut, L.F. Kurilo</i>
Chronology and dynamics of sex gonadal
differentiation and gametogenesis in humans</p> |
| <p><i>Е.Л. Куренков, В.С. Рыкун, С.А. Гордеева</i>
Клинико-морфологические корреляции
при прогрессирующей миопии</p> | 24 | <p><i>E.L. Kurenkov, V.S. Rykun, S.A. Gordeeva</i>
Clinical and morphological correlations
in progressive myopia</p> |

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

- | | | |
|---|----|---|
| <p><i>Н.В. Яглова, Д.А. Цомартова, В.В. Яглов,
С.С. Обернихин, С.В. Назимова</i>
Изменения секреторной деятельности
адреналокитов крыс, развивавшихся
в условиях воздействия низких доз
дихлордифенилтрихлорэтана</p> | 30 | <p><i>N.V. Yaglova, D.A. Tsomartova, V.V. Yaglov,
S.S. Obernihkhin, S.V. Nazimova</i>
Altered secretion of adrenomedullary a-cells
in rats after developmental exposure to low-dose
dichlorodiphenyltrichloroethane</p> |
|---|----|---|

О.О. Янушевич, И.Ю. Малышев, О.В. Зайратьяни, А.В. Журавлева, Е.Н. Цмокалюк, Г.С. Рунова, Л.В. Кузнецова, М.А. Морозова, А.Г. Аджиева
Сравнительная морфология зубов, выращенных методами гетеро- и гомотопической трансплантации их эмбриональных зачатков в эксперименте

35

O.O. Yanushevich, I.Y. Malyshev, O.V. Zayratyants, A.V. Zhuravlyeva, E.N. Tsmokalyuk, G.S. Runova, L.V. Kuznetzova, M.A. Morozova, A.G. Adzhieva
Comparative morphology of teeth grown from embryonic germs by hetero- and homotopic transplantation in experimental study

Е.А. Пономаренко, В.А. Мхитаров, С.А. Кузикьяни, Н.А. Золотова, Д.Н. Хочанский, И.С. Цветков, А.А. Степанов
Цитологическая характеристика клеток сперматогенного эпителия у мышей C57Bl/6

42

E.A. Ponomarenko, V.A. Mkhitarov, S.A. Kuzikyants, N.A. Zolotova, D.N. Khochansky, I.S. Tsvetkov, A.A. Stepanov
Cytological characteristic of spermatogenic epithelium cells in C57Bl/6 mice

Н.В. Булякова, В.С. Азарова
Аллопластика области травмы в скелетной мышце крысы мышечной тканью от погибшей крысы-донора, предварительно облученной He-Ne лазером

53

N.V. Bulyakova, V.S. Azarova
Muscle allotransplantation in injured rat skeletal muscle with the tissue from dead rat donor pre-irradiated with He-Ne laser

М.В. Кондашевская, Л.В. Кактурский
Нарушение адаптации при посттравматическом стрессовом расстройстве и его коррекция введением малых доз гепарина в эксперименте

63

M.V. Kondashevskaya, L.V. Kaktursky
Adaptation abnormalities in posttraumatic stress disorder corrected by low dose heparin injections in an experiment

ЮБИЛЕЙ ANNIVERSARY

Ирина Александровна Казанцева
(к 80-летию со дня рождения)

69

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СТРУКТУР ВЕНТРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ В КОМПАКТНОЙ ЧАСТИ ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

В.Н. Сальков, Д.Н. Воронков, Р.М. Худоерков

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва

На аутопсийном материале, включавшем мозг пожилых людей с болезнью Паркинсона и пожилых людей, не выявлявших при жизни неврологических расстройств (контрольная группа), методами компьютерной морфометрии оценивали основные количественные показатели нейронов и нейроглии в компактной части черного вещества. Обнаружили, что по сравнению с контролем при болезни Паркинсона показатели плотности расположения нейронов, число дофаминовых нейронов и площади их тел были достоверно ниже, а показатели общей плотности расположения нейроглии, плотности расположения GFAP- и S100-позитивной нейроглии выше. Полученные данные продемонстрировали, что в компактной части черного вещества при болезни Паркинсона число нейронов существенно уменьшалось, но в ответ на этот процесс развивался компенсаторный нейроглиоз.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, черное вещество головного мозга, морфометрия, нейроны, нейроглиоз

Одним из наиболее социально значимых заболеваний нервной системы, ассоциированных с пожилым возрастом, является болезнь Паркинсона (БП), распространенность которой в России в настоящее время составляет 139,9 случая на 100 000 населения [2]. При развернутой клинической картине, соответствующей 3–4-й стадиям заболевания по шкале Хен–Яра, патоморфологически обнаруживают тельца Леви в нейронах, содержащих нейромеланин, и убыль дофаминовых нейронов в компактной части черного вещества (ЧВкч) головного мозга [1, 4], что наиболее существенно регистрируется в вентральной ее области [8]. Вместе с тем установлено, что в отдельных этнических группах (индийцы) плотность расположения нейронов в ЧВкч головного мозга существенно выше, чем у европейцев и североамериканцев, и в пожилом возрасте она значимо не изменяется, а распространенность БП у них в 2,5 раза ниже [3].

Другим не менее важным патоморфологическим признаком, характеризующим БП, является нейроглиоз. Несмотря на то, что он наблюдается при большинстве повреждений головного мозга, независимо от их этиологии, данные литературы о характере изменений нейроглии при БП противоречивы [6]. Одни авторы утверждают, что при этом заболевании количество клеток нейроглии возрастает (преимущественно за счет

астроцитов) [5], другие считают, что их число остается неизменным, а нейроглиоз при БП обусловлен гипертрофией астроцитов [11].

В доступной нам литературе мы не нашли работ, в которых были бы количественно представлены при БП взаимоотношения между структурно и функционально различными типами клеток – нейронами и нейроглией.

Целью работы была оценка основных количественных показателей нейронов и нейроглии в вентральной области компактной части черного вещества головного мозга при болезни Паркинсона.

Материалы и методы

Исследовали аутопсийный материал головного мозга лиц с БП, умерших от интеркуррентных заболеваний в возрасте 60 (одна женщина), 70 и 74 лет (два мужчины). Прижизненно у всех диагностировали смешанную форму БП. У одного была 2-я стадия заболевания по шкале Хен–Яра, а у остальных – 3-я стадия, при длительности заболевания 5, 6 и 10 лет. Для контроля использовали аутопсийный материал головного мозга не выявлявших при жизни неврологических расстройств людей пожилого возраста (три мужчины и две женщины – всего пять случаев), средний возраст которых составил 69,8 года (от 62 до 75 лет). Патологоанатоми-

ческое заключение констатировало отсутствие существенных расхождений с прижизненными диагнозами.

Образцы аутопсийного мозга фиксировали в 4% растворе формалина, подвергали стандартной гистологической обработке и заключали в парафиновые блоки, которые на уровне среднего мозга раскладывали на фронтальные срезы толщиной 10 мкм. Одну часть срезов окрашивали 1% раствором крезилового фиолетового по методу Ниссля или гематоксилином и эозином, на другой проводили иммуногистохимические реакции. Дофаминовые нейроны выявляли иммуногистохимически по локализации их маркера тирозингидроксилазы специфическими поликлональными антителами (Sigma, № T8700) в разведении 1:1500, связывание которых определяли при помощи набора EXTRA3-KIT (Sigma, Германия) авидин-пероксидазным методом, используя хромоген SigmaFast (3,3-диаминобензидин с CoCl_2). Локализацию телец Леви определяли при помощи антител (Wako, Япония, № 015-25191) к фосфорилированному по остатку серина-129 α -синуклеину, составляющему основу этих включений. Астроцитарную нейроглию обнаруживали, применяя реакцию с моноклональными антителами на GFAP (Sigma, № G3893) в разведении 1:200, а S100-позитивную нейроглию локализовали при помощи реакции связывания кроличьих поликлональных антител (Sigma, № S2644) с S100-протеином в разведении 1:80. Для иммуноокрашивания во всех случаях использовали вторичные антитела из набора Multivision (Thermo Scientific, США, № TL-012-MHRA), конъюгированные с щелочной фосфатазой, связывание которых выявляли при помощи того же набора.

Структуры черного вещества головного мозга изучали гистологически и оценивали количественно на микроскопе Leica-DMLB (Leica Microsystems, Германия), оснащенный цифровой видеокамерой и системой компьютерного анализа видеоизображений Leica Qwin. Нейроны, окрашенные по Ниссля, и дофаминовые нейроны в вентральной области ЧВкч подсчитывали в поле зрения микроскопа (объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$), а затем вычисляли их количество на площади, равной $0,01 \text{ мм}^2$, то есть определяли плотность расположения нервных клеток. Аналогичным способом определяли общую плотность расположения нейроглии (на препаратах, окрашенных по методу Ниссля), а также плотность расположения GFAP- и S100-позитивной нейроглии. В каждом случае исследовали не менее 50 полей зрения. Кроме того, измеряли (объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$) площадь сечения тел нейронов. Объекты (нейроны) выделяли вручную методом обрисовки при помощи графического планшета. Двоичное изображение объекта получали и его характеристику оценивали при помощи упоминавшейся выше системы компьютерного анализа видеоизображений. Объем выборки составил не менее 100 клеток в каждом случае. Глиальный индекс определяли как отношение плотности расположения нейроглии к плотности расположения нейронов.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Выборки исследуемых морфометрических показателей оценивали с учетом условий распределения и, принимая во внимание, что их объемы были достаточными ($n > 30$), для сравнения средних значений одноименных показателей в двух группах применяли двухвыборочный t-критерий для независимых выборок.

Результаты и обсуждение

На серийных фронтальных срезах среднего мозга людей пожилого возраста (контроль) черное вещество выявлялось на всем его протяжении в виде изогнутого в дорсолатеральном направлении продольного тяжа, который располагался между красным ядром и основанием ножек мозга. Оно отчетливо разграничивалось на две части – редкоклеточную ретикулярную и густоклеточную компактную. В ЧВкч различали дорсальную и вентральную области (рис. 1), которые были представлены разного размера нейронами округлой, овальной и полигональной формы. В цитоплазме большинства нейронов наблюдали накопление глыбок нейромеланина. По сравнению с контрольной группой у пациентов с БП дофаминовые нейроны в ЧВкч располагались реже, и в их отростках экспрессия тирозингидроксилазы была более отчетливой (рис. 2 А, Б). Кроме того, у пациентов с БП в нейронах ЧВкч обнаруживали единичные тельца Леви при иммуногистохимическом окрашивании на фосфорилированный α -синуклеин (рис. 3 А, Б).

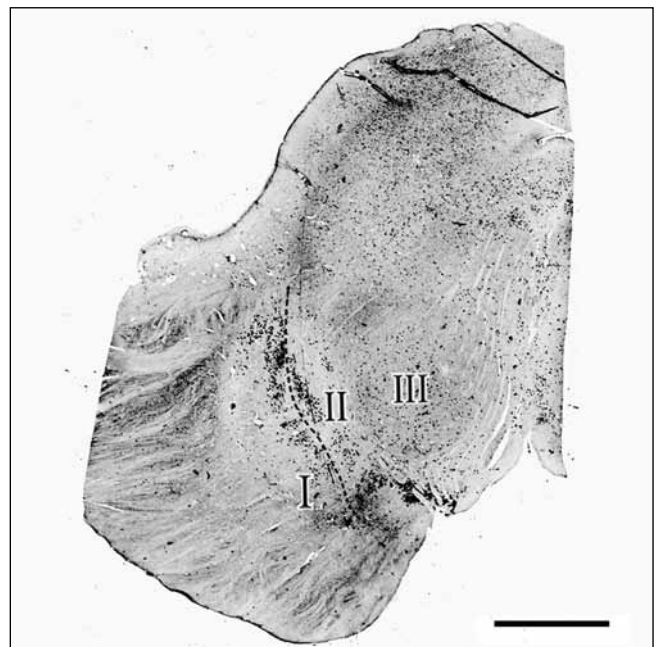


Рис. 1. Компактная часть черного вещества головного мозга человека. I – вентральная область, II – дорсальная область, III – красное ядро. Изображение в градациях серого. Окраска крезильовым фиолетовым. $\times 15$, масштабный отрезок – 5 мм

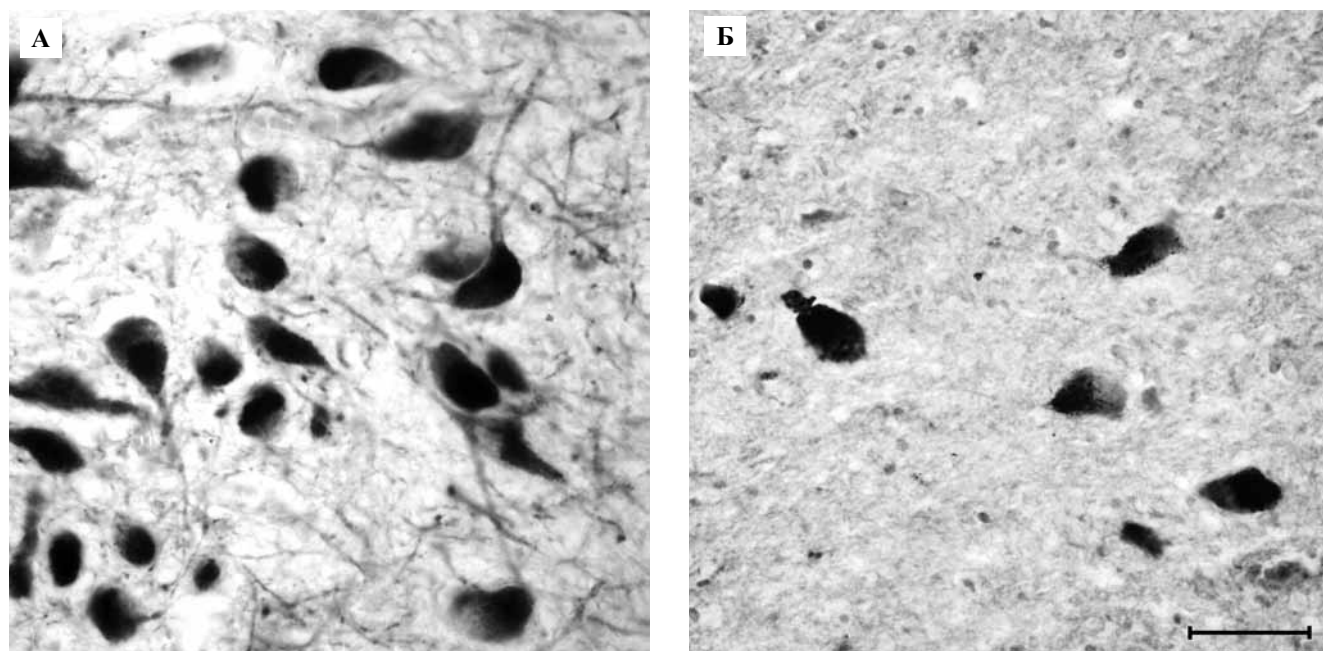


Рис. 2. Дофаминовые нейроны в вентральной области компактной части черного вещества головного мозга. А – у человека без неврологической патологии, 72 года, Б – у человека с болезнью Паркинсона, 70 лет. Изображение в градациях серого. Иммуногистохимическое выявление тирозингидроксилазы. $\times 400$, масштабный отрезок – 100 мкм

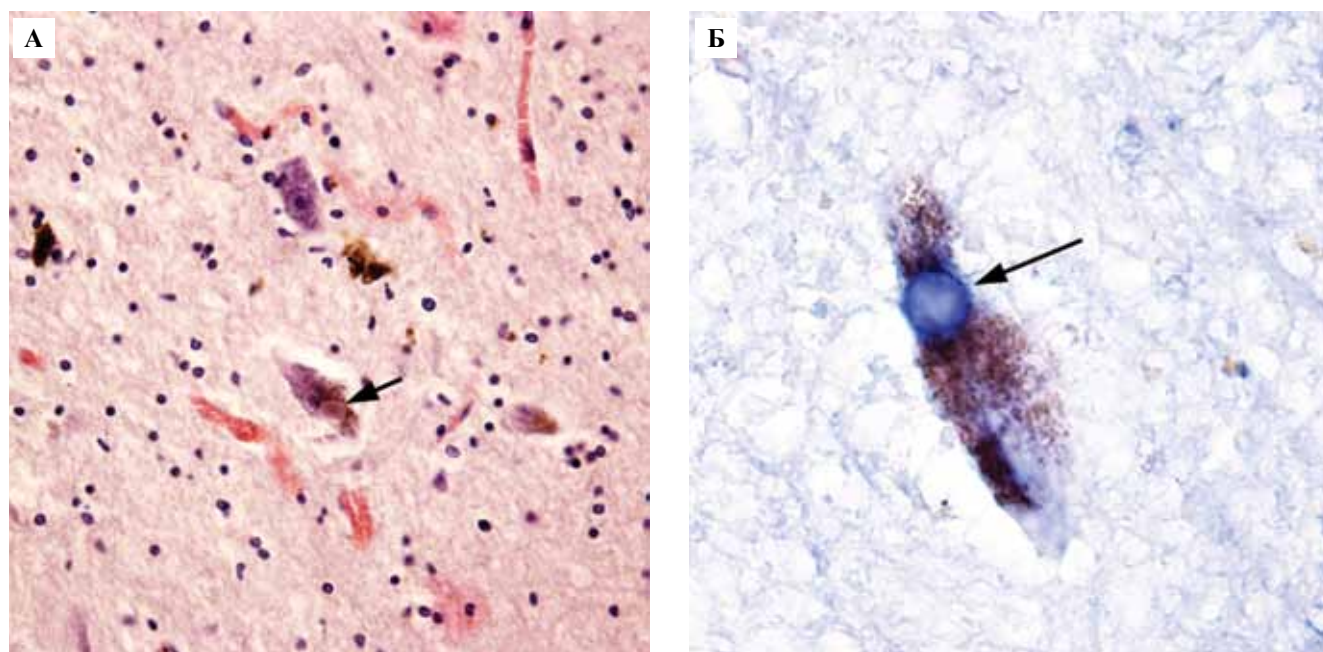


Рис. 3. Тельце Леви в компактной части черного вещества головного мозга у человека с болезнью Паркинсона, 74 года. Тельце Леви показано стрелкой. А – окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$
Б – иммуногистохимическое выявление фосфорилированного по остатку серина-129 α -синуклеина. $\times 400$, фрагмент изображения

Проведенное морфометрическое исследование показало, что по сравнению с контролем у пациентов с БП в вентральной области ЧВкч площадь сечения тел нейронов была на 17% меньше (табл.), плотность расположения нейронов, окрашенных по Нисслю, на 20% меньше, а плотность расположения дофаминовых нейронов на 41% меньше. Выраженное в процентах (%)

соотношение плотности расположения дофаминовых нейронов и плотности расположения нейронов, окрашенных по Нисслю, в группе контроля составляло 76, а у пациентов с БП – 56.

Общая плотность расположения нейроглии в вентральной области у пациентов с БП превышала контрольные величины на 27%, а глиальный индекс был

больше на 59%. Избирательный подсчет отдельных типов нейроглии показал, что по сравнению с общей плотностью расположения нейроглии величины плотности GFAP-позитивной нейроглии составляли 8% в контроле и 11% при БП. Аналогичное сопоставление для S100-позитивной нейроглии выявило, что плотность указанной нейроглии по сравнению с общей плотностью нейроглии составляла 18% в контроле и 17% при БП. При сопоставлении показателей плотности расположения GFAP-позитивной и S100-позитивной нейроглии с соответствующими контролями выяснилось, что при БП первой из них было больше на 77%, а второй на 16% (табл.).

Проведенное исследование показало, что у пациентов с БП общая потеря нейронов в вентральной области ЧВкч была умеренной (20%), а потеря дофаминовых нейронов в 2 раза больше (41%), что соответствует данным других исследователей о том, что при БП потеря дофаминовых нейронов в вентральной области может достигать до 90% и она существенно опережает потерю нейронов, содержащих нейромедин [7]. Общая плотность расположения нейроглии в ЧВкч у пациентов с БП была достоверно выше, чем в контроле, что можно расценить как развитие заместительного глиоза. Об этом свидетельствуют и изменения глиального индекса. Глиальный индекс у пациентов с БП существенно (на 59%) превышал контрольные величины, что было связано не только с потерей нейронов, но и с увеличением общей плотности расположения нейроглии. Подсчет нейроглии, содержащей специфические глиальные маркеры, показал, что число нейроглии, как GFAP-позитивной, так и S100-позитивной, было достоверно выше на единицу площади нервной ткани у пациентов с БП, чем в контроле, что коррелировало с данными других авторов для GFAP [12] и S100 [10]. Вместе с тем по сравнению с контролем у пациентов с БП отношение

плотности расположения GFAP- и S100-позитивной нейроглии к общей плотности расположения нейроглии существенно не менялось. В первом случае оно составляло 0,076 в контроле и 0,11 при БП, а во втором – 0,184 в контроле и 0,168 при БП. Следовательно, несмотря на то, что по сравнению с контролем при БП общая плотность расположения нейроглии увеличивалась, также увеличивалась и плотность расположения GFAP- и S100-позитивной нейроглии, что сохраняло количественные пропорции нейроглии, содержащей специфические белки (GFAP и S100), по отношению к общему числу нейроглии. Такое поддержание баланса GFAP- и S100-позитивной нейроглии при БП может свидетельствовать о важной роли этих популяций нейроглии в структурно-функциональных перестройках клеточных взаимоотношений, присущих нейродегенеративному процессу.

Выявленное нами уменьшение размеров нейронов по сравнению с контролем при БП может быть обусловлено вовлечением протеинов их цитоскелета в процесс патологической агрегации, которым объясняют формирование телец Леви [9].

Заключение

Сравнительное морфометрическое исследование вентральной области в компактной части черного вещества, проведенное на аутопсийном материале головного мозга пациентов с болезнью Паркинсона и людей пожилого возраста (контрольная группа без неврологической симптоматики), позволило обнаружить, что морфометрические показатели нейронов черного вещества при болезни Паркинсона существенно отличались от контрольной группы более низкими величинами. Наибольшее отставание выявили по показателю плотности расположения дофаминовых нейронов. Вместе с тем изменения показателей нейроглии при болезни Паркинсона свидетельствовали о заместительных пе-

Таблица

Морфометрические показатели нейронов и нейроглии вентральной области компактной части черного вещества головного мозга у пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и людей пожилого возраста (контроль)¹

Морфометрический показатель	Контроль ^{II}	БП ^{II}	Отклонение от контроля (%)
Площадь сечения тел нейронов, мкм ²	523,78±8,84	434,92±17,38*	-17
Плотность расположения нейронов	16,32±0,49	13,12±0,33*	-20
Плотность расположения дофаминовых нейронов	12,42±0,21	7,38±0,24*	-41
Общая плотность расположения нейроглии	83,46±1,25	106,11± 1,42*	+27
Плотность расположения GFAP-позитивной нейроглии	6,34±0,29	11,24±0,49*	+77
Плотность расположения S100-позитивной нейроглии	15,34 ± 0,51	17,8 ± 0,33*	+16
Глиальный индекс	5,1	8,1	+59

I – использовали двухвыборочный t-критерий для независимых выборок; II – показатели вариации: M±m (M – среднее значение, m – ошибка среднего); * – p < 0,05 для показателей у пациентов с БП по сравнению с людьми пожилого возраста

рестройках структурного характера в черном веществе головного мозга при этом заболевании, не сопровождавшихся компенсацией нарушенных двигательных функций.

Литература/References

1. Богданов Р.Р., Мананникова Е.И., Абраменко А.С., Маратканова Т.В., Котов С.В. Визуализация дофаминергических структур среднего мозга при болезни Паркинсона // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2013. Т. 7, № 3. С. 31–36. [Bogdanov R.R., Manannikova E.I., Abramenko A.S., Maratkanova T.V., Kotov S.V. Visualization of dopaminergic midbrain structures in Parkinson's disease // *Annaly klinicheskoy i experimental'noy nevrologii*. 2013. V. 7. No 3. P. 31–36. (In Russ.)].
2. Рудакова А.В., Левин О.С. Фармакоэкономические аспекты комбинированной терапии развернутой стадии болезни Паркинсона // *Нервные болезни*. 2017. № 2. С. 30–34. [Rudakova A.V., Levin O.S. Pharmacoeconomic aspects of combined treatment of advanced Parkinson's disease // *Nervnye bolezni*. 2017. V. 2. P. 30–34. (In Russ.)].
3. Alladi P.A., Mahadevan A., Yasha T.C., Raju T.R. et al. Absence of age-related changes in nigral dopaminergic neurons of asian indians: relevance to lower incidence of Parkinson's disease // *Neuroscience*. 2009;159:236–45.
4. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease // *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197–211.
5. Braak H., Sastre M., Del Tredici K. Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease // *Acta Neuropathol*. 2007;114:231–41.
6. Halliday G.M., Stevens C.H. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease // *Mov Disord*. 2011;26(1):6–17.
7. Kordower J.H., Olanow C.W., Dodiya H.B., Chu Y. et al. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease // *Brain*. 2013; 136(8):2419–31.
8. Ross G.W., Petrovitch H., Abbott R.D., Nelson J. et al. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD // *Ann Neurol*. 2004;56(4):532–9.
9. Rudrabhatla P. Regulation of neuronal cytoskeletal protein phosphorylation in neurodegenerative diseases // *J Alzheimers Dis*. 2014;41(3):671–84.
10. Sathe K., Maetzler W., Lang J.D., Mounsey R.B. et al. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway // *Brain*. 2012;135(11):3336–47.
11. Sofroniew M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation // *Trends Neurosci*. 2009;32:638–47.
12. Thannickal T.C., Lai Y.Y., Siegel J.M. Hypocretin (orexin) cell loss in Parkinson's disease // *Brain*. 2007;130(6):1586–95.

MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF THE VENTRAL REGION IN THE SUBSTANTIA NIGRA PARS COMPACTA IN PARKINSON'S DISEASE

V.N. Sal'kov, D.N. Voronkov, R.M. Khudoerkov

The basic quantitative characteristics obtained by computer morphometry of neurons and neuroglia in the substantia nigra pars compacta were evaluated in autopsied brain tissue of elderly people with Parkinson's disease (PD) and of the elderly without any other neurological signs (control group). It was found that the density of neurons, the number of dopamine neurons and the area of their somata were significantly lower in PD compared to the control, and the overall density of neuroglia as well as the density of GFAP – and S100-positive neuroglia were higher in PD. The data demonstrated that the number of neurons was significantly decreased in the substantia nigra pars compacta in PD, but compensatory neurogliosis occurred in response to neuronal death.

Key words: Parkinson's disease, substantia nigra, morphometry, neurons, neuroglia

Информация об авторах

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

Адрес: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. E-mail: vla-salkov@yandex.ru

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

E-mail: neurolab@yandex.ru

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

E-mail: rolbrain@yandex.ru

Контакты: Сальков Владимир Николаевич.

105064, Москва, переулок Обуха, д. 5. Телефоны: +7 (495) 916 34 72, +7 977 265 46 27. E-mail: vla-salkov@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 23 марта 2018 года

© Кутукова К.А., Иванов М.В., 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-9-13

УДК: 616.8-091.817

ИЗМЕНЕНИЯ СОМАТОДЕНДРИТНОЙ СТРУКТУРЫ ШИПИКОВЫХ НЕЙРОНОВ ХВОСТАТОГО ЯДРА ЧЕЛОВЕКА ПРИ СТАРЕНИИ

К.А. Кутукова, М.В. Иванов

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва

Основная причина нарушения моторных функций как при болезни Паркинсона, так и при нормальном старении – комплекс патологических изменений, происходящих в нигростриатной системе головного мозга. Морфологическим субстратом функциональных нарушений в нигростриатной системе является не только убыль нейронов, но и изменения в строении нервных клеток и их отростков. Цель настоящего исследования – охарактеризовать изменения соматодендритной структуры шипиковых нейронов, импрегнированных серебром по методу Гольджи, в хвостатом ядре человека при старении. В старческом возрасте по сравнению со зрелым морфологические изменения шипиковых нейронов включали локальные изменения толщины дендритов (появление истонченных участков, варикознозастоев, колб ретракции), появление сильно увеличенных грибовидных шипиков, филоподий, а также двукратное уменьшение количества шипиков.

Ключевые слова: хвостатое ядро, мозг человека, старение, дендриты, дендритные шипики

В настоящее время в связи с неуклонно повышающейся средней продолжительностью жизни человека особое внимание уделяется изучению патогенетических особенностей старения и ассоциированных с возрастом заболеваний, прежде всего болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. Возрастная инволюция, происходящая при так называемом нормальном, или физиологическом, старении, как и нейродегенеративный процесс при развитии паркинсонизма, включают гибель нейронов, изменения в нейропиле, нарушения нейрорхимических взаимодействий в определенных структурах мозга. Основной причиной нарушения моторных функций как при болезни Паркинсона (БП), так и при нормальном старении является комплекс патологических изменений, происходящих в нигростриатной системе головного мозга и включающих гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции и уменьшение дофаминергической афферентации нейронов хвостатого ядра [14]. В литературе имеются данные об изменениях структуры нейронов черной субстанции, происходящих при нормальном старении и при БП [4, 12]. Вместе с тем возрастные изменения нейронов хвостатого ядра, являющегося ключевой структурой нигростриатной системы, у человека не описаны. Для понимания механизмов возникновения моторного дефицита при развитии паркинсонизма необходимо прежде всего получить представление о пластических процессах, происходящих в нигростриатной системе

при нормальном старении мозга человека. Морфологическим субстратом функциональных нарушений в нигростриатной системе является не только убыль нейронов, но и изменения в строении нервных клеток и их отростков, поэтому целью настоящего исследования стало изучение изменений соматодендритной структуры шипиковых нейронов в хвостатом ядре человека при старении.

Материалы и методы

Для исследования использовали аутопсийный материал мозга людей зрелого возраста (две женщины и три мужчины, возраст от 34 до 57 лет) и старческого возраста (три женщины и два мужчины, возраст от 76 до 89 лет), умерших от заболеваний, не связанных с неврологическими и психическими нарушениями. Взятие материала осуществлялось в течение 5–11 часов после смерти. Образцы аутопсийного материала толщиной 0,5 см, содержащие хвостатое ядро, импрегнировали серебром по методу Гольджи [9], дегидратировали в спиртах восходящей концентрации и ксилолах, заливали в 10% целлоидин и раскладывали на фронтальные срезы толщиной 120–150 мкм. Для дальнейшего исследования брали по пять срезов каждого случая, с которых при помощи микроскопа ORTHOLUX II (Leitz Wetzlar, Германия), оснащенного рисовальным аппаратом, при увеличении объектива $\times 16$ и $\times 25$ были сделаны точные зарисовки шипиковых нейронов со всеми дендритами

(по 30 нейронов каждого случая). Морфометрическое исследование соматодендритной структуры шипиковых нейронов включало измерения зарисованных клеток на дигитайзере (D-Scan, Model. No. DT-3600, Япония) по семи параметрам: площадь тела нейрона (Scl), число дендритов (d), число свободных концов всех дендритов (Bd), наибольший радиус дендритного поля (R), общая длина всех дендритов (Ld), площадь дендритного поля (Sda) и удельная плотность дендритов (Nds) [9]. При увеличении объектива $\times 100$ на участке дендрита, равном 100 мкм, анализировали количество шипиков и их структуру. Достоверность различий между сравниваемыми параметрами устанавливали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни.

Результаты

В хвостатом ядре мозга человека старческого возраста по сравнению со зрелым возрастом были выявлены патологические изменения дендритов. Эти изменения включали варикозные расширения (варикозности) (рис. 1 А, рис. 2 В, Г), истонченные участки дендритов (рис. 1 В, Г), увеличенные места бифуркации дендритов (дендритные площадки) (рис. 1 З). Терминальные участки дендритов часто были истонченными либо, наоборот, заканчивались булавовидными расширениями (рис. 1 А, Б, Ж). Встречались дегенерировавшие дендритные ветви, утолщенные и укороченные до состояния «пеньков» (рис. 2 В, Г). Проксимальные участки дендритов были утолщены, с бугристой поверхностью

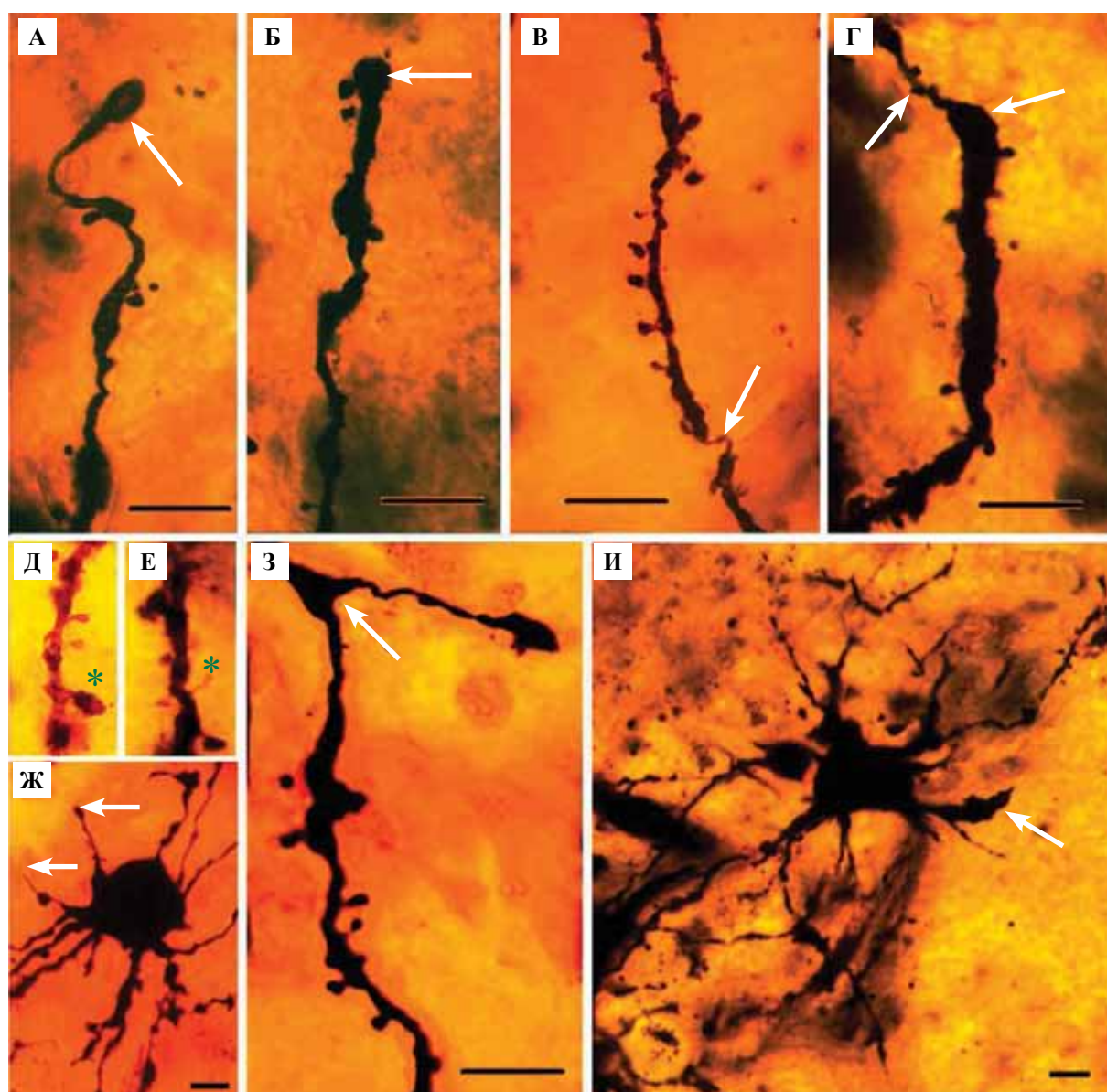


Рис. 1. Изменения дендритов шипиковых нейронов хвостатого ядра человека при старении.

А, Б – колбы ретракции на концах дендритов, В – локальное истончение дендрита, Г – чередование утолщенных и истонченных участков дендрита, Д – гигантский грибовидный шипик, Е – филоподия, Ж – колба ретракции и истончение дендритного окончания, З – увеличенная дендритная площадка, И – утолщение и редукция дендрита.

Масштаб 10 мкм, увеличение на рис. Д и Е такое же, как на рис. А–Г

(рис. 1 И, 2 В). Среди шипиков встречались структуры с сильно увеличенной головкой (гигантские грибовидные шипики) и длинные нитевидные выросты (филоподии) (рис. 1 Д, Е). Описанные изменения наблюдали только приблизительно у 30% изученных нейронов в старческом возрасте. Большинство же импрегнированных нейронов имело нормальную соматодендритную структуру (рис. 2 Б), сходную со структурой нейронов в зрелом возрасте (рис. 2 А).

В старческом возрасте по сравнению со зрелым возрастом выявили значительное уменьшение плотности дендритных шипиков. Количество шипиков на 100 мкм длины дендрита в старческом возрасте было вдвое меньше, чем в зрелом возрасте ($17,3 \pm 2,68$ и $35,8 \pm 0,84$, соответственно) (рис. 3 А). Заметно, что при относительной сохранности крупных грибовидных шипиков более мелкие тонкие шипики практически полностью исчезали (рис. 3 Б, В).

Были получены результаты по семи морфометрическим показателям соматодендритной структуры шипиковых нейронов в зрелом и в старческом возрасте (табл.), однако статистическая обработка данных с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни не выявила статистически значимых различий между исследованными возрастными группами ни по одному из параметров.

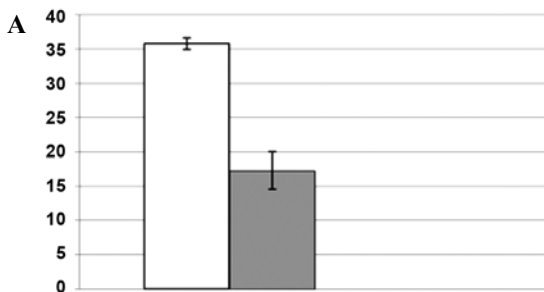


Рис. 3. Снижение плотности дендритных шипиков в старческом возрасте. А – количество шипиков на 100 мкм длины дендрита в зрелом (белый столбик) и старческом (серый столбик) возрасте, среднее±ошибка среднего, Б, В – участки дендритов нейронов хвостатого ядра человека зрелого (Б) и старческого (В) возраста. Масштаб 10 мкм

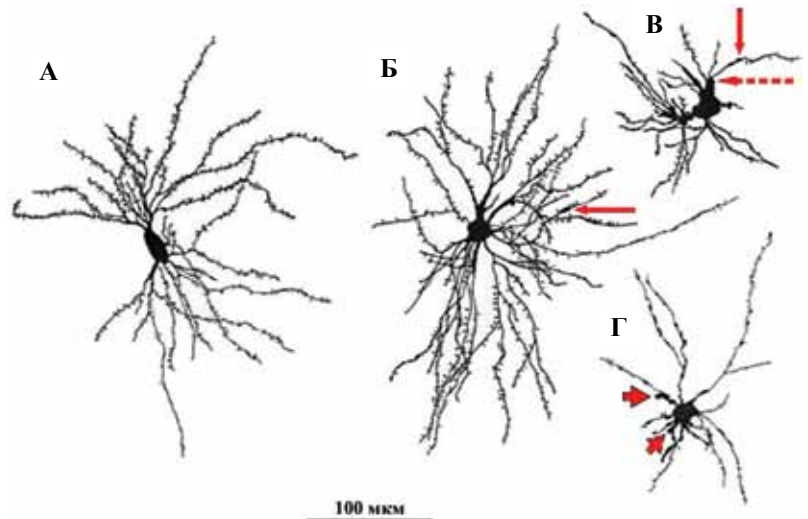
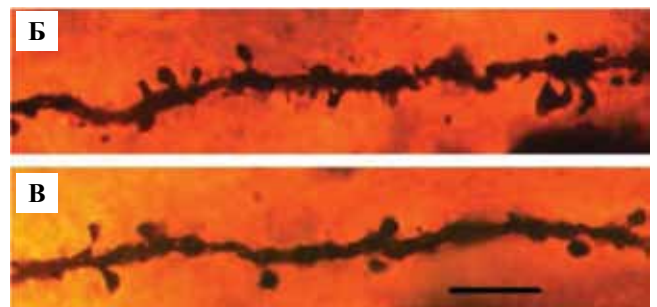


Рис. 2. Изменения шипиковых нейронов хвостатого ядра человека при старении. А – зрелый возраст, Б–Г – старческий возраст. Длинные стрелки – варикозности, короткая стрелка – редуцированная ветвь дендрита, пунктирная стрелка – утолщенный проксимальный сегмент дендрита. Точные зарисовки сделаны при $\times 25$

Обсуждение

В исследованном материале нами выявлено 50% снижение плотности дендритных шипиков в хвостатом ядре при старении, что согласуется с результатами аналогичных исследований на животных [7, 10]. Вместе с тем количественные изменения дендритов шипиковых нейронов у человека в старческом возрасте не выявлены. Вероятно, это связано с тем, что



Таблица

Морфометрические параметры шипиковых нейронов хвостатого ядра в зрелом и в старческом возрасте

Возраст	Scl, мкм ²	d	Bd	R, мкм	Ld, мкм	Sda, мкм ²	Nds
Зрелый	255,7± 19,8	6,1± 0,4	21,4± 1,2	223,5± 4,6	2024,1± 122,7	62252± 3856	351,3± 16,3
Старческий	248,8± 9,6	5,6± 0,3	19,6± 1,0	221,4± 5,9	2022± 146,1	59982± 4379	337,1± 12,7

Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего

в исследованной нами выборке нейронов старческого возраста лишь около 30% нейронов имели признаки атрофии дендритов, в то время как у большинства нейронов морфология дендритного дерева оказалась сохранна. Встречались даже нейроны, дендриты которых были длиннее, чем самые длинные дендриты нейронов в зрелом возрасте. Ранее [1] при исследовании старческих изменений нейронов скорлупы, входящей вместе с хвостатым ядром в состав полосатого тела, по этим же семи морфометрическим параметрам нами было выявлено небольшое (до 15%) снижение наибольшего радиуса дендритного поля, общей длины всех дендритов и площади дендритного поля. По другим параметрам статистически значимые различия не выявлены. При исследовании соматодендритной структуры шипиковых нейронов стриатума человека при БП McNeill и Brown (1988) также выявили уменьшение длины дендритов в путамене, в то время как соматодендритная структура нейронов хвостатого ядра оставалась неизменной [11]. В исследовании на мышах Rafols и McNeill (1987) тоже не выявили количественных морфологических изменений соматодендритной структуры шипиковых нейронов в стриатуме старых мышей по сравнению с молодыми [13]. Как и в нашем исследовании на человеке, у старых мышей, возраст которых составлял 25–30 месяцев, помимо нейронов с признаками атрофии дендритного дерева выявлялись клетки с дендритами нормальной и даже увеличенной длины. Авторы предположили, что продолжающийся в пожилом и старческом возрасте рост дендритов некоторых нейронов может быть проявлением компенсаторного ответа выжившей популяции нейронов на гибель соседних клеток [13]. У человека при БП и на моделях паркинсонизма, как и в нашем исследовании у человека старческого возраста, наблюдается значительная потеря шипиков нейронами стриатума [11, 16]. Вместе с тем при паркинсонизме выявляется сокращение длины и количества дендритов [16], в то время как в нашей выборке нейронов человека старческого возраста таких изменений не наблюдалось. На дендритах шипиковых нейронов в хвостатом ядре, как и ранее в скорлупе [1], у человека старческого возраста было выявлено большое количество варикозностей. Варикозные изменения дендритов выявляются как при нормальном старении, так и при различных нейродегенеративных заболеваниях, в том числе болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона [8]. Их появление связывают с локальными патологическими изменениями цитоскелета, накоплением агрегатов белков и отеком внутрицитоплазматических структур дендрита вследствие деафферентации [3, 6]. Наличие булавовидных расширений, так называемых колб ретракции (retraction bulb), на концах некоторых дендритов свидетельствует о деградаци и втягивании этих отростков [13, 17]. Тем не менее, поскольку нами не было выявлено сокращение длины дендритов в старческом возрасте, можно предположить, что при

атрофии одних дендритов другие могут компенсаторно удлиниться. Филоподии, тонкие нитевидные отростки, обнаруженные нами на дендритах нейронов в старческом возрасте, участвуют в образовании новых синапсов в онтогенезе [6, 15]. Их появление в стареющем мозге связывают с ответно-компенсаторной реакцией дендритов на частичную деафферентацию. Филоподия, отходя от дендритного ствола по направлению к аксону, образует с ним контакт, затем укорачивается и превращается в зрелый шипик [6]. К компенсаторным реакциям дендритов на деафферентацию относят и появление гигантских шипиков, несущих на своей поверхности увеличенные синапсы [5], которое наблюдается как при нормальном старении [7, 10], так и при нейродегенеративных заболеваниях, например болезни Альцгеймера [2].

Заключение

В старческом возрасте были обнаружены деструктивные морфологические изменения дендритов и дендритных шипиков: появление крупных варикозностей, истонченных участков дендритов, колб ретракции, а также значительная элиминация шипиков. Вместе с тем выявлены и компенсаторно-гиперпластические изменения дендритов, такие как появление anomalно увеличенных грибовидных шипиков и филоподий, увеличение длины отдельных дендритов, которые свидетельствуют о возможности пластических репаративных изменений и могут служить целью для терапевтического воздействия для замедления процессов старения и при лечении нейродегенеративных заболеваний. Полученные результаты расширяют представление о пластических изменениях, происходящих в хвостатом ядре человека при старении, и служат основой для изучения процессов, происходящих при патологическом старении, прежде всего при развитии болезни Паркинсона.

Литература/References

1. Иванов М.В., Кутукова К.А., Бережная Л.А. Изменения соматодендритной структуры шипиковых нейронов скорлупы человека при физиологическом старении // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2017. Т. 11, № 2. С. 42–47. [Ivanov M.V., Kutukova K.A., Berezhnaya L.A. Alterations in the somatodendritic structure of spiny neurons in human putamen during physiological aging // *Annals of clinical and experimental neurology*. 2017. V. 11, No 2. P. 42–47. (In Russ.)].
2. Baloyannis S.J. Dendritic pathology in Alzheimer's disease // *J Neurol Sci*. 2009;283(1–2):153–7.
3. Bodick N., Stevens J.K., Sasaki S., Purpura D.P. Microtubular disarray in cortical dendrites and neurobehavioral failure. II. Computer reconstruction of perturbed microtubular arrays // *Brain Res*. 1982;281(3):299–309.
4. Cruz-Sánchez F.F., Cardozo A., Tolosa E. Neuronal changes in the substantia nigra with aging: a Golgi study // *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995;54(1):74–81.

5. *Fiala J.C., Spacek J., Harris K.M.* Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? // *Brain Res Rev.* 2002;39(1):29–54.
6. *Harris K., Spacek J.* Dendrite structure. In: G. Stuart, N. Spruston, M. Hausser (eds.). *Dendrites*. 3rd ed. Oxford: Oxford university press, 2016. 616 p.
7. *Itzev D., Lolova I., Lolov S., Usunoff K.G.* Age-related changes in the synapses of the rat's neostriatum // *Arch Physiol Biochem.* 2001;109:80–9.
8. *Kweon J.H., Kim S., Lee S.B.* The cellular basis of dendrite pathology in neurodegenerative diseases // *BMB Rep.* 2017;50(1):5–11.
9. *Leontovich T.A., Fedorov A.A., Mukhina J.K., Mikhalchenko N.A. et al.* Neuron species and neuron categories of human striatum. Moscow: Publishing House «Sputnik +», 2015. 132 p.
10. *Levine M.S., Adinolfi A.M., Fisher R.S., Hull C.D. et al.* Quantitative morphology of medium-sized caudate spiny neurons in aged cats // *Neurobiology of aging.* 1986;7(4):277–86.
11. *McNeill T.H., Brown S.A., Rafols J.A., Shoulson I.* Atrophy of medium spiny I striatal dendrites in advanced Parkinson's disease // *Brain Res.* 1988;455(1):148–52.
12. *Patt S., Gertz H.J., Gerhard L., Cervós-Navarro J.* Pathological changes in dendrites of substantia nigra neurons in Parkinson's disease: a Golgi study // *Histol Histopathol.* 1991;6(3):373–80.
13. *Rafols J.A., McNeill T.H.* Age-related dendritic changes of spiny and aspiny neurons in the rodent striatum. In: M.B. Carpenter, A. Jayaraman (eds). *The Basal Ganglia II: Structure and Function—Current Concepts.* Advances in Behavioral Biology. V. 32. New York: Springer, 1987. 548 p. P. 227–240.
14. *Rodriguez M., Rodriguez-Sabate C., Morales I., Sanchez A. et al.* Parkinson's disease as a result of aging // *Aging Cell.* 2015;14(3):293–308.
15. *Shirao T., González-Billault C.* Actin filaments and microtubules in dendritic spines // *J Neurochem.* 2013;126(2):155–64.
16. *Villalba R.M., Smith Y.* Loss and remodeling of striatal dendritic spines in Parkinson's disease: from homeostasis to maladaptive plasticity? // *J Neural Transm (Vienna).* 2018;125(3):431–47.
17. *Williams D.W., Truman J.W.* Cellular mechanisms of dendrite pruning in *Drosophila*: insights from in vivo time-lapse of remodeling dendritic arborizing sensory neurons // *Development.* 2005;132(16):3631–42.

ALTERED SOMATODENDRITIC STRUCTURE OF SPINY NEURONS IN CAUDATE NUCLEUS IN AGING HUMANS

K.A. Kutukova, M.V. Ivanov

The complex of pathological changes occurring in the nigrostriate system is the main cause of impairment of motor function in Parkinson's disease as well as in normal aging. The morphological substrate of functional impairment in the nigrostriate system is not only the loss of neurons, but also altered structure of neurons and their processes. The purpose of this study is to characterize the changes in the somatodendritic structure of Golgi-impregnated spiny neurons in the human caudate nucleus in aging. In old age group compared to middle age group, the morphological changes in spiny neurons included local changes in the thickness of the dendrites (appearance of thinned patches, varicosities, retraction bulbs), the occurrence of abnormally enlarged mushroom spines, filopodia, and two-fold decrease in the quantity of spines.

Key words: caudate nucleus, human brain, aging, dendrites, dendritic spines

Информация об авторах

Кутукова Кристина Александровна – младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

Адрес: Москва, 125367, Волоколамское шоссе, д. 80. E-mail: chrisbiomag@mail.ru

Иванов Михаил Викторович – младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфохимии отдела исследований мозга Научного центра неврологии.

E-mail: kitazatot@yandex.ru

Контакты: Кутукова Кристина Александровна.

105064, Москва, пер. Обуха, д. 5. Научный центр неврологии, отдел исследований мозга.

Телефоны: +7 916 503 36 16, +7 925 714 22 06. E-mail: chrisbiomag@mail.ru

Материал поступил в редакцию 7 июня 2018 года

© Коллектив авторов, 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-14-17

УДК: 616-091, 616.346.2-002.1

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ОСТРОГО АППЕНДИЦИТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА И ПОЛА

А.А. Каниболоцкий², П.О. Свищева², О.В. Макарова¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

² ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского», Москва

Цель работы – оценить распределение частоты заболеваемости острым аппендицитом, его клинико-морфологических форм, а также осложнений по возрасту и полу. Проведено исследование червеобразных отростков, полученных при аппендэктомии от 728 пациентов с 2013 по 2016 год. Пациенты были разделены по полу и возрастным группам. В каждой возрастной группе проводили оценку частоты тех или иных клинико-морфологических форм аппендицита и его осложнений. Частота заболеваемости острым аппендицитом выше у мужчин. По клинико-морфологическим группам как у мужчин, так и у женщин чаще встречался флегмонозный аппендицит. Пик заболеваемости острым аппендицитом приходился на возрастную группу пациентов от 20 до 29 лет, а после 70 лет число больных было минимальным. Осложнения, связанные с воспалением червеобразного отростка – перитонит, аппендикулярный инфильтрат, абсцесс брюшной полости, наблюдались у 93 пациентов и чаще встречались у мужчин в возрастных группах 30–39 и 50–59 лет. Среди них наиболее частыми были перитонит и абсцесс в брюшной полости. Начиная с 70 лет число осложненных форм острого аппендицита уменьшалось.

Сделан вывод, что возраст 20–29 лет и мужской пол являются факторами риска возникновения осложненных форм острого аппендицита. Наиболее частая морфологическая форма – флегмонозная, наиболее частые осложнения – перитонит и абсцесс брюшной полости.

Ключевые слова: острый аппендицит, клинико-морфологические формы

Острый аппендицит – наиболее частая причина синдрома острого живота среди пациентов трудоспособного возраста, требующая хирургического вмешательства. Основная лечебная тактика при этом заболевании – аппендэктомия. Смертность от осложнений острого аппендицита составляет от 0,5 до 10% [9, 12]. Клиническая картина острого аппендицита не всегда представлена определенным комплексом симптомов. По данным V.Y. Kong et al. [8], симптоматика в 68% случаев характеризуется неспецифической абдоминальной болью. Данную хирургическую патологию может имитировать ряд других заболеваний: почечная колика, внематочная беременность, воспалительные заболевания яичников и инфекционные заболевания кишечника. Чаще всего дифференциальный диагноз проводится с гинекологической патологией, острым холециститом и функциональными расстройствами кишечника. Необходимо также отметить, что тяжесть состояния пациента далеко не всегда соответствует клинико-морфологической форме острого аппендицита, например гангренозная форма может сопровождаться слабо выраженными симптомами интоксикации. Процент расхождений клинического и морфологического диагнозов при так называемом ложном («белом») ап-

пендиците достигает 19,6 [12]. В педиатрической практике нередко бывает трудно вовремя диагностировать острый аппендицит, потому что он клинически может манифестировать как острая кишечная инфекция [1].

Вопросы этиологии и патогенеза острого аппендицита остаются дискуссионными. Раньше считали, что этиологическими факторами развития аппендицита являются обтурация просвета и повышение давления внутри червеобразного отростка, что приводит к некрозу и воспалению стенки. Позднее было показано, что значительный вклад в развитие воспалительных изменений вносят нарушения количественного и качественного соотношения компонентов микрофлоры, эпителиального барьера, иммунной системы [11, 13].

Несмотря на множество работ по изучению острого аппендицита, единой универсальной классификации его клинико-морфологических форм не существует, что препятствует проведению сравнительного анализа данных в опубликованных работах. Некоторые отечественные исследователи [4] используют классификацию В.И. Колесова, в которой дополнительно выделено понятие «осложненный аппендицит» [3]. Первая морфологическая классификация была предложена в 1891 году С. McBurney [10], в ней выделялись три

формы аппендицита: 1) катаральный (с неповрежденной слизистой оболочкой), 2) гнойный – деструктивные изменения с гнойно-бактериальной инфильтрацией стенки и 3) аппендицит, осложненный перитифлитом и периаппендицитом. Позже было разработано много классификаций, и одна из наиболее рациональных предложена А.В. Русаковым в 1951 году [6]. В соответствии с этой классификацией выделяют следующие формы аппендицита: острый простой; острый деструктивный, включающий его варианты – флегмонозно-язвенный, апостематозный, флегмонозный, гангренозный. Особое внимание следует уделить последним двум вариантам, так как нет морфологических критериев, позволяющих проводить их дифференциальную диагностику.

В монографии П.Ф. Калитеевского [2], указано, что клинический диагноз «гангренозный аппендицит» хирурги ставят довольно часто, но морфологически он подтверждается только в 1% случаев. Обычно хирурги ошибочно принимают черный цвет удаленного аппендикса за гангренозные изменения, однако этот цвет, как считает П.Ф. Калитеевский, обусловлен изменением пигмента крови под воздействием газов кишечника. В отличие от флегмонозного аппендицита при данном варианте наблюдается циркулярный некроз нескольких сосудистых сегментов или всего отростка. Флегмонозный аппендицит характеризуется лейкоцитарной инфильтрацией, которая может быть диффузной и иметь относительно равномерный характер на фоне более или менее выраженного отека отростка, а также микроабсцессами, локализованными в центре лимфоидных узелков. При наличии язв воспалительный процесс рассматривается как флегмонозно-язвенный.

В Национальном руководстве по патологической анатомии [5] выделяют следующие морфологические формы аппендицита: простой, поверхностный, флегмонозный, гангренозный.

В настоящее время действующей клинической классификацией острого аппендицита и его осложнений является МКБ-10, согласно которой выделяют острый аппендицит с генерализованным перитонитом; аппендицит (острый) с прободением, перитонитом (разлитым), разрывом. K35.1 Острый аппендицит с перитонеальным абсцессом; абсцесс червеобразного отростка. K35.9 Острый аппендицит неуточненный; острый аппендицит без прободения, перитонеального абсцесса, перитонита, разрыва.

Целью нашей работы была оценка распределения частоты заболеваемости острым аппендицитом, его клинико-морфологических форм, а также осложнений по возрасту и полу.

Материалы и методы

Проведено исследование червеобразных отростков, полученных при аппендэктомии от 728 пациентов хирургического отделения городской клинической больницы имени Е.О. Мухина Департамента здравоохранения города Москвы с 2013 по 2016 год. Пациенты

были разделены по полу и возрастным группам (20–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69, 70–79, 80–89, 90–99 лет). В каждой возрастной группе проводили оценку частоты тех или иных клинико-морфологических форм аппендицита и его осложнений.

Доставленный в патологоанатомическое отделение аппендикс после описания его внешнего вида был вскрыт для оценки состояния слизистой оболочки и характера содержимого. Для гистологического исследования получали поперечные срезы из разных отделов отростка. Данная методика является общепринятой, однако она не позволяет провести оценку состояния стенки на всем протяжении, поэтому, на наш взгляд, целесообразно продольное вскрытие отростка.

Результаты

Среди 728 пациентов с диагнозом «острый аппендицит» было 300 женщин и 428 мужчин. Недеструктивные формы аппендицита (простой и поверхностный) у мужчин составляли 3,15%, у женщин – 4,5%; флегмонозный аппендицит был диагностирован у 45% мужчин и 28,5% женщин, гангренозный встречался в 10,7% и 8,2% случаев, соответственно. Пик заболеваемости острым аппендицитом приходился на возрастную группу пациентов от 20 до 29 лет – 302 человека (70%), в возрастной группе 30–70 лет было постепенное уменьшение числа пациентов (202), а после 70 лет их число было минимальным (17). Среди прооперированных пациентов преобладали мужчины в возрастной группе 20–29 лет (191 человек), из них с флегмонозной формой аппендицита – 79 человек. Простая и поверхностная форма аппендицита была наиболее редкой (56 человек), гангренозная форма обнаружена у 138 человек. Она встречалась в возрастных группах 20–29 и 40–49 лет (рис. 1). Осложнения, связанные с воспалением червеобразного отростка – перитонит, аппендикулярный инфильтрат, абсцесс брюшной полости, наблюдались у 93 пациентов (12,4%) и чаще встречались у мужчин в возрастных группах 30–39 лет (15 пациентов) и 50–59 лет (14 пациентов). Среди них наиболее частыми были перитонит – 75 случаев (81%) и абсцесс в брюшной полости, развившийся у 11 пациентов (12%). Наиболее редким осложнением являлся аппендикулярный инфильтрат – семь случаев (8%). Следует отметить, что начиная с 70 лет число осложненных форм острого аппендицита уменьшалось (рис. 2).

Обсуждение

Представленные нами результаты совпадают с данными зарубежных и отечественных исследователей [4, 7, 9, 12]. Во всех этих работах были выявлены различия показателей заболеваемости острым аппендицитом среди мужчин и женщин разных возрастных групп, отмечалось преобладание пациентов-мужчин, у которых чаще диагностировались деструктивные формы. Наибольшее число пациентов независимо от пола,

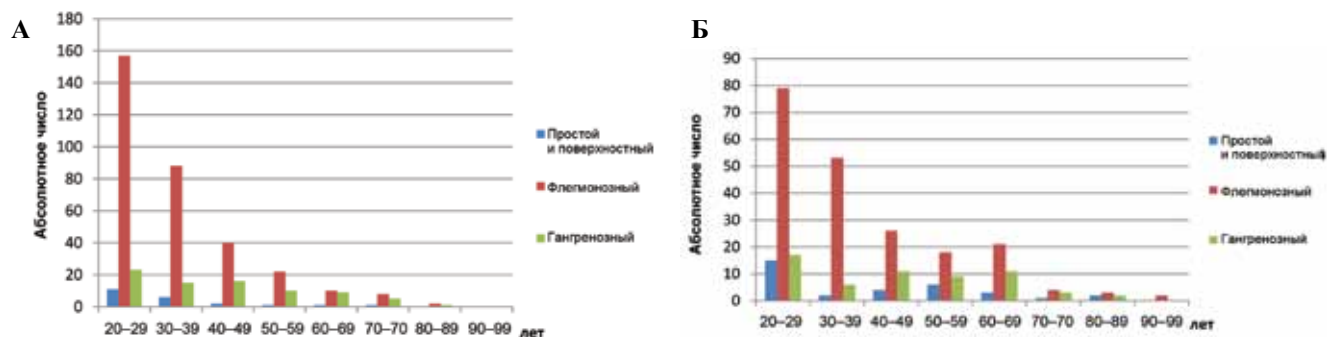


Рис. 1. Распределение по возрасту частоты встречаемости различных форм острого аппендицита за 2013–2016 годы среди мужчин (А) и женщин (Б)

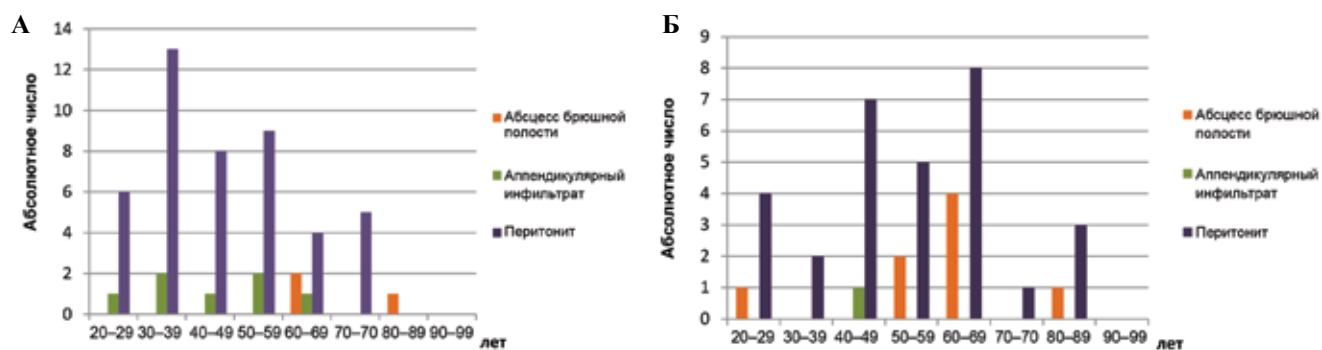


Рис. 2. Частота осложнений острого аппендицита за 2013–2016 годы среди мужчин (А) и женщин (Б)

по данным А.Р. Lima и М. Ceresil [7, 8], приходилось на возраст 20–29 лет.

Наши данные по осложнениям совпадают с результатами G.Y. Stein [12] – у женщин чаще наблюдался абсцесс брюшной полости, а у мужчин – перитонит. Тем не менее Ю.В. Берингер и А.И. Гошкинка, проводившие исследование в 1950-х годах, показали, что наибольшая частота встречаемости острого аппендицита наблюдалась у женщин [3]. Это, очевидно, связано с тем, что авторы анализировали клинические данные, а у женщин абдоминальный болевой синдром может не только наблюдаться при остром аппендиците, но и быть следствием инфекционно-воспалительных, гинекологических, урологических заболеваний.

Выводы

1. Острый аппендицит наиболее часто выявляется в возрасте 20–29 лет, и среди этой возрастной группы преобладают мужчины.
2. Среди морфологических форм чаще встречается флегмонозный аппендицит, и он наиболее распространен у мужчин.
3. Возраст 20–29 лет и мужской пол являются факторами риска возникновения осложненных форм острого аппендицита

Литература/References

1. Дьяконова Е.Ю., Поддубный И.В. Острая кишечная инфекция как маска острого аппендицита у детей // Педиатрическая

фармакология. 2016. Т. 13, № 1. С. 51–53 [Dyakonova E.Y., Poddubny I.V. Acute intestinal infections as a mask of acute appendicitis in children // *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2016. V. 13, No 1. P. 51–53. (In Russ.)].

2. Калитеевский П.Ф. Болезни червеобразного отростка. М.: Медицина, 1970. 203 с. [Kaliteevsky P.F. Diseases of appendix. M.: Medicina, 1970. 203 p. (In Russ.)].

3. Колесов В.И., ред. Острый аппендицит. М.: Медгиз, 1959. 290 с. [Kolesov V.I., ed. Acute appendicitis. M.: Medgiz, 1959. 290 p. (In Russ.)].

4. Мустафин Т.И., Александрова Н.В. Клинико-анатомический анализ при остром аппендиците // Ульяновский медико-биологический журнал. 2013. № 2 С. 25–28 [Mustafin T.I., Aleksandrova N.V. Clinical and anatomical analysis for acute appendicitis // *Ulyanovsky medico-biologicheskyy journal*. 2013. V. 2. P. 25–28. (In Russ.)].

5. Пальцев М.А., Кактурский Л.В., Зайратьянц О.В., ред. Патологическая анатомия: Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 1264 с. [Paltsev M.A., Kaktursky L.V., Zairatyants O.V., eds. Pathological anatomy: National guidelines. M.: GEOTAR-Media, 2014. 1264 p. (In Russ.)].

6. Русаков А.В. Труды института им. Н.В. Склифосовского. М., 1957. Т. 4. Ч. 1. С. 26 [Rusakov A.V. The works of the N.V. Sklifosovsky institute. M., 1957. V. 4. Pt. 1. P. 26 (in Russ.)].

7. Ceresoli M., Zucchi A. Acute appendicitis: Epidemiology, treatment and outcomes analysis of 16544 consecutive cases // *World J Gastroint Surg*. 2016;8 (10):693–9.

8. Kong V.Y., Sartorius B. Acute appendicitis in the developing world is a morbid disease // *Ann R Coll. Surg. Engl*. 2015;97:390–5.

9. Lima A.P., Felipe J.V. Clinical-epidemiological profile of acute appendicitis: retrospective analysis of 638 cases // *Rev Col Bras Cir.* 2016;43(4):248–53.
10. McBurney Ch. Experience with early operative interference in cases of disease of the vermiform appendix // *New York Med. Journal.* 1889;I:676–83.
11. Salo M., Marungruang N. Evaluation of the microbiome in children's appendicitis // *Int J Colorectal Dis.* 2017;32(1):19–28.
12. Stein Y.G., Rath-Wolfson L. Sex differences in the epidemiology, seasonal variation, and trends in the management of patients with acute appendicitis // *Langenbecks Arch Surg.* 2012;397:1087–92.
13. Zhong D., Brower-Sinning R. Acute appendicitis in children is associated with an abundance of bacteria from the phylum Fusobacteria // *Journal of Pediatric Surgery.* 2014;49:441–6.

CLINICAL MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF VARIOUS FORMS OF ACUTE APPENDICITIS DEPENDING ON AGE AND GENDER

A.A. Kanibolotskiy, P.O. Svishcheva, O.V. Makarova

The aim of the work was to assess the distribution of the incidence of acute appendicitis, its clinical and morphological forms as well as complications depending on age and gender. The study of appendiceal processes obtained during appendectomy from 728 patients in years 2013 to 2016 was carried out. Patients were divided into gender and age groups. In each age group, the frequency of certain clinical and morphological forms of appendicitis and its complications was assessed. The incidence of acute appendicitis was higher in men. Phlegmonous appendicitis was more common in both men and women. The incidence of acute appendicitis reached a peak in the age group of patients from 20 to 29 years, and after 70 years the number of patients was minimal. Complications associated with inflammation of the appendix, such as peritonitis, appendicular infiltrate, and abdominal abscess, were detected in 93 patients, and they were more common in men in the age groups from 30 to 39 years and from 50 to 59 years. Among them, the most frequent were peritonitis and abscess in the abdominal cavity. The number of complicated forms of acute appendicitis has decreased after age 70 years. It is concluded that the age of 20–29 years and the male sex are risk factors for the occurrence of complicated forms of acute appendicitis. The most common morphological form is phlegmonous appendicitis; the most frequent complications are peritonitis and abdominal abscess.

Key words: acute appendicitis, clinical morphological forms

Информация об авторах

Каниболоцкий Александр Алексеевич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий патологоанатомическим отделением НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

Адрес: 129090, Москва, Большая Сухаревская площадь, д. 3. Телефон +7 910 464 58 83. E-mail: dr.kaa@mail.ru

Свищева Полина Олеговна – ординатор отдела патологической анатомии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

Адрес: 129090, Москва, Большая Сухаревская площадь, д. 3. E-mail: polinaartamonova@yandex.ru

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

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

Материал поступил в редакцию 14 июня 2018 года

ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОНОЛОГИИ И ДИНАМИКИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ГОНАД И ГАМЕТ ЧЕЛОВЕКА

М.И. Штаут, Л.Ф. Курило

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

В ядрах половых клеток гонад эмбрионов, плодов и новорожденных мальчиков на стадии прелептотены происходит только конденсация хромосом, не отмечена их деконденсация (в отличие от половых клеток в случае женского пола). В ядрах половых клеток женских антенатальных гонад развитие мейоза протекает до стадии диплотены, развивается фолликулогенез.

Ключевые слова: сперматогенез, оогенез, прелептотенная стадия профазы I мейоза, прохромосомы, неонатальные яички

Первичные половые клетки формируются у эмбрионов млекопитающих из клеток эпибласта [4] и мигрируют в область формирования гонад у человека на 35–36-й день после оплодотворения [7]. В половозрелом организме сперматоцит I деления мейоза через два редукционных деления образует четыре клетки (сперматогонии), равно потенциальные для оплодотворения. Ооцит I (в антенатальном яичнике) в результате I деления мейоза разделяется на ооцит II и редукционное (полярное) тельце. В результате II деления мейоза редукционное тельце делится на две клетки (вторичные полярные тельца), а ооцит II разделяется на яйцеклетку с основным количеством цитоплазмы и второе полярное тельце (редукционное тельце). В оогенезе метафаза I наступает не сразу после прохождения гаметами длительных стадий профазы I мейоза. Ооциты переходят (у плода седьмого месяца антенатального развития) [3] в специфическую для оогенеза стадию – диктиотену [2, 6]. В половозрелый период за длительной стадией диктиотены следует формирование кариосферы (хромосомы вновь конденсируются и концентрируются вокруг ядрышка в плотную кольцеобразную массу), и лишь затем наступают диакинез [6], метафаза I и далее, до формирования гаплоидной яйцеклетки в созревшем преовуляторном фолликуле.

Для женского организма рекомбинация наследственных структур на стадии пахитены профазы I мейоза происходит в антенатальный период. Другими словами, после конъюгации гомологичных родительских хромосом в зиготене и кроссинговера – обмена участками между гомологичными родительскими хромосомами – в пахитене профазы I мейоза каждая половая клетка (ПК) содержит уникальный геном, включающий гены хромосом отца и матери [6]. Для мужского организма

такие события рекомбинации наследственных структур как конъюгация родительских хромосом в зиготене и кроссинговера в пахитене профазы I мейоза проходят постнатально, с наступлением полового созревания.

Разнообразные, проявляющиеся и морфологически, преобразования митотических и мейотических хромосом, их моделирование и ремоделирование исследуют с целью сравнительного анализа количественных показателей соотношения половых и соматических клеток в процессе дифференцировки гонад у человека как на основе количественных данных, так и через описание морфологической специфичности стадий и хронологии развития ПК. При этом остаются фрагментарно обсуждаемыми вопросы о биологическом смысле различий хронологии и морфологических преобразований хроматина на стадиях профазы I мужского и женского мейоза, особенно событий преобразования хроматина на прелептотенных стадиях профазы I мейоза, на других этапах полоспецифических уникальных процессов дифференцировки гамет и гонад [2, 6, 10–13].

Материалы и методы

В работе использовали материал искусственного прерывания беременности на сроках от 6,5 недели внутриутробного развития человека. Были исследованы срезы от 21 гонады эмбрионов и плодов человека (разных сроков развития) и срезы от 11 половых желез новорожденных мальчиков (табл.). Фиксацию гонад проводили в смеси Буэна. После фиксации материала его обезвоживали по спиртам восходящей концентрации и ксилолу. Готовили срезы толщиной 6–8 мкм, которые после их депарафинирования окрашивали гематоксилином Эрлиха с докраской 1% эозином и затем заключали в канадский бальзам. Для количественного

Таблица

Количественные характеристики состава соматических и половых клеток в гонадах эмбрионов и плодов человека женского и мужского пола, а также новорожденных мальчиков

Группы по возрасту и полу, число эмбрионов, плодов, или новорожденных в группе	Поля зрения (соотношение ПК и соматических клеток)	Доля ПК от общего количества соматических клеток и ПК, %	Доля ПК в митозе от общего количества ПК, %	Доля ПК на прелептотенной стадии в ядрах ПК от общего количества ПК, %	Доля ПК в состоянии дегенерации от общего количества ПК, %
Индифферентные гонады, n=5	330 (904 / 8291)	14,80±10,37 (9,21–33,29)	6,23 ± 2,34 (3,17–9,02)	7,95 ± 5,02 (4,76–16,79)	7,59±6,01 (2,91–17,54)
Гонады эмбрионов и плодов женского пола до 18 недель после оплодотворения, n=3	34 (134 / 307)	8,00±6,61 (2,1–15,14)	7,53±1,9 (5,26–8,33)	7,55±5,15 (0,90–8,33)	3,44±2,27 (0,90–5,26)
Гонады плодов женского пола с 18 недель после оплодотворения, n=4	39 (206 / 979)	11,83±4,15 (5,92–15,27)	4,58±3,92 (1,96–10,34)	4,93±3,75 (2,22–13,33)	8,39±9,43 (1,96–22,41)
Гонады эмбрионов мужского пола 6,0–7,5 недели, n=4	281 (583 / 4944)	12,75±2,96 (9,51–16,67)	1,27±0,88 (0,51–2,38)	2,92±1,01 (2,33–4,43)	6,25±5,66 (0,51– 12,03)
Гонады плодов мужского пола после 8 недель антенатального развития, n=5	342 (687 / 7203)	12,33±4,86 (6,19–17,57)	5,67±5,55 (1,67–13,24)	6,11±7,20 (1,83–18,84)	5,65±2,98 (2,50–9,13)
Яички новорожденных мальчиков и мальчиков грудного возраста, n=11	683 (1488 / 15630)	10,33±2,50 (5,71–15,12)	–	6,42±7,14 (0,00–23,01)	16,16±18,36 (1,32–64,52)

анализа состава клеток на серийных срезах гонад использовали следующие параметры: доля подсчитанных ПК и отдельно соматических клеток (разных типов соматических клеток гонад, среди которых развивались ПК: недифференцированные соматические в случае индифферентных гонад, фолликулярные и прегранулезные соматические клетки в случае женских гонад, клетки Лейдига и Сертоли в случае мужских гонад), от суммы ПК и соматических клеток, в процентах; доля гамет на разных стадиях дифференцировки (сперматогонии и оогонии, ПК в митозе, ПК на прелептотенной стадии, ПК в дегенерации, ооциты на стадиях от лептотены до диплотены профазы I мейоза), в процентах от общего числа подсчитанных ПК [6].

Исходя из имеющихся данных литературы и собственных наблюдений, период антенатального развития человека был поделен на несколько условных возрастных групп с учетом пола эмбрионов и плодов [6]: индифферентные гонады; гонады от эмбрионов и плодов человека женского пола до 18 недель после оплодотворения; гонады плодов женского пола с 18 недель после оплодотворения (в процессе активного фолликулообразования) до 34 недель после оплодотворения; гонады от эмбрионов и плодов человека мужского пола 6–7,5 недели после оплодотворения; после 8 недель антенатального развития мужского организма, когда

между извитыми семенными канальцами эмбрионального типа уже локализованы мезенхимные клетки, которые у половозрелых мужчин разовьются в клетки Лейдига.

Развитие профазы I мейоза в мужском организме происходит только до стадии прелептотенной конденсации хромосом в прохромосомы, то есть не оканчивается в антенатальном периоде, поэтому мы проанализировали отдельную возрастную группу новорожденных мальчиков (сроки развития: 1 день – 10 дней) и мальчиков грудного возраста (11 дней – 1 год). Использован материал эмбрионов и плодов из архивной коллекции Медико-генетического научного центра, полученной лабораторией генетики нарушения репродукции в 1970–1980-е годы из секционного материала аборт по медицинским показаниям или спонтанных аборт. Выражаем благодарность доктору медицинских наук, профессору А.Ф. Астраханцеву за предоставленный секционный материал гонад мальчиков, новорожденных и грудного возраста, собранный в 1970–1990-е годы, из архивной коллекции Рязанского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова. Получение материала, интерпретация результатов строго соответствуют требованиям, предъявляемым нормами международной медицинской биоэтики.

Статистический анализ результатов выполняли с использованием программы StatSoft Statistica 8 (Dell Technologies, США). Статистическое сравнение полученных данных проводили, применяя параметрический t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Клеточный состав исследованных гонад в группах по возрасту и полу представлен в таблице. Доля ПК от суммы клеток, подсчитанных в гонадах ранних сроков (до 6 недель беременности), индифферентных по половой структуре, составляет от 9,21 до 33,29% (табл.), 3,17–9,02% ПК вступают в митоз.

В гонаде организма женского пола (рис. 1 А, Б) формирование пула ПК обеспечивается активной пролиферацией оогониев (1,96–10,34% митозов) в эмбриогенезе и дегенерацией ПК разных стадий. При постепенном вступлении ПК в митоз начинается дегенерация, более интенсивная (из-за уникальности материала и немногочисленности выборки незначимо

статистически) при развитии гонад у плодов мужского пола (5,91%±4,07% ПК в состоянии дегенерации), чем женского (6,27%±7,29%). Прелептотенная конденсация (рис. 2 А) хромосом (0,90–8,33% от ПК в раннем антенатальном оогенезе) начинается с появления тонких волокон, собирающихся вокруг хромоцентров из центрального гетерохроматина. Существенным отличием динамики преобразования хроматина в ядрах мужских ПК от таковой в ядрах женских ПК (рис. 1 Б) является отсутствие этапа деконденсации (рис. 2 Б, В) хроматина (прохромосом) во время прелептотены в ядрах ПК яичка. Кроме того, степень конденсации хромосом в мужских ПК не достигает степени, характерной для женских ПК (рис. 1 Б), мужские ПК не переходят к лептотене в антенатальном периоде [9]. В мужской гонаде (рис. 1 В, Г) формируется блок митозов до полового созревания [15].

При сравнении групп с мужскими (рис. 1 А, Б) и с женскими гонадами различия по соотношениям половых и соматических клеток между группами были ста-

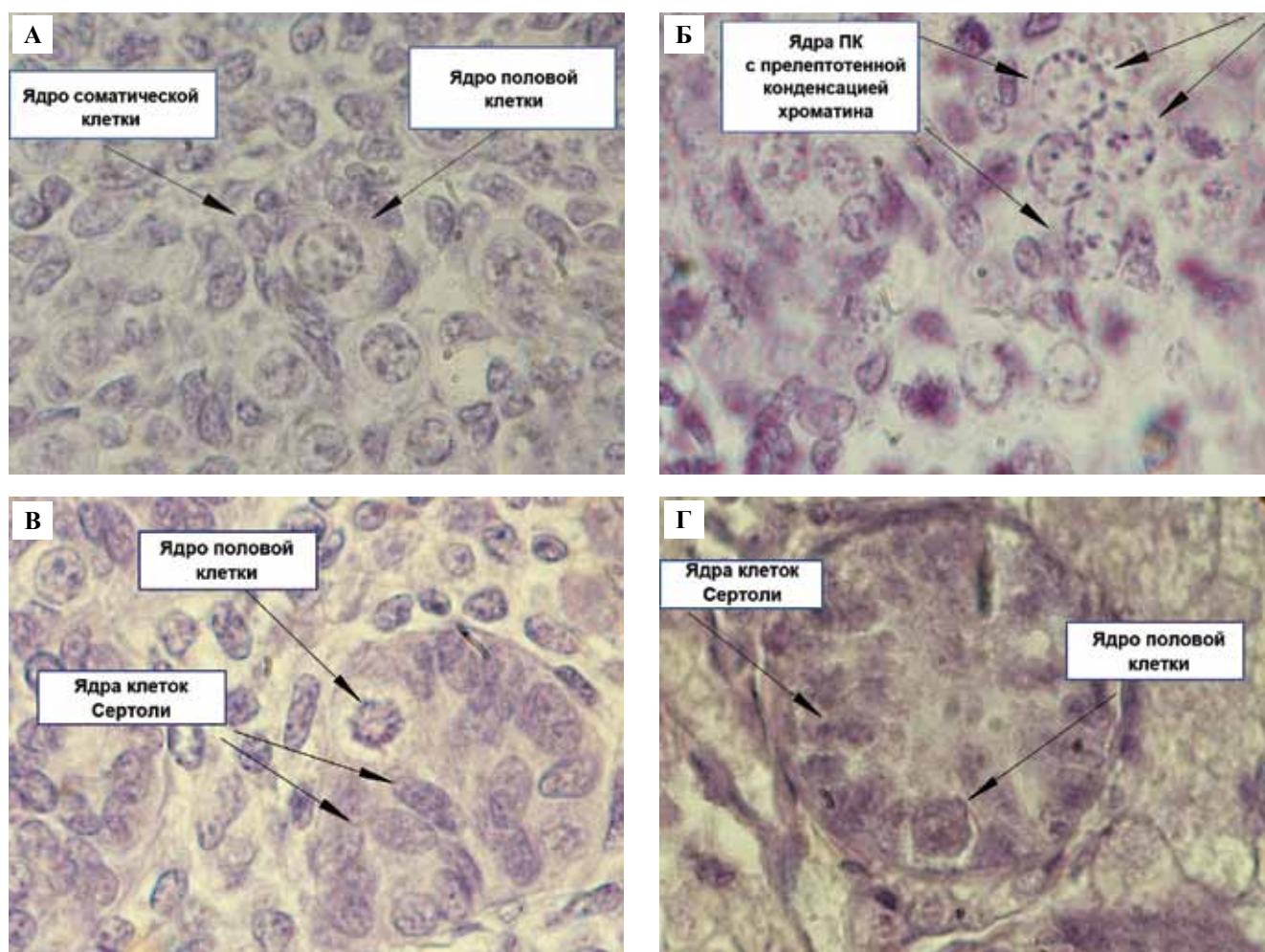


Рис. 1. Фрагменты срезов гонад человека в антенатальном периоде. Слева – гонады, развивающиеся по женскому типу: у эмбриона 6–7 недель после оплодотворения (А), формирующиеся яичники у плода женского пола на сроке 25 недель беременности (Б). Справа – гонады, развивающиеся по мужскому типу: у эмбриона мужского пола 7 недель после оплодотворения (В), формирующиеся тестикулы у плода мужского пола, 11 недель после оплодотворения (Г). ×1000

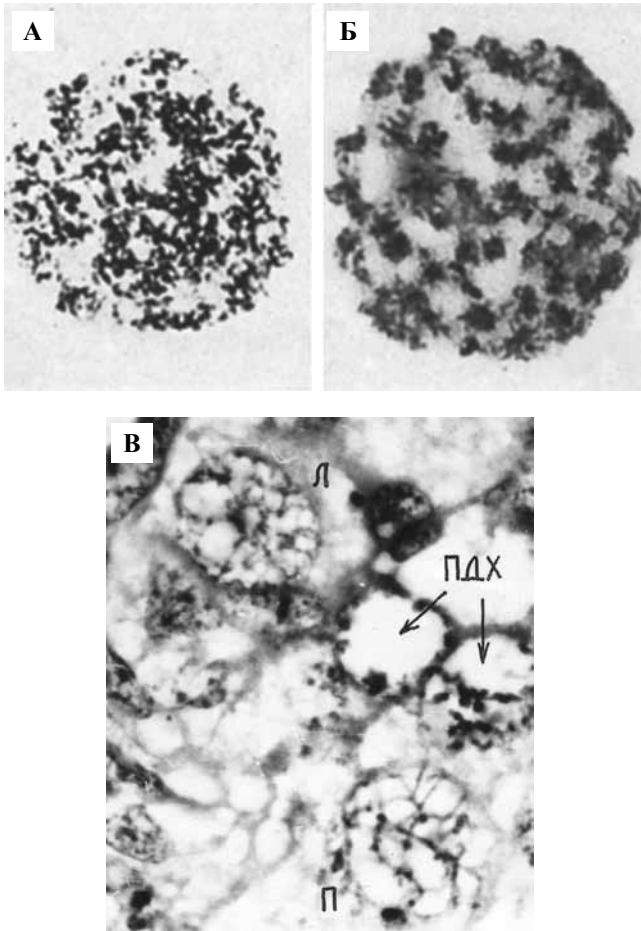


Рис. 2. Ядра половых клеток в женской гонаде: с прелептотенной конденсацией хроматина (А) и деконденсацией хроматина (Б) ($\times 945$ [10]), ядра половых клеток с прелептотенной деконденсацией хроматина во фрагменте женской гонады (В) человека в антенатальном периоде. Стрелками показаны стадии (ПДХ – прелептотенная деконденсация хроматина, Л – лептотена профазы I мейоза, П – пахитена профазы I мейоза). $\times 1000$ [6]

тистически незначимы ($p=0,368$). Из-за уникальности материала исследования выборки не были многочисленными. Таким образом, результаты данной работы свидетельствуют только о хронологии появления конкретных стадий дифференцировки в ядрах ПК.

В женском гаметогенезе лептотена сменяется зиготеной, характеризующейся конъюгацией между гомологичными родительскими хромосомами, пахитеной, во время которой происходит кроссинговер (обмен участками между гомологичными родительскими хромосомами). В этот момент формируются клетки с отличающимся от материнского организма [6] геномом (то есть в женском организме эти события развиваются пренатально). Для мужского организма события рекомбинации наследственных структур – конъюгации гомологичных родительских хромосом в зиготене и кроссинговера в пахитене профазы I мейоза – проходят постнатально, с наступлением полового созревания.

В развивающихся женских гонадах вокруг ПК на стадии диплотены локализуются прегранулезные соматические клетки, вступающие в контакт с ооцитами в диплотене, и формируются примордиальные фолликулы [6, 11]. Оогонии на протяжении всего периода пренатального онтогенеза дифференцируются в ооциты I. При нормально протекающей беременности у четырехмесячного плода женского пола формируется пул (резерв) ПК с уникальным геномом в профазе I мейоза [6].

В гонадах эмбрионов мужского пола 6–7 недель после оплодотворения (рис. 1 А) между соматическими клетками локализованы мигрировавшие первичные половые клетки [4]. Усиление экспрессии гена *SRY* инициирует каскад экспрессии различных генов, приводящий к морфологической дифференцировке гонады по мужскому типу [5, 9]. Из мезенхимы в мужских гонадах формируются соматические клетки Сертоли (выстилающие извитые семенные канальцы (ИСК) эмбрионального типа), позднее (после 9-й недели) выявляются соматические интерстициальные клетки – предшественники клеток Лейдига.

Как мужская, так и женская гонадная система отделена от структур кровеносной системы физиологическими барьерами (гематотестикулярный барьер (ГТБ) или гематофолликулярный барьер (ГФБ), которые защищают ПК от повреждающих воздействий, в том числе иммунных ответов материнского организма на чужеродный геном. Таким образом, становление барьеров должно соотноситься с моментом появления клеток с уникальным геномом, то есть после прохождения пахитены, обеспечивающей формирование уникального состава родительских генов вследствие кроссинговера в каждой гамете. Вокруг мужских ПК у млекопитающих становление ГТБ совпадает с появлением просвета в семенных канальцах (после наступления половой зрелости). В течение репродуктивной жизни в мужском организме происходит самообновление ГТБ [14]. Плод женского пола рождается со сформированными для гамет барьером и пулом ПК [6]. Начало формирования ГТБ и ГФБ соответствует протеканию событий на стадии пахитены в I делении мейоза [8]: в антенатальном развитии женского организма и с наступлением пубертатного периода в мужском организме.

Большинство исследователей показывают, что в мужских ПК (у человека) только после четырех лет возобновляются единичные митозы ПК [1], по достижении периода половой зрелости количество митозов ПК значительно возрастает. В популяциях мужских ПК в семенных канальцах у человека мы находим ядра на стадии прелептотенной конденсации хромосом, в гонадах плодов мужского пола (рис. 3) и в яичках новорожденных у человека (табл. 1), в разном соотношении к мужским ПК до стадии лептотены. Относительно причин прелептотенных преобразований хроматина можно обсуждать несколько предположений: при недостатке сигнальных молекул развития по мужскому

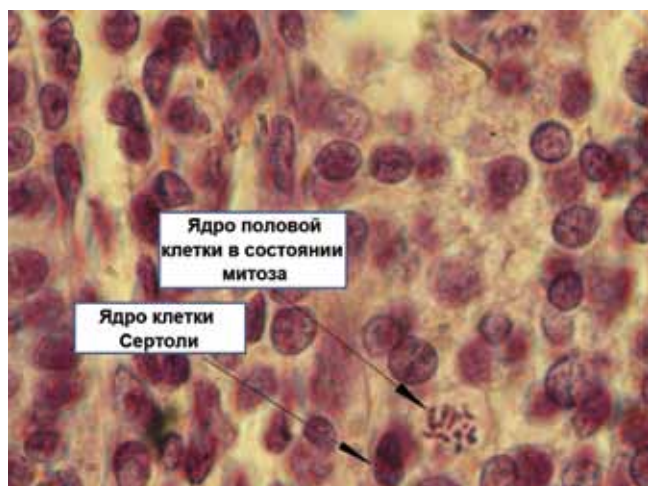


Рис. 3. Мужская гонада плода человека возраста 11 недель беременности. Митоз в половых клетках. $\times 1000$

типу возможно появление небольшого количества ПК, не подвергшихся блоку мейоза. Кроме того, нарушения формирования компонентов ГТБ могут вызывать преждевременное инициирование мейоза. Защита гамет с помощью ГТБ важна в том числе и потому, что ПК на протяжении длительного периода своего развития деметилированы, так как родительские метки метилирования стираются в ДНК первичных половых клеток во время их миграции к половым валикам [12, 13, 16].

Заключение

Хронология и динамика (события преобразования хроматина, происходящие в процессе развития половых клеток и половых желез человека, в половых клетках женских и мужских гонад эмбрионов, плодов и гонад новорожденных мальчиков прослежены для групп по возрасту и полу. Доля половых клеток от общего количества клеток разных типов в гонадах ранних сроков составляет 9,21–33,29%. Формирование пола женских половых клеток к сроку четырех месяцев внутриутробного развития обеспечивается активной пролиферацией оогониев (1,96–10,34% митозов) в эмбриогенезе и фетогенезе и дегенерацией половых клеток разных стадий. Отличием динамики преобразований хроматина в ядрах мужских ПК от динамики изменений хроматина в ядрах женских половых клеток является следующее.

1. В популяциях мужских половых клеток в семенных канальцах у человека отмечены ядра гамет на стадии прелептотенной конденсации хромосом в прохромосомы (в яичках эмбрионов, плодов, новорожденных), но отсутствие деконденсации прохромосом в прелептотенный период.

2. Хронология прохождения процесса конденсации хромосом в прохромосомы и затем их деконденсация, приводящая к лептотене профазы I мейоза у эмбрионов и плодов женского пола.

3. Прохождение процесса дифференцировки женских половых клеток до стадии диплотены – диктиотены профазы I мейоза и участие ооцитов в процессе фолликулообразования (с формированием примордиальных фолликулов в антенатальном периоде).

Литература/References

1. Астраханцев А.Ф. Структура мужских половых желез в постнатальном онтогенезе: Автореферат дис. ... докт. мед. наук. Рязань, 1996. 49 с. [Astrachantsev A.F. Structure of male gonads in post-natal ontogenesis: Avtoreferat dis. ... dokt. med. nauk, Ryazan, 1996. 49 p. (In Russ.).]
2. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: КМК, 2007. 360 с. [Bogdanov Yu.F., Kolomiyets O.L. The synaptonemal complex – the indicator of dynamics of meiosis and variability of chromosomes. M.: KMK, 2007. 360 p. (In Russ.).]
3. Голиченков В.А. Эмбриология: Учебник для университетов / В.А. Голиченков, Е.А. Иванов, Е.Н. Никерясова. М.: Академия, 2004. 218 с. [Golichenkov V.A. Embryology: Guide for universities / Golichenkov V.A., Ivanov E.A., E.N. Nikeryasova. M.: Akademia, 2004. 218 p. (In Russ.).]
4. Кожухарь В.Г. Первичные половые клетки млекопитающих и человека. Происхождение, идентификация, миграция // Цитология. 2011. № 53 (3). С. 211–220. [Kozhukhar V.G. Germ cells of mammals and a man. Origin, identification, migration // Tsitologiya. 2011. V. 53 (3). P. 211–220. (In Russ.).]
5. Кожухарь В.Г. SRY И SOX9 – главные факторы генетической детерминации пола у млекопитающих // Цитология. 2012. № 54 (5). С. 390–404 [Kozhukhar V.G. SRY and SOX9 – the main factors of genetic determination of a gender of mammals // Tsitologiya. 2012. V. 54 (5). P. 390–404. (In Russ.).]
6. Курило Л.Ф. Закономерности овариогенеза и оогенеза млекопитающих. Deutschland: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 282 с. [Kurylo L.F. Regularities of an ovariogenesis and an oogenesis of mammals. Deutschland: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. 282 p. (In Russ.).]
7. Радзинский В.Е. Руководство к практическим занятиям по гинекологии. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. 520 с. [Radzinsky V.E. Guide to a practical training on gynecology. M.: Medical Information Agency, 2005. 520 p. (In Russ.).]
8. Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 208 с. [Raytsina S.S. Spermatogenesis and structural bases of his regulation. M.: Nauka, 1985. 208 p. (In Russ.).]
9. Черных В.Б., Курило Л.Ф. Генетическая контроль дифференцировки пола у человека // Генетика. 2001. № 37 (10) С. 1317–1329. [Chernykh V.B., Kurylo L.F. Genetic control of a differentiation of a gender of the person // Genetics. 2001. V. 37 (10) P. 1317–1329 (In Russ.).]
10. Штаут М.И. Аспекты морфогенетических преобразований хроматина на прелептотенных стадиях сперматогенеза у человека // Андрология и генитальная хирургия. 2016. Т. 17, № 2. С. 104–111. [Shtaut M.I. Morphogenetic chromatin reorganization aspects at the preleptoten stage of human

- spermatogenesis // *Andrology and Genital Surgery*. 2016. V. 17, No 2. P. 104–111 (In Russ.).
11. Kurilo L.F. Oogenesis in antenatal development in man // *Human Genet.* 1981;57:86–92.
 12. La Salle S., Trasler J.M. Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse // *Dev Biol.* 2006;296(1):71–82.
 13. Lucifero D., La Salle S., Bourc'his D., Martel J. et al. Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis // *BMC Developmental Biology*. 2007;7:36.
 14. Smith B.E., Braun R.E. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions // *Science*. 2012;Nov 9;338(6108):798–802.
 15. Vanhoutteghem A., Messiaen S., Hervé F. The zinc-finger protein basonuclin 2 is required for proper mitotic arrest, prevention of premature meiotic initiation and meiotic progression in mouse male germ cells // *Development*. 2014;141(22):4298–310.
 16. Wu S.C., Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:607–20.

CHRONOLOGY AND DYNAMICS OF SEX GONADAL DIFFERENTIATION AND GAMETOGENESIS IN HUMANS

M.I. Shtaut, L.F. Kurilo

In contrast to female sex cells, the nuclei of preleptotene germ cells of embryos, fetuses and newborn boys show only condensation and not decondensation of chromosomes. In female antenatal gonads, meiosis proceeds as far as the diplotene stage, and folliculogenesis occurs.

Key words: spermatogenesis, oogenesis, preleptotene stage of meiosis prophase I, prochromosome, neonatal testes

Информация об авторах

Штаут Мария Имреевна – научный сотрудник лаборатории генетики нарушений репродукции Медико-генетического научного центра. Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1. Телефон +7 (499) 324 13 20. E-mail: shtaut@yandex.ru

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

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1. Телефон +7 (499) 324 13 20. E-mail: kurilo@med-gen.ru

Материал поступил в редакцию 28 июня 2018 года

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ ПРИ ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ МИОПИИ

Е.Л. Куренков¹, В.С. Рыкун¹, С.А. Гордеева²

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск

²Филиал № 1 ФГКУ «354 Военный клинический госпиталь» Минобороны России, Челябинск

Изучали взаимосвязь между клеточным составом, фибриллярным компонентом теноновой капсулы и клиническими данными, указывающими на рост глазного яблока, при прогрессирующей миопии. Исследовали клинические данные, включающие остроту зрения без коррекции, радиус кривизны роговицы, градиент годового прогрессирования миопии, величину передне-задней оси, у 35 детей, которые поступили на оперативное лечение косоглазия и склероукрепляющие операции при прогрессирующей миопии. У данных пациентов в ходе операций был проведен забор образцов теноновой капсулы: при гиперметропии в сочетании с косоглазием исследовано 25 образцов, при прогрессирующей миопии – 22. Установлено, что при аксиальном удлинении глазного яблока >24,50 мм выявляется снижение количества адипоцитов и регистрируется средней силы обратная корреляционная связь ($r_s = -0,500$, $p=0,041$); при увеличении передне-задней оси >24,90 мм имеет место увеличение количества тучных клеток, коэффициент корреляции составляет ($r_s=0,465$, $p=0,001$); с увеличением передне-задней оси >26,50 мм в структуре теноновой капсулы отмечается сильная корреляционная связь с максимальной длиной отростков фибробластов ($r_s=0,870$, $p=0,024$) и снижением плотности коллагеновых фибрилл ($r_s = -0,845$, $p=0,034$). При прогрессирующей миопии была выявлена реакция клеток и фибриллярных структур теноновой капсулы на рост глазного яблока, что отражает определенные закономерности патогенеза прогрессирующей миопии.

Ключевые слова: прогрессирующая миопия, передне-задняя ось глазного яблока, тенонова капсула, клеточный состав, фибробласты, тучные клетки, жировые клетки

В Российской Федерации в структуре инвалидности по зрению у детей миопия занимает второе место – 26,4% [2, 3]. Наибольшую опасность данного заболевания представляют осложнения: рефракционная амблиопия, дистрофия сетчатки, миопическая макулопатия, разрывы, отслойка сетчатки [1], что снижает качество жизни ребенка, нарушает адаптацию среди сверстников, ограничивает возможности в выборе будущей профессии.

Для расширения представлений о механизмах, лежащих в основе прогрессирования миопии, были рассмотрены взаимосвязи клинических и морфологических параметров при аномалиях рефракции.

Цели работы – выявление взаимосвязи между клеточным составом, фибриллярным компонентом теноновой капсулы и клиническими данными, указывающими на рост глазного яблока, при прогрессирующей миопии, диагностика вида аметропий, основываясь на данных морфометрического анализа теноновой капсулы.

Материалы и методы

В ходе исследования изучались клинические данные, включающие остроту зрения без коррекции, радиус кривизны роговицы (РКР), градиент годового

прогрессирования (ГПП) миопии, величину передне-задней оси (ПЗО), у 35 детей, которые поступили на оперативное лечение косоглазия и склероукрепляющие операции при прогрессирующей миопии. У данных пациентов в ходе операций был проведен забор образцов теноновой капсулы: при гиперметропии в сочетании с косоглазием исследовано 25 образцов, при прогрессирующей миопии – 22. На проведение исследования получено разрешение этического комитета (протокол № 2 от 25.09.2013).

Клеточный состав теноновой капсулы изучали на полутонких срезах, окрашенных толудиновым синим, плотность коллагеновых волокон, максимальную длину отростков фибробластов – на ультратонких срезах при помощи трансмиссионной электронной микроскопии на микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Биоптаты теноновой капсулы подготавливали для проведения трансмиссионной электронной микроскопии путем фиксации, дегидратации, пропитки эпоксидными смолами.

Количество различных видов клеток каждого образца теноновой капсулы подсчитывали на стандартной площади, а затем пересчитывали на единицу площади – 10^4 $\mu\text{м}^2$ при помощи программного обеспечения «Ви-

деоТест – Морфология 5.0», линейную длину отростков клеток, плотность расположения коллагеновых волокон оценивали в программе Digital Micrograph. Статистическая обработка проводилась при помощи пакета прикладных программ SPSS 15.0 и MS Excel 2010.

Оценку взаимосвязей между параметрами осуществляли при помощи корреляционного анализа, расчета коэффициента корреляции Спирмена (r_s) и его значимости (p). Диагностика вида аномалий рефракции проводилась на основе изучения морфометрического состава теновой капсулы и применения логистического регрессионного анализа. Применение ROC-анализа (receiver operating characteristic, рабочая характеристика приемника) позволяет судить об эффективности модели и оценить соотношение чувствительности и специфичности используемого метода.

Результаты и обсуждение

Проведенный корреляционный анализ выявил значимые связи между морфометрическими показателями клеточного состава теновой капсулы и клиническими характеристиками, указывающими на рост глазного яблока, при прогрессирующей миопии.

Клеточный состав теновой капсулы при разных видах клинической рефракции представлен в таблице 1.

Данные коэффициента корреляции и его значимости представлены в таблице 2.

При аксиальном удлинении глазного яблока более 24,50 мм выявляется снижение количества адипоцитов и регистрируется средней силы обратная корреляционная связь ($r_s = -0,500$, $p=0,041$); при увеличении ПЗО более 24,90 мм имеет место увеличение уровня тучных

клеток, коэффициент корреляции составляет ($r_s=0,465$, $p=0,001$); с увеличением ПЗО более 26,50 мм в структуре теновой капсулы отмечаются сильная корреляционная связь с максимальной длиной отростков фибробластов ($r_s=0,870$, $p=0,024$) и снижением плотности коллагеновых фибрилл ($r_s = -0,845$, $p=0,034$). Динамика изменений представлена на рисунке 1.

На рисунках 2–6 продемонстрировано изменение плотности коллагенового волокна и максимальной длины отростков фибробластов при увеличении длины глазного яблока, усилении рефракции.

Эти данные подтверждают динамику, изложенную ранее, поскольку коэффициент корреляции Спирмена между ГПП и ПЗО указывает на значимую сильную корреляционную взаимосвязь ($r_s=0,885$, $p=0,008$).

Между тем наибольший интерес представляет обнаруженная взаимосвязь между ГПП $>1,0$ Дптр и активными тучными клетками, при которой коэффициент корреляции составляет $r_s=0,896$, $p=0,0001$.

Значения радиуса кривизны роговицы и остроты зрения без коррекции при прогрессирующей миопии не связаны с клеточными и внеклеточными показателями структуры теновой капсулы, что подтверждает корреляционный анализ.

Тенова капсула может быть объектом морфометрической диагностики при аметропиях. Теоретическая значимость в моделировании диагноза «гиперметропия» или «прогрессирующая миопия» отводится основному фактору – количеству фибробластов теновой капсулы. Значимость данного предиктора составляет $p=0,032$, остальные параметры в уравнении регрессии не могут быть рассмотрены, так как $p>0,05$ (табл. 3).

Таблица 1

Клеточный состав теновой капсулы при разных видах клинической рефракции

Виды клинической рефракции	Количество фибробластов, 10^4 мкм ²	Количество тучных клеток, 10^4 мкм ²	Количество жировых клеток, 10^4 мкм ²
Гиперметропия	1,10 ± 0,13 [0,84; 1,36]	0,045 ± 0,25 [-0,01; 0,10]	0,21 ± 0,07 [0,62; 0,35]
Прогрессирующая миопия	1,56 ± 0,12* [1,30; 1,81]	0,08 ± 0,02* [0,05; 0,11]	0,01 ± 0,001* [-0,003; 0,03]

$M \pm m$ – среднее и стандартная ошибка среднего, 95% доверительный интервал, достоверные различия

* – между гиперметропией и прогрессирующей миопией, ($p < 0,05$)

Таблица 2

Коэффициент корреляции и его значимость

Показатели	Количество фибробластов	Количество тучных клеток	Количество жировых клеток	Плотность коллагеновых волокон	Максимальная длина отростков фибробластов
ПЗО	$r_s=0,350$, $p=0,016$	$r_s=0,374$, $p=0,01$	$r_s=-0,320$, $p=0,028$	$r_s=-0,304$, $p=0,038$	$r_s=0,505$, $p=0,0001$
ГПП	$r_s=0,419$, $p=0,003$	$r_s=0,451$, $p=0,001$	$r_s=-0,366$, $p=0,011$	$r_s=-0,349$, $p=0,016$	$r_s=0,415$, $p=0,004$

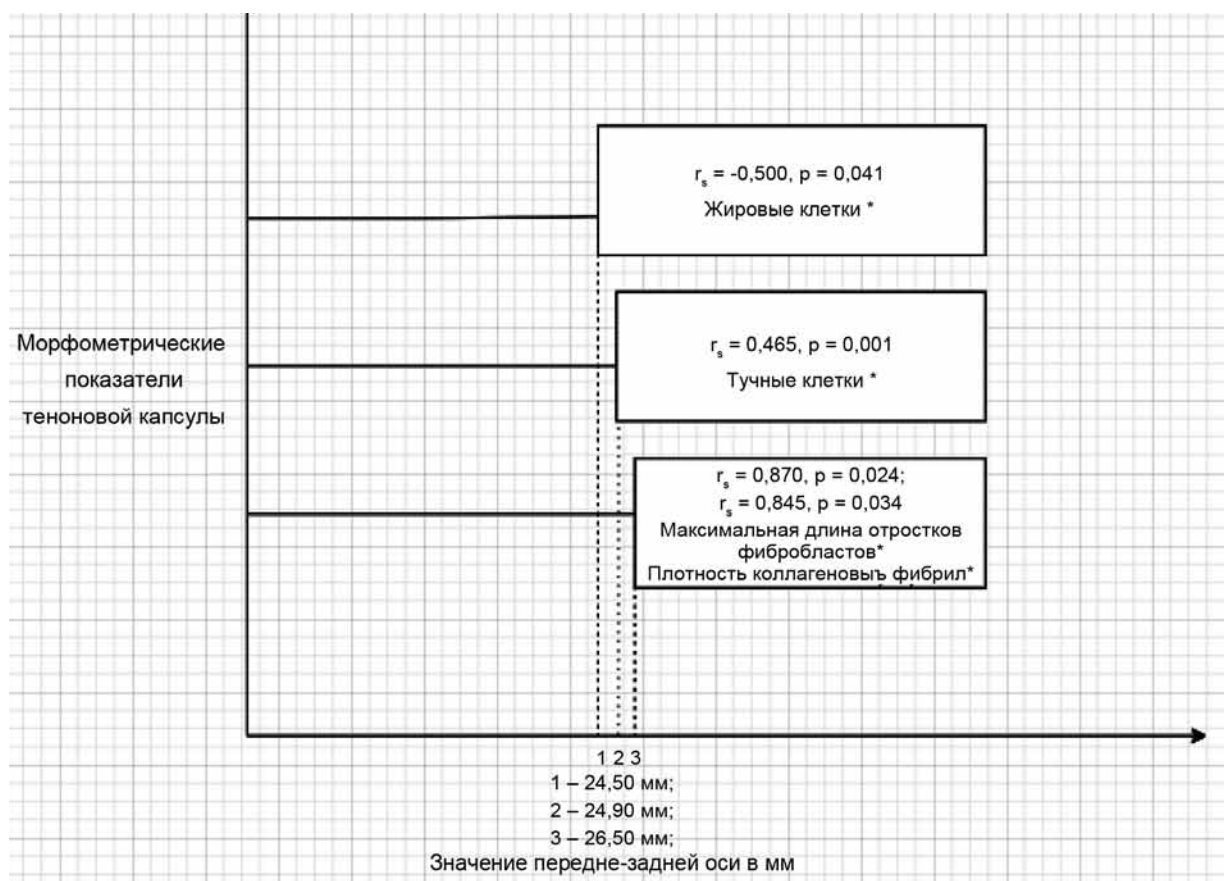


Рис. 1. Реакция клеток теноновой капсулы на рост глазного яблока.

*сила и значимость корреляционной связи между передне-задней осью и клеточным составом, фибриллярными структурами теноновой капсулы

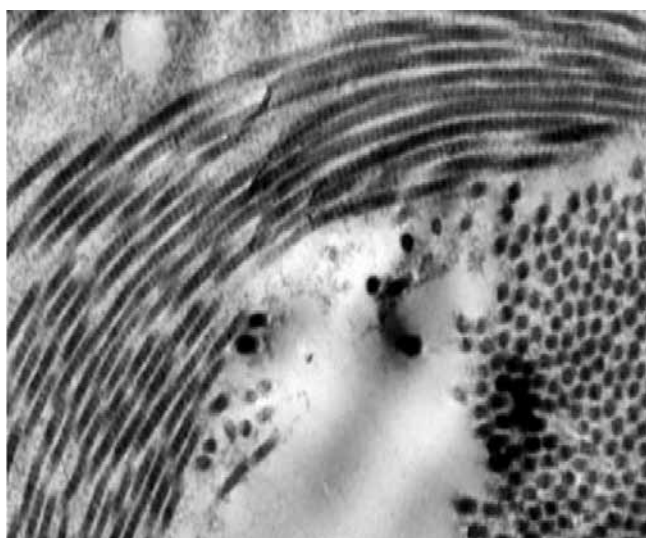


Рис. 2. Плотность коллагенового волокна при прогрессирующей миопии средней степени. Трансмиссионная электронная микроскопия, $\times 4000$

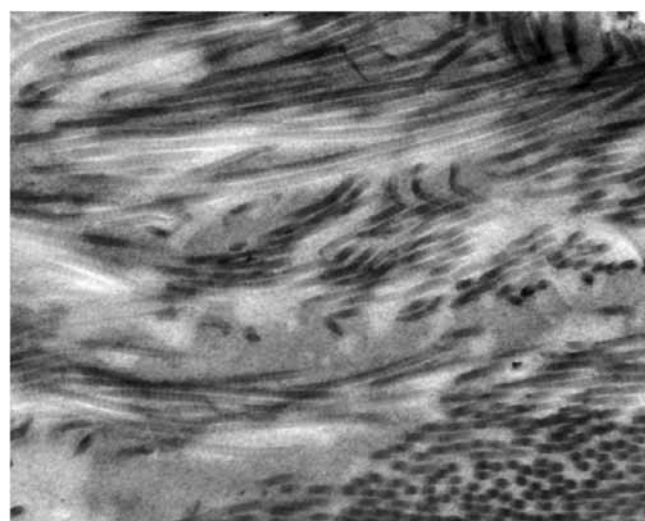


Рис. 3. Плотность коллагенового волокна при прогрессирующей миопии высокой степени. Трансмиссионная электронная микроскопия, $\times 4000$

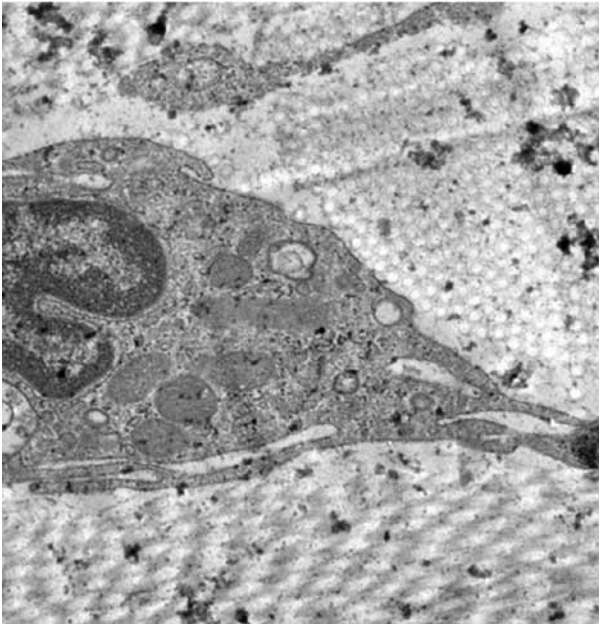


Рис. 4. Максимальная длина отростков фибробласта. Прогрессирующая миопия средней степени. Трансмиссионная электронная микроскопия, × 4000



Рис. 5. Максимальная длина отростков фибробласта. Прогрессирующая миопия высокой степени. Трансмиссионная электронная микроскопия, × 4000

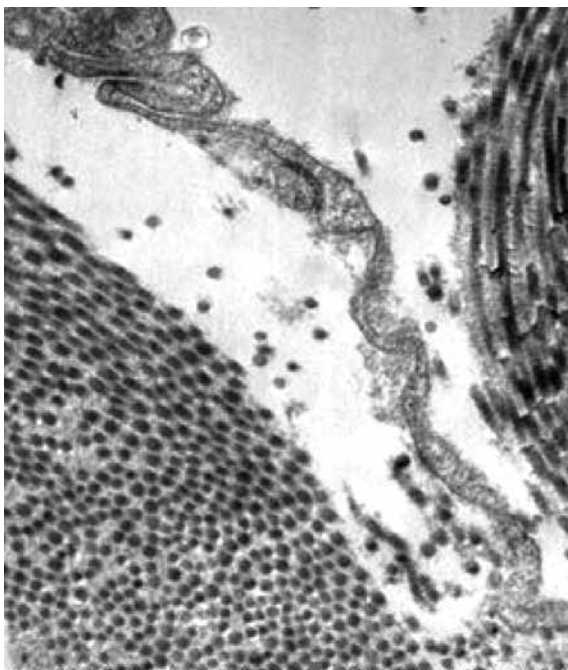


Рис. 6. Плотность коллагенового волокна. Прогрессирующая миопия высокой степени. Трансмиссионная электронная микроскопия, × 4000

Уравнение регрессии, полученное в ходе применения логистического регрессионного анализа, представлено следующим образом:

$$Z = -1,698 + 1,449 \times \text{количество фибробластов},$$

где -1,698 – константа уравнения логистической регрессии;
1,449 – коэффициент регрессии.

Полученное значение Z подставляется в уравнение вероятности наступления события:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-Z}},$$

где e – математическая константа, основание натурального логарифма, равно $\approx 2,71828$.

Показатель $P > 0,5$ расценивается как прогрессирующая миопия, $P < 0,5$ – гиперметропия.

Диагностика вида аномалий рефракций представлена в таблице 4.

Из 22 случаев прогрессирующей миопии 19 на основании рассчитанных показателей были верно расценены как прогрессирующая миопия (истинно положительные – ИП), три неверно отнесены к группе гиперметропии (ложно отрицательные – ЛО). Из 25 случаев гиперметропии 21 был верно отнесен к группе гиперметропии (истинно отрицательные – ИО), и четыре неверно расценены как случаи прогрессирующей миопии (ложно положительные – ЛП).

Чувствительность данного метода, определяемая по формуле $\text{ИП} / \text{ИП} + \text{ЛО} \times 100\%$, составила 86,3%. Специфичность, определяемая по формуле $\text{ИО} / \text{ИП} + \text{ИО} \times 100\%$, составила 91,3%.

Таким образом, при исследовании теноновой капсулы определение количества фибробластов может выявлять вид аномалии рефракции с вероятностью 85,1%, рассчитанной как сумма истинно положительных и истинно отрицательных показателей, поделенных на общее число случаев (табл. 4).

Чувствительность и специфичность регрессионного анализа графически представлены на рисунке 7.

Таблица 3

Переменные в уравнении логистической регрессии

Предикторы	B – коэффициент регрессии	Стандартная ошибка	Статистика Вальда	Степень свободы	Значимость
Количество фибробластов	1,4488	0,694	4,590	1	0,032
Количество мастоцитов	-0,696	3,633	0,037	1	0,848
Количество адипоцитов	-12,746	7,586	2,823	1	0,093
Количество активных тучных клеток	45,577	40,010	1,298	1	0,255
Константа	-1,698	0,903	3,535	1	0,060

Таблица 4

Диагностика вида аномалий рефракции

Наблюдаемые аномалии	Предсказанные аномалии			% корректных предсказаний
	миопия прогрессирующая	гиперметропия	Итого	
Миопия прогрессирующая	19	3	22	86,4
Гиперметропия	4	21	25	84,0
Общий процент			47	85,1

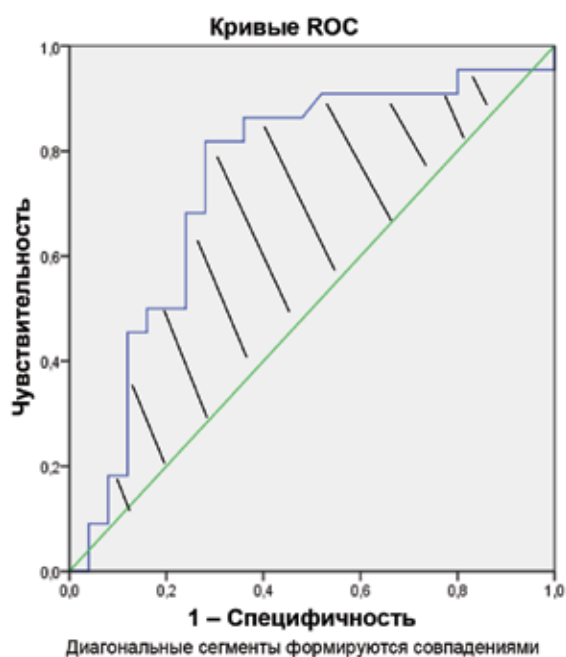


Рис. 7. ROC – кривые, отражающие соотношение чувствительности и специфичности данного метода. Штриховка указывает на площадь фигуры

Площадь под фигурой составляет 0,746, что характеризует хорошее качество полученной модели.

Заключение

Теноновая капсула рассмотрена в качестве объекта морфометрической диагностики аномалий рефракции, количество фибробластов теноновой капсулы с высокой долей вероятности позволяет верно классифицировать аметропии.

При прогрессирующей миопии были выявлены отдельные сильные взаимосвязи между клеточным составом, фибриллярным компонентом теноновой капсулы и клиническими характеристикам, ассоциированными с ростом глазного яблока. Реакция клеток теноновой капсулы на увеличение глазного яблока позволяет судить о некоторых закономерностях патогенеза прогрессирующей миопии.

Литература/References

1. *Иомдина Е.Н., Тарутта Е.П.* Современные направления фундаментальных исследований патогенеза прогрессирующей миопии // Вестник Российской академии медицинских наук. 2014. № 3, Т. 4. С. 44–49. [*Iomdina E.N., Tarutta E.P.* Modern directions of fundamental studies of the pathogenesis of progressive myopia // Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014. V. 3, No 4. P. 44–49. (In Russ.)].
2. *Либман Е.С., Шахова Е.В.* Слепота и инвалидность вследствие патологии органа зрения в России // Вестник офтальмологии. 2006. № 1. С. 35–37. [*Libman E.S., Shakhova E.V.* Blindness and disability due to pathology of the organ of vision in Russia // Bulletin of Ophthalmology. 2006. V. 1. P. 3–37. (In Russ.)].

3. *Поболь-Солонко О.Л., Марченко Л.Н., Иванова В.Ф. и др.* Эпидемиология детской близорукости в Республике Беларусь: Материалы республиканской научной конференции с международным участием «Современная реконструктивная хирургия в офтальмологии». 2013. С. 231–235. [*Pobol-Solonko O.L., Marchenko L.N., Ivanova V.F. et al.* Epidemiology of children's myopia in the Republic of Belarus: Materials of the republican scientific conference with international participation "Modern Reconstructive Surgery in Ophthalmology". 2013. P. 231–235. (In Russ.)].

CLINICAL AND MORPHOLOGICAL CORRELATIONS IN PROGRESSIVE MYOPIA

E.L. Kurenkov, V.S. Rykun, S.A. Gordeeva

We studied the interrelationships of cellular composition, fibrillar component of Tenon's capsule and clinical data indicating the growth of the eyeball in progressive myopia. We investigated the clinical data, including: uncorrected visual acuity, radius of corneal curvature, the slope of the annual increase in myopia, optical axial length in 35 children who were admitted for surgical treatment of strabismus and sclera-strengthening operations with progressive myopia.

Tenon's capsule was sampled in these patients during the surgery; 26 specimens from children with hypermetropia combined with strabismus and 21, with progressive myopia, were examined

We revealed a decrease in the number of adipocytes in patients with an axial length more than 24.50 mm, moderate negative correlation was registered ($r_s = -0.500$, $p = 0.041$). An increase in axial length to 24.90 mm and more was correlated with the growing level of mast cells ($r_s = 0.465$, $p = 0.001$); axial length more than 26.50 mm showed a strong correlation with the maximum length of fibroblast processes in Tenon's capsule ($r_s = 0.870$, $p = 0.024$) and a decreased density of collagen fibrils ($r_s = -0.845$, $p = 0.034$). Reaction of the cells and fibrillar structures of the Tenon's capsule to the lengthening of the eyeball in progressive myopia was revealed, which reflects certain patterns of the pathogenesis of progressive myopia.

Key words: progressive myopia, optical axial length, Tenon's capsule, cellular composition, fibroblasts, mast cells, fat cells

Информация об авторах

Курунков Евгений Леонидович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии и оперативной хирургии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454076, Челябинск, ул. Воровского, д. 64.

Рыкун Вадим Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры глазных болезней Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Адрес: 454076, Челябинск, ул. Воровского, д. 64.

Гордеева (Мохначева) Светлана Александровна – врач-офтальмолог филиала № 1 ФГКУ «354 ВКГ» Минобороны России.

Адрес: 454008, Челябинск, Свердловский проспект, д. 28а. Телефон +7 951 815 5634. E-mail: mohnacheva87@mail.ru

Материал поступил в редакцию 23 апреля 2018 года

ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ АДРЕНАЛОЦИТОВ КРЫС, РАЗВИВАВШИХСЯ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКИХ ДОЗ ДИХЛОРДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА

Н.В. Яглова, Д.А. Цомартова, В.В. Яглов, С.С. Обернихин, С.В. Назимова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Цель – изучение секреторной деятельности адреналокитов крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в разные периоды онтогенеза. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, выявлены снижение концентрации адреналина в плазме крови, уменьшение размеров адреналокитов и их ядер и численности митохондрий при высоком содержании секреторных гранул. У крыс, подвергавшихся ежедневному воздействию ДДТ с первого дня постнатального периода, уровень адреналина в системном кровотоке не отличался от контрольных значений. В адреналокитах выявлены признаки повышенной функциональной нагрузки на митохондрии, а также уменьшение содержания секреторных гранул в цитоплазме. Таким образом, воздействие ДДТ приводит к уменьшению числа митохондрий в клетках и, как следствие, снижению выделения секреторных гранул, что обуславливает пониженный уровень адреналина в системном кровотоке.

Ключевые слова: надпочечник, мозговое вещество, адреналокит, секреция, ультраструктура, адреналин, эндокринный дисраптор, ДДТ

Способность эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) изменять секреторную деятельность клеток мозгового вещества надпочечников – вопрос мало изученный, как и в целом влияние ДДТ на метаболизм катехоламинов в организме. Анализ многочисленных научных публикаций показывает, что большие дозы ДДТ вызывают уменьшение синтеза мембранного транспортера дофамина и везикулярного транспортера моноаминов в клетках полосатого тела и черной субстанции, но в отношении низкодозового воздействия не удалось выявить существенных сдвигов в функционировании дофаминовой системы [9]. Также имеются единичные сведения о способности сублетальных доз ДДТ увеличивать экскрецию адреналина и норадреналина с мочой [11]. Известно, что катехоламины надпочечников не только участвуют в реализации защитных реакций совместно с глюкокортикоидами, но и являются метаболически зависимыми от них [7]. В своих предыдущих работах мы показали значительные изменения в секреции стероидных гормонов надпочечников при развитии организма в условиях постоянного воздействия ДДТ [2], что указывает на потенциальный риск нарушения синтеза и выделения катехоламинов их хромаффинных клеток. Основную часть хромаффинных клеток надпочечников крысы

составляют адреналокиты [4], являющиеся объектом настоящего исследования.

Целью работы было изучение секреторной деятельности адреналокитов крыс пубертатного возраста, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в разные периоды онтогенеза.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар (n=30). Опытную группу (n=10) составило мужское потомство самок, которые с первого дня ссаживания с самцами вместо воды получали раствор о,п-ДДТ (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мкг/л. В подсосном периоде новорожденные крысы потребляли ДДТ с молоком матери, а с трехнедельного возраста – самостоятельно тот же раствор о,п-ДДТ до достижения пубертатного возраста. Второй экспериментальной группой (n=10) стало мужское потомство самок, не получавших ДДТ во время беременности, которое с первого дня постнатального развития получало ДДТ с молоком матери, затем самостоятельно аналогично предыдущей группе. Расчет потребляемой дозы ДДТ проводили с учетом требований к определению низких доз и нормативам содержания ДДТ в пищевой продукции согласно Техническому регламенту Таможенного

союза ТР ТС 021/2011 [1]. Среднесуточное самостоятельное потребление ДДТ самцами крыс составило $2,90 \pm 0,12$ и $3,71 \pm 0,15$ мкг/кг, соответственно, что сопоставимо с уровнем потребления ДДТ человеком с продуктами питания с учетом особенностей метаболизма этого вещества в организме крысы [14]. Крысы контрольной группы ($n=10$) получали водопроводную воду. Отсутствие в воде и корме для животных ДДТ, его метаболитов и родственных хлороорганических соединений подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила в возрасте 42 суток – начале пубертатного периода. 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.

В плазме крови проводили определение содержания адреналина методом твердофазного иммуоферментного анализа с помощью набора реактивов CatCombi (IBL International, Германия).

Для электронномикроскопического исследования мозговое вещество надпочечника фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида в какодилатном буфере с постфиксацией в 1% растворе тетраоксида осмия. После стандартной проводки заливали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме PowerTome X (RMC Voeckeler, США). Определяли концентрацию альдостерона в сыворотке крови крыс методом иммуоферментного анализа с использованием 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

У крыс контрольной группы пубертатного возраста адреналциты представляли собой продолговатой формы клетки с крупными округлыми ядрами с ровными контурами. В ядрах преобладал эухроматин. Во многих ядрах наблюдались 1–2 ядрышка. Матрикс цитоплазмы клеток был просветлен. Митохондрии имели удлиненную форму, септальные кристы и электронно плотный матрикс. Они располагались в основном в парануклеарной области, встречалось и субплазмалемальное расположение митохондрий. Во многих клет-

ках в парануклеарной области выявлялись комплексы Гольджи, представленный канальцами и везикулами, а также канальцы гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС). В цитоплазме содержалось большое количество секреторных гранул. Секреторные гранулы имели содержимое различной электронной плотности. У большинства секреторных гранул наблюдалось просветление вокруг плотного ядра. Просветы капилляров содержали плазму или единичные эритроциты, реже в просветах встречались секреторные гранулы хромаффинных клеток (рис. 1 А).

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии, размеры хромаффинных клеток и их ядер были меньшими (рис. 2). Адреналциты имели типичную форму. Ядра – округлые, с четкими ровными контурами – характеризовались высоким содержанием эухроматина. Ядрышко располагалось центрально, реже было эктопировано. Митохондрии находились в парануклеарной области (рис. 1 Б). Их размеры и структура не отличались от таковых в контрольной группе, но отмечалось уменьшение численности митохондрий в клетках (рис. 2). Количество секреторных гранул в цитоплазме соответствовало контрольным значениям (рис. 2). В цитоплазме встречалась умеренно развитая гЭПС. Концентрация адреналина в плазме крови была меньше в среднем на 20%, чем у крыс контрольной группы (рис. 2).

У крыс, потреблявших низкие дозы ДДТ только в постнатальном периоде, размеры адреналцитов и их ядер были больше, чем у крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пренатальном и постнатальном периоде, но размер ядер не достигал контрольных значений (рис. 2). Ядра имели овальную форму и четкий контур. В структуре ядра значительно превалировал эухроматин. У адреналцитов отмечались выраженные изменения в структуре митохондрий. Митохондрии были значительно увеличены в размерах, характеризовались отеком матрикса и деструкцией крист (рис. 1 В). Количество митохондрий в клетках было уменьшено по сравнению с контролем (рис. 2). Также было значительно меньше содержание секреторных гранул (рис. 1 В, рис. 2). Хорошо была выражена гЭПС, в парануклеарной области встречался комплекс Гольджи. Концентрация адреналина в плазме не отличалась от значений контрольной группы (рис. 2).

Обсуждение

Известно, что около 90% пула адреналина в крови формирует мозговое вещество надпочечников. Исследование выявило, что лишь в группе крыс, подвергавшихся и пренатальному, и постнатальному воздействию ДДТ, снижается концентрация адреналина в крови. Изучение ультраструктурных проявлений секреции в адреналцитах показало, что в пубертатном периоде у крыс, развивавшихся в условиях воздействия дисраптора, изменения были минимальными и сводились к уменьшению числа митохондрий в клетках. Митохонд-

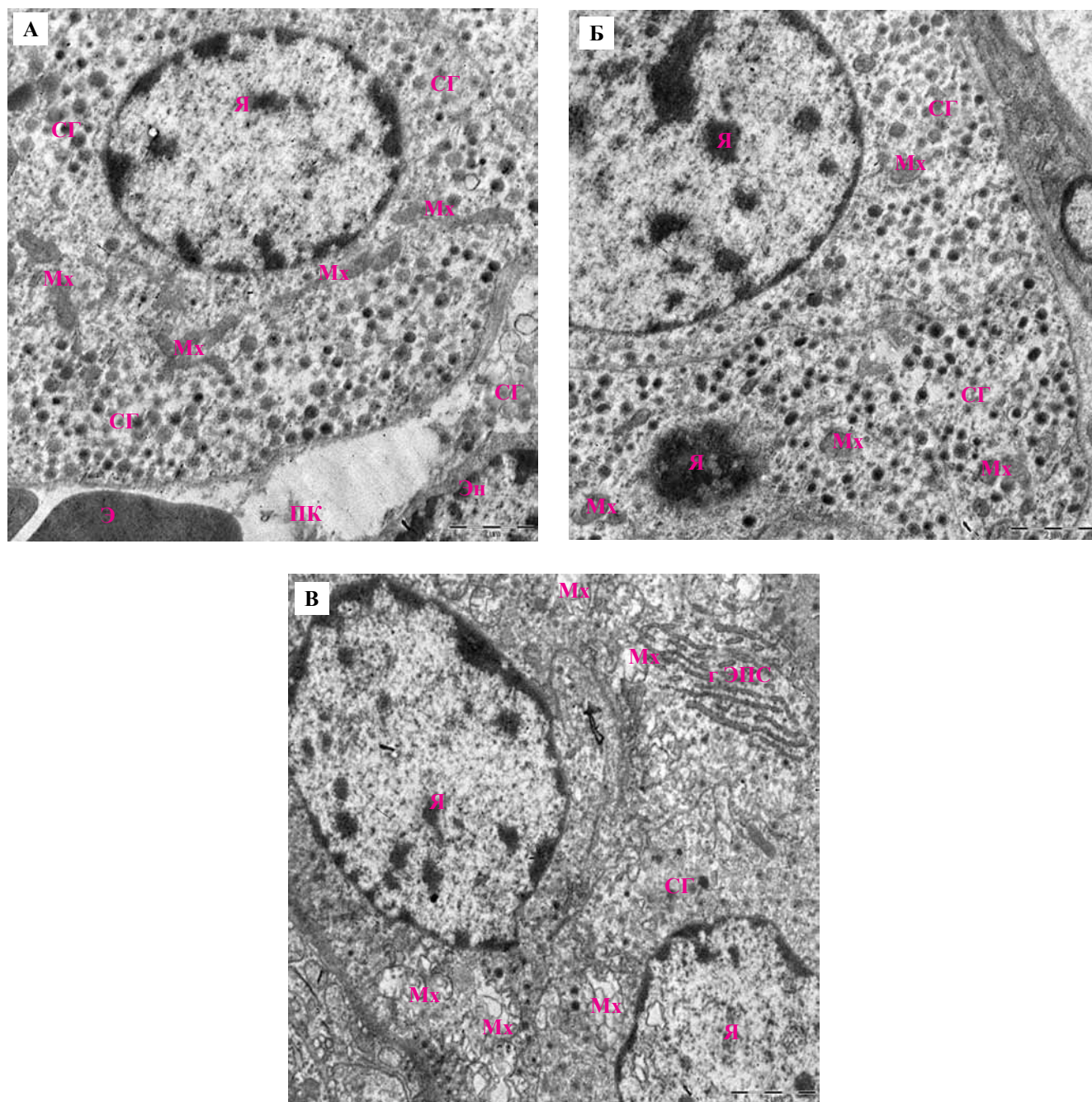


Рис. 1. Ультраструктура адреналокита крыс контрольной группы (А), подвергавшейся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ (Б) и постнатальному воздействию ДДТ (В).

А – ядро (Я) овальной формы с высоким содержанием эухроматина. Митохондрии (Мх) продолговатой формы с матриксом умеренной электронной плотности и расположены парануклеарно. В цитоплазме большое количество секреторных гранул (СГ), большинство которых не имеет признаков обводнения. К адреналокиту прилежит капилляр. В просвете капилляра (пК) видны эритроциты, над эндотелиоцитом (Эн) в просвете расположены выделившиеся секреторные гранулы (СГ).

Б – округлое ядро (Я) с ровным контуром и высоким содержанием эухроматина. Митохондрии (Мх) небольшого размера с электронно плотным матриксом. В цитоплазме большое количество секреторных гранул (СГ) с резко осмиофильным ядром.

Признаки обводнения содержимого секреторных гранул встречаются редко.

В – адреналокиты содержат ядра (Я) с неровными контурами. В цитоплазме каналцы гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС) с содержимым повышенной электронной плотности. Митохондрии (Мх) с отеком матрикса и деструкцией крист.

Количество секреторных гранул (СГ) в цитоплазме невелико



Рис. 2. Изменения морфофункциональных характеристик адреналокитов крыс, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в разные этапы онтогенеза

Значения контрольной группы приняты за 100%, статистически значимые отличия от значений контрольной группы:

* – группы крыс, подвергавшихся пренатальному и постнатальному воздействию ДДТ,

+ – группа крыс, подвергавшихся постнатальному воздействию ДДТ,

Мх – митохондрии

рии в хромоффинных клетках не только выполняют функции биологического окисления и окислительного фосфорилирования, но и, располагаясь под плазмолеммой, участвуют в экзоцитозе гранул, регулируя наряду с эндоплазматической сетью содержание и транспорт ионов кальция [8, 12, 13]. У крыс, подвергавшихся воздействию дисраптора в пренатальном и постнатальном периодах, митохондрии располагались преимущественно парануклеарно, их содержание в клетках было уменьшено. Секреторные гранулы хромоффинных клеток также способны выделять содержимое за счет растворения и молекулярной секреции, как и базофилы, эозинофилы, тучные клетки [3, 5, 6, 10], но признаков усиленного обводнения не наблюдалось, и секреторные гранулы практически не отличались по структуре от таковых у контрольных животных. Эти данные свидетельствуют об уменьшении выделения секреторного продукта, что подтверждает пониженная концентрация адреналина в плазме. Следовательно, в нарушениях секреторной деятельности хромоффинных клеток при дисрапторном воздействии ДДТ важную роль играют изменения в митохондриях. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с первого дня постнатального развития, выявлены значительные отек матрикса и деструкция крист, свидетельствующие об усилении функциональной активности митохондрий, при хорошо выраженном белоксинтезирующем аппарате и незначительном уменьшении содержания адреналина в системном кровотоке. Поскольку уменьшение числа митохондрий в 1 мкм² цитоплазмы происходило на фоне увеличения их размеров, общее количество митохондрий в клетках существенно не изменялось.

Сопоставление ультраструктурных изменений у крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ в пренатальном и постнатальном периодах и только в постнатальном периоде, указывает на усиление функциональной нагрузки и последующую гибель митохондрий как один из механизмов снижения секреторной активности адреналокитов.

Таким образом, развитие организма при пренатальном и постнатальном воздействии низких доз эндокринного дисраптора ДДТ приводит к нарушениям секреторной деятельности адреналокитов в пубертатном возрасте, связанным с уменьшением числа митохондрий в клетках и, как следствие, снижением выделения секреторных гранул, что обуславливает пониженный уровень адреналина в системном кровотоке.

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.: GIORD, 2015. 176 p. (In Russ.)].
2. Яглова Н.В., Цомартова Д.А., Яглов В.В. Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии // Биомедицинская химия. 2017. Т. 63, № 4. С. 306–311. [Yaglova N.V., Tsomartova D.A., Yaglov V.V. Differences in Production of Adrenal Steroid Hormones in Pubertal Rats Exposed to Low Doses of the Endocrine Disruptor DDT during Prenatal and Postnatal Development // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2018. V. 12, No 1. P. 80–86.]

3. Яглова Н.В., Яглов В.В. Ультраструктурные проявления молекулярного способа выявления секреторного материала тучными клетками щитовидной железы при воздействии липополисахарида // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155. № 2. С. 229–232. [Yaglova N.V., Yaglov V.V. Ultrastructural Characteristics of Molecular Release of Secretory Products from Thyroid Mast Cells Induced by Lipopolysaccharide // Bulletin of experimental biology and medicine. 2013. V. 155, No 2. P. 260–263. (in Rus.).].
4. Coupland R. Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. I. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla // J Anat. 1965;99(2):231–54.
5. Crivellato E., Belloni A., Nico B., Nussdorfer G. et al. Chromaffin Granules in the Rat Adrenal Medulla Release Their Secretory Content in a Particulate Fashion // Anat. Rec. 2004;277A:204–8.
6. Dvorak A. Ultrastructural analysis of human basophil and mast cell recovery after secretion // Semin Clin Immunol. 1994;8:5–16.
7. Ehrhart-Bornstein M., Hinson J., Bornstein S., Scherbaum W. et al. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis // Endocr Rev. 1998;19(2):101–43.
8. Garcia-Sancho J., de Diego A., Garcia, A. Mitochondria and chromaffin cell function // Pflugers Arch. 2012;464: 33–41.
9. Hatcher J., Delea K., Richardson J., Pennell K. et al. Disruption of dopamine transport by DDT and its metabolites // Neurotoxicology. 2008;29(4): 682–90. doi:10.1016/j.neuro.2008.04.010.
10. Karawajczyk M., Seveus I., Garcia R., Bjornsson E. et al. Piecemeal degranulation of peripheral blood eosinophils: a study of allergic subjects during and out of the pollen season // Am J Respir Cell Mol Biol. 2000;23:521–9.
11. Stavinoha W., Rieger J. Effect of DDT on the urinary excretion of epinephrine and norepinephrine by rats // Toxicology and Applied Pharmacology. 1966;8(3):365–8.
12. Villalobos C., Nuñez L., Montero M., Garcia A. et al. Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells // FASEB J. 2002;16:343–53.
13. Villanueva J., Viniestra S., Gimenez-Molina Y., Garcia-Martinez V. et al. The position of mitochondria and ER in relation to that of the secretory sites in chromaffin cells // Journal of Cell Science. 2014;127:5105–14.
14. 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.

ALTERED SECRETION OF ADRENOMEDULLARY A-CELLS IN RATS AFTER DEVELOPMENTAL EXPOSURE TO LOW-DOSE DICHLORODIPHENYLTRICHLOROETHANE

N.V. Yaglova, D.A. Tsomartova, V.V. Yaglov, S.S. Obernikhin, S.V. Nazimova

The study was aimed on the evaluation of secretion in adrenomedullary A-cells of pubertal rats after developmental exposure to low dose dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). Prenatal and postnatal exposure resulted in reduction of epinephrine plasma content, decreased size of A-cells and their nuclei, fewer numbers of mitochondria and retention of secretory granules in cytoplasm. Daily postnatal exposure did not change epinephrine plasma content. A-cells showed hyperfunction and exhaustion of mitochondria and lowered number of secretory granules. Thus, developmental exposure to DDT lead to reduction of mitochondria content and therefore impaired exocytosis of secretory granules which results in lowered epinephrine in circulation.

Key words: adrenal gland, adrenal medulla, A-cell, secretion, ultrastructure, epinephrine, endocrine disruptor, DDT

Информация об авторах

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

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон/факс +7 (499) 120 80 65, телефон +7 910 404 21 01. E-mail: yaglova@mail.ru

Цомартова Дибахан Асланбековна – кандидат медицинских наук, 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.

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.

Контакты: Яглова Наталья Валентиновна.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон/факс +7 (499) 120 80 65, телефон +7 910 404 21 01. E-mail: yaglova@mail.ru

Материал поступил в редакцию 25 мая 2018 года

© Коллектив авторов, 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-35-41

УДК: 616-003

СРАВНИТЕЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ ЗУБОВ, ВЫРАЩЕННЫХ МЕТОДАМИ ГЕТЕРО- И ГОМОТОПИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ЗАЧАТКОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

*О.О. Янушевич, И.Ю. Малышев, О.В. Зайратьянц, А.В. Журавлева,
Е.Н. Цмокалюк, Г.С. Рунова, Л.В. Кузнецова, М.А. Морозова, А.Г. Аджиева*

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

Целью исследования было сравнительное морфологическое исследование зубов, выращенных с помощью гетеро- (субкапсулярно в кору почки) и гомотрансплантации (в челюстную кость) их эмбриональных зачатков в эксперименте у мышей. У 16 эмбрионов мышей на 14,5 дня беременности выделяли эмбриональные зачатки зубов на одонтогенетической стадии «колпачка» из хряща нижнечелюстной дуги. Гетеротопическую трансплантацию эмбриональных зачатков зубов осуществляли под капсулу почки восьми мышам, гомотопическую – восьми мышам в кость верхней челюсти в области диастемы. Через 3 недели проводили гистологическое исследование выращенных зубов. Подтверждены возможность получения жизнеспособных эмбриональных зачатков зубов из хряща нижнечелюстной дуги мышинных эмбрионов, использования в качестве естественного биореактора для их культивирования субкапсулярного коркового слоя почек мыши и образование в 75% наблюдений в целом правильно сформированных зубов. Впервые продемонстрирована целесообразность исключения предварительного этапа культивирования зачатков зубов в искусственном или естественном биореакторе и проведения их гомотрансплантации непосредственно в челюстную кость. Выявлена хорошая интеграция выросших зубов с тканями челюсти, десны и регионарной сосудистой системы в 50% наблюдений. Исследование демонстрирует потенциальные возможности использования методов регенеративной стоматологии для выращивания зубов с целью замены способов их традиционного протезирования. Однако для разработки технологии выращивания зубов у человека необходимо решить ряд сложных проблем, включая выбор источников их роста и технологию выращивания, или способов их создания методами тканевой инженерии и биопечати, а также технику имплантации.

Ключевые слова: регенеративная стоматология, эмбриональный зачаток зуба мыши, выращивание зуба, морфология выращенных зубов, гетеро- и гомотопическая трансплантация

Несмотря на большие успехи, достигнутые за последние десятилетия в стоматологии, замещение зубов, утраченных по разным причинам, остается актуальной медико-социальной проблемой. Так, в России у 14% людей старше 60 лет зубы отсутствуют полностью, а их потеря нередко становится значительной уже в молодом возрасте. Причины утраты зубов разнообразны – плохая гигиена рта, стоматологические и общесоматические наследственные и приобретенные заболевания, различные травмы и т.д. Важно помнить, что отсутствие даже отдельных зубов ведет не только к эстетическим проблемам, но и, вследствие нарушения первичной обработки пищи, к развитию или обо-

стрению желудочно-кишечных и других заболеваний. В настоящее время для замены утраченных зубов применяются методы протезирования и имплантации с использованием искусственных материалов, однако при этом не происходит восстановления всех функций зуба и возможно развитие различных ранних и поздних осложнений.

Для решения проблемы утраты зубов могут оказаться перспективными методы копирования естественного онтогенеза или тканевой инженерии новой области стоматологии и регенеративной медицины – регенеративной стоматологии. Первые эксперименты по выращиванию зубов из аутологических и аллогенных

стволовых и индуцированных плюрипотентных клеток, а также эмбриональных зачатков *in vitro* в биореакторах и *in vivo* под капсулой почки оказались достаточно успешными, но остается много нерешенных вопросов [1–4]. Это этические и законодательные проблемы использования стволовых клеток, длительность их культивирования (у человека – до 20 месяцев), а также сложность формирования полноценного биоинженерного зуба или полученного методом 3D биопечати. Это трудности с последующей успешной имплантацией выращенных или созданных зубов в альвеолярный отросток челюстной кости с воссозданием зубодесневого сегмента. Кроме того, при использовании стволовых клеток существует риск развития опухолей. Пока методами регенеративной стоматологии удается вырастить или сформировать лишь зубоподобные структуры с нарушением формы и соотношения составляющих их компонентов – элементов пульпы, дентина и эмали. При трансплантации в челюстные кости как таких структур, так и аллогенных естественных зубных имплантов не происходит их полноценной интеграции с регионарными сосудистой и нейро-, иммуно-, эндокринной системами [7–9].

Представляют интерес дальнейшие эксперименты по выращиванию зубов из эмбриональных зачатков с предварительной гетеротопической (субкапсулярно в почку) или сразу гомотопической (в челюстную кость) трансплантацией, что позволяет сократить время формирования зуба. Накопленная информация в последующем поможет определить наиболее эффективные и альтернативные искусственным протезам и имплантам способы восстановления утраченных зубов.

Целью работы было сравнительное морфологическое исследование зубов, выращенных с помощью гетеро- (субкапсулярно в почку) и гомотрансплантации (в челюстную кость) их эмбриональных зачатков в эксперименте у мышей.

Материалы и методы

В эксперименте использовали 16 мышей C57BL/6J (филиал «Андреевска» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России) весом 23–28 граммов. Все процедуры проводили в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работ с лабораторными животными (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, Страсбург, 1985; Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденные приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977, приказ Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики»). Мышей содержали в стандартных условиях, индивидуальных клетках, при естественном освещении, температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$, свободном доступе к воде и корму. Все манипуляции проводили под наркозом.

На 14,5 дня беременности мышей декапитировали, выделяли из матки эмбрионы и помещали их в охлажденный физиологический раствор (4°C). Из эмбрионов по методике Тсуджи [5] получали эмбриональные зачатки зубов на одонтогенетической стадии «колпачка» [6]. Для этого нижнюю челюсть эмбрионов разрезали пополам, отделяли хрящ нижнечелюстной дуги (хрящ Меккеля) и выделяли из него эмбриональные зачатки резцов и моляров, которые помещали в охлажденный физиологический раствор (рис. 1 А, Б). Гетеротопическую трансплантацию эмбриональных зачатков зубов проводили под капсулу в корковый слой почки восьми мышам по общепринятой технологии [2–4], гомотопическую – также восьми мышам по специально разработанному для этих целей протоколу. Мышей под наркозом (хлоралгидрат 200 мг/кг, внутривенно) фиксировали за конечности на операционном столике, мордочки обрабатывали спиртом, верхнюю и нижнюю челюсти фиксировали отдельно и для лучшего доступа прошивали щеку шовным материалом (Prolene 5,0). В области диастемы правой половины верхней челюсти, в 1 мм перед первым моляром, перфорировали твердосплавным бором (HM1 204 007, Meisinger, Германия) небную кортикальную костную пластинку, не отслаивая слизисто-надкостничный лоскут (рис. 1 В, Г). В полученное отверстие интраоссально вводили зачаток зуба и заклеивали рану клеем БФ-6. Через 3 недели мышей декапитировали, структуры, выросшие из зачатков зубов (рис. 1 Д), выделяли вместе с верхней челюстью, оценивали визуально, проводили фоторегистрацию и помещали в 10% нейтральный забуференный формалин для гистологического исследования. Аналогичную процедуру проводили с почками, с выросшими под их капсулой зубами (рис. 1 Е).

Далее фрагменты челюсти подвергали предварительной декальцинации (реагент Биодек R, Италия) и под контролем лупы вырезали участок, содержащий зачаток зуба. После дополнительного, второго этапа декальцинации образцы ткани по общепринятой методике обезвоживали и заливали в парафиновые блоки. Фрагменты почек с зубами также подвергали декальцинации и заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы толщиной 3–4 мкм, полученные на микротоме Leica (Германия), окрашивали гематоксилином и эозином. Для получения гистологического среза выросшего из имплантированного зачатка зуба и правильной его ориентации материал челюстей и почек многократно дорезали методами ступенчатых и серийных срезов, меняя положение парафинового блока. Гистологические препараты исследовали и фотографировали на микроскопе AxioLab A1 (Carl Zeiss Microscopy, Германия).

Результаты и обсуждение

Гетеротопическая (субкапсулярно в корковый слой почки) трансплантация эмбрионального зачатка зуба. Зубы с относительно правильно развитыми структурными

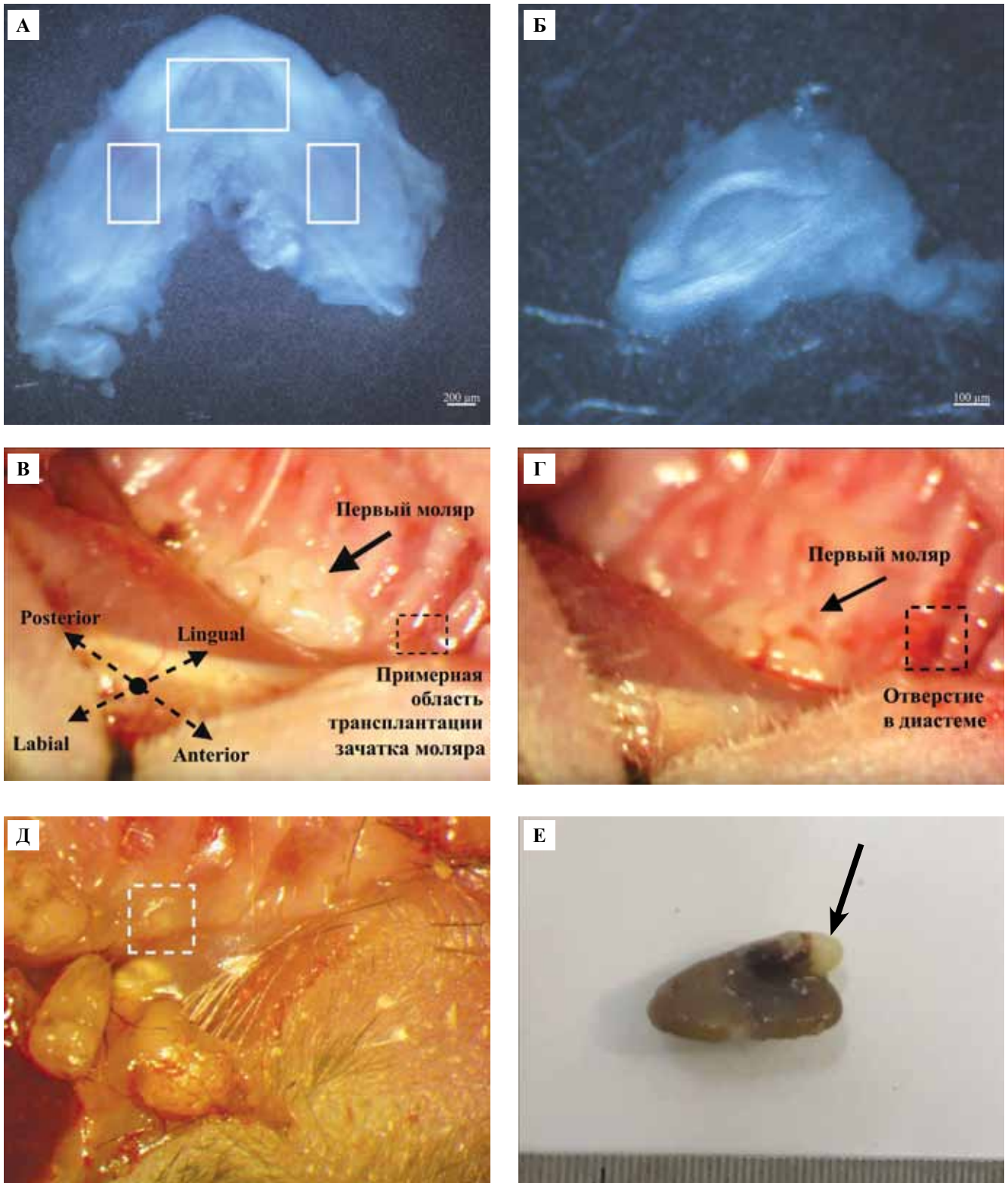


Рис. 1. Гетеро- и гомотрансплантация эмбрионального зародыша зуба мыши.

- А – выделенная нижняя челюсть эмбриона мыши (рамками отмечено расположение зачатков резцов и моляров),
 Б – выделенный зачаток зуба на 14,5 дня эмбрионального развития, В – операционное поле при трансплантации зачатка моляра мыши в диастему верхней челюсти, Г – перфорационное отверстие в диастеме верхней челюсти мыши,
 Д – структура, выросшая из трансплантированного в диастему эмбрионального зачатка зуба (отмечена пунктиром),
 Е – структура, выросшая из трансплантированного под капсулу почки эмбрионального зачатка зуба (стрелка)

ми компонентами сформировались в шести из восьми наблюдений (75%). Над поверхностью капсулы почки определялись подобные молярам образования плотной консистенции белого цвета размерами 2–3 мм, направленные перпендикулярно или под разными углами к ее капсуле (рис. 1 Е). Гистологическое исследование показало, что в 75% наблюдений образовались зубы с четким делением на корневую и коронковую части, хорошо развитым кровоснабжением нормально сформированной пульпы, ясно выраженными слоями преддентина и дентина, покрытые в коронковой части ровным слоем эмали, а также окруженные островками костной ткани в области корней. Однако форма корней зубов оказалась преимущественно неправильной, а части коронки нередко были погружены в ткани коркового слоя почки, причем на поверхности эмали сохранялся слой энамелобластов. Многослойный плоский эпителий, характерный для ротовой полости, образовывал рядом с зубами кистозные структуры, которые местами напоминали фолликулярные, местами – ортокератозные кератокисты челюстных костей у людей (рис. 2 А, Б). В двух наблюдениях аномально сформированных зубов отмечались выраженные дистрофические изменения с гибелью одонтобластов и энамелобластов, отек и очаговая лимфоидная инфильтрация пульпы и периодонтальной связки, а также дистрофические изменения преддентина, дентина и эмали (рис. 2 В). Представляет интерес одно из этих наблюдений с взаимопроникновением тканей зачатка зуба и коры почки с расположением в новообразованной мезенхиме с костной тканью и пульпе зуба очагов, представленных извитыми и прямыми почечными канальцами (рис. 2 Г).

Гомотопическая (в верхнечелюстную кость) трансплантация эмбрионального зачатка зуба. Во всех восьми наблюдениях в области имплантации зубного зачатка формировались возвышающиеся над твердым небом зубоподобные структуры твердой консистенции белого цвета, размерами и формой аналогичные молярам мыши (рис. 1 Д). Гистологическое исследование выявило, что у четырех мышей (50%) образовались зубы с характерными признаками моляров и относительно правильно сформированным соотношением и расположением их составных компонентов. Пульпарные камеры имели корневые и коронковые отделы. Пульпа была представлена фибробластоподобными клетками и экстрацеллюлярным матриксом с развитой сетью полнокровных сосудов микроциркуляторного русла, что указывало на хорошее кровоснабжение зубов и их интеграцию в локальную сосудистую систему. Тем не менее ориентировка зубов не всегда была перпендикулярной поверхности неба, а в коронковой части пульпы отмечалось перикапиллярное формирование преддентина. Границу пульпы и преддентина образовывал правильно организованный сплошной ряд одонтобластов, слой преддентина и дентина на большом протяжении завершались снаружи зубов отчетливо выраженным слоем эмали. Дентин прилежал к сформиро-

ванной периодонтальной связке, образуя структуры корней зубов, но форма их была неправильной. Эмаль покрывала как участки, свободные от мягких тканей, так и расположенные в их толще с сохранением слоя энамелобластов – высоких призматических клеток, ориентированных перпендикулярно ее поверхности (рис. 2 Д).

В других четырех наблюдениях зубы отличались либо аномально расположенными структурными компонентами с нарушением их соотношения и направления развития коронковой части и корней, либо выраженными в разной степени дистрофическими изменениями с реактивной лимфоидной инфильтрацией, отеком пульпы и периодонтальной связки, а также на большом протяжении утратой слоя одонтобластов. Слои преддентина и дентина были неравномерной толщины, только местами покрытые островками эмали (рис. 2 Е).

Таким образом, первая часть экспериментального исследования подтвердила возможность получения жизнеспособных эмбриональных зачатков зубов из хряща нижнечелюстной дуги (хрящ Меккеля) мышечных эмбрионов, использования в качестве естественного биореактора для их культивирования субкапсулярного коркового слоя почек мыши и образование преимущественно правильно сформированных зубов. Вторая часть работы впервые продемонстрировала, что имеется принципиальная возможность исключения предварительного этапа культивирования эмбриональных зачатков зубов в искусственном или естественном биореакторе. Более целесообразно проводить гомотрансплантацию, то есть сразу имплантировать зубной зачаток в костную ткань челюсти. Результаты развития эмбрионального зачатка зуба в челюсти мало отличаются от полученных при его росте под капсулой почки. Исследование показало хорошую интеграцию выросшего зуба с тканями челюсти и десны, регионарной сосудистой системой и отсутствие признаков реактивного воспаления.

Тем не менее, как и в ранее проводимых экспериментах других исследователей [1–4], от 25 до 50% зубов независимо от места трансплантации их эмбриональных зачатков формируется неправильно (вплоть до образования участков взаимопроникновения тканей, например, в почке) или в них прогрессируют дистрофические изменения, которые в финале приведут к гибели зачатка. Следовательно, в дальнейших экспериментах целесообразно сконцентрировать усилия на совершенствовании способов выделения и подготовки к трансплантации эмбриональных зачатков зубов, а также техники их имплантации, возможно с применением различных биологически активных веществ – факторов роста и т.д.

Несмотря на определенные успехи, достигнутые в эксперименте, для разработки технологии выращивания зубов у человека необходимо решить ряд сложных проблем, таких как поиск источника их роста, включая

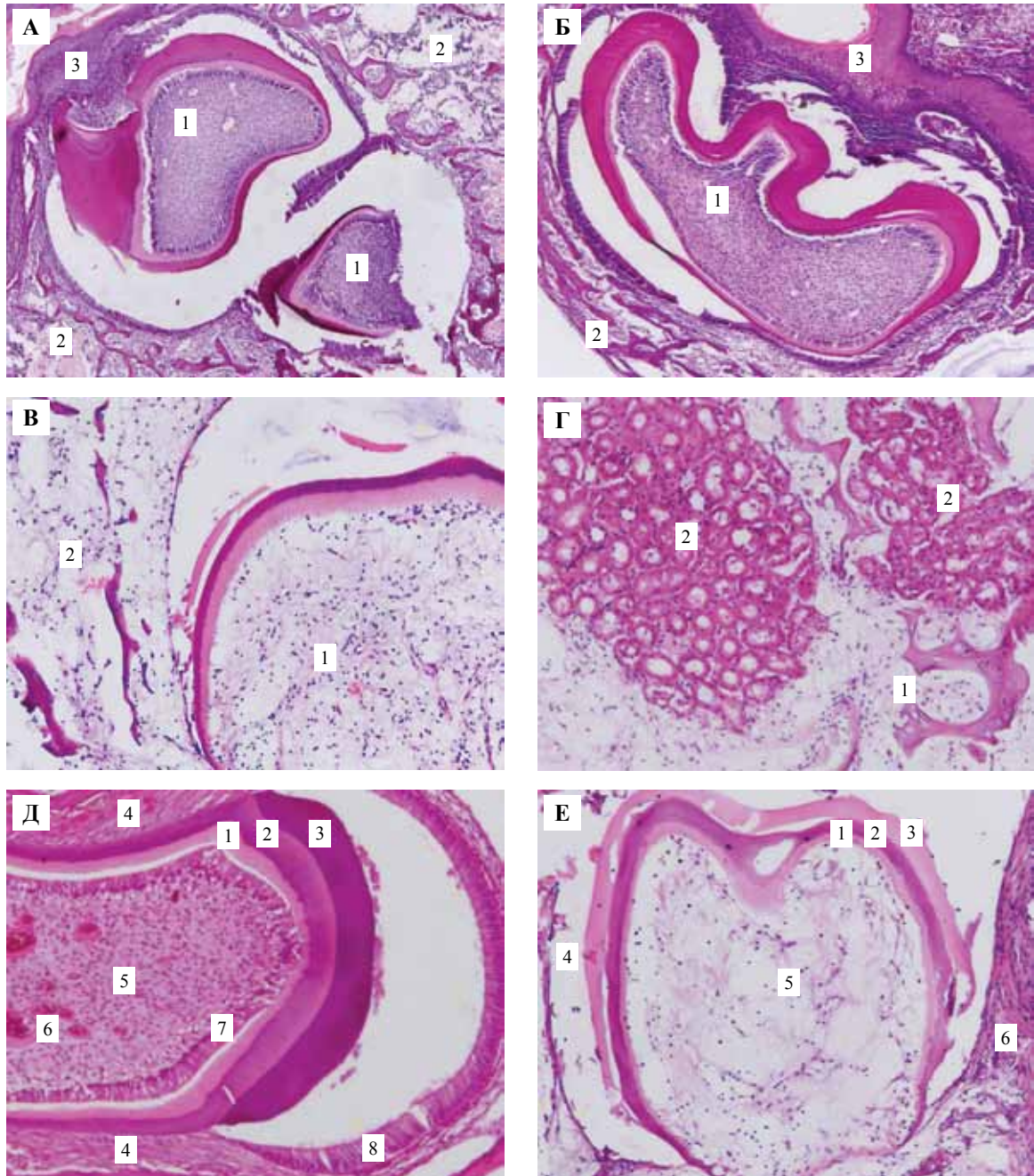


Рис. 2. Гистологическая картина правильно и anomalно сформированных зубов, выросших из их эмбриональных зачатков под капсулой почки (А–Г, гистологические срезы, параллельные поверхности почки) и в челюсти мыши (Д – гистологический срез, параллельный поверхности нёба, на уровне подслизистого слоя мягких тканей нёба, Е – гистологический срез, перпендикулярный поверхности нёба, участок зуба, покрытый эмалью, частично выступал в полость рта).
 А, Б – зуб (1), представленный пульпой с одонтобластами по периферии, предентином, дентином и эмалью, слоем энамелобластов, окруженный костной тканью (2), и многослойный плоский эпителий, характерный для ротовой полости, образовавший кистозную структуру (3). В – дистрофически измененный зуб (1), окруженный костной тканью (2), в отечной пульпе сохранившиеся одонтобласты с выраженной вакуольной дистрофией, деструкция предентина, дентина и эмали, дистрофические изменения энамелобластов, слабо выраженная диффузная лимфоидная инфильтрация.
 Г – среди новообразованной костной ткани и скоплений мезенхимальных клеток (1) островки сохранившихся извитых канальцев почки (2). Д – хорошо сформированный зуб: 1 – предентин, 2 – дентин, 3 – эмаль, 4 – периодонтальная связка, 5 – пульпа с одонтобластами на границе с предентином, 6 – полнокровные сосуды пульпы с перикапиллярным формированием предентина, 7 – одонтобласты, 8 – энамелобласты. Е – anomalно сформированный зуб: 1 – предентин, 2 – дентин, 3 – эмаль (узкие, неоднородной толщины слои), 4 – дистрофические изменения и отек периодонтальной связки, 5 – пульпа с выраженными дистрофическими изменениями, слабой диффузной лимфоидной инфильтрацией, отеком и утратой одонтобластов, 6 – окружающие зуб мягкие ткани со слабо выраженной лимфоидной инфильтрацией и дистрофически измененные костные балки. Окраска гематоксилином и эозином. А – $\times 60$, Б, В – $\times 120$, Г–Е – $\times 250$

ауто- и гетерологичные стволовые клетки [7–9], или создание биоинженерных конструкций, включая 3D биопечать, морфофункционально соответствующих такой сложной структуре, каковой являются зуб.

Следует разработать технику имплантации таких зубов с интеграцией в эпителиально-мезенхимальные ткани и регионарные сосудистые, нейро-, эндокрино-, иммунную системы альвеолярного отростка челюстей. Неясно, как при использовании клеточных технологий избежать риска таких осложнений, как инициация, со временем, роста опухолей.

Важную роль играют и сроки этих процедур, которые должны конкурировать со сроками установки искусственных имплантатов, что в настоящее время возможно лишь при совершенствовании технологии биопечати зубов.

Заключение

Регенеративная стоматология является быстро развивающимся направлением медицины и в скором времени, несомненно, внесет значительные изменения в способы лечения ряда стоматологических заболеваний. Проведенное исследование демонстрирует потенциальные возможности использования ее методов для выращивания зубов с целью замены традиционного протезирования. Подтверждена целесообразность получения жизнеспособных эмбриональных зачатков зубов из мышинных эмбрионов и впервые продемонстрирована возможность исключения предварительного этапа культивирования эмбриональных зачатков в искусственном или естественном биореакторе до их имплантации в ткани челюсти. Однако для разработки технологии выращивания зубов у человека необходимо решить целый ряд сложных проблем, включая выбор источников их роста и технологию выращивания, или иных способов их создания и технику имплантации.

Работа проведена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (Государственное задание Минздрава России от 2 февраля 2016 года

№ 056-00139-16, уникальный номер реестровой записи 110 401 000 000 000 000 071 021 02).

Литература/References

1. *Jamal H.A.* Tooth Organ Bioengineering : Cell Sources and Innovative Approaches // *Dent J.* 2016;4(18):1–12. <https://doi.org/10.3390/dj4020018>
2. *Hirayama M., Oshima M., Tsuji T.* Development and prospects of organ replacement regenerative therapy // *Cornea.* 2013;32(1):S13–21. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e3182a18e6c>
3. *Hashmi B., Zarzar L.D., Mammoto T., Mammoto A., Jiang A., Aizenberg J., Ingber D.E.* Developmentally-Inspired Shrink-Wrap Polymers for Mechanical Induction of Tissue Differentiation // *Advanced Materials.* 2014;26(20):3253–7. <https://doi.org/10.1002/adma.201304995>
4. *Monteiro N., Yelick P.C.* Advances and perspectives in tooth tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2016; <https://doi.org/10.1002/term.2134>
5. *Tooth Regeneration.* In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.).* V. 1597. 2017:97–116. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6949-4_8
6. *Jussila M., Thesleff I.* Signaling Networks Regulating Tooth Organogenesis and Regeneration, and the Specification of Dental Mesenchymal and Epithelial Cell Lineages // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2012;4(4):a008425. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008425>
7. *Otsu K., Kumakami-Sakano M., Fujiwara N., Kikuchi K. et al.* Stem Cell Sources for Tooth Regeneration: Current Status and Future Prospects // *Frontiers in Physiology.* 2014;5:36. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00036>
8. *Sonoyama W., Liu Y., Yamaza T., Tuan R.S. et al.* Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study // *Journal of Endodontics.* 2008;34(2):166–71. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
9. *Otsu K., Kishigami R., Oikawa-Sasaki A., Fukumoto S. et al.* Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells // *Stem Cells and Development.* 2012;21(7):1156–64. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0210>

COMPARATIVE MORPHOLOGY OF TEETH GROWN FROM EMBRYONIC GERMS BY HETERO- AND HOMOTOPIC TRANSPLANTATION IN EXPERIMENTAL STUDY

O.O. Yanushevich, I.Y. Malyshev, O.V. Zayratyants, A.V. Zhuravlyeva, E.N. Tsmokalyuk, G.S. Runova, L.V. Kuznetzova, M.A. Morozova, A.G. Adzhieva

The aim of the work was the comparative morphological study of tooth-like structures formed as a result of heterotopic transplantation of mouse embryonic tooth germs under the renal capsule and homotopic transplantation of tooth germs into the jawbone of the mouse. Sixteen tooth germs were isolated from mouse embryos on embryonic day 14.5 (a cap stage of tooth development) and transplanted either heterotopically under the renal capsule as a natural bioreactor (8 of 16 germs) or homotopically into the upper jawbone, namely, into the diastema (the remaining 8 germs). It has been confirmed that heterotopic transplantation of mouse embryonic tooth germs under the renal capsule resulted in formation of tooth-like structures with regular physiological dental tissue distribution in as much as 75% of instances. For the first time it has been shown that embryonic tooth germs can be homotopically transplanted directly into the jawbone without any preliminary cultivation in artificial or natural bioreactors. The results of current study have demonstrated good

integration of tooth germ-derived tooth-like structures with adjacent tissues of jaw and gingiva and regional vascular system in 50% of instances. The study demonstrates the potential possibilities of using regenerative dentistry methods for tooth regeneration instead of a traditional use of artificial implants. However, in order to develop a technology for growing teeth, there are quite a number of issues to be solved including the choice of the cell sources, tissue engineering/bioprinting technologies and implantation techniques.

Key words: regenerative dentistry, embryonic mouse tooth germ, tooth growth, morphology of grown tooth, heterotopic and homotopic transplantation

Информация об авторах

Янушевич Олег Олегович – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, ректор и заведующий кафедрой пародонтологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Россия, Москва, ул. Делегатская, д. 20. E-mail: olegyanushevich@me.com

Мальшев Игорь Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 985 177 90 70. E-mail: iymalyshev1@gmail.com

Зайратьянц Олег Вадимович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 903 184 92 17. E-mail: ovzair@mail.ru

Журавлева Анна Владимировна – ассистент кафедры патологической анатомии, врач-патологоанатом клинического медицинского центра МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 905 577 91 47. E-mail: zhuravleva_a.v@mail.ru

Цмокалюк Елена Николаевна – ассистент кафедры патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 905 328 33 09. E-mail: etsmokalyk@mail.ru

Рунова Галина Сергеевна – кандидат медицинских наук, профессор кафедры пародонтологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 910 464 92 61. E-mail: runovagal@mail.ru

Кузнецова Лариса Вячеславовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных биотехнологий Научно-исследовательского медико-стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 917 542 55 85. E-mail: lorakuznetsova@gmail.com

Морозова Маргарита Александровна – ординатор кафедры пародонтологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 965 337 86 08. E-mail: margaritka.sunny@yandex.ru

Аджиева Авельдина Гаряевна – ординатор кафедры пародонтологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Россия, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 910 464 92 61. E-mail: runovagal@mail.ru

Контакты

Зайратьянц Олег Вадимович

Телефон +7 903 184 92 17. E-mail: ovzair@mail.ru

Материал поступил в редакцию 23 июля 2018 года

© Коллектив авторов, 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-42-52

УДК: 576.08+591.81

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ У МЫШЕЙ C57BL/6

*Е.А. Пономаренко, В.А. Мхитаров, С.А. Кузикаянц, Н.А. Золотова,
Д.Н. Хочанский, И.С. Цветков, А.А. Степанов*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

В работе представлена детальная цитологическая характеристика преобразования структур половых клеток мыши в процессе их дифференцировки от сперматогониев до сперматозоидов. Полученные данные сопоставлены с имеющимися в литературе электронномикроскопической и светооптической характеристиками клеток сперматогенеза мыши. Цитологическая характеристика половых клеток сперматогенного эпителия в мазках необходима для идентификации клеток сперматогенеза при проведении экспериментальных исследований.

Ключевые слова: сперматогенез мышей, сперматогонии, сперматоциты, сперматиды

Цель работы – дать детальную цитологическую характеристику половых клеток сперматогенного эпителия в мазках семенников мыши.

Клетки сперматогенного эпителия в разных отделах извитых семенных канальцев у мышей образуют группы клеток с разными стадиями дифференцировки. Так, например, седьмая стадия цикла сперматогенного эпителия у мышей содержит сперматогонии типа А-А, сперматоциты на стадии прелептотены, пахитены и сперматиды 6-го и 15-го этапов спермиогенеза [2, 5].

Ряд авторов [2, 5, 14, 18] при описании цитологических особенностей сперматогенного эпителия на гистологических срезах учитывали стадию дифференцировки, основываясь на клеточном составе групп половых клеток, что значительно облегчало их идентификацию. По сравнению с гистологическими срезами определенные морфологии и стадии развития сперматогенных клеток мыши в мазках представляет более трудную задачу, так как в этом случае отсутствуют клеточные ассоциации определенного типа, нарушены тканевые структуры и клетки разобщены между собой [22]. Для идентификации половых клеток семенника мыши в мазках необходимо выделение морфологических признаков, которые позволяют отнести их к определенному типу дифференцировки, поэтому в работе нужно было систематизировать данные литературы – для идентификации стадии развития половых клеток. Для этого использованы схематические изображения клеток, данные электронной и световой микроскопии срезов семенников мыши.

Материалы и методы

В работе использованы мыши-самцы линии C57BL/6 массой тела 20–22 грамма (питомник «Столбовая»).

При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека. Мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом.

Для более детальной верификации морфологии половых клеток применяется окраска с помощью ШИК-реакции, которая позволяет выявлять акросомы в сперматиде на разных этапах дифференцировки [4]. В связи с этим мы изготавливали мазки семенников мышей, фиксировали по методу Шабадаша, проводили ШИК-реакцию и докрашивали ядра гематоксилином Майера [4]. Снимки делали с помощью микроскопа AxioPlan 2 imaging (Carl Zeiss, Германия) при $\times 640$. Морфологию половых клеток в мазках сравнивали с описанной в литературе.

Результаты и обсуждение

Клетки сперматогенного эпителия млекопитающих проходят ряд последовательных цитологических преобразований – процесс сложной дифференцировки половых клеток, конечной целью которого является образование сперматозоидов, способных существовать автономно и оплодотворять яйцеклетку [2, 5]. В сперматогенезе выделяют три этапа. Первый этап – сперматоцитогенез, когда происходит последовательное митотическое деление сперматогониев с образованием более дифференцированных поколений клеток и формированием сперматоцитов на стадии прелептотены. Второй этап – мейоз – включает изменение ядерного материала клетки: кроссинговер, то есть обмен между генными локусами гомологичных родительских хромосом, два деления созревания с формированием

сперматиды с гаплоидным набором хромосом. Третий этап – спермиогенез, в результате которого происходит формирование сперматозоида из сперматиды [2, 5]. На каждом этапе дифференцировки половые клетки претерпевают морфологические изменения и приобретают характеристики, присущие только определенной стадии их развития.

При морфологическом анализе клеток сперматогенного эпителия мышей в мазках к клеткам первого этапа сперматогенеза относили сперматогонии типа А0, А1–4, промежуточного типа (Пр) и типа Б (табл. 1).

В большинстве исследований тип сперматогониев идентифицировали в соответствии с определенной стадией развития эпителия семенных канальцев [13, 14, 18]. Сперматогонии разных типов в мазках имеют характерные признаки. При оценке сперматогониев типа А0 в электронном микроскопе ядро имеет диффузно деконденсированный хроматин с одним или двумя четко очерченными ядрышками. Цитоплазма содержит немногочисленные митохондрии с пластинчатыми либо трубчатыми кристами, слабо развитый эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. В цитоплазме имеется большое количество рибосом и полирибосом [2, 5] (табл. 1).

Схематические изображения, электронномикроскопические фотографии сперматогониев при $\times 7300$ и исследования клеток при световой микроскопии систематизированы в таблице 1. Они основаны на данных литературы [12–14]. Трансмиссионная электронная микроскопия – трудоемкий метод, и его использование не всегда возможно. Более доступным является исследование клеток в мазках. При цитологическом исследовании необходимо учитывать не только морфологию клетки, но и размеры ее ядра. Для сперматогониев типа А мыши размеры ядра составляют 12–14 мкм [11].

Chiellini-Garcia и Meistrich (2008) отмечают, что фиксация семенников с помощью раствора Ценкер (ценкер-формол) или жидкости Буэна и последующей заливкой в парафин не дает четкой морфологической картины сперматогониев, поэтому авторы в качестве фиксатора предлагают использовать глутаровый альдегид, заливку в эпоксидные смолы, изготолвление срезов толщиной 5 мкм и окрашивание их толудиновым синим. Идентификация сперматогониев с помощью световой микроскопии основывается на морфологических особенностях структур ядер этих клеток, состоянии хроматина и гетерохроматина [12]. Первый оцениваемый параметр – гетерохроматин рассеян по всему ядру в виде крупных глыбок. В сперматогониях типа А0 глыбки гетерохроматина более выражены, чем у других типов сперматогониев, и чередуются с небольшими прозрачными глыбками эухроматина (табл. 1). Чем больше дифференцированы сперматогонии, тем меньше размер глыбок, что в конечном счете дает картину мелкой гранулярности ядра [12]. Вторая особенность сперматогониев – наличие примембранного гетерохроматина, который начинает появляться в сперматогониях

типа А2 у мышей и занимает 10% площади ядерной оболочки. Количество примембранного гетерохроматина увеличивается от сперматогониев типа А2 до сперматогониев типа Б и достигает 70–100% площади ядерной оболочки (табл. 1). Третий параметр оценки сперматогониев – число, форма и плотность ядрышек. В менее зрелых сперматогониях они небольшие по размеру, нерегулярные, компактные, темные. У сперматогониев типа А1 ядрышки четко очерчены и имеют сетчатую структуру, а в сперматогониях типов А2–А4 постепенно становятся менее компактными и их количество составляет 2–3 на ядро. В сперматогониях типов Пр и Б ядрышки более компактные и темные. Цитоплазма редко имеет четкие признаки, которые можно использовать для дифференцировки клеток сперматогонияльного ряда [12]. Четвертым признаком в развивающихся половых клетках [13] является расположение комплекса Гольджи относительно базальной мембраны, а пятым – размеры и число митохондрий. Мы исследовали клетки в мазках с использованием светового микроскопа, поэтому данные признаки не могли быть учтены.

Для идентификации сперматогониев в полученных мазках при ШИК-реакции цитологическая картина была соотнесена со схематическим изображением сперматогониев грызунов (крысы, мыши), представленным в работе Clermont, Bustos-Obregon [14], с электронномикроскопическими фотографиями Chiellini-Garcia, Russell [13] и данными световой микроскопии Chiellini-Garcia, Meistrich [12].

Основываясь на работах Clermont, Bustos-Obregon, Chiellini-Garcia и Meistrich [12–14], можно выделить следующие признаки, присущие сперматогониям соответствующего типа.

Сперматогонии типа А0: хроматин неоднородный, распределен неравномерно по всему ядру, его более конденсированные плотные области содержат небольшие вкрапления гетерохроматина (табл. 1, указано стрелками), светлые зоны гетерохроматина не содержат. Ядрышки имеют небольшие размеры, компактные, темные, их количество варьибельно (1–2).

Сперматогонии типа А1: хроматин мелкозернистый, равномерно рассеян по всему ядру. Наличие гетерохроматина на внутренней стороне ядерной мембраны не выявлено. Ядрышки компактны, их количество варьибельно (1–3).

Сперматогонии типа А2: хроматин сперматогониев А2 имеет более плотную структуру, чем в сперматогониях А1. Обнаружены больше областей с мелкозернистой структурой и вкрапления гетерохроматина по внутреннему краю ядерной оболочки, которые занимают <10% площади ядерной мембраны. Ядрышки по сравнению с таковыми в сперматогониях А1 были такой же плотности, но распределены по ядру.

Сперматогонии типа А3: хроматин в сперматогониях этого типа тоже мелкозернистый, как в типе А2. При этом отмечено повышение количества вкраплений

Морфология сперматогонияльных клеток мыши

Сперматогонии, типы	Схематическое изображение сперматогониев грызунов – крыс и мышей [14]	Электронные микрофотографии [13], ×7300	Препарат – срез, световая микроскопия [12], ×1000	Препарат – мазок, световая микроскопия, окраска: ШИК-реакция с докраской ядер гематоксилином (собственные данные), ×640
A0				
A1				
A2				
A3				
A4				
Пр				
Б				

гетерохроматина, они занимают от 10 до 25% площади внутренней поверхности ядерной оболочки. Ядрышки так же свободно располагаются в ядре.

Сперматогонии типа А4: хроматин остается мелкозернистым, однородным. Гетерохроматин занимает 25–40% поверхности внутренней мембраны ядерной оболочки. Ядрышки по количеству, расположению и плотности подобны ядрышкам сперматогониев типов А2 и А3.

Сперматогонии типа Пр: хроматин мелкозернистый, гетерохроматин образует широкую неравномерную линию по внутренней стороне ядерной оболочки и занимает 40–90% ее окружности. Ядрышки конденсированы, и их количество составляет 2–3.

Сперматогонии типа Б: ядра этих клеток имеют меньший диаметр (8 мкм), чем сперматогонии типа А0–А4 [11], хроматин остается мелкозернистым. Гетерохроматин занимает 25–45% площади ядерной оболочки и образует округлые плотные гранулы больших размеров. Ядрышки разной формы не связаны с ядерной мембраной.

Подводя итог, можно выделить следующие признаки сперматогониев: небольшое количество цитоплазмы, довольно крупное ядро с 1–3 ядрышками, в большинстве клеток этого типа хроматин мелкозернистый. Основным признаком, на который мы ориентировались при определении типа сперматогониев, – количество гетерохроматина относительно площади внутренней окружности ядра.

Следующий этап – мейоз. Это процесс деления клетки, на разных этапах которого происходят рекомбинация ее генетического материала и редукция числа хромосом до гаплоидного [7]. В соответствии с кинетикой процесса мейотического деления на разных стадиях этого длительного многостадийного процесса образуются клетки с определенной морфологией.

Первый этап деления клетки при мейозе включает несколько фаз: профазы I, метафазы I, анафазы I, телофазы I мейоза [7]. Первичные сперматогонии профазы I мейоза различаются по морфологии в зависимости от стадии. Данные различия обусловлены изменениями морфологии хромосом, их расположением и, как следствие, изменением морфологии ядер.

В профазе I мейоза выделяют следующие стадии: прелептотена; лептотена – стадия тонких нитей (хромосом); зиготена – стадия формирования синаптонемного комплекса и прохождения конъюгации гомологичных родительских хромосом (синапсис); пахитена – стадия толстых нитей. В пахитене профазы I мейоза происходят полная конъюгация и обмен участками между гомологичными родительскими хромосомами – кроссинговер; диплотена – стадия двойных нитей. На этой стадии идет отталкивание хромосом в зоне центромера, остаются зоны перекреста и сцепления – хиазмы; диакinesis характеризуется конденсацией хромосом, уменьшением числа хиазм, исчезновением ядрышек и ядерной оболочки, расхождением центриолей [3, 7].

Сперматогонии на стадии прелептотены имеют равномерное распределение хроматина в ядре. Хроматин конденсируется и становится более плотнотелным по сравнению с таковым в сперматогониях Б. Отмечают области конденсированного хроматина, которые могут быть локализованы по всему ядру или располагаются в непосредственной близости к ядерной оболочке (табл. 2). Хроматиновые глыбки неправильной формы связаны между собой тонкими волокнами, что является признаком прелептотенной конденсации хромосом (прохромосом) [6]. Для этих клеток характерно небольшое количество цитоплазмы вокруг ядра [9]. Диаметр ядра составляет 7,5–8 мкм [9]. Де Робертис и соавт. [3] считают прелептотену соответствующей ранней профазе митоза. Хромосомы чрезвычайно тонкие, с трудом различимые. Выделяются половые хромосомы в виде компактных гетеропикнотических телец. Goetz et al. [17] описывали прелептотену у мышей после окраски клеток серебром как клетки с диффузно рассеянным хроматином, в ядре которых много положительно окрашенных серебром телец и ряд телец большего размера, а также видны тонкие нити, окрашенные серебром, – хромосомы (табл. 2). Russell и Frank [22] проводили сравнительный анализ сперматогонии в прелептотене со сперматогонием типа В. Ядра этих клеток сходны по внешнему виду, но есть ряд отличий. Гетерохроматин клеток в прелептотене неглубоко проникает внутрь ядра, расстояния между скоплениями гетерохроматина не столь большие. Ядра более неоднородные по внешнему виду. Ядерная оболочка видна не очень четко.

Сперматогонии на стадии лептотены профазы I мейоза характеризуется появлением тонких нитчатых элементов в ядре в результате начала деконденсации хромосом. В других областях ядра хроматин является гомогенным, гранулированным. Часто наблюдают фибриллярно-гранулярные образования нуклеолонемы. Диаметр ядер этих клеток составляет 8–10 мкм [9]. Ядро имеет однородную плотность, а цитоплазма относительно менее окрашена (табл. 2). Во время лептотены нитевидные хромосомы прикрепляются теломерными участками к ядерной оболочке, несколько поляризуются, что облегчает выравнивание, сопряжение гомологичных хромосом, и, как следствие, в конце лептотены формируется фигура «букета» в ядре [10].

Во время формирования «букета» в сперматогониях мыши теломеры разных хромосом располагаются рядом с центромерой и формируется прицентромерный гетерохроматин – хромоцентр, который расположен на периферии ядра (рис. 1) [10].

Ю.С. Ченцов описывает лептотену следующим образом: «Это стадия тонких нитей, хромосомы тонкие, их компактизация снижена в 30 раз, по сравнению с митозом, а длина может превышать в 10–100 раз соответствующие митотические хромосомы». Кроме того, есть указание на то, что на тонких хромосомах в «букете» появляются участки более конденсированного

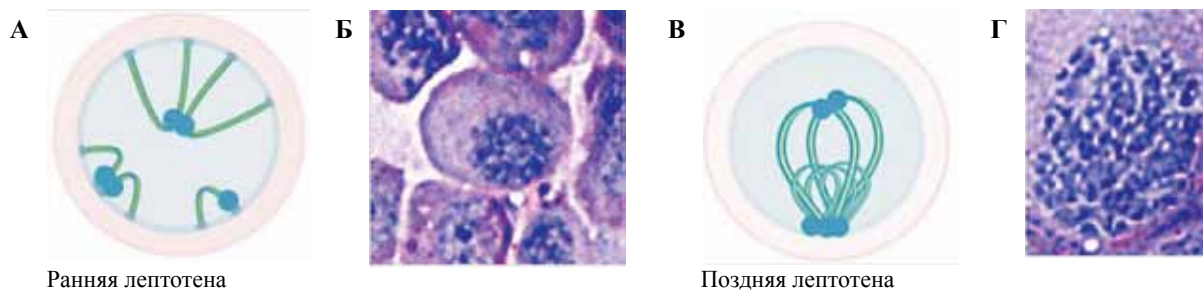


Рис. 1. Схема формирования фигуры «букета» в ядре сперматоцита.
А, В – стадии лептотены [10], Б, Г – препарат-мазок (собственные данные)

хроматина – хромомеры, которые как бы нанизаны в виде бусинок по всей длине хромосомы. В теломерных участках гомологичных хромосом, связанных с ядерной оболочкой, появляется синаптонемный комплекс [7].

В сперматоцитах на стадии зиготены профазы I мейоза сохраняется структура «букета» и полярного соединения хромосом, что способствует упорядочению конъюгации [10]. Появляются короткие сегменты синаптонемных комплексов (табл. 2). X и Y хромосомы (в мужских половых клетках) конденсируются с формированием «полового пузырька». Ядра этих клеток имеют диаметр 10–12 мкм. При электронной микроскопии визуализируются эндоплазматический ретикулум с узкими цистернами и удлинённые митохондрии с расширенными кристами [9]. На стадии зиготены сохраняется структура «букета», с началом формирования синаптонемных комплексов, они при световой микроскопии не видны [1, 7, 10, 17].

На стадии пахитены профазы I мейоза ядро сперматоцита увеличивается, его размеры варьируют от 12 до 18 мкм. Ядра этих клеток содержат зернистый конденсированный хроматин, видны «половой пузырек» (табл. 2, стрелка) и большое шаровидное ядрышко, которое на более поздних стадиях прилежит к ядерной мембране. При электронной микроскопии описаны митохондрии с расширенными кристами и выражены эндоплазматический ретикулум. Хромосомы укорачиваются, становятся более конденсированными. Сперматоциты в пахитене – это крупные клетки, в которых тонкий край цитоплазмы окружает большое ядро с конденсированным хроматином, иногда видно ядрышко [21].

В сперматоците на стадии диплотены профазы I мейоза происходит отталкивание участков гомологичных хромосом друг от друга. Разрушается синаптонемный комплекс, кроме тех локусов, где произошёл кроссинговер и сформировались хиазмы [1].

На стадии диакинеза в сперматоците завершается отталкивание участков гомологичных родительских хромосом, число хиазм уменьшается, биваленты укорачиваются, ядрышки исчезают [7]. Хромосомы теряют связь с ядерной оболочкой. Происходит подготовка к построению хромосом на экваторе веретена деления [1]. Evans et al. [16] изучали эту стадию с помощью

метода обработки клеток гипотоническим раствором и высушивания препаратов. На препаратах видно расхождение хромосом, наличие хиазм. Нам удалось найти сперматоцит со сходной картиной ядра при фиксации клеток в мазках и проведении ШИК-реакции с докраской гематоксилином (табл. 2).

При описании дальнейших фаз мейоза (рис. 2) – метафаза I и II, анафаза I и II, телофаза I и II мейоза – можно ориентироваться только на расположение хромосом относительно веретена деления, ядерная мембрана в метафазе и анафазе разрушена, в телофазе она образуется вновь. Соответствующие изображения даны на снимках в мазках при ШИК-реакции с докраской ядер клеток гематоксилином.


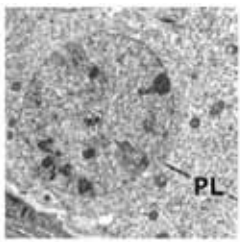
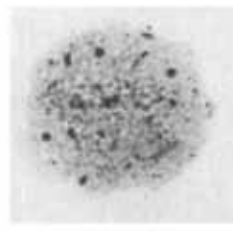
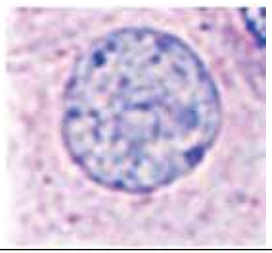
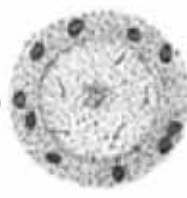
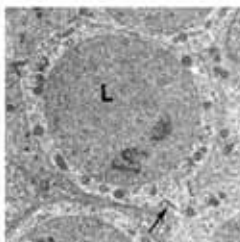
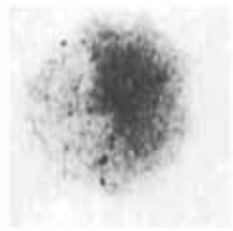
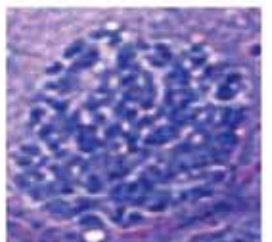
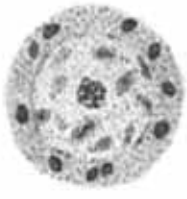
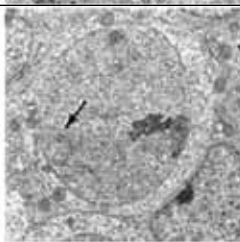
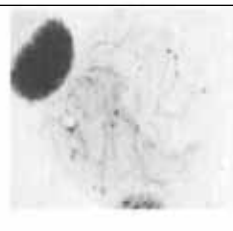


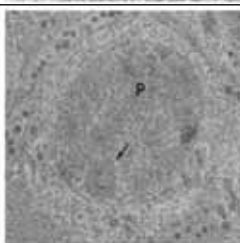
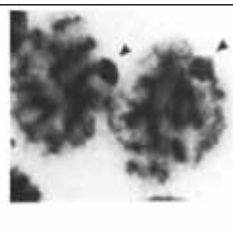
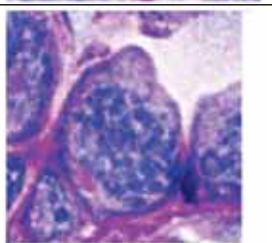

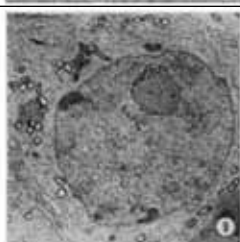
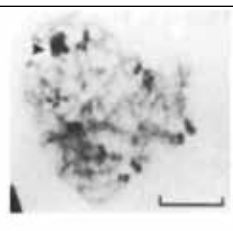
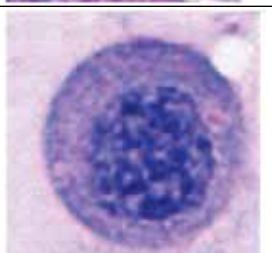
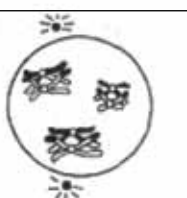
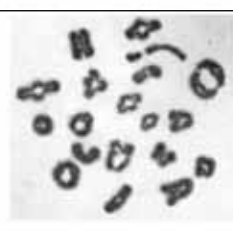
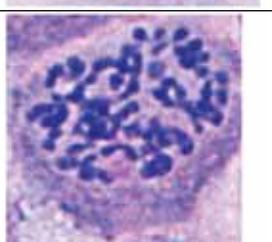
Подводя итоги, можно отметить, что наибольшие трудности при идентификации сперматоцитов в мазках вызывают клетки, относящиеся к профазе I. Общим для этих клеток является то, что они довольно больших размеров, с крупным ядром. Клетки прелептотены сходны со сперматогониями Б. Отличие состоит в том, что ядра на стадии прелептотены профазы I мейоза крупнее, хроматин неоднороден, а расположенный вдоль ядерной оболочки гетерохроматин не выражен. Лептотена в раннем периоде характеризуется формированием фигуры «букета», в позднем – наличием этой фигуры. В стадии зиготены профазы I мейоза происходит полная конъюгация хромосом, которые в световом микроскопе выглядят как спиралевидно закрученные тяжи. В пахитене профазы I мейоза также можно видеть специфическую картину конденсированных хромосом. На стадиях диплотены и диакинеза наблюдают разную степень выраженности расхождения конденсирующихся хромосом перед метафазой I мейоза.

Клетки третьего этапа спермиогенеза – сперматиды – легко определяются с помощью окраски акросомы. Акросома – это органелла, которая прилежит к ядру в виде «шапочки», содержит гидролитические ферменты и углеводы, которые при проведении ШИК-реакции окрашиваются в ярко-малиновый цвет. По форме, размерам акросомы и по форме ядра выделяют 16 и 18 этапов спермиогенеза [2, 5, 18].

Leblond, Clermont, Hess [15, 18, 19] определяли принадлежность клеток сперматогенного эпителия к определенной стадии по морфологии сперматид. Исследователи выделили I–XII стадий развития эпителия

Таблица 2

Морфология сперматоцитов мыши в профазе I

Схематическое изображение клеток [9]		Электронные микрофотографии [9], ×4800	Препарат – срез, световая микроскопия. А–В окраска серебром, Г–Д – карболовым фуксином [17], Е – метод высушенных препаратов [16], ×1000	Препарат – мазок, световая микроскопия, окраска: ШИК-реакция с докраской ядер гематоксилином (собственные данные), ×640
Прелетогена			А 	
Летогена			Б 	
Зиготена			В 	
Пахитена			Г 	
Диплотена			Д 	
Диакинез			Е 	

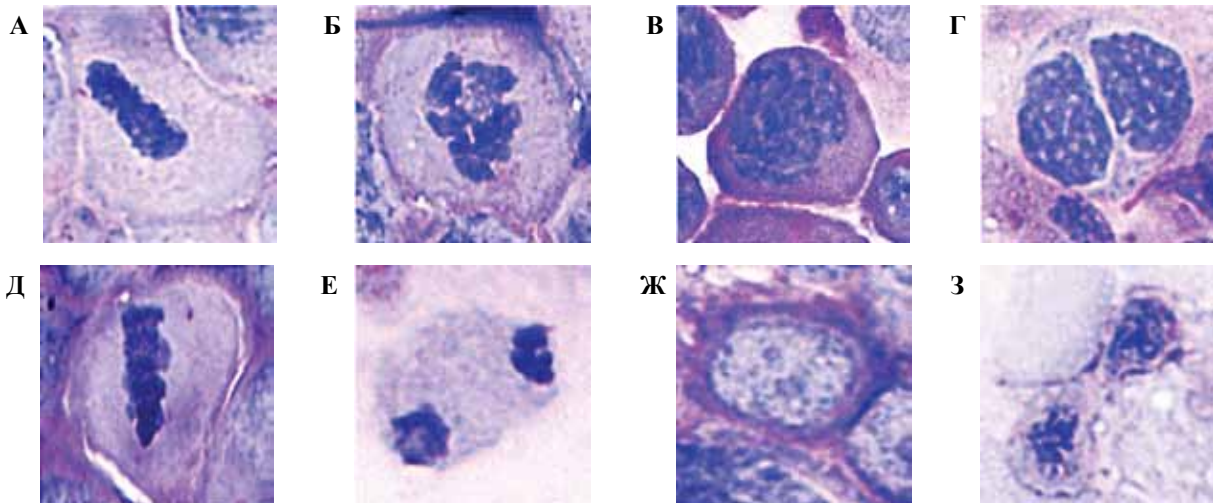


Рис. 2. Клетки семенника мыши в мазках-отпечатках на стадиях метафазы I–телофазы II мейоза. А – метафаза I, Б – анафаза I, В – анафаза I, Г – телофаза I, Д – метафаза II, Е – анафаза II, Ж – телофаза II (двухядерные ранние сперматиды по Meistrich [20]), З – телофаза II

в зависимости от клеточных ассоциаций, встречающихся в поперечном сечении извитых канальцев (рис. 3). Hess [18] обращает внимание на то, что в процессе сперматогенеза часто можно встретить набор клеток, характерный для двух стадий промежуточного типа, поэтому для оценки целесообразно использовать градацию сперматид: ранние, I–V; средние, VI–VIII; поздние, IX–XII (рис. 3).

Стадии развития сперматогенного эпителия можно различить только на срезах канальцев, поэтому при исследовании мазков мы ориентировались главным образом на форму ядер сперматид и размеры акросом. Тем не менее с целью систематизации и описания морфологии клеток была использована классификация, отражающая стадии спермиогенеза (I–XII) (табл. 3).

Процесс спермиогенеза делят на четыре фазы – Гольджи, колпачка, акросомную фазу и фазу созревания [2, 5]. При описании фаз спермиогенеза опираются на локализацию, форму и размеры акросомы, ядер сперматид. В фазе Гольджи (1–4-й этапы) акросомы представляют собой две гранулы, в конце фазы формируется одна гранула. В стадии колпачка (5–8-й этапы) акросома расплывается по поверхности ядра и частично его охватывает. В акросомной фазе (9–14-й этапы) идут сложные изменения ядра сперматиды, в результате чего формируется форма, близкая к сперматозоиду. В следующей фазе происходит окончательное созревание сперматозоида. Указанные фазы созревания сперматид в сперматозоид основаны на морфологических и функциональных характеристиках, представлен-

ных в работах Leblond, Clermont, Hess [15, 18, 19]. Эта классификация основана на характеристике акросом и морфологии сперматид. Так, Leblond, Clermont [19], выделяют 12 стадий (клеточных ассоциаций) в сперматогенном эпителии (табл. 3), и стадиям в какой-то степени соответствуют 16 этапов созревания сперматид.

Стадия I (этап 1). Сперматиды на этом этапе имеют круглое ядро, в центре которого расположено ядрышко. Комплекс Гольджи не содержит ШИК-положительного материала.

Стадия II (этап 2). Появляются небольшие проакросомные ШИК-положительные гранулы в аппарате Гольджи. Проакросомная гранула прилежит к ядру.

Стадия III (этап 3). Акросомная гранула формируется в крупной везикуле комплекса Гольджи, прилежит к ядру и образует углубление в круглом ядре сперматиды.

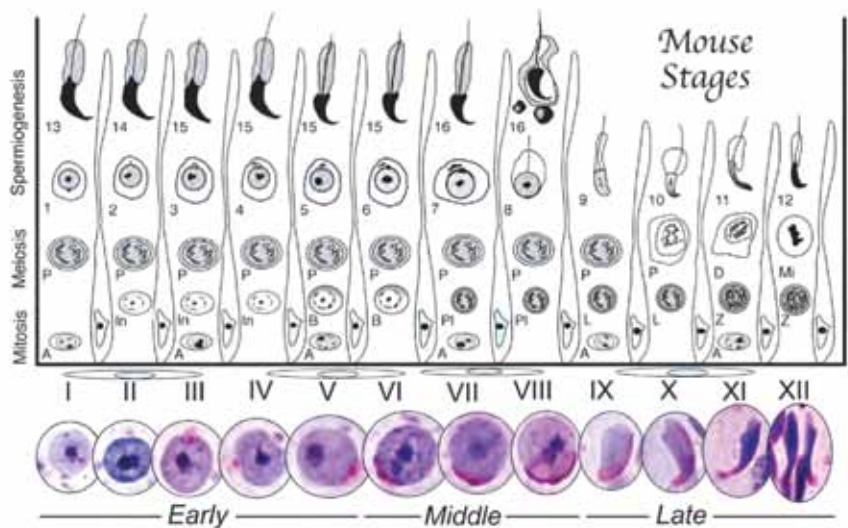


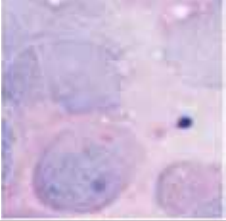

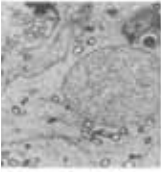

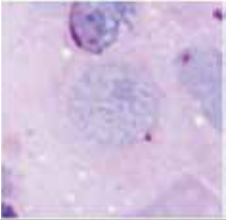


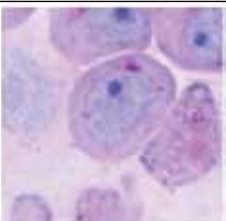
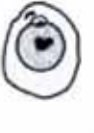

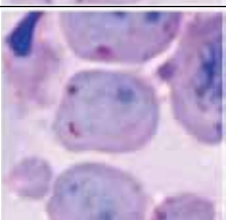

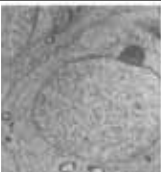

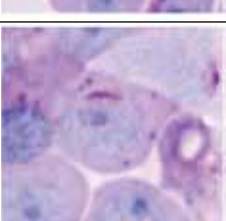


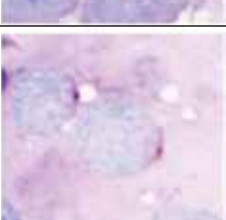

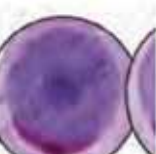
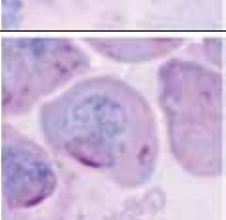

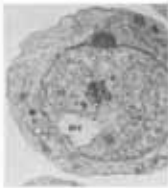
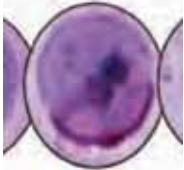
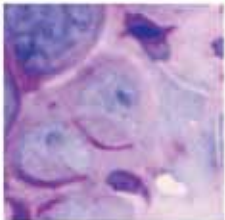

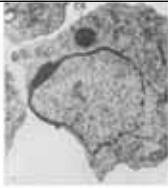




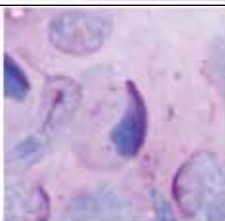

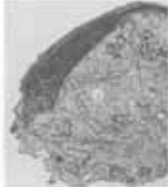

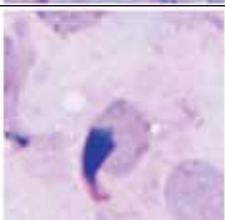



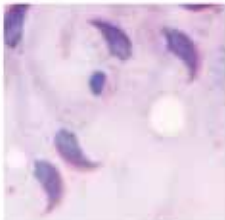


Рис. 3. Этапы цикла дифференцировки сперматогенного эпителия мыши по Hess [18]

Таблица 3

Морфология сперматид на срезах и мазках

Классификация сперматид [18]	Схематичное изображение клеток [18]	Электронные микрофотографии [8]	Препарат – срез, световая микроскопия [18]	Препарат – мазок, световая микроскопия, окраска: ШИК-реакция с докраской ядер гематоксилином (наши результаты), ×640	
Ранние	I		*		
	II		 ×6425		
	III		*		
	IV		*		
	V		 ×8160		
Средние	VI		*		
	VII		*		

Классификация сперматид [18]		Схематичное изображение клеток [18]	Электронные микрофотографии [8]	Препарат – срез, световая микроскопия [18]	Препарат – мазок, световая микроскопия, окраска: ШИК-реакция с докраской ядер гематоксилином (наши результаты), ×640
Поздние	VIII		 ×8165		
	IX		 ×6885		
	X		*		
	XI		 ×9065		
	XII		 ×7750		

* – данные в литературе отсутствуют

Стадия IV (этап 4). На этой стадии акросомная гранула начинает уплотняться.

Стадия V (этап 5). Акросомная система представлена акросомной гранулой, расположенной на ШИК-положительной линии с образованием «шапочки», колпачка на поверхности круглого ядра сперматиды.

Стадия VI (этап 6). ШИК-положительная акросомная система распространяется по поверхности круглого ядра, занимает менее 1/3 его площади, утолщается, но гранула определяется.

Стадия VII (этап 7). Акросомная система продолжает распространяться по 1/3 поверхности ядра и становится тоньше, в результате чего центральная гранула выступает над акросомной везикулой.

Стадия VIII (этап 8). Акросома уплощена и формирует «шапочку», которая распространяется почти на половину окружности ядра сперматиды.

Стадия IX (этап 9). На этом этапе круглое ядро становится овальным. Акросома покрывает тонким слоем удлиненное ядро от его вершины к каудальной части.

Стадия X (этап 10). Головка сперматозоида формирует острый угол. Дорсальная поверхность ядра покрыта акросомой.

Стадия XI (этап 11). Ядра сперматиды становятся вытянутыми и окрашиваются более интенсивно, что указывает на конденсацию хроматина.

Стадия XII (этап 12). Ядра сперматид вытянутые, ШИК-положительная акросома охватывает дорсальную и вентральную поверхности ядра, за исключением зоны, прилежащей к каудальной части сперматиды.

Этапы 9–14 (акросомная фаза) соответствуют перемещению акросомы по вентральной поверхности ядра сперматиды и удлинению ядер сперматид. Эта миграция завершается к 14-му этапу. Процесс распространения акросомы по поверхности ядра трудно определить на гистологических срезах и в мазках, так как в срезах сперматозоиды по-разному ориентированы, находятся в разных плоскостях и под разными углами. Таким образом, специфические стадии спермиогенеза определяют, ориентируясь главным образом по расположению акросомы на круглом ядре сперматиды. Кроме того, в акросомной фазе спермиогенеза происходят конденсация хроматина, компактизация хромосом, и окраска их гематоксилином становится более интенсивной.

Созревание сперматид включает 15–16-й этапы и характеризуется меньшими изменениями в форме ядра и акросомной системе. Ядро продолжает конденсироваться. Акросома превращается в тонкую перинуклеарно расположенную структуру, которая прерывается в зоне соединения сперматиды с хвостом.

Заключение

Обобщение и систематизация немногочисленных данных литературы, посвященных описанию морфологии и ультраструктурным преобразованиям половых клеток в процессе дифференцировки в семенниках мыши, в сопоставлении с результатами собственных исследований морфологических особенностей половых клеток при проведении ШИК-реакции с докраской гематоксилином позволили охарактеризовать клетки разных этапов дифференцировки сперматогенного эпителия мыши в мазках. Цитологическая характеристика половых клеток сперматогенного эпителия необходима при проведении экспериментальных исследований, в частности для идентификации клеток сперматогенеза и дальнейших молекулярно-биологических и иммунохимических исследований.

Литература/References

1. Боданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс-индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. 358 с. [Bogdanov Yu.F., Kolomiets O.L. Sinaptonemnyy kompleks-indikator dinamiki meyoza i izmenchivosti hromosom. M.: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2007. 358 s. (In Russ.)].
2. Бурнашева С.А., Габеева Н.С., Данилова Л.В. и др. Современные проблемы сперматогенеза. М.: Наука, 1982. 260 с. [Burnasheva S.A., Gabaeva N.S., Danilova L.V. i dr. Sovremennyye problemy spermatogeneza. M.: Nauka, 1982. 260 s. (In Russ.)].
3. Де Робертис Э., Новинский В., Сазе Ф. Биология клетки. М.: Мир, 1967. 473 с. [De Robertis E., Novinskij V., Sae's F. Biologiya kletki. M.: Mir, 1967. 473 s. (In Russ.)].
4. Пономаренко Е.А., Кузикянц С.А., Мхитаров В.А. Модифицированный метод окраски акросом сперматид у мышей // Клиническая и экспериментальная морфология. 2017. № 2. С. 72–75. [Ponomarenko E.A., Kuzikyants S.A., Mhitarov V.A. Modifitsirovannyiy metod okraski akrosom spermatid u myishey // Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya. 2017. V. 2. P. 72–75. (In Russ.)].
5. Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 208 с. [Raytsina S.S. Spermatogenez i strukturnyye osnovyy ego regulyatsii. M.: Nauka, 1985. 208 s. (In Russ.)].
6. Хилькевич Л.В., Курило Л.Ф. Кинетика популяции мужских половых клеток человека в антенатальном периоде онтогенеза // Онтогенез. 1992. Т. 23, № 5. С. 506–510 [Hilkevich L.V., Kurilo, L.F. Kinetika populyatsii muzhskih polovyykh kletok cheloveka v antenatálnom periode ontogeneza // Ontogenez. 1992. V. 23, No 5. P. 506–510. (In Russ.)].
7. Ченцов Ю. С. Цитология с элементами целлюлярной патологии: Учебное пособие для университетов и медицинских вузов. М.: Медицинское информационное агентство, 2010. 368 с. [Chentsov Yu.S. Citologiya s e'lementami cellyulyarnoj patologii: Uchebnoe posobie dlya universitetov i medicinskix vuzov. M.: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2010. 368 s. (In Russ.)].
8. Barcellona W.J., Meistrich M.L. Ultrastructural integrity of mouse testicular cells separated by velocity sedimentation // J Reprod Fertil. 1977;50(1):61–8.
9. Bellve A.R., Cavicchia J.C., Millette C.F., O'Brien D.A., Bhatnagar Y.M., Dym M. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization // J Cell Biol. 1977;74(1): 68–85.
10. Berrios S. Nuclear Architecture of Mouse Spermatocytes: Chromosome Topology, Heterochromatin, and Nucleolus // Cytogenet Genome Res. 2017;151(2):61–71.
11. Chandley A.C., Hotta Y., Stern H. Biochemical analysis of meiosis in the male mouse. I. Separation of DNA labelling of specific spermatogenic stages // Chromosoma. 1977;62(3):243–53.
12. Chiarini-Garcia H., Meistrich M.L. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia // Methods Mol Biol. 2008;450:95–107.
13. Chiarini-Garcia H., Russell L.D. Characterization of mouse spermatogonia by transmission electron microscopy // Reproduction. 2002;123(4):567–77.
14. Clermont Y., Bustos-Obregon E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto" // Am J Anat. 1968;122(2): 237–47.
15. Clermont Y., Perey B. The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-hematoxylin and hematoxylin-eosin stained sections // Rev Can Biol. 1957;16(4):451–62.

16. *Evans E.P., Breckon G., Ford C.E.* An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes // *Cytogenetics*. 1964;3:289–94.
17. *Goetz P., Chandley A.C., Speed R.M.* Morphological and temporal sequence of meiotic prophase development at puberty in the male mouse // *J Cell Sci*. 1984;65:249–63.
18. *Hess R.A., Renato de Franca L.* Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium // *Adv Exp Med Biol*. 2008;636:1–15.
19. *Leblond C.P., Clermont Y.* Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat // *Ann N Y Acad Sci*. 1952;55(4):548–73.
20. *Meistrich M.L., Bruce W.R., Clermont Y.* Cellular composition of fractions of mouse testis cells following velocity sedimentation separation // *Exp Cell Res*. 1973;79(1):213–27.
21. *Romrell L.J., Bellve A.R., Fawcett D.W.* Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization // *Dev Biol*. 1976;49(1):119–31.
22. *Russell L., Frank B.* Characterization of rat spermatocytes after plastic embedding // *Arch Androl*. 1978;1(1):5–18.

CYTOLOGICAL CHARACTERISTIC OF SPERMATOGENIC EPITHELIUM CELLS IN C57BL/6 MICE

E.A. Ponomarenko, V.A. Mkhitarov, S.A. Kuzikyants, N.A. Zolotova, D.N. Khochansky, I.S. Tsvetkov, A.A. Stepanov

In this work we present a comprehensive cytological description of the transformation of mouse germ cells during their differentiation from spermatogonia to spermatozoa. The obtained results are compared with the data available in the literature on microscopic and light-optical features of the cells involved in spermatogenesis in mice. The cytological characteristics of the cells of spermatogenic epithelium in smears are necessary for the identification of spermatogenic cells during experimental studies.

Key words: spermatogenesis in mice, spermatogonium, spermatocytes, spermatids

Информация об авторах

Пономаренко Елена Алексеевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы д. 3. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

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

Кузикянц Сусанна Арамаисовна – лаборант-исследователь лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека.

Золотова Наталья Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Хочанский Дмитрий Николаевич – младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

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

Степанов Александр Алексеевич – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Материал поступил в редакцию 14 июня 2018 года

© Булякова Н.В., Азарова В.С., 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-53-62

УДК:616.833.15-009.7-085.849.19-091.8-092.9

АЛЛОПЛАСТИКА ОБЛАСТИ ТРАВМЫ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ МЫШЕЧНОЙ ТКАНЬЮ ОТ ПОГИБШЕЙ КРЫСЫ-ДОНОРА, ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ОБЛУЧЕННОЙ НЕ-НЕ ЛАЗЕРОМ

Н.В. Булякова, В.С. Азарова

ФГБНУ «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова» РАН, Москва

Одной из нерешенных проблем в области регенеративной биологии и медицины является восстановление травмированных скелетных мышц в условиях значительной утраты мышечной массы. Целью исследования было изучение восстановления икроножных мышц у взрослых крыс при утрате трети мышечной массы и аллопластике области травмы с помощью мышечного фрагмента, предварительно облученного He-Ne лазером у погибшего донора. Работа выполнена на 20 беспородных крысах-самцах в возрасте 2 месяцев. В средней области обеих икроножных мышц удаляли треть мышечной массы. Исследовали 30-суточные регенераты без аллопластики области травмы (контроль), с аллопластикой мышечной ткани от погибшего донора без предварительного лазерного облучения (1-я серия) и с аллопластикой мышечной ткани, предварительно облученной He-Ne лазером у погибшего донора в течение 3 минут (2-я серия) или 30 минут (3-я серия). Определяли массу регенератов и их гистологическую структуру. Показано, что без аллопластики в области травмы формируется узкий плотный соединительнотканый рубец. В 1-й серии аллоплант подвергался соединительнотканному и жировому перерождению. Вростание в область травмы мышечных волокон реципиента подавлено. Во 2-й и 3-й сериях аллопластика улучшала восстановление мышц. Регенераты были значительно крупнее. Лазерное облучение способствовало медленной резорбции аллогенного имплантата, в результате чего в течение наблюдаемого срока постепенно формировалась основа из волокон соединительной ткани для регенерации мышечной ткани реципиента. В области травмы наряду с участками аллогенной мышечной ткани, подвергающейся постепенной дегенерации, наблюдалась регенерировавшая мышечная ткань реципиента, в которой не было лейкоцитарной инфильтрации. Процесс восстановления был более эффективен в 3-й серии. Выводы: аллопластика мышечной ткани от погибшего донора, облученной He-Ne лазером, тормозит образование плотного узкого соединительнотканного рубца между культями поврежденной мышцы реципиента и может выполнять роль своеобразного каркаса, улучшая регенерацию мышц в условиях значительной потери мышечной массы.

Ключевые слова: взрослая крыса, скелетная мышца, травма, аллопластика, мышечный фрагмент от погибшей крысы, He-Ne лазер

В настоящее время одной из нерешенных проблем в области регенеративной биологии и медицины является восстановление травмированных скелетных мышц в условиях значительной утраты мышечной массы. Предлагаются методы тканевой (заместительной) терапии и тканевой инженерии. В первом случае аутопластика мышечной ткани в область травмы предполагает нанесение организму дополнительных повреждений, связанных с извлечением пересаживаемого фрагмента мышечной ткани, а при имплантации

генетически чужеродной мышечной ткани требуется постоянное применение иммунодепрессантов. Во втором случае для восстановления скелетной мышцы необходимо создать пул плюрипотентных стволовых клеток и натуральный/синтетический каркас. В ходе искусственного выращивания мышечного лоскута каркас активно заселяется стволовыми клетками и способствует правильной аранжировке регенерирующих тканей в травмированной мышце [17, 21]. Предлагаемые каркасы не должны вызывать реакцию отторжения у

реципиента. При этом большие затруднения вызывает обеспечение условий для достаточного кровоснабжения и иннервации имплантированного искусственно выращенного мышечного лоскута, а также величина, соответствующая утраченной мышечной массе. Описаны различные методы для улучшения восстановления капиллярной сети и нервно-мышечных контактов в искусственно выращиваемом фрагменте мышечной ткани в условиях совместного культивирования стволовых клеток из мышечной ткани человека, эндотелиальных клеток пупочной вены человека и нейроподобных клеток [11, 14, 18, 20]. Нейроподобные клетки, полученные из стволовых клеток скелетной мышцы человека, высевали на васкуляризированные миотубы, чтобы получить нейромышечные соединения.

Для улучшения восстановления поврежденных органов и тканей часто сочетают методы регенеративной медицины с воздействием физических факторов, в частности лазерного излучения низких интенсивностей [4, 5]. Воздействие лазера оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию и дифференцировку мышечных клеток-сателлитов, усиливает неоангиогенез в мышцах, в том числе за счет резервных капилляров, повышает ионную проницаемость мембран эритроцитов [16]. Лазерное воздействие может изменять иммуногенность генетически чужеродных тканей [6]. В частности, показано, что аллопланты (кость, кожный лоскут) после воздействия лазерного излучения не отторгаются, а постепенно замещаются соответствующей регенерирующей тканью хозяина [3, 8, 19].

Несмотря на обширный арсенал медицинских технологий, кардинального решения проблемы до сих пор нет, и поиск эффективных методов продолжается.

Целью нашего исследования было изучение восстановления икроножных мышц у взрослых крыс при значительной утрате мышечной массы и аллопластике области травмы с помощью мышечного фрагмента, предварительно облученного He-Ne лазером у погибшего донора.

Материалы и методы

Работа выполнена на 20 беспородных крысах-самцах в возрасте 2 месяцев, вес тела 130–140 граммов. Проведено три серии опытов (18 крыс). В 1-й серии – аллопластика от погибшего донора без предварительного лазерного облучения мышечной ткани. Во 2-й серии – аллопластика мышечной ткани, предварительно облученной He-Ne лазером в течение 3 минут у погибшего донора. В 3-й серии – аллопластика мышечной ткани, предварительно облученной у погибшего донора He-Ne лазером в течение 30 минут. В каждой серии были исследованы по четыре крысы-реципиента, которым от двух доноров в одну из оперированных икроножных мышц имплантировали мышечный фрагмент (четыре регенерата). В противоположные травмированные мышцы аллопластика области травмы не проводилась (четыре регенерата), и эти регенераты служили

контролем к экспериментальным сериям. Кроме того, соответствующие показатели сравнивали с икроножными мышцами интактных крыс того же возраста (две крысы, четыре икроножные мышцы).

У крыс-реципиентов под нембуталовым наркозом в асептических условиях в обеих икроножных мышцах вырезали из средней части около трети мышечной массы, сохраняя неповрежденными нервно-сосудистый пучок, лежащий на поверхности мышцы, и подлежащий малоберцовый нерв. Затем в область дефекта одной из икроножных мышц имплантировали примерно такой же по объему фрагмент икроножной мышцы от погибшего донора. Концы имплантируемых мышечных фрагментов не подшивали к проксимальной и дистальной культям икроножных мышц реципиента. После операции кроющую мышцу и кожу зашивали хирургическим шелком.

Подготовка донорской мышечной ткани состояла в следующем. Крыс-доноров усыпляли, вводя большую дозу нембутала. Через два часа после остановки дыхания обе задние конечности крыс в области проекции икроножных мышц облучали He-Ne лазером. Затем мышцы извлекали и помещали в холодильник в чашках Петри со стерильным физиологическим раствором при температуре 8–9°C. На следующий день проводили аллопластику мышечной ткани. Донорские мышцы перед аллопластикой помещали на 2–2,5 часа в термостат при температуре 38°C, ополаскивали свежим стерильным физиологическим раствором и имплантировали в дефект одной из икроножных мышц реципиента, из правых мышц донора в правые мышцы реципиента, а из левых мышц донора в левые мышцы реципиента. Противоположная мышца реципиента оставалась без аллопластики дефекта.

Условия воздействия He-Ne лазера: (установка ОКГ-12, Россия): длина волны 632,8 нм, плотность потока мощности составляла 2,5–3 мВт/см². Доза облучения имплантируемого мышечного фрагмента во 2-й серии составляла 0,45–0,54 Дж/см², в 3-й серии – 4,5–5,4 Дж/см². Луч лазера на выходе был расфокусирован с помощью линзы, диаметр поля облучения 2–2,5 см. Режим облучения дистанционный стабильный.

Экспериментальный материал анализировали через 30 суток после аллопластики. Мышцы фиксировали в смеси Карнуа, парафиновые срезы толщиной 7–8 мкм окрашивали железным гематоксилином по Рего с докраской по Маллори. Определяли относительную массу регенератов икроножных мышц (процент от массы тела крысы-реципиента) и гистологическую структуру на 32 продольных гистологических срезах, сделанных на разных уровнях с каждого регенерата. Кроме того, только в регенератах с аллопластикой измеряли количественное соотношение соединительной ткани, мышечной ткани, не содержащей лимфоидные клетки (мышечная ткань реципиента), и мышечной ткани с лимфоидной инфильтрацией (мышечная ткань донора). Относительную площадь, занимаемую этими тканями

в регенератах, определяли с помощью тестовой окулярной сетки и микроскопа Motic DMBA-310 (Motic, Гонконг, КНР) при $\times 400$.

Иллюстрации получали с помощью микроскопа Motic DMBA-310 с видеокамерой и микроскопа LEICA (LEICA DMR и фотокамера JVC 3 CCD C-MOUNT) (Leica, Германия).

Исследования осуществлялись с соблюдением Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755). Крыс-реципиентов выводили из опыта введением больших доз нембутала. Количественные данные обрабатывали статистически, и различия средних величин оценивали по критерию Стьюдента. На эксперимент получено заключение комиссии по биоэтике на проведение экспериментальных исследований № 13 от 30 ноября 2017 года.

Результаты

Общий вид регенератов представлен на рисунке 1 (А–Г). Контрольные регенераты во всех сериях после удаления средней трети икроножной мышцы и без последующей аллопластики дефекта значительно уменьшаются в размерах (рис. 1 А). В области утраты мышечной массы формируется узкий плотный соединительнотканый тяж из широких пучков продольно

ориентированных коллагеновых волокон. При аллопластике дефекта мышцы крупнее и область травмы шире (рис. 1 Б, В, Г).

Изменения массы регенератов в разных условиях аллопластики области травмы в мышцах крыс-реципиентов представлены в таблице 1. При всех видах аллопластики относительная масса регенератов значительно ниже, чем масса икроножных мышц у интактных крыс того же возраста, но интенсивность снижения различается. После аллопластики необлученного мышечного фрагмента (1-я серия), облученного в течение 3 минут (2-я серия) и облученного 30 минут (3-я серия) относительная масса регенератов уменьшается в 3,0, 1,6 и 2,1 раза, соответственно, то есть облучение имплантата лазером способствует улучшению восстановления травмированных мышц. Кроме того, масса регенератов с аллопластикой облученных лазером мышечных фрагментов во 2-й и 3-й сериях была достоверно выше, чем масса соответствующих контрольных регенератов этих серий без аллопластики. В 1-й же серии после аллопластики с помощью необлученной лазером мышечной ткани можно говорить только об увеличении среднеарифметического значения массы регенерата.

Отмечаются различия и в гистологической структуре регенератов. В контрольных регенератах через

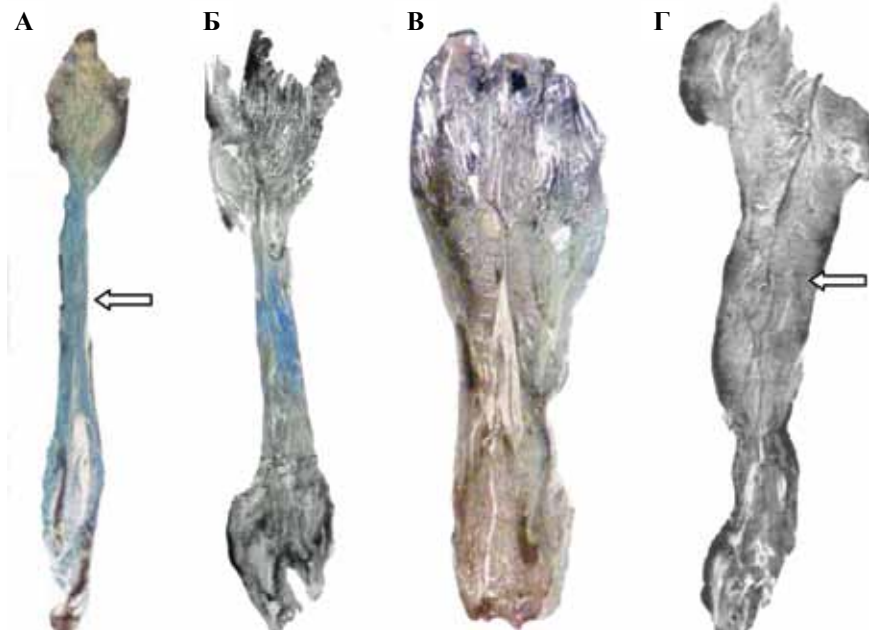


Рис. 1. Общий вид 30-суточных регенератов икроножной мышцы, восстанавливающейся в разных условиях после удаления средней трети мышечной массы.

А – без аллопластики области травмы, образование узкого плотного тяжа соединительной ткани между проксимальной и дистальной культями мышцы реципиента (стрелка)

Б – аллопластика области травмы с помощью необлученного He-Ne лазером мышечного фрагмента, извлеченного из погибшего донора, перешеек между двумя культями более широкий, но в нем преобладает соединительная ткань

В – аллопластика области травмы с помощью мышечного фрагмента от погибшего донора, облученного He-Ne лазером в течение 3 минут; участки аллогенной мышечной ткани и мышечной ткани реципиента

Г – аллопластика области травмы с помощью мышечного фрагмента от погибшего донора, облученного He-Ne лазером в течение 30 минут; участки мышечной ткани реципиента (стрелка) преобладают над участками аллогенной мышечной ткани

Таблица 1

Масса регенератов икроножных мышц при утрате 1/3 мышцы и аллопластике области травмы с помощью необлученной и облученной лазером мышечной ткани от погибшего донора (% от массы тела крысы)

Контроль Икроножная мышца интактной крысы	1-я серия Аллопластика мышц с помощью мышечной ткани, не облученной лазером		2-я серия Аллопластика мышц с помощью мышечной ткани, облученной лазером в течение 3 минут		3-я серия Аллопластика мышц с помощью мышечной ткани, облученной лазером в течение 30 минут	
	без операции	без имплантата	с имплантатом	без имплантата	с имплантатом	без имплантата
0,56±0,02	0,13±0,03	0,19±0,02*	0,18±0,02	0,35±0,02* **	0,17±0,01	0,27±0,03* **

* – различия между регенератами с аллопластикой и интактной икроножной мышцей ($p < 0,01$)

** – различия между регенератами с аллопластикой и без аллопластики (с контролем в соответствующих сериях) ($p < 0,01$)

30 суток после удаления средней трети икроножной мышцы без последующей аллопластики дефекта обе культы значительно уменьшаются в размерах, мышечные волокна в них истончаются, утолщаются септы, дистальная культя частично или полностью замещается волокнами соединительной ткани. В области утраты мышечной массы формируется узкий соединительно-тканый тяж из пучков продольно ориентированных коллагеновых волокон, поддерживающих целостность мышцы и скрепляющих обе культы. Много делящихся фибробластов и скоплений жировых клеток. От проксимальной культы единичные узкие одиночно лежащие мышечные волокна отрастали на очень короткое расстояние, но оказывались замурованными в соединительной ткани. В область травмы врастают сосуды. Лейкоциты в интерстициальном пространстве и в просветах кровеносных сосудов встречаются в небольшом количестве (2–3 в поле зрения). Данные указывают на то, что регенерация мышцы на 30-е сутки завершается формированием в области травмы плотного соединительно-тканого рубца.

В 1-й серии при аллопластике 1/3 дефекта в икроножной мышце взрослых крыс-реципиентов с помощью фрагмента трупной мышцы, необлученного предварительно He-Ne лазером, в целом отмечаются разрастание волокнистых соединительно-тканых структур и жировое перерождение мышечного регенерата. В обеих культях реципиента можно наблюдать одновременно сравнительно упорядоченное расположение мышечных волокон и участки с нарушением архитектоники мышечной ткани, а также расширение септ и замещение мышечной ткани соединительной. В дистальной культе замещению соединительной тканью может подвергаться до половины ее мышечной массы. Иногда дистальная культя очень узкая и замещается соединительной тканью практически полностью. Область травмы сужается, но в меньшей степени, чем без аллопластики. Мышечный аллоплант, заполняющий область травмы, подвергается активной резорбции (рис. 2 А). В интерстициальном пространстве и в просветах крупных кровеносных сосудов отмечалось много клеток лимфоид-

ной ткани и макрофагов. Мышечные волокна в обеих культях на границе с аллоплантом истончаются, лежат среди участков жировой и волокнистой соединительной ткани, и рост их в сторону дефекта не происходит (рис. 2 Б).

Во 2-й серии при аллопластике 1/3 дефекта с помощью фрагмента трупной мышцы, облученного предварительно He-Ne лазером в течение 3 минут, мышечные регенераты крупнее, чем регенераты в 1-й серии. В проксимальной культe реципиента сохраняются архитектоника мышечной ткани, перистое расположение мышечных волокон, но наблюдается их рыхлое распределение (рис. 2 В) и утолщение септ. Мышечные волокна без признаков дегенерации. Иногда в них встречаются короткие цепочки овальных мышечных ядер (по 2–5 штук). В области аллопластики формируется два (иногда три) соединительно-тканых тяжа, между ними наблюдаются участки мышечной ткани и незначительные скопления клеток жировой ткани (рис. 2 Г). Участки мышечных волокон без лейкоцитарной инфильтрации в интерстиции представляются врастающие в область пластики мышечные волокна реципиента (рис. 2 Д). Вместе с тем в области травмы отмечается аллогенная мышечная ткань, подвергающаяся резорбции. Так, встречаются мышечные фрагменты чужеродной мышечной ткани, окруженные лейкоцитами и макрофагами (рис. 2 Е), а также аллогенные мышечные волокна с интенсивной инфильтрацией лимфоидных клеток в интерстиции (рис. 2 Ж). На месте резорбированного участка аллогенной мышечной ткани остаются очаги скопления лейкоцитов. В регенератах более выражена реакция воспаления. Активно врастают кровеносные сосуды. В просветах кровеносных сосудов отмечается сравнительно большое число лейкоцитов. В периваскулярной зоне много макрофагов и тучных клеток. В верхних слоях регенерата мышечные волокна, растущие от культей, близко подходят друг к другу. Иногда в тяжах соединительной ткани видны одиночно лежащие бледно окрашенные мышечные волокна без лейкоцитарной инфильтрации. Возможно, это мышечные волокна

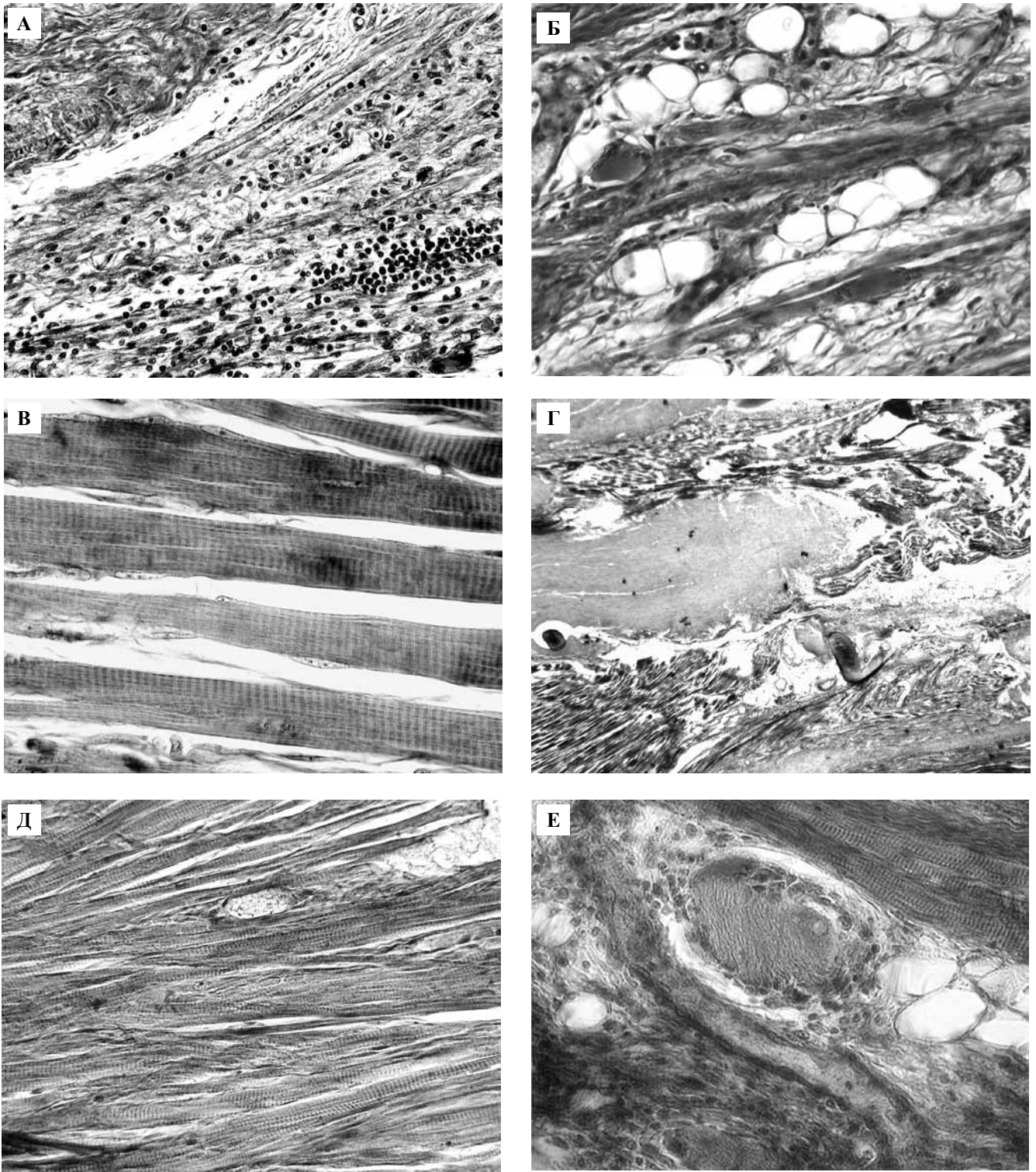


Рис. 2. Гистологический анализ 30-суточных регенератов икроножной мышцы, восстанавливающейся в разных условиях после удаления средней трети

1-я серия: аллопластика области травмы необлученной лазером аллогенной мышечной тканью от погибшего донора.

А – резорбция аллогенной мышечной ткани, активная лейкоцитарная инфильтрация в области травмы $\times 200$. Б – формирующаяся в дефекте жировая и соединительная ткань, подавление роста мышечных волокон по краю проксимальной культы реципиента, $\times 400$.

2-я серия: аллопластика области травмы аллогенной мышечной тканью от погибшего донора, облученной лазером в течение 3 минут. В – рыхлое расположение мышечных волокон в проксимальной культе, участки мышечной ткани без признаков дегенерации, $\times 400$. Г – мышечная ткань и тяжи соединительной ткани в области травмы, $\times 40$.

Д – область травмы, мышечная ткань реципиента без инфильтрации, $\times 200$. Е – область травмы, мышечный фрагмент аллогенной мышечной ткани, окруженный лейкоцитами и макрофагами, $\times 1000$

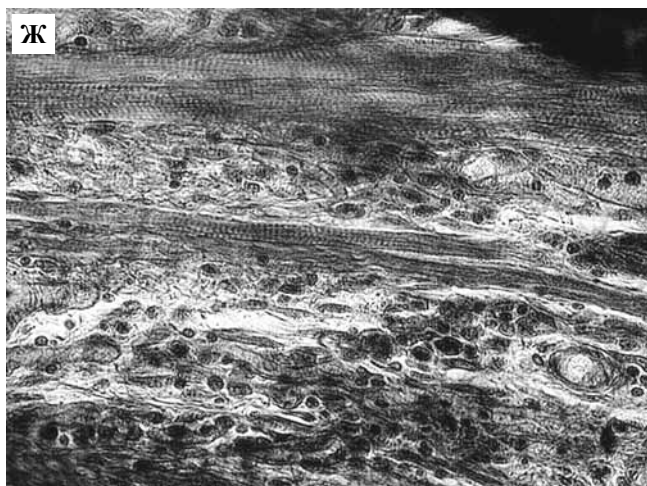


Рис. 2 (окончание).

Ж – область травмы, участок резорбируемой аллогенной мышечной ткани, активная лейкоцитарная инфильтрация, $\times 400$.

3-я серия: аллопластика области травмы аллогенной мышечной тканью от погибшего донора, облученной лазером в течение 30 минут. 3 – область травмы, мышечные волокна реципиента без лейкоцитарной инфильтрации, внизу скопления лейкоцитов на месте резорбированной аллогенной мышечной ткани, $\times 400$. И – васкуляризация мышечной ткани реципиента в области травмы, $\times 400$

реципиента, оказавшиеся замурованными в соединительной ткани в процессе резорбции аллогенной мышечной ткани.

В 3-й серии при аллопластике 1/3 дефекта с помощью фрагмента трупной мышцы, облученного предварительно He-Ne лазером в течение 30 минут, мышечные регенераты несколько уменьшаются в размерах по сравнению со 2-й серией, но они заметно крупнее, чем контрольные регенераты этой серии (без аллопластики). В мышечной ткани проксимальной культи на фоне некоторого увеличения количества структур соединительной ткани сохраняется перистое расположение мышечных волокон, а подавляющее большинство мышечных волокон имеет нормальное строение, что, очевидно, позволяет регенерировать мышечной ткани реципиента и частично заполнять область травмы. В области аллопластики, как и во 2-й серии, встречаются участки мышечной ткани с повышенной лейкоцитарной инфильтрацией и без нее. Регенерировавшие мышечные волокна реципиента могут располагаться рядом с резорбированным участком аллогенной мышечной ткани, на месте которого остаются скопления лейкоцитов (рис. 2 3). В мышечных волокнах содержатся крупные овальные ядра, образующие иногда короткие цепочки

по периферии или в центре волокна. В мышечную ткань активно врастают кровеносные сосуды (рис. 2 И). Аллогенная мышечная ткань, подвергающаяся дегенерации, встречается в области травмы значительно реже, чем во 2-й серии, и на 30-е сутки после операции резорбция аллогенной мышечной ткани, по-видимому, приближается к завершению. В целом, реакция воспаления и лейкоцитарная инфильтрация в регенератах этой серии менее выражены, чем во 2-й серии.

В таблице 2 представлен количественный анализ структуры мышечных регенератов после имплантации в область травмы донорской мышечной ткани, подготовленной к аллопластике в разных условиях. При имплантации аллогенной мышечной ткани, облученной He-Ne лазером (2-я и 3-я серии), регенераты содержали значительно большее количество мышечной ткани реципиента (без лейкоцитарной инфильтрации) и меньше соединительной ткани по сравнению с 1-й серией. При этом на 30-е сутки после аллопластики наиболее положительный эффект наблюдался при имплантации мышечной ткани от погибшего донора, облученной He-Ne лазером в течение 30 минут (3-я серия). В отличие от 2-й серии в регенератах этой серии количество мышечной ткани реципиента, не

Таблица 2

Морфометрический анализ структуры регенератов икроножных мышц при утрате 1/3 мышцы и аллопластике области травмы с помощью необлученной и облученной лазером мышечной ткани от погибшего донора

Исследуемые параметры	1-я серия	2-я серия	3-я серия
	Аллопластика мышц с помощью мышечной ткани, не облученной лазером	Аллопластика мышц с помощью мышечной ткани, облученной лазером в течение 3 минут	Аллопластика мышц с помощью мышечной ткани, облученной лазером в течение 30 минут
Мышечная ткань реципиента, не содержащая лейкоциты (%)	44±4	62±2* (p<0,01)	73±2*(p<0,01) ** (p<0,02)
Донорская мышечная ткань с лейкоцитарной инфильтрацией (%)	6±0,5	8±0,1* (p<0,01)	2±0,6*(p<0,01) ** (p<0,01)
Соединительная ткань (%)	50±5	30±2* (p<0,02)	25±1*(p<0,01) ** (p<0,05)

* – различия в структуре регенератов по сравнению с 1-й серией

** – различия в структуре регенератов 3-й серии по сравнению со 2-й серией

содержащей лейкоциты, существенно преобладало по сравнению с аллогенной мышечной тканью, содержащей лимфоидные клетки.

Обсуждение

Проведен сравнительный анализ эффекта имплантированного мышечного фрагмента от погибшего донора на восстановление мышц у взрослых крыс-реципиентов как восстановлению биологического каркаса. Исследовано восстановление скелетной мышцы в разных условиях после утраты средней 1/3 мышечной массы через 30 суток: без аллопластики дефекта, после аллопластики области повреждения с помощью необлученной He-Ne лазером мышечной ткани, а также предварительно облученной лазером в течение 3 или 30 минут.

Показано, что имплантация аллогенного мышечного фрагмента, извлеченного из икроножной мышцы погибшей крысы, заметно тормозит образование плотного узкого соединительнотканного тяжа между культями икроножной мышцы крысы-реципиента. Относительная масса регенератов была выше, чем масса регенератов без аллопластики (контрольные регенераты в соответствующих сериях).

Большая эффективность наблюдалась при аллопластике с помощью мышечной ткани, предварительно облученной лазером у погибшего донора. В регенератах количество мышечной ткани без лейкоцитов значительно преобладало по сравнению с содержанием мышечной ткани при имплантации необлученного лазером аллопланта.

На основании анализа гистологической структуры регенератов и морфометрических данных можно утверждать, что облученный лазером аллоплант не

оказывает агрессивного влияния на мышечную ткань реципиента. От проксимальной и дистальной культей травмированной икроножной мышцы в сторону дефекта отрастали неширокие мышечные волокна. В результате в области травмы наряду с элементами соединительной ткани наблюдались участки резорбируемой аллогенной мышечной ткани с лейкоцитарной инфильтрацией и участки регенерировавшей мышечной ткани реципиента без лейкоцитов в интерстиции.

Отмечено также, что интенсивность резорбции аллогенной мышечной ткани зависит от энергетической облученности лазером. При имплантации мышечной ткани, облученной в течение 3 минут, в области травмы чаще встречались участки с перестраивающейся аллогенной мышечной тканью. Присутствие резорбируемой аллогенной мышечной ткани поддерживает, в некоторой степени, воспалительный процесс и состояние экссудативного отека тканей в регенератах. При имплантации мышечной ткани, облученной в течение 30 минут, перестройка аллопланта приближалась к завершению. Очевидно, этим можно объяснить тот факт, что относительная масса регенератов при облучении в течение 3 минут была выше, чем при облучении в течение 30 минут.

После резорбции облученной лазером аллогенной мышечной ткани остаются элементы соединительной ткани, формирующиеся в виде сравнительно нешироких тяжелей коллагеновых волокон, имеющих продольное расположение и направляющих рост мышечной ткани реципиента. Облученный лазером мышечный аллоплант, пересаженный от погибшего донора, служит своеобразным каркасом, улучшая структурные показатели восстанавливающихся мышц. Соглас-

но данным литературы, биологические скаффолды, созданные из скелетной мышечной ткани, могут сохранять эндомизиальные трубочки и следы роста нервных окончаний и кровеносных сосудов, что упорядочивает регенерацию мышечных волокон и стимулирует нейроваскуляризацию [10]. Ранее фибробласты традиционно связывали с патологическими изменениями в тканях, формированием фиброзной ткани, однако обзор литературы по этой проблеме показал, что фибробласты способны продуцировать факторы роста, цитокины и протеазы, изменять биохимическое и механическое микроокружение в тканях, участвовать в физиологической регенерации и сохранении гомеостаза [12]. В настоящее время наиболее перспективным считается выращивание биологических тканей на основе естественных матричных каркасов, содержащих фибриллярный белок соединительной ткани, а именно коллаген [9, 13].

Анализ полученных результатов показывает, что в качестве заместительной терапии можно заполнить временно обширный дефект в мышце фрагментом трупной мышцы, предварительно облученной He-Ne лазером в терапевтических дозах. В погибшем организме скелетная мышечная ткань подвергается дегенеративным изменениям постепенно, по мере прекращения процессов жизнеобеспечения мышц. Установлено, что из десяти изученных мышечных белков большинство более длительное время сохраняет свою структуру, не подвергаясь дегенерации в период после смерти, то есть посмертные фазы более продолжительные [15]. Сразу после гибели кровь некоторое время остается жизнеспособной за счет сохраняющихся в ней форменных элементов, гормонов и ферментов [7]. Показано также, что в течение 7–16 часов после смерти организма лимфоциты сохраняют структуру, способность к пролиферации, розеткообразованию и трансформации в blastsциты в ответ на антигенное раздражение. Постепенное снижение Т-клеточного иммунитета и уменьшение количества лимфоцитов (CD3, CD4, CD8, CD25) наблюдалось в течение первых 3 суток после смерти [2]. Кроме того, согласно положениям судебно-медицинской экспертизы, в первое время после гибели организма умирающие ткани сохраняют способность отвечать на внешние раздражители. Возможно, лазерное воздействие на икроножные мышцы крыс-доноров через два часа после остановки дыхания еще способствовало некоторому поддержанию активности метаболизма в мышечной ткани погибшего животного, сохранению жизнеспособности соединительнотканых структур и лимфоцитов в кровеносном русле и тем самым могло влиять на иммуногенность мышечного имплантата. В результате аллогенная мышечная ткань не подвергалась резкому отторжению, а постепенно вовлекалась в процесс регенерационной перестройки. Повышение адаптивных свойств мышечных аллоплантов, облученных лазером в теле погибшего донора, то есть *in*

vivo, подтверждает наши наблюдения, полученные ранее на мышцах старых крыс [1].

Выводы

При утрате одной трети мышечной массы в икроножной мышце взрослой крысы имплантация в область травмы мышечного фрагмента, облученного He-Ne лазером у погибшей крысы-донора того же возраста, улучшает процесс восстановления. Масса регенератов достоверно выше, чем без аллопластики. Облученная лазером аллогенная мышечная ткань подвергается резорбции постепенно. При этом имплантированный мышечный фрагмент не оказывает агрессивного влияния на регенерационную способность травмированной мышечной ткани реципиента. В результате в процессе продолжительной регенерационной перестройки аллопланта остаются элементы соединительнотканного каркаса, который направляет рост мышечной ткани реципиента в область травмы.

Литература/References

1. Булякова Н.В., Азарова В.С. Экспериментальное морфофункциональное исследование мышечных аллоплантов от живых и погибших доноров, облученных He-Ne лазером *in vivo* и *ex vivo* // Клиническая и экспериментальная морфология. 2016. № 2. С. 17–22 [Bulyakova N.V., Azarova V.S. Experimental morphofunctional study of muscle alloplants from living and dead donors irradiated with an He-Ne laser *in vivo* and *ex vivo* // Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya. 2016. V. 2. P. 17–22 (In Russ.)].
2. Денисенко А.Г. Некоторые показатели Т-клеточного иммунитета в различные промежутки после наступления смерти // Вестник Витебского ГМУ. 2010. Т. 9, № 4. С. 147–152 [Denisenko A.G. Some indicators of T-cell immunity at various intervals after the onset of death // Vestnik Vitebskogo SMU. 2010. V. 9, No 4. P. 147–152 (In Russ.)].
3. Калмыков К.К., Медведева Г.Г., Скибенко К.П., Дудник Л.А. Изучение влияния лазера на биологические свойства кожных трансплантатов. В кн.: Актуальные вопросы криобиологии и криомедицины. Киев: Наукова думка, 1974. С. 54–55. [Kalmykov K.K., Medvedeva G.G., Skibenko K.P., Dudnik L.A. Study of the influence of the laser on the biological properties of skin grafts. V kn.: Aktualnyye voprosy kriobiologii i kriomeditsiny. Kiev: Naukova dumka, 1974. P. 54–55 (In Russ.)].
4. Крюк А.С., Мостовников В.А., Хохлов И.В. Терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения. Минск: Наука и техника, 1986. 240 с. [Kryuk A.S., Mostovnikov V.A., Khokhlov I.V. Therapeutic efficacy low-intensity laser radiation. Minsk: Nauka i tekhnika, 1986. 240 p. (In Russ.)].
5. Москвин С.В., Хадарцев А.А. Лазерный свет – можно ли им навредить? (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. 2016. Т. 23, № 3. С. 265–283 [Moskvin S.V., Khadartsev A.A. Laser light – can he do harm? (review of the literature) // Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2016. V. 23, No. 3. P. 265–283 (In Russ.)].

6. Патент 2209085 «Способ повышения антигенности и иммуногенности биоматериала» (Заявка: 2001117399/14 от 20.06.2001) / Г.А. Баранов и др., 2003. [Patent 2209085 «A method for increasing the antigenicity and immunogenicity of a biomaterial» (Zayavka: 2001117399/14 of 20.06.2001) / G.A. Baranov et al., 2003 (In Russ.)].
7. Петров В.К., Воронков И.Ф. Влияние различных режимов излучения гелий-неонового лазера на длительность хранения, спонтанный и индуцированный гемолиз донорской крови. В сб.: Применение лазеров в хирургии и медицине. Ч. 1. М., 1989. С. 480–482 [Petrov V.K., Voronkov I.F. Influence of different helium-neon laser emission regimes on storage time, spontaneous and induced hemolysis of donor blood. V sb.: Primeneniye lazerov v khirurgii i meditsine. Ch. 1. M., 1989. P. 480–482 (In Russ.)].
8. Рахисhev А.Р., Шуйская Б.З. О влиянии лазерного света на жизнеспособность костной ткани, консервированной в газовой среде. В сб.: Лазеры в травматологии и ортопедии. Л., 1979. С. 95–101. [Rakhishev A.R., Shuiskaya B.Z. On the influence of laser light on the viability of bone tissue preserved in gas environment. V sb.: Lazery v travmatologii i ortopedii. L., 1979. P. 95–101 (In Russ.)].
9. Adachi E., Tamai M., Togawa Y. Collagen: the oldest scaffold for tissue regeneration // *Current Tissue Engineering*. 2016;5(2):85–102.
10. Borschel G.H., Dennis R.G., Kuzon W.M., Jr. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold // *Plast Reconstr Surg*. 2004;113:595–602.
11. Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // *Eur Spine J*. 2008;17(Suppl 4):467–79.
12. Costa-Almeida R., Soares R., Granja P.L. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration // *J Tissue Eng Regen Med*. 2017. doi: 10.1002/term.2405.
13. Duffy R.M., Sun Y., Feinberg A.W. Understanding the role of ECM protein composition and geometric micropatterning for engineering human skeletal muscle // *Ann Biomed Eng*. 2016;44(6):2076–89.
14. Ertan A.B., Kenar H., Beyzadeoglu T., Kok F.N., Torun Kose G. An in vitro human skeletal muscle model: coculture of myotubes, neuron-like cells, and the capillary network // *Turkish J of Biology*. 2017;41:514–25.
15. Foditsch E.E., Saenger A.M., Monticelli F.C. Skeletal muscle proteins: a new approach to delimitate the time since death // *Int J Legal Med*. 2016;130(2):433–40.
16. Gao X., Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation // *J Biomed Sci*. 2009;16(1):4–20.
17. Grasman J.M., Zayas M.J., Page R.L., Pins G.D. Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries // *Acta Biomater*. 2015;25:2–15.
18. Mertens J.P., Sugg K.B., Lee J.D., Larkin L.M. Engineering muscle constructs for the creation of functional engineered musculoskeletal tissue // *Regen Med*. 2014;9(1):89–100.
19. Namenyi J., Mester E., Foldes I., Tisza S. Effect of laser irradiation and immunosuppressive treatment on survival of mouse skin allotransplants // *Acta Chir Acad Sci Hung*. 1975;16(4):327–35.
20. Shandalov Y., Egozi D., Koffler J., Dado-Rosenfeld D. et al. An engineered muscle flap for reconstruction soft tissue defects // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; PubMed ID: 24711414.
21. Turner N.J., Badyalak S.F. Biologic scaffolds for musculetendinous tissue repair // *Eur Cell Mater*. 2013;25:130–43.

MUSCLE ALLOTRANSPLANTATION IN INJURED RAT SKELETAL MUSCLE WITH THE TISSUE FROM DEAD RAT DONOR PRE-IRRADIATED WITH HE-NE LASER

N.V. Bulyakova, V.S. Azarova

One of the unresolved problems in the field of regenerative biology and medicine is the restoration of injured skeletal muscles in conditions of the significant loss of muscle tissue. The goal of the research was to study the restoration of gastrocnemius muscle in adult rats under loss of $\frac{1}{3}$ muscle mass and allotransplantation of muscle tissue of the dead rat donor previously irradiated with He-Ne laser in the site of the injury. The work was carried out on 20 white outbred male rats aged 2 months. One-third of the muscle mass was removed in the middle region of both m. gastrocnemii. After 30 days, regenerates of rats not subjected to allotransplantation (controls), regenerates with muscle allografts from the dead donors not exposed to preliminary laser irradiation (1st series), and those with muscle allografts from the dead rat donors pre-irradiated by He-Ne laser for 3 min (2nd series) or 30 min (3rd series) were investigated. The weight of regenerates and their histological structure were analyzed. It was shown that in control regenerates, a narrow tight connective tissue scar was formed in the area of the excised muscle tissue. In the 1st series, the allografts were subjected to connective tissue and fatty degeneration. The growth of the muscle fibers of the recipient was suppressed. In the 2nd and 3rd series, allotransplantation improved muscle recovery. Regenerates were much larger. Laser irradiation slowed resorption of the allograft, which resulted in the gradual formation of the framework of connective tissue fibers during the period of observation promoting the regeneration of the muscular tissue of the recipient. In the area of injury, regenerated muscular tissue of the recipient, in which there was no leukocyte infiltration, was revealed along with the areas of allogeneic muscle tissue subject to gradual degeneration. The recovery process was more effective in the 3rd series.

Conclusions: laser-irradiated muscle allograft from the dead donor significantly inhibits the formation of the dense narrow connective tissue scar between the stumps of the injured muscle of the recipient and can serve as a kind of framework, improving muscle regeneration in a significant loss of muscle mass.

Key words: adult rat, skeletal muscle, injury, allotransplantation, muscle fragment from the dead rat, He-Ne laser

Информация об авторах

Булякова Нелли Васильевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории морфологических адаптаций позвоночных Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН.

Адрес: 119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33. Телефон +7 (495) 954 75 53. E-mail: bulyakova38@mail.ru

Азарова Валентина Сергеевна – ведущий инженер лаборатории морфологических адаптаций позвоночных Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН.

Адрес: 119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33. Телефон +7 (495) 954 75 53. E-mail: vazarova@mail.ru

Материал поступил в редакцию 27 марта 2018 года

© Кондашевская М.В., Кактурский Л.В., 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-27-3-63-68

УДК 616-092.9:616.3:616.8:615.3

НАРУШЕНИЕ АДАПТАЦИИ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССОВОМ РАССТРОЙСТВЕ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ ВВЕДЕНИЕМ МАЛЫХ ДОЗ ГЕПАРИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М.В. Кондашевская, Л.В. Кактурский

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

Используя новые методы тестирования и регистрации поведенческих проявлений, оценивая показатели уровня кортикостерона в сыворотке крови и анализируя состояние стенки дна желудка крыс-самцов Вистар, установлено, что модель посттравматического стрессового расстройства воспроизведена. Показано, что курсовое введение малых доз гепарина (64 МЕ/кг) после десятидневного применения витального предаторного стресса (страх жертвы перед хищником) оказывает лечебное действие, повышающее адаптационные возможности организма и выражающееся в нормализации психосоматического состояния животных.

Ключевые слова: гепарин, посттравматическое стрессовое расстройство, приподнятый крестообразный лабиринт, кортикостерон, эрозии слизистой стенки желудка, крысы Вистар

Основной причиной развития посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) является воздействие стрессорных событий, в которых возник серьезный физический и/или психический вред. Боевые действия, экологические и транспортные катастрофы, социальные и другие потрясения имеют психоэмоциональные последствия, ведут к страданиям и гибели людей, снижению качества жизни, разрушению социальной инфраструктуры. Если ранее ПТСР относили к нервно-психическим расстройствам, то в настоящее время они считаются психосоматическим заболеванием с очевидным хроническим характером. У большинства пациентов с диагнозом «посттравматическое стрессовое расстройство», а также у животных при моделировании этого заболевания в эксперименте выявляются тревожно-депрессивные расстройства, нарушения со стороны сердечно-сосудистой, пищеварительной, гепатобилиарной и других систем [6, 8]. Все эти нарушения сопровождаются достаточно специфичным для ПТСР снижением уровня кортизола у людей и кортикостерона у лабораторных грызунов [12].

Для коррекции стрессорных расстройств при ПТСР в клинической практике широко применяются психотропные препараты разных классов, которые способны нарушать процессы обучения и памяти, подавляя активную адаптацию организма [7]. В связи с этим в настоящее время актуален поиск полифункциональ-

ных лекарственных средств, обладающих наименьшим спектром побочных действий. Гепарин – антикоагулянт, играющий существенную роль в профилактике и терапии сердечно-сосудистых нарушений, имеет целый ряд свойств, выходящих далеко за рамки основной активности. Чаще всего его применяют в виде курсовых инъекций. Имеются отдельные сведения о лечебном действии гепарина при стрессе и других негативных воздействиях, однако информацию о результатах его применения при ПТСР в доступной литературе обнаружить не удалось [1].

Цель настоящей работы – изучить влияние курсового введения малых доз высокомолекулярного гепарина на процессы адаптации половозрелых самцов крыс Вистар при моделировании ПТСР. Задачей было, используя новые методы тестирования и регистрации поведенческих проявлений, выявить у животных основные признаки нарушения адаптации, связанные с развитием ПТСР: тревожно-депрессивное состояние, дефицит содержания кортикостерона в сыворотке крови, наличие воспаления в слизистой оболочке желудка.

Материалы и методы

Исследование проведено в осенне-зимний период на 40 половозрелых самцах крыс Вистар (питомник «Столбовая»), индивидуально промаркированных и содержащихся в отдельных клетках по 10 особей,

исходная масса тела 180,24±8,78 грамма. Все экспериментальные процедуры осуществляли в соответствии с регламентом директивы Европейского союза от 2010 года об использовании лабораторных животных.

Было сформировано четыре группы животных: 1) группа ПТСР – крысы, у которых создавали предаторный стресс – страх жертвы перед хищником, предъявление кошачьей мочи в течение 10 суток по 10 минут ежедневно с последующим содержанием 14 суток в обычных условиях; 2) группа ПТСР + Геп – стрессированные животные, которым при содержании в обычных условиях в первые 10 суток один раз в день внутрибрюшинно вводили высокомолекулярный гепарин Serva (Германия, субстанция) в дозе 64 МЕ/кг – эквивалент человеческой дозы значительно ниже терапевтической, с последующим содержанием в обычных условиях 4 суток; 3) группа Геп – крысы, которым вводили гепарин без стрессирования одновременно и аналогично тому, как это делали в предыдущей группе; 4) интактные животные.

Для выявления поведенческих изменений крыс всех групп на 24-й день эксперимента (за день до выведения из него) тестировали поодиночке в течение 10 минут (600 секунд) в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ) в модифицированном М.В. Кондашевской варианте. В тесте ПКЛ регистрировали новые для данного теста показатели: локомоторную активность (ЛА – число зон, пересекаемых за 600 секунд); число и виды психоэмоциональных проявлений, разделенных на классы [2]. Кроме того, регистрировали традиционные для теста ПКЛ показатели: время нахождения в открытых рукавах, число заходов в открытые и закрытые рукава [9, 11]. Вычисляли показатель тревожности (ПТ) по формуле, разработанной М.В. Кондашевской [2]:

$$ПТ = 100 - [(ВОР/600 + ЧПЗ/ЧПП)/2],$$

где ВОР – время нахождения в открытых рукавах, 600 – время тестирования в секундах, ЧПЗ – число пройденных зон, ЧПП – число психоэмоциональных проявлений.

На 25-й день животных выводили из эксперимента и подсчитывали количество стрессиндуцированных эрозий в желудке. Для гистологического исследования кусочки желудка фиксировали в 10% забуференном формалине, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, анализировали с помощью микроскопа Axiopter 2 imaging (Carl Zeiss, Германия), получали микрофотографии. В сыворотке крови оценивали уровень кортикостерона, используя иммуноферментные наборы (IBL, Германия).

Для обработки результатов исследования использован пакет прикладных программ Statistica 8.0. В связи с отсутствием нормального распределения множественные статистически значимые различия определяли с помощью критерия Краскела–Уоллисса, предназначен-

ного для проверки разности медиан нескольких выборок. Результаты выражали как Me (Qн; Qв) – медиана, нижний и верхний квартили. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе традиционно регистрируемых показателей поведения крыс в ПКЛ при ПТСР выявлено достоверно значимое снижение времени нахождения животных в открытых рукавах ПКЛ ($p=0,004$, рис. 1) – признак, который многие исследователи считают показателем тревожного состояния [9, 11].

При тестировании крыс в приподнятом крестообразном лабиринте мы использовали приоритетный метод – регистрацию расширенного спектра психоэмоциональных проявлений (всего 18), демонстрируемых лабораторными грызунами, так как применяемые до настоящего времени методы тестирования и регистрации поведенческих проявлений экспериментальных животных не соответствуют диапазону клинических проявлений ПТСР у людей. Кроме того, применяли новый комплексный показатель тревожно-депрессивного состояния – показатель тревожности [2].

При оценке новых для теста ПКЛ показателей установлено, что при ПТСР существенно возросли значения контекстных, пассивно- и активно-оборо-

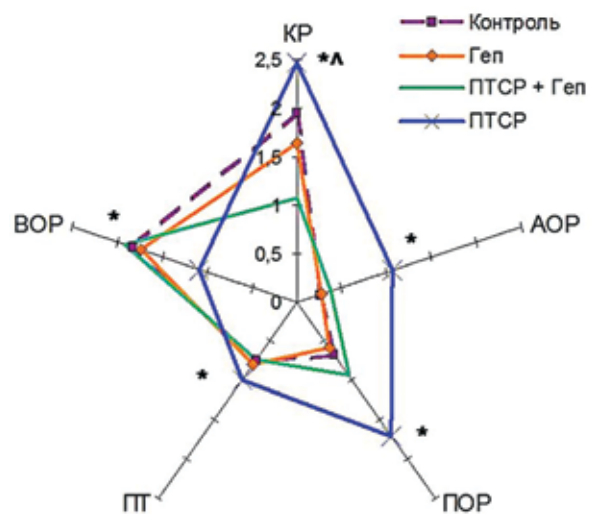


Рис. 1. Поведенческие показатели крыс Вистар при моделировании посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), животных которым вводили гепарин на фоне ПТСР (ПТСР + Геп), гепарин без стрессирования (Геп) и контрольных интактных крыс
 КР – контекстные реакции (значения взяты с коэффициентом 10^{-1}), АОР – активно-оборонительные реакции, ПОР – пассивно-оборонительные реакции, ПТ – показатель тревожности (значения взяты с коэффициентом 10^{-2}), ВОР – время нахождения в открытых рукавах лабиринта (значения взяты с коэффициентом 10^{-2})
 * $p \leq 0,05$ – отличие ПТСР от контроля, ^ $p \leq 0,05$ – отличие ПТСР + Геп от контроля по Манну–Уитни

нительных реакций ($p=0,0006$, $p=0,003$, $p=0,00005$, соответственно, рис. 1), а также повышены значения показателя тревожности ($p=0,005$, рис. 1). В совокупности эти данные указывают на наличие поведенческих атрибутов тревожно-депрессивного состояния у крыс группы ПТСР.

Увеличение числа контекстных проявлений может быть признаком затруднения при ориентации в пространстве. Следует отметить, что 60% животных группы ПТСР продемонстрировали от 1 до 12 случаев freezing-реакций – замираний, входящих в класс пассивно-оборонительных реакций и свидетельствующих о состоянии депрессии [1, 2]. В контроле и остальных опытных группах эту реакцию демонстрировали по одной крысе в группе, не более двух эпизодов. В класс активно-оборонительных реакций, число и спектр разнообразия которых повысились, по нашей классификации входят невротические и стрессовые, отражающие тревожность у крыс группы ПТСР (рис. 1) [1, 2]. Перечисленные изменения сопровождались достоверно значимым снижением уровня кортикостерона – 238,2 (149,6; 373,8) по сравнению с контролем – 428,8 (392,2; 581,6), группой крыс, которым после стрессирования вводили гепарин (ПТСР + Геп) – 398,4 нмоль/л (297,7; 486,9) и животными, которым вводили гепарин без стрессирования (Геп) – 372,7 нмоль/л (307,7; 451,5) (Me (Qн; Qв)). Следовательно, за исключением группы ПТСР, значения уровня кортикостерона всех остальных опытных групп не отличались от контрольных.

Изменение поведения и гормонального статуса животных группы ПТСР сопровождалось морфологическими проявлениями воспаления слизистой оболочки стенки дна желудка – у шести из 10 крыс обнаруживались эрозии (от трех до семи). При микроскопическом исследовании отмечено, что эпителий десквамирован, дефект захватывал половину или чуть менее толщины слизистой оболочки, железистые клетки увеличены в размере. В дне и краях эрозии видна лейкоцитарная инфильтрация, кое-где лейкоциты проникают в подслизистый слой (рис. 2 В, Г).

В противоположность группе ПТСР поведение животных, которым после стрессирования вводили гепарин (группа ПТСР + Геп), отличалось от поведения животных группы контроля уменьшением числа контекстных проявлений ($p=0,0006$, рис. 1). Последнее может свидетельствовать о позитивных свойствах гепарина, вводимого в малых дозах, а именно об улучшении когнитивных механизмов, участвующих в реализации способности к ориентации в пространстве, а также принятия решения при выборе направления движения. По сравнению с группой ПТСР уменьшение у крыс группы ПТСР + Геп пассивно- и активно-оборонительных проявлений ($p=0,02$ и $p=0,0005$, соответственно, рис. 1) указывает на нормализацию поведения и сбережение энергетических ресурсов организма на необходимые процессы адаптации. Об улучшении процессов адаптации у этой группы животных свидетель-

ствует также отсутствие эрозий в желудке, слизистая оболочка которого при микроскопическом исследовании не отличалась от таковой у крыс контрольной группы (рис. 2 А, Б). Аналогичное поведение и отсутствие изменений в слизистой оболочке желудка зарегистрированы у группы животных, которым вводили гепарин без стрессирования (группа Геп).

С целью объяснения механизмов действия гепарина в дозах ниже терапевтических мы обратились к нашим работам, проведенным ранее, где было установлено, что у крыс, получавших гепарин до начала обучения (формирование пищедобывательного поведения) в многоальтернативном лабиринте, из поведения исчезали все виды безусловных реакций, отражающих наличие психоэмоционального напряжения. В частности, исчезали такие реакции, как двигательная заторможенность, активные и пассивные стрессовые, возникающие обычно у интактных крыс на определенных этапах обучения. Все это позитивно сказывалось на работоспособности крыс, которым вводили гепарин. В результате после 20-дневного обучения в лабиринтной среде обучалось 90% особей по сравнению с контролем, где таких животных было 50–60%. Следовательно, можно констатировать, что гепарин в дозе 64 МЕ/кг обладает анксиолитическим действием, способностью активировать локомоторную активность и когнитивные процессы, а также механизмы, повышающие способность к ориентации в пространстве.

Для объяснения молекулярных механизмов действия гепарина нами был проведен анализ содержания моноаминов в структурах головного мозга. Среди механизмов, вызывавших состояние стресса и адинамии, возможно, важную роль сыграло снижение уровня моноаминов в гипоталамусе, гиппокампе и коре головного мозга, тогда как успешное обучение гепаринизированных крыс в многоальтернативном лабиринте, сопровождающееся высоким уровнем локомоторной активности, вероятнее всего, связано с повышением уровня дофамина в стриатуме. По данным литературы известно, что понижение уровня дофамина приводит к потере инициативы и снижению двигательной активности, в то время как повышение уровня дофамина ведет к увеличению этих показателей [4, 5, 10].

В нативном состоянии нейромедиаторы очень быстро подвергаются распаду и обратному захвату в нервные окончания. Б.А. Кудряшовым (1975) установлено, что при стрессе в крови значительно увеличивается содержание комплексов гепарина с нейромедиаторами – норадреналином, дофамином и серотонином. Эти комплексы обеспечивают более длительное действие нейромедиаторов, а кроме того обладают фибринолитическими свойствами и способностью снижать вязкость крови, что может повышать прохождение регуляторных веществ через клеточные барьеры [3]. Указанные эффекты могут способствовать обеспечению наиболее благоприятных условий для форсирования адаптационных процессов при стрессе. Таким образом, эндоген-

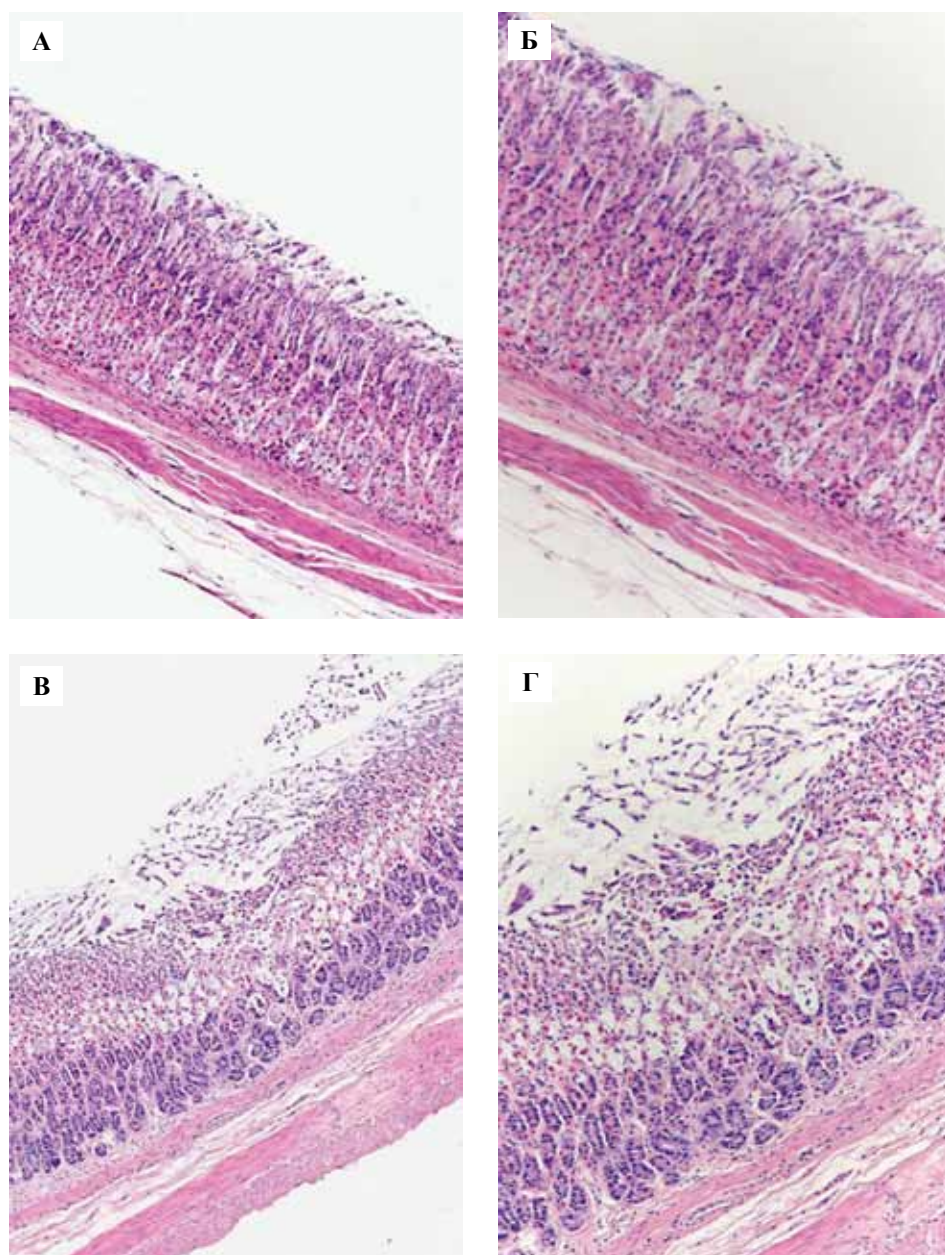


Рис. 2. Стенка дна желудка крысы Вистар. А, Б – контроль, В, Г – моделирование посттравматического стрессового расстройства. Окраска гематоксилином и эозином, А, В $\times 100$, Б, Г $\times 400$

ный гепарин является наиболее вероятным связующим звеном, с помощью которого устанавливается функциональная взаимосвязь между медиаторами нервной системы и биологически активными веществами периферических органов. Как было показано Б.А. Кудряшовым, такими же свойствами обладает экзогенно вводимый высокомолекулярный гепарин, аналогичный по своей структуре гепарину тучных клеток [3]. Есть все основания полагать, что в наших экспериментах курсовое введение гепарина оказало регуляторное влияние на экспериментальных животных, в результате чего их организм адаптировался к функционированию в условиях экстремального режима при воздействии predatorного стресса.

Заключение

Проведенное исследование позволило установить, что в результате применения predatorного стресса у крыс Вистар развиваются основные атрибуты посттравматического стрессового расстройства: тревожно-депрессивное состояние, снижение уровня циркулирующего кортикостерона, признаки формирования воспаления в слизистой оболочке желудка. На современном этапе возникла потребность в разработке новых лекарственных средств с целью сохранения здоровья, работоспособности и профессионального долголетия человека при экстремальных воздействиях. В настоящей работе приведены результаты анализа действия высокомолекулярного гепарина при

моделировании посттравматического стрессового расстройства. Следует обратить внимание на то, что применялись дозы значительно ниже эквивалентных терапевтическим дозам, вводимым человеку. Инъекции гепарина обеспечили нормализацию поведенческих и психоэмоциональных проявлений, уровня кортикостерона, состояния слизистой оболочки желудка. Показано, что при моделировании посттравматического стрессового расстройства гепарин обладает антистрессорным и противовоспалительным действием, содействует улучшению способности животных к ориентации в пространстве. Полученные результаты могут послужить экспериментальным обоснованием для расширения клинического применения гепарина в малых дозах с целью предупреждения и лечения психосоматической патологии при посттравматических стрессовых расстройствах.

Литература/References

1. *Кондашевская М.В.* Гепарин – новая парадигма эффектов действия. М.: Студия МДВ, 2011. 276 с. [*Kondashevskaya M.V.* Heparin – a new paradigm of the effects of action. М.: Studiya MDV, 2011. 276 p. (In Russ.)].
2. *Кондашевская М.В.* Экспериментальная оценка влияния малых доз гепарина на поведение и морфофункциональное состояние печени крыс Вистар при посттравматическом стрессовом расстройстве // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 164, № 10. С. 490–494. [*Kondashevskaya M.V.* Experimental evaluation of the effect of small doses of heparin on the behavior and morphofunctional state of the liver of Wistar rats in posttraumatic stress disorder // *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2017. V. 164, No 10. P. 490–494. (In Russ.)].
3. *Кудряшов Б.А.* Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М.: Медицина. 1975. 486 с. [*Kudriashov B.A.* Biological problems of regulation liquid state of blood and its coagulation. М.: Meditsina, 1975. 486 p. (In Russ.)].
4. *Литвинова С.А., Клодт П.М., Кудрин В.С., Наркевич В.Б. и соавт.* Изучение поведения и содержания нейротрансмиттеров в структурах мозга крыс с моделируемой введением Аβ₂₅₋₃₅ болезнью Альцгеймера // Нейрохимия. 2015. Т. 32, № 1. С. 48–56. [*Litvinova S.A., Klodt P.M., Kudrin V.S., Narkevich V.B. et al.* A study of the behavior and content of neurotransmitters in rat brain structures with the simulated administration of Аβ₂₅₋₃₅ Alzheimer's disease // *Neirokhimiya*. 2015. V. 32. No 1. P. 48–56 (In Russ.)].
5. *Николаева А.А., Королева С.В., Ашмарин И.П.* Дофамин – серотонин – соматостатин: изучение взаимодействий в этой системе обещает новые перспективы в теории и практике // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009. Т. 72, № 2. С. 60–64. [*Nikolaeva A.A., Koroleva S.V., Ashmarin I.P.* Dopamine – serotonin – somatostatin: the study of interactions in this system promises new perspectives in theory and practice // *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009. V. 72, No 2. P. 60–64. (In Russ.)].
6. *Пальцев А.И., Торгашов М.Н., Попова О.С.* Патология желудочно-кишечного тракта и абдоминальные боли у ветеранов боевых действий // Терапевтический архив. 2013. Т. 85, № 2. С. 36–42. [*Paltsev A.I., Torgashov M.N., Popova O.S.* Pathology of the gastrointestinal tract and abdominal pain in war veterans // *Terapevticheskii arkhiv*. 2013. V. 85, No 2. P. 36–42. (In Russ.)].
7. *Резник А.М., Фастовцов Г.А.* Психофармакотерапия ветеранов войн с посттравматическим стрессовым расстройством // Российский психиатрический журнал. 2010. № 3. С. 59–65. [*Reznik A.M., Fastovtsov G.A.* Psychopharmacotherapy of veterans of wars with posttraumatic stress disorder // *Rossiiskii psikhiatricheskii zhurnal*. 2010. V. 3. P. 59–65. (In Russ.)].
8. *Стрельникова Ю.Ю.* Типы психологических и соматических последствий, возникающих у сотрудников МЧС России в процессе профессиональной деятельности // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия «Психология». 2016. Т. 9, № 1. С. 55–63. [*Strelnikova Yu.Yu.* Types of psychological and somatic consequences that arise in MES of Russia employees in the course of their professional activities // *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya "Psikhologiya"*. 2016. V. 9, No 1. P. 55–63. (In Russ.)].
9. *Судаков С.К., Назарова Г.А., Алексеева Е.В., Башкатова В.Г.* Определение уровня тревожности у крыс: расхождение результатов в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155, № 3. С. 268–270. [*Sudakov S.K., Nazarova G.A., Alekseeva E.V., Bashkatova V.G.* The determination of the anxiety level in rats: the discrepancy between the results in the tests “open field”, “cross-shaped elevated labyrinth” and Vogel's conflict test // *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2013. V. 155, No 3. P. 268–270. (In Russ.)].
10. *Daberkow D.P., Kesner R.P., Keefe K.A.* Relation between methamphetamine-induced monoamine depletions in the striatum and sequential motor learning // *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;81(1):198–204. doi:10.1016/j.pbb.2005.03.010.
11. *Koresh O., Kaplan Z., Zohar J., Matar M.A. et al.* Distinctive cardiac autonomic dysfunction following stress exposure in both sexes in an animal model of PTSD // *Behav Brain Res*. 2016;308:128–42. doi: 10.1016/j.bbr.2016.04.024.
12. *Yehuda R., Seckl J.* Minireview: Stress-related psychiatric disorders with low cortisol levels: a metabolic hypothesis // *Endocrinology*. 2011;152(12):4496–503. doi: 10.1210/en.2011-1218. Epub 2011 Oct 4.

ADAPTATION ABNORMALITIES IN POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER CORRECTED BY LOW DOSE HEPARIN INJECTIONS IN AN EXPERIMENT

M.V. Kondashevskaya, L.V. Kaktursky

The reproducibility of the model of post-traumatic stress disorder was confirmed using new methods of testing and recording behavioral events, assessing the serum corticosterone levels and analyzing the state of the stomach bottom wall in male Wistar rats. It was shown that the course of administration of low dose heparin (64 IU / kg) after 10-day exposure to predator-induced stress (fear of predator) had a therapeutic effect increasing the adaptive capacity of the organism and resulting in the psychosomatic recovery.

Key words: heparin, posttraumatic stress disorder, elevated plus maze, corticosterone, gastric erosion, Wistar rats

Информация об авторах

Кондашевская Марина Владиславовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон +7 980 714 22 40. E mail: marivladiko@mail.ru

Кактурский Лев Владимирович – доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, научный руководитель

НИИ морфологии человека, заведующий Центральной патологоанатомической лабораторией НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон +7 903 509 62 06. E mail: levkaktur@mail.ru

Материал поступил в редакцию 15 июня 2018 года

ИРИНА АЛЕКСАНДРОВНА КАЗАНЦЕВА (К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)



2 сентября 2018 года исполнилось 80 лет доктору медицинских наук профессору Ирине Александровне Казанцевой. В 1961 году И.А. Казанцева окончила лечебный факультет 1-го ММИ имени И.М. Сеченова, в 1966-м – аспирантуру по патологической анатомии при МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского, в 1967-м защитила кандидатскую диссертацию, в 1974-м – докторскую. В 1986 году ей присвоено звание профессора.

С 1978 по 1992 год И.А. Казанцева возглавляла Центральную патологоанатомическую лабораторию НИИ морфологии человека РАМН, с 1992-го руководит патологоанатомическим отделением МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского, не разрывая творческую связь с НИИ морфологии человека. В течение 26 лет Ирина Александровна вела преподавательскую деятельность в системе дополнительного медицинского образования в качестве профессора последипломной кафедры патологической анатомии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова на всем протяжении периода существования этой кафедры.

Научно-исследовательская деятельность И.А. Казанцевой посвящена разным аспектам онкоморфологии: патологии митоза при предраковых процессах и в различных опухолях, опухолевой патологии при иммунодефицитных состояниях, в частности при саркоме Капоши, клинической морфологии новообразований эндокринных желез, рака желудка, молочной железы и гастроинтестинальных стромальных опухолей. Ею опубликовано свыше 400 работ, в том числе восемь монографий и глав в руководствах, которые пользуются большой популярностью. Ирина Александровна является наиболее авторитетным специалистом в клинической онкоморфологии и других областях патологической анатомии, именно к ней обращаются за помощью специалисты и родственники пациентов в наиболее ответственных и трудных для диагностики случаях.

Выступления Ирины Александровны с научными докладами и лекциями всегда вызывают живой интерес у слушателей благодаря ее незаурядному таланту лектора, яркой индивидуальности личности, высочайшей эрудиции и широкому кругозору. Результаты ее научных исследований неоднократно с успехом докладывались на российских и международных форумах.

Во главе Центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека И.А. Казанцева проводила большую организационную работу по совершенствованию патологоанатомической службы в стране, под ее руководством лаборатория выполняла функции Всесоюзного научно-методического центра патологоанатомической службы, издавая научно-методическую литературу, участвуя в подготовке нормативных документов Министерства здравоохранения. При непосредственном участии и по инициативе Ирины Александровны в стране была проведена чрезвычайно важная организационная работа по централизации патологоанатомической службы с созданием патологоанатомических бюро как юридически самостоятельных учреждений здравоохранения. Патологоанатомические бюро доказали свою высокую эффективность в разных городах России и ближнего зарубежья.

И.А. Казанцева уделяет много внимания воспитанию научных кадров. Под ее руководством подготовлены и успешно защищены восемь докторских и 16 кандидатских диссертаций. И.А. Казанцева постоянно ведет большую консультативную работу по биопсийной диагностике, щедро делится своими знаниями с молодыми специалистами.

Ирина Александровна Казанцева ведет большую научно-организационную работу, часто выступает в качестве официального оппонента при защите кандидатских и докторских диссертаций и в качестве рецензента научных работ. Является членом диссертационных советов МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского и НИИ морфологии человека.

В 2005 году И.А. Казанцевой присвоено почетное звание заслуженного работника здравоохранения Российской Федерации.

Коллективы сотрудников НИИ морфологии человека, МОНИКИ имени М.Ф. Владимирского, президиум Российского общества патологоанатомов, правление Московского общества патологоанатомов сердечно поздравляют дорогую Ирину Александровну с юбилеем, желают ей крепкого здоровья и новых творческих достижений!

ТРЕБОВАНИЯ К РУКОПИСЯМ, НАПРАВЛЯЕМЫМ В ЖУРНАЛ «КЛИНИЧЕСКАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ»

(составлены с учетом требований Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации и Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы, разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов)

При рассмотрении полученных авторских материалов редакция руководствуется принципами Декларации, разработанной Ассоциацией научных редакторов и издателей (АНРИ) в качестве свода этических принципов, регулирующих политику редакций, редакторов, рецензентов, издателей и авторов в сфере научных публикаций (Москва, 20 мая 2016 года).

Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением от учреждения, заверенным печатью. На последней странице должны быть подписи всех авторов.

Статья должна быть напечатана шрифтом Times New Roman, 14 пунктов через 1,5 интервала с полями 2,5 см с каждой стороны.

Рукописи, а также сопроводительные документы могут быть поданы в редакцию одним из следующих способов:

- по электронной почте на адрес журнала **sem.journal@mail.ru** (текст статьи подается в формате Microsoft Word, сопроводительные документы с оригинальными подписями прикрепляются к письму в формате PDF);
- обычной почтой (2 экземпляра распечатки рукописи с обязательным приложением электронной версии (в формате Microsoft Word) на CD диске, а также оригиналы всех необходимых сопроводительных документов).

Статья регистрируется в редакции только при наличии полного комплекта документов. После закрытого рецензирования статья рассматривается на заседании редакционной коллегии и может быть принята к печати, отклонена или отправлена на доработку.

При необходимости доработки статьи замечания рецензентов доводятся до сведения авторов. Авторы

исправляют статью в соответствии с замечаниями рецензента и присылают в редакцию ее новый вариант и письмо с ответом на замечания рецензента и просьбой рассмотреть статью повторно.

Структура рукописи

Титульный лист должен содержать следующие элементы: УДК, название статьи, инициалы и фамилии авторов, полное название учреждения (учреждений) с ведомственной принадлежностью, город.

Формат заглавия: название работы – прописными буквами; инициалы, фамилия авторов – курсивом, полное название организации, город – обычным шрифтом строчными буквами.

Если авторы публикации работают в разных организациях, принадлежность авторов к разным учреждениям отмечается цифрами, **как указано в образце**, – после фамилий авторов следует надстрочно указать номер, соответствующий номер ставят надстрочно перед названием организации.

Авторский реферат (резюме)

Перед началом текста статьи печатаются краткий реферат (резюме) объемом **230–250 знаков**, в котором отражается основное содержание работы, и ключевые слова (**от 3 до 7**). Резюме должно излагать основные и существенные факты работы. Для оригинальных исследований резюме должно быть структурированным в соответствии с текстом статьи и включать введение, цели и задачи, методы, результаты, заключение (выводы). Сокращения и условные обозначения, кроме общепотребительных, применяют в исключительных случаях, им дают расшифровку и определения при первом упоминании в резюме.

Далее следует перевод на английский язык названия статьи, фамилий авторов, реферата (резюме), ключевых слов.

Образец титульной страницы

УДК:

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛНОТЫ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ
ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАНЫ НА СПИНЕ И ЖИВОТЕ КРЫС

Е.Ю. Кананыхина^{1,2}, Г.Б. Большакова¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

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

Текст резюме

Ключевые слова: полнослойная кожная рана, экспериментальная модель, живот, спина, рубцевание, регенерация

QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF THE EXTENT OF REGENERATION IN THE HEALING OF DORSAL AND VENTRAL RAT SKIN WOUNDS

E. Yu. Kananykhina, G.B. Bolshakova

Abstract text

Key words: full-thickness skin wound, experimental model, abdomen, back, scarring, regeneration

Текст. Объем оригинальной статьи не должен превышать 12 страниц (включая иллюстрации, таблицы и список литературы), кратких сообщений и описаний наблюдений – 3–4 страниц, обзорных и дискуссионных статей – 12–18 страниц. Большой объем статей с оригинальными исследованиями допускается в индивидуальном порядке, по решению редколлегии. Число рисунков и таблиц должно соответствовать объему представляемой информации. Данные, представленные в таблицах, не должны дублировать данные рисунков.

В тексте оригинальной статьи **обязательно** должны быть выделены следующие разделы: **Цель исследования; Материалы и методы; Результаты; Обсуждение** (возможно объединение разделов – **Результаты и обсуждение**); **Выводы** (или **Заключение**); **Литература**. Рубрика Введение не именуется.

При представлении в печать экспериментальных работ с использованием животных авторы должны указать, выполнялись ли требования Европейской конвенции по защите позвоночных животных, правила проведения работ с использованием экспериментальных животных. В разделе **Материалы и методы** кроме вида, пола и числа использованных животных авторы обязательно должны указать применявшиеся при проведении болезненных процедур методы обезболивания и методы выведения животных из эксперимента. При отсутствии этих данных работы приниматься не будут.

В разделе **Материалы и методы** должны быть указаны методы статистической обработки экспериментальных и клинических данных. В тексте статьи и в таблицах при указании достоверности желательно приводить полное значение p ($p=...$, а не $p<...$). Коэффициенты корреляции следует приводить только с указанием их статистической значимости, то есть со значением p , например $r=0,435$; $p=0,006$.

Кроме общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, ДНК) допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте (не более 4–5 аббревиатур). Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте (но не в резюме) при их первом упоминании. Сокращения простых слов, даже если они часто повторяются, не допускаются. Единицы измерения даются по системе СИ. Курсивом указывают названия микроорганизмов, генотипов и аллелей генов.

Использование сокращений в выводах или заключении не допускается.

Иллюстрации. Рисунки должны быть четкими, фотографии – контрастными. На каждый рисунок необходимо сделать ссылку в статье. Подрисовочные подписи даются отдельно с указанием номера рисунка и объяснением условных обозначений. В подписях к микрофотографиям нужно указывать степень увеличения. В тексте статьи, в левом поле, желательно выделить место, где следует разместить рисунок. Внутри квадрата обозначается номер рисунка.

Каждый рисунок следует представлять отдельным файлом в формате TIF, JPEG с разрешением не менее 300 dpi (допускается формат Word). Диаграммы – в Excel или Word с сохранением данных.

Таблицы. Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер, заголовки – точно соответствовать содержанию граф. На каждую таблицу необходимо сделать ссылку в статье. Все разъяснения, включая расшифровку аббревиатур, даются в сносках. Следует указывать статистические методы, использованные для представления вариабельности данных и достоверности различий.

К тексту статьи должна прилагаться информация об авторах – фамилия, имя, отчество полностью, ученая степень, звание, должность и место работы (обязательно с почтовым адресом, включая индекс) каждого автора, фамилия, имя, отчество, e-mail и мобильный телефон автора, ответственного за связь с редакцией.

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

Библиография и образцы оформления литературы

Библиографический список: предпочтительно статьи в журналах за последние 5 лет, за исключением основополагающих работ. Не рекомендуется включать в список диссертационные работы и авторефераты, ссылки на русскоязычные тезисы и статьи из сборников трудов и материалов конференций.

В оригинальных статьях цитируется не более 15–20 источников, в обзорах – не более 50. Ссылки на публикации авторов статьи (самоцитирование) не должны составлять более 15 процентов от общего списка. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных. Библиографические источники (сначала отечественные, затем иностранные) должны быть расположены в алфавитном порядке и пронумерованы. В тексте статьи библиографические ссылки

даются в квадратных скобках арабскими цифрами в соответствии со списком литературы. Список литературы должен быть озаглавлен **Литература/References**, напечатан на отдельном листе через 1,5 интервала, каждый источник с новой строки под порядковым номером; при отсутствии полных выходных данных статьи указывается DOI. За правильность приведенных в литературном списке данных ответственность несет автор. Фамилии иностранных авторов даются в оригинальной транскрипции.

Названия отечественных журналов даются полностью, зарубежных – в сокращенном в соответствии со стилем, принятым в PubMed.

В отечественных публикациях приводятся фамилии и инициалы всех авторов, в зарубежных источниках авторы книги или статьи (при авторском коллективе до 4 человек включительно) упоминаются все, при больших авторских коллективах — 4 первых автора и «et al.».

Изменение прежних правил

С учетом требований международных систем цитирования (Web of Science, Scopus) после каждого русскоязычного источника в квадратных скобках помещается его библиографическая ссылка, имеющая следующую структуру: авторы и название книги или статьи (английский язык), название источника (транслитерация в стандарте BSI), выходные данные в цифровом формате. В конце англоязычной части библиографического описания в круглых скобках указывается язык публикации (In Russ.).

Образцы оформления литературы

Статья в журнале

Прощина А.Е. Пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека // Клиническая и экспериментальная морфология. 2017. № 2. С. 4–11 [Proshchina A.E. Plasticity of the endocrine part of human pancreas // Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya. 2017. V. 2. P. 4–11. (In Russ.)].

Виноходова А.Г., Быстрицкая А.Ф., Смирнова Т.М. Способность к психической саморегуляции как фактор устойчивости к стрессу в экстремальных условиях космического полета // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2005. Т. 39, № 5. С. 14–18. [Vinokhodova A.G., Bystritskaya A.F., Smirnova T.M. Ability to control own psyche as a factor of stress tolerance in the extreme conditions of space flight // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2005. V. 39. N. 5. P. 14–18. (In Russ.)].

Price S., Anning P.B., Mitchell J.A., Evans T.W. Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications // Eur Heart J. 1999; 20(10):715–24.

Beirne J.P., McArt D.G., James J.A., Salto-Tellez M. et al. p16 as a prognostic indicator in ovarian/tubal high-

grade serous carcinoma // Histopathology. 2016;68(4): 615–8.

Mundinger T.O., Mei Q., Foulis A.K., Fligner C.L. et al. {PT ArticleTitle} Human type 1 diabetes is characterized by an early, marked, sustained and islet-selective loss of sympathetic nerves // {/ArticleTiDiabetes}{/JournalTitle PT}, {PT Year}2016{/Year PT}; doi: {PT DOI}10.2337/db16-0284.

Книга

Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы: Руководство. СПб.: Сотис, 2002. 288 с. [Khmelnitsky O.K. Cytological and histological diagnosis of thyroid diseases: A guide. SPb.: Sotis, 2002. 288 s. (In Russ.)].

Воробьев А.П. (ред.). Руководство по гематологии. 3-е изд. Т. 3. М.: Ньюдиамед, 2005. 416 с. [Vorobyov A.P., ed. Manual on hematology. 3rd ed. V. 3. Moscow: Nyudiamed, 2005. 416 s. (In Russ.)].

Радзинский В.Е. (ред.). Перионеология: Учебное пособие. М.: РУДН, 2008. 78 с. [Radzinsky V.E., ed. Perionology: Textbook. Moscow: RUDN, 2008. 78 p. (In Russ.)].

An Y.H., Kylie L.M. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. Totowa, NJ: Humana Press, 2003. 315 p.

Глава в книге, статья в сборнике

Иванова А.Е. Тенденции и причины смерти населения России. В кн.: Демографическое развитие России в XXI веке / Под ред. В.Г. Осипова, Л.Л. Рыбаковского. М.: Экон-Информ, 2009. С. 110–131. [Ivanova A.E. Trends and causes of death of the population of Russia / Demograficheskoye razvitiye Rossii v XXI veke. M.: Ekon-Inform. 2009. S. 110–131. (In Russ.)].

Peter H.J., Geber H., Studer H., Grosch P. et al. Thyroid cell lines forming follicle-like lumina in vitro. In: A. Gordon (ed.) Progress in Thyroid Research. Rotterdam: Balkema, 1991. P. 579–82.

Chhabra P., Kensinger C.D., Moore D.J., Brayman K.L. Present Accomplishments and Future Prospects of Cell-Based Therapies for Type 1 Diabetes Mellitus. In: Type 1 Diabetes – Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy / Ed. by D. Wagner. Shanghai: InTech, 2011. P. 295–335.

Silver R.M., Peltier M.R., Branch D.W. The immunology of pregnancy. In: Creasey R.K., Rcsnik R., eds. Maternal-fetal medicine: Principles and practices. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. P. 89–109.

Редакторы, составители в качестве авторов

Крыжановский Г.Н. Пластичность. В кн.: Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов / Под ред. Г.Н. Крыжановского. М.: Медицина, 2002. 632 с. [Kryzhanovsky G.N. Plasticity. In: Disregulation pathology: A guide for physicians and biologists / edited by G.N. Kryzhanovsky / Dizregulyatsionnaya patologiya:

Rukovodstvo dlya vrachey i biologov. Moscow: Meditsina, 2002. 632 s. (In Russ.).

Mikhelson A.D., ed. Platelets. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2007. 1398 p.

Mesiecky J., Lamm M.E., Strober W., eds. Mucosal immunology. 3rd ed. New York: Academic Press, 2005. 2064 p.

Материалы научных конференций

Салов И.А., Маринушкин Д.Н. Акушерская тактика при внутриутробной гибели плода: Материалы IV Российского форума «Мать и дитя». М., 2000. С. 516–519. [Salov I.A., Marinushkin D.N. Obstetrical tactics in fetal death: Materials of the IV Russian forum «Mother and child» / Materialy IV Rossiyskogo foruma «Mat i ditya». M., 2000. S. 516–519. (In Russ.).]

Берченко Г.Н. Костные трансплантаты в травматологии и ортопедии. В сб.: Применение искусственного имплантата Коллапан в травматологии и ортопедии. М., 2008. С. 3–8. [Berchenko G.N. Bone grafts in trauma and Orthopaedics / V sb.: Primeneniye iskusstvennogo implantata Kollapan v travmatologii i ortopedii. M., 2008. P. 3–8. (In Russ.).]

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun K.C., Degoulet P., eds. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World congress on medical informatics; 1992 Sep 6–10; Geneva Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. P. 1561–5.

Диссертации

Мусина Л.М. Анатомическое обоснование восстановления альвеолярного отростка верхней челюсти со-

единительнотканными аллотрансплантатами: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Уфа, 2014. 23 с. [Musina L.M. Anatomical study on the rehabilitation of the alveolar process of the maxilla by connective tissue allografts: Diss., Ufa, 2014. (In Russ.).]

Множественные публикации

Редакция не рассматривает статьи ранее опубликованные, одновременно представленные для публикации в другие журналы, а также работы, которые в большей части уже были опубликованы в виде статьи или представлены для публикации (приняты к печати) другим печатным изданием либо электронными средствами массовой информации. Это не исключает рассмотрение статьи, не принятой к публикации другим журналом, или полного описания, представленного после публикации предварительных результатов, то есть тезисов или постерных сообщений, представленных на профессиональных конференциях.

* * *

Статьи, оформление которых не соответствует настоящим требованиям, рассматриваться не будут. Присланные рукописи, которым отказано в публикации, не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на сокращение и редактирование присланных статей.

Авторские экземпляры не предусмотрены. Журнал «Клиническая и экспериментальная морфология» можно получить только по подписке.

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

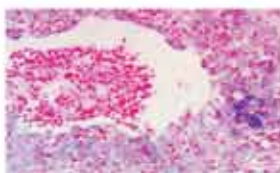


NEW МУЛЬТИПЛЕКСНЫЕ
ТЕХНОЛОГИИ В
ПАТОМОРФОЛОГИИ

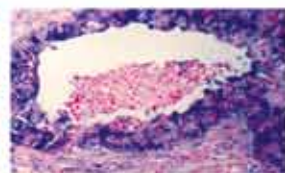
Наборы реагентов TSA[®] и Opal[™]

- 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