

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ISSN 2226-5988

№ 4 (28) / 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

- И.В. Маев, О.В. Зайратьянц, П.Р. Мовтаева,
Г.О. Зайратьянц, А.М. Токмаков*
Варианты строения слизистой оболочки
дистального отдела пищевода и кардиального
отдела желудка: что считать патологией?
- 4 *I.V. Mayev, O.V. Zayratyants, P.R. Movtaeva,
G.O. Zayratyants, A.M. Tokmakov*
Structural variants of distal esophageal mucosa
and gastric cardiac mucosa: what is considered
pathology?

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

- Д.Ш. Джалилова, Н.А. Золотова, М.А. Полякова,
М.Е. Диатроптов, М.Т. Добрынина, О.В. Макарова*
Морфологические особенности воспалительного
процесса и субпопуляционный состав лимфоцитов
периферической крови при хроническом колите
у мышей с разной устойчивостью к гипоксии
- 13 *D.Sh. Dzhalilova, N.A. Zolotova, M.A. Polyakova,
M.E. Diatroptov, M.T. Dobrynina, O.V. Makarova*
Morphological features of the inflammatory process
and subpopulation pattern of peripheral blood
lymphocytes during chronic colitis in mice exhibiting
different responses to hypoxia
- С.П. Мозолева, А.П. Надеев,
С.В. Позднякова, Л.Ю. Костина*
Электронномикроскопическое исследование
клеток Купфера и морфологические изменения
в печени при внутриутробном кандидозном
инфицировании у новорожденных мышей
оппозитных линий СВА и С57BL/6
- 21 *S.P. Mozoleva, A.P. Nadeev,
S.V. Pozdnyakova, L.Yu. Kostina*
Electron-microscopic study of Kupffer cells
and morphological changes in liver for intrauterine
candida albicans infection in newborn mice of opposite
lines CBA and C57BL/6
- Н.Б. Сerezникова, Л.С. Погодина, А.В. Творогова,
П.П. Зак, А.Е. Донцов*
Исследование митохондриальной активности
клеток ретинального пигментного эпителия
при низкодозовом светодиодном облучении
- 28 *N.B. Sereznikova, L.S. Pogodina, A.V. Tvorogova,
P.P. Zak, A.E. Dontsov*
Study of the mitochondrial activity of the retinal
pigment epithelium cells at low-dose led irradiation

МЕТОДЫ METHODS

- И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин*
Способ декальцинации костной ткани
- 34 *I.A. Shurygina, M.G. Shurygin*
Method of decalcination of bone tissue

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

*Т.Б. Бухарова, А.В. Васильев, Е.В. Галицына,
Р.Н. Магомедов, В.С. Кузнецова, О.В. Махнач,
О.А. Зорина, Д.В. Гольдштейн*
Морфометрические критерии регенерации тканей
пародонта

38

*T.B. Bukharova, A.V. Vasiliev, E.V. Galitsyna,
R.N. Magomedov, V.S. Kuznetsova, O.V. Makhnach,
O.A. Zorina, D.V. Goldshtein*
Morphometric criteria of periodont tissue regeneration

А.А. Епишкина, С.С. Кузнецов
Морфологическая дифференциальная диагностика
не ассоциированных с филадельфийской
хромосомой миелопролиферативных заболеваний:
состояние проблемы

43

A.A. Epishkina, S.S. Kuznetsov
Histologic differential diagnosis for philadelphia
chromosome-negative myeloproliferative neoplasm:
problem statement

*И.М. Богданова, Т.В. Фокина, И.И. Степанова,
М.Н. Болтовская, А.П. Милованов*
Роль децидуализации эндометрия в наступлении
и развитии беременности

50

*I.M. Bogdanova, T.V. Fokina, I.I. Stepanova,
M.N. Boltovskaya, A.P. Milovanov*
The role of the endometrial decidualization
in the establishment and development of pregnancy

А.Н. Копылов, П.Л. Гореликов, А.И. Алексева
Стволовые клетки глиобластомы

61

A.N. Kopylov, P.L. Gorelikov, A.I. Alekseeva
Stem cells of glioblastoma

РЕЦЕНЗИЯ

Рецензия на монографию
Н.В. Ягловой, С.С. Обернихина
«Развитие иммунной системы потомства
после иммуностимулирующего воздействия
в ранние сроки беременности».

68

ХРОНИКА

Научная конференция с международным участием
«Актуальные вопросы морфогенеза в норме
и патологии»

70

НЕКРОЛОГ

Памяти
Николая Петровича Омеляненко

72

ВАРИАНТЫ СТРОЕНИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ДИСТАЛЬНОГО ОТДЕЛА ПИЩЕВОДА И КАРДИАЛЬНОГО ОТДЕЛА ЖЕЛУДКА: ЧТО СЧИТАТЬ ПАТОЛОГИЕЙ?

И.В. Маев¹, О.В. Зайратьянц¹, П.Р. Мовтаева^{1,2}, Г.О. Зайратьянц³, А.М. Токмаков^{1,4}

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва

² ГБУ «Республиканская клиническая больница скорой медицинской помощи имени У.И. Ханбиева», Грозный

³ ГБУЗ «Городская клиническая больница имени С.С. Юдина» ДЗМ, Москва

⁴ ГБУЗ «Городская клиническая больница имени братьев Бахрушиных» ДЗМ, Москва

Цель исследования – изучение вариантов строения слизистой оболочки дистального отдела пищевода и кардиального отдела желудка на материале аутопсий у умерших от различных заболеваний. Изучено 1127 ранних вскрытий (в сроки 6–8 часов после констатации летального исхода с целью минимизации аутолиза) умерших в стационарах (средний возраст – 61,3±7,2 года). Были исключены умершие с упоминанием в медицинской документации о гастроэзофагеальном рефлюксе, других заболеваниях органов пищеварения. Слизистую оболочку 4 стенок пищевода и желудка исследовали на протяжении 10 см выше и ниже пищеводно-желудочного соединения (ПЖС) методом ступенчатых гистологических срезов.

Совпадение Z-линии и ПЖС (±1 см – из-за иррегулярности Z-линии) обнаружено в 315 наблюдениях (28%), она была выше ПЖС от нескольких миллиметров до 6 см у 806 умерших (71,5%) и в шести наблюдениях (0,5%) располагалась ниже ПЖС до 2 см, в кардиальном отделе желудка (в этих случаях гистологически диагностирован хронический атрофический пангастрит). Слизистая оболочка кардиального типа отсутствовала в 14 наблюдениях (1,2%, из них в шести случаях при Z-линии в кардиальном отделе желудка и в восьми – на уровне ПЖС, ±1 см). Она выявлена в 1113 наблюдениях (98,8%), из них ее верхняя граница в 806 случаях (71,5%) была в пределах от нескольких миллиметров до 6 см выше ПЖС (±1 см), в 307 (27,3%) – на ее уровне, а нижняя граница во всех 1113 случаях – ниже ПЖС (±1 см) в кардиальном отделе желудка, на протяжении до 1,5 см. Частота выявления кардиальной слизистой оболочки и ее длина статистически значимо ($p < 0,05$) нарастали с возрастом, преобладая после 60 лет у мужчин, но не у женщин, у которых ее частота была в 3,1 раза ниже. Очаги кишечной метаплазии обнаружены в пределах кардиальной слизистой оболочки пищевода в 48 наблюдениях (4,3%) и в 11 (1%) – в области ПЖС и кардиальном отделе желудка, на фоне нее или атрофически измененной слизистой оболочки фундального типа. Заключение – кардиальную слизистую оболочку в области ПЖС (±1 см с учетом иррегулярной Z-линии) следует расценивать как вариант нормы, при этом большая часть кардиального отдела желудка выстлана фундальной слизистой оболочкой. Отсутствие кардиальной слизистой оболочки и смещение Z-линии в кардиальный отдел желудка являются, по-видимому, отклонениями от нормы и следствием гипоацидного состояния при атрофическом гастрите. Появление кардиальной слизистой оболочки проксимальнее 1 см от ПЖС – распространенный патологический процесс, частота которого растет с возрастом, и развивающийся в ответ на гастроэзофагеальный рефлюкс. Кишечная метаплазия пищевода, ПЖС и кардиального отдела желудка – безусловно патологические процессы, но разные по своей сущности и прогнозу.

Ключевые слова: слизистая оболочка дистального отдела пищевода, слизистая оболочка кардиального отдела желудка, варианты строения, аутопсии

Единого мнения о том, какой вариант строения слизистой оболочки дистальных 1–2 см пищевода, пищеводно-желудочного соединения (ПЖС) и прок-

симальной части кардиального отдела желудка следует считать нормой, а какой патологией, нет до настоящего времени. Это затрудняет своевременную диагностику

предопухолевых изменений слизистой оболочки пищевода и, как полагают, является одной из причин роста показателей частоты заболеваемости и смертности от аденокарцином пищевода (аденокарцином Барретта) [1–4]. Рак пищевода в России занимает 9-е место в статистике смертности от всех злокачественных опухолей, доля аденокарцином пищевода составляет более 50% от числа всех его злокачественных опухолей, и их частота в последние десятилетия растет быстрее, чем других онкологических заболеваний, таких, например, как меланома, рак молочной железы или простаты. Риск развития аденокарциномы выше при длинном (более 2–3 см) сегменте железистой (цилиндроклеточной) метаплазии дистального отдела пищевода. При железистой метаплазии пищевода, независимо от ее гистологического типа, частота развития аденокарциномы пищевода составляет 0,28% в год у мужчин и 0,13% у женщин, а при кишечной метаплазии (КМ) 0,5%. Другими словами, при КМ рак пищевода ежегодно развивается у одного из 200 больных. Такие пациенты имеют 2–25% риск развития дисплазии различной степени тяжести и 2–5% риск возникновения аденокарциномы пищевода, что в 30–125 раз выше, чем в общей популяции [5–10].

Под термином «кардиальный отдел желудка» понимают его часть начиная от ПЖС до условной границы с фундальным отделом, которую обычно проводят на расстоянии 3–5 см от ПЖС [1, 2, 11]. Пищеводно-желудочное соединение является одним из уникальных в организме человека соединений двух типов слизистых оболочек – многослойного плоского неороговевающего эпителия пищевода и железистого желудка. Место их соединения получило название плоскоклеточно-железистого перехода (зубчатая, или Z-линия) [1, 2, 11]. Вопросы о совпадении ПЖС и Z-линии в норме, о вариантах нормального строения слизистой оболочки дистального отдела пищевода в пределах 1–2 см от ПЖС и проксимальной части кардиального отдела желудка уже много лет служат предметом дискуссий [1–4, 12].

Классические работы J. Nayward (1961) и A. Paull (1976) постулировали, что дистальные 2 см пищевода, ПЖС и проксимальная часть (неопределенной длины) кардиального отдела желудка высланы в норме слизистой оболочкой кардиального типа (СОКТ), а Z-линия локализуется проксимальнее ПЖС [12, 13]. Гистологически СОКТ представлена только слизистыми железами, продуцирующими нейтральные муцины, идентичными желудочным (MUC1+, MUC5AC+ и др.) и сходна с эмбриональной железистой слизистой оболочкой дистального отдела пищевода у плодов и новорожденных, которая в норме может сохраняться до одного года жизни [1, 2, 11]. Такую СОКТ J. Nayward (1961) назвал переходным типом слизистой оболочки, полагая, что она защищает дистальный отдел пищевода и ПЖС от кислого содержимого желудка [12]. Появление железистой (цилиндроклеточной) слизистой оболочки в дистальном отделе пищевода выше, по крайней мере 2 см,

получило название железистой (цилиндроклеточной) метаплазии, которая, как окончательно доказано, является следствием гастроэзофагеального рефлюкса (ГЭР). Ее следует отличать от очагов врожденной гетеротопии слизистой оболочки желудка, наблюдаемой преимущественно в верхней трети пищевода [1–6, 11].

Метаплазированная железистая слизистая оболочка пищевода может быть четырех гистологических типов: кардиального (СОКТ), кислотообразующего кардиального (СОККТ), фундального, или желудочного (СОФТ), а также тонко- или толстокишечного. Последний вариант получил название «кишечная метаплазия» (КМ, полная или неполная) [1–6, 11–13] и именно его российские и американские клинические рекомендации предлагают расценивать как предраковое состояние (еще до появления дисплазии), называемое пищеводом Барретта (ПБ) [1, 5, 7, 14–18]. Тем не менее клинические рекомендации Великобритании [19], Японии [20] и некоторые другие [21], поддержанные в 2015 году международным консенсусом [22], вернули первоначальное и ранее, в 1990-е годы, отвергнутое значение понятия ПБ, включив в него любой тип железистой метаплазии дистального отдела пищевода выше 1 см от ПЖС. При такой трактовке ПБ обязательно уточнять наличие или отсутствия КМ как типа метаплазии с наибольшим риском развития аденокарциномы, а также учитывать другие факторы риска (пол, возраст, ожирение и т.д.) [19, 20]. В связи с этим вопрос о вариантах нормального строения последних 2 см дистального отдела пищевода и ПЖС стал еще более актуальным.

Многочисленные исследования выявили значительную вариабельность длины железистой слизистой оболочки разных типов как в пищеводе, так и в желудке, поставив под сомнение существование в норме СОКТ – переходного типа слизистой оболочки и ее защитной функции [3, 4]. Так, например, было показано, что СОКТ может отсутствовать, часто не распространяется дистальнее 0,5 см от ПЖС и, следовательно, ее границы не совпадают с условными границами анатомического понятия «кардиальный отдел желудка», большая часть которого выслана СОФТ [1–4].

Целью исследования явилось изучение вариантов строения слизистой оболочки дистального отдела пищевода и кардиального отдела желудка на материале аутопсий у умерших от различных заболеваний.

Материалы и методы

Слизистая оболочка дистального отдела пищевода и кардиального отдела желудка изучена по результатам 1127 патологоанатомических вскрытий, проведенных в сроки 6–8 часов после констатации смерти (ранние вскрытия, производимые в целях минимизации посмертного аутолиза). Вскрытия были произведены в 2010–2016 годы в городской клинической больнице им. братьев Бахрушиных Департамента здравоохранения города Москвы и городской клинической больнице им. С.С. Юдина Департамента здравоохранения города

Москвы, являющихся базами кафедры патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. Отобраны умершие, проходившие лечение в указанных стационарах в сроки от трех суток до 1,5 месяца и умершие от ишемических болезней сердца (38% – инфаркт миокарда, постинфарктный и атеросклеротический кардиосклероз), цереброваскулярных заболеваний (61% – инсульт и хроническая ишемия головного мозга), пневмоний и других заболеваний (1%). Были исключены умершие скоропостижно, до полного клинического обследования, получавшие терапию, влияющую на секреторную функцию желудка, а также с заболеваниями органов пищеварения, эндокринной системы, данными о хронической алкогольной интоксикации, длительной интенсивной терапии, а после изучения слизистой оболочки пищевода и желудка – с выраженными макро- и микроскопическими признаками их аутолиза. Указания на ГЭР в медицинской документации при обследовании и в анамнезе отсутствовали (при их наличии наблюдения исключались из исследования).

Соотношение мужчин и женщин составило 1:1,6, возраст – от 36 до 98 лет (средний – $61,3 \pm 7,2$ года). ПЖС локализовали по общепринятым анатомическим критериям (включая дистальный край нижнего пищеводного сфинктера, дубликатуру брюшины, точку прикрепления френоэзофагеальных связок, острый угол Гиса, проксимальный конец желудочных складок, дистальный край продольных вен подслизистого слоя пищевода) и в последующем гистологически, на основании особенностей строения мышечной оболочки пищевода и желудка и выявления подслизистых эзофагеальных желез и их протоков. Эти железы являются наиболее достоверным признаком пищевода (рис. 1 А) [1, 11]. Слизистую оболочку пищевода и желудка исследовали макро- и микроскопически на протяжении до 10 см выше ПЖС и ниже, включая фундальный отдел желудка и участки его антрального отдела. Вследствие выраженной иррегулярности Z-линии и относительной условности линии, принимаемой за ПЖС, которые не всегда проходили строго перпендикулярно длинной оси пищевода, оказалось невозможным объективно судить об их взаимоотношениях в пределах менее 1 см, поэтому под ПСЖ принимали участок слизистой оболочки шириной 1 см.

Для гистологического исследования использовали стандартный метод фиксации в 10% нейтральном формалине и заливки в парафин с окраской гистологических препаратов толщиной 3–4 мкм, полученных на микротоме Leica (Германия), гематоксилином и эозином. Использовали метод ступенчатых срезов, производимых из линейных фрагментов слизистой оболочки, вырезанных перпендикулярно ПЖС из 4 стенок пищевода и кардиального отдела желудка. В результате получали относительно непрерывную картину строения слизистой оболочки от дистального отдела пищевода до фундального отдела желудка. Гистологические препараты исследовали и фотографировали на микроскопе Axio

Lab A1 (Carl Zeiss, Германия). При оценке результатов исследования учитывали ограничения, обусловленные хотя и незначительно выраженными посмертными аутолитическими изменениями.

Результаты исследования обрабатывали статистически с использованием программного обеспечения MS Office Excel и Statistica for Windows 10.0. Величина критического уровня значимости принималась равной 0,05.

Результаты и обсуждение

Совпадение Z-линии и ПЖС (± 1 см) обнаружено только в 315 наблюдениях (28%), причем в 179 таких случаях (56,8%), несмотря на слабый аутолиз слизистой оболочки, отмечены выраженные признаки неэрозивного рефлюкс-эзофагита (рис. 2 А, рис. 3). Макроскопически на протяжении до 4–5 см от ПЖС (нередко длина пораженного участка была различной в разных стенках пищевода с диапазоном 1–3 см) слизистая оболочка пищевода, представленная многослойным плоским эпителием, выглядела неравномерно отечной, местами покрытой фибрином, но без образования ее дефектов. Гистологически выявлялись межклеточный отек и дистрофические изменения кератиноцитов многослойного плоского эпителия, повышенное число интраэпителиальных нейтрофильных лейкоцитов с примесью эозинофилов, полнокровие и лимфоидная, с нейтрофилами инфильтрация стромально-сосудистых сосочков и субэпителиального слоя собственной пластинки слизистой оболочки. Более вероятно, что такой неэрозивный рефлюкс-эзофагит развивался в терминальной стадии тяжелых сердечно-сосудистых заболеваний, которые преимущественно были причинами смерти пациентов, так как упоминания о гастроэзофагеальном рефлюксе в медицинской документации отсутствовали. Возможно также, что гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ) протекала у этих пациентов бессимптомно, как это нередко бывает [5–7], или не была зафиксирована в истории болезни.

Z-линия была выше ПЖС (± 1 см) от нескольких миллиметров до 6 см, локализуясь в дистальном отделе пищевода, в большинстве наблюдений – у 806 умерших (71,5%) (рис. 2 Б, В, рис. 3). У большинства умерших был выражен неэрозивный рефлюкс-эзофагит, а в 23 случаях (2,8%) у них был обнаружен эрозивно-язвенный рефлюкс-эзофагит метаплазированной железистой слизистой оболочки. Длина метаплазированной железистой слизистой оболочки в разных стенках пищевода значительно варьировала. Она имела вид «язычков» синюшно-красного цвета и зернистой, резко отличаясь от гладкой белесоватой слизистой оболочки, выстланной многослойным плоским эпителием (циркулярный или круговой тип метаплазии с разной длиной «язычков» линейного распространения по Пражской системе «С & М критерии» [1, 5, 6]). Граница железистой слизистой оболочки с многослойным плоским эпителием (Z-линия) была четко выражена, неровная (зубчатая),

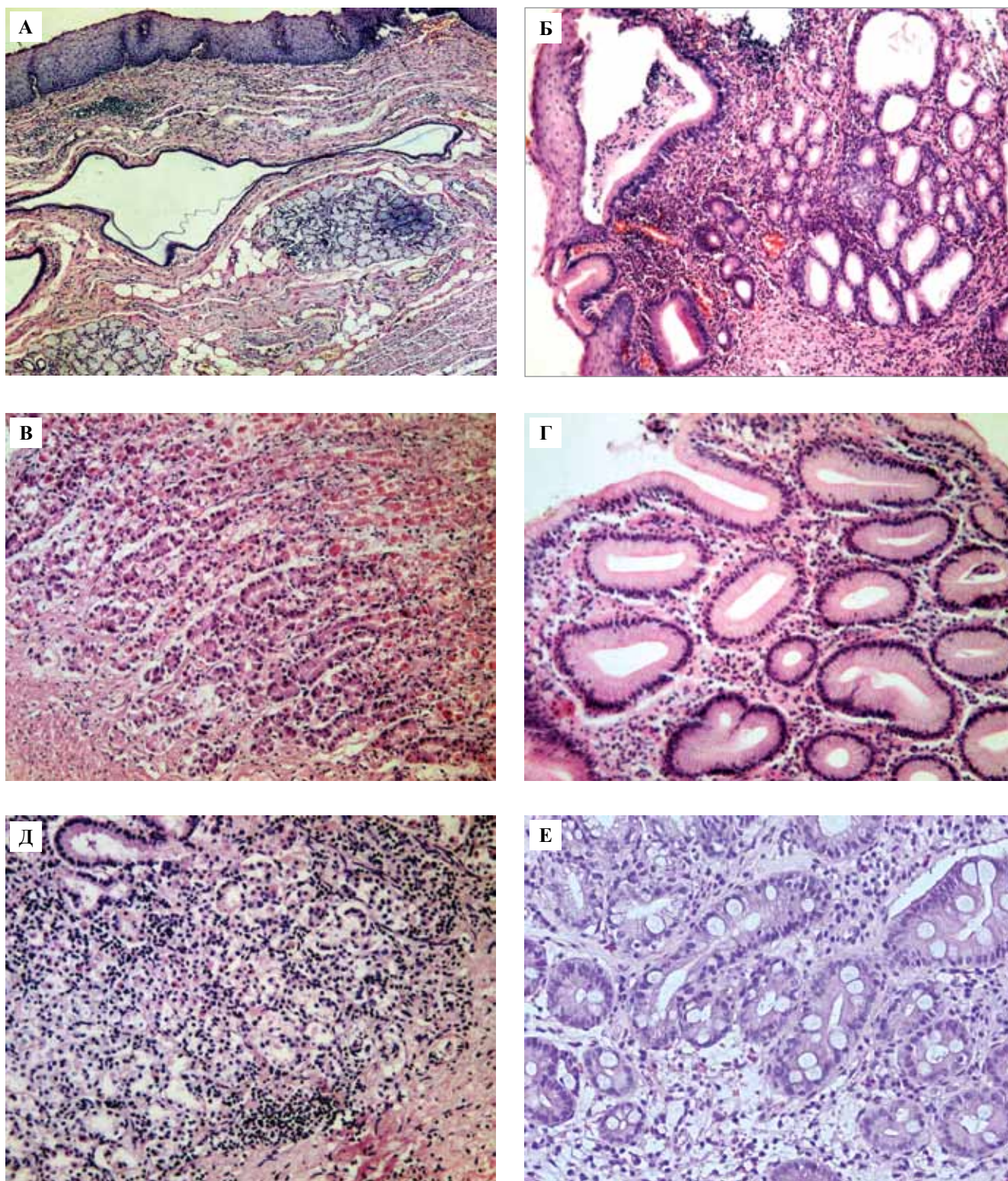


Рис. 1. Гистологические типы строения слизистой оболочки

дистального отдела пищевода (А, Г–Е) и кардиального отдела желудка (В, В).

А – эзофагеальная подслизистая железа с расширенными выводными протоками – морфологический признак слизистой оболочки пищевода, Б – очаги плоскоклеточной метаплазии слизистой оболочки кардиального типа в кардиальном отделе желудка, В – слизистая оболочка фундального типа в кардиальном отделе желудка,

Г – слизистая оболочка кардиального типа в дистальном отделе пищевода, Д – слизистая оболочка кардиального кислотообразующего типа в дистальном отделе пищевода, Е – кишечная метаплазия в дистальном отделе пищевода.

Окраска гематоксилином и эозином. А – $\times 60$, Б – $\times 120$, В–Д – $\times 200$, Е – $\times 250$

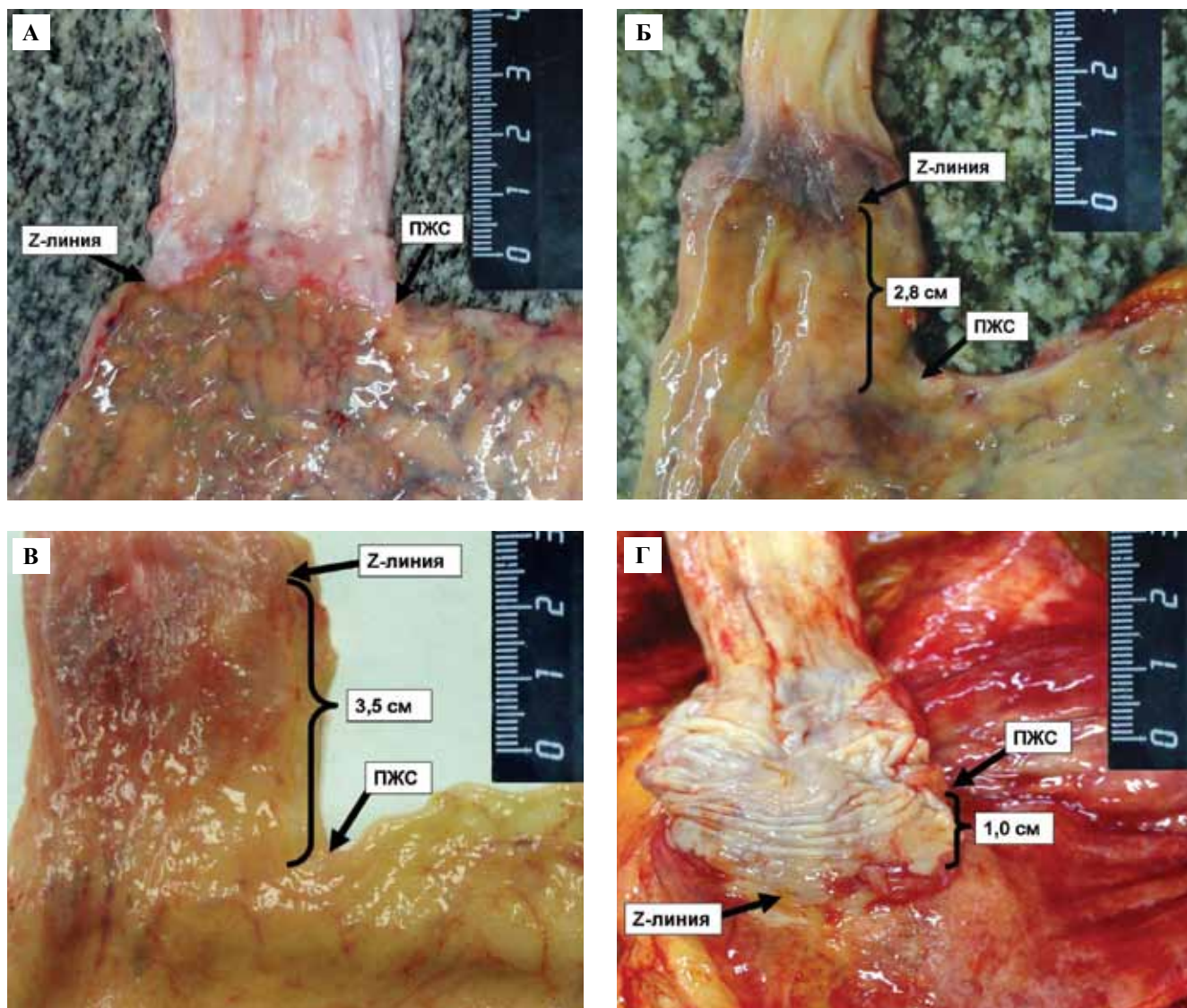


Рис. 2. Варианты расположения Z-линии по отношению к ПЖС.
 А – Z-линия совпадает с ПЖС, Б, В – Z-линия проксимальнее ПЖС в пределах 2,8 и 3,5 см,
 Г – Z-линия дистальнее ПЖС на 1 см в кардиальном отделе желудка

обычно с узкой демаркационной зоной отека и наложениями фибрина. Однако такие участки с признаками эзофагита часто встречались и на всем протяжении метаплазированной слизистой оболочки. В части наблюдений выше верхней границы метаплазированной железистой слизистой оболочки отмечались аналогичного вида участки округлой и удлинённой формы размерами до 0,5–1 см (очаговый или островковый тип метаплазии по Пражской системе «С & М критерии» [1, 5, 6]).

В шести наблюдениях (0,5%) Z-линия располагалась ниже ПЖС от нескольких миллиметров до 2 см, то есть в кардиальном отделе желудка (рис. 2 Г, рис. 3). Во всех этих случаях распространения многослойного плоского эпителия циркулярно и в виде «язычков» в кардиальный отдел желудка был выражен хронический атрофический пангастрит хеликобактерной или иной,

возможно алкогольной, этиологии (как подтвердилось при гистологическом исследовании, хотя клинические данные о наличии хронического гастрита отсутствовали) и не обнаружены морфологические признаки рефлюкс-эзофагита. Вероятно, причиной дистальной транслокации Z-линии в таких наблюдениях стало снижение кислотности желудочного сока. Гистологическое исследование также выявило дополнительные микроскопические очаги плоскоклеточной метаплазии СОФТ в кардиальном отделе желудка даже на некотором удалении от границы многослойного плоского эпителия (рис. 1 Б).

Гистологическое исследование показало, что СОКТ отсутствовала в 14 наблюдениях (1,2%), из них в шести – при Z-линии, обнаруженной в кардиальном отделе желудка, и в восьми – на уровне ПЖС (± 1 см),

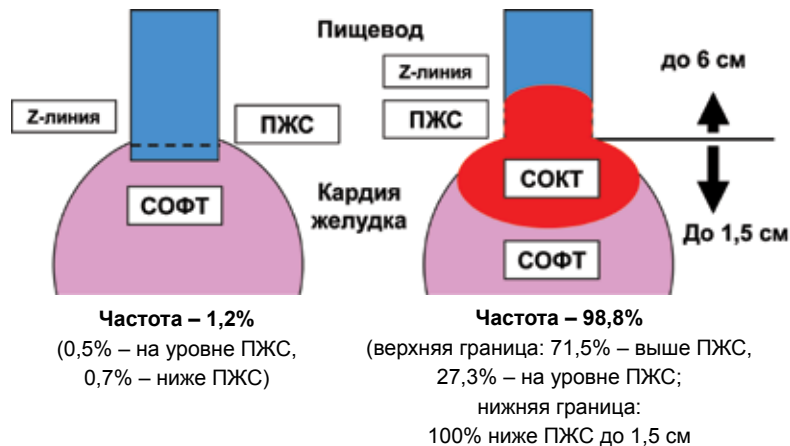


Рис. 3. Частота разных вариантов строения слизистой оболочки дистального отдела пищевода, ПЖС и кардиального отдела желудка. ПЖС – пищеводно-желудочное соединение, СОКТ – слизистая оболочка кардиального типа, СОФТ – слизистая оболочка фундального типа

причем без признаков эзофагита. В этих случаях многослойный плоский эпителий пищевода контактировал непосредственно с СОФТ, которая выстилала кардиальный отдел желудка (рис. 1 В). Во всех этих наблюдениях гистологически был обнаружен выраженный в разной степени хронический атрофический пангастрит хеликобактерной, алкогольной и неуточненной этиологии (хотя и не диагностированный при жизни больных). Этот факт позволяет предположить, что такая особенность плоскоклеточно-железистого соединения является реактивным приобретенным состоянием и следствием пониженной кислотности желудочного сока и поэтому не может быть расценена как вариант нормы.

СОКТ (рис. 1 Г) была выявлена в 1113 наблюдениях (98,8%), из них ее верхняя граница в 806 случаях (71,5%) была в пределах от нескольких миллиметров до 6 см выше ПЖС (± 1 см), в 307 (27,3%) – на ее уровне, а нижняя граница во всех 1113 случаях – ниже ПЖС (± 1 см) в кардиальном отделе желудка, на протяжении до 1,5 см. Причем длиной более нескольких миллиметров дистальнее ПЖС, выстилающая заметную часть кардиального отдела желудка, она была только в 69 случаях (6,1%). В железах СОКТ встречались микрофокусы с наличием единичных кислотообразующих (париетальных) клеток, то есть местами она имела строение, характерное для СОККТ (рис. 1 Д), аналогичные единичные очаги СОККТ были найдены и в СОФТ.

Частота выявления СОКТ и ее длина статистически достоверно ($p < 0,05$) нарастали с возрастом, преобладая после 60 лет у мужчин, но не у женщин, у которых частота СОКТ, выходящей за пределы 1 см в области ПЖС, была в 3,1 раза меньше. Достоверной разницы частоты обнаружения и длины СОКТ от причин летальных исходов умерших обнаружено не было.

Очаги КМ разной величины (рис. 1 Е) выявлены среди СОКТ пищевода в 48 наблюдениях (4,3%) и еще в 11 (1%) – в области ПЖС (± 1 см) и дистальнее: в кар-

диальном отделе желудка, на фоне СОКТ или атрофически измененной СОФТ. Ни в одном наблюдении КМ не встретилась как изолированный тип метаплазированной слизистой оболочки, ее очаги были неравномерно, мозаично распределены среди других типов КМ. Никакой статистически достоверной закономерности в возникновении и локализации очагов КМ пищевода в зависимости от длины СОКТ, пола и возраста умерших, а также причин их смерти не выявлено. В кардиальном отделе желудка очаги КМ были обнаружены при хроническом атрофическом гастрите (как и в других отделах желудка). Из-за аутолитических изменений слизистой оболочки, хотя и слабо выраженных, объективно судить о наличии дисплазии на участках КМ, как и в других типах слизистой оболочки, не представлялось возможным, тем более что признаки тяжелой дисплазии не встретилось. Следует также отметить, что те же аутолитические изменения достоверно не позволяли обнаружить единичные бокаловидные клетки, особенно в покровно-ямочном эпителии слизистой оболочки. Следовательно, можно утверждать, что выявленный показатель частоты КМ пищевода (4,3%) нужно расценивать как заниженный, хотя он и превышает более чем в 2 раза показатель, обычно приводимый в популяционной статистике ПБ (1–2%) [3, 5, 6, 8, 10].

Результаты проведенного исследования подтверждают точку зрения, согласно которой любой тип железистой слизистой оболочки в дистальном отделе пищевода, проксимальнее 1 см от ПЖС, следует расценивать как патологический процесс и следствие широко распространенного в популяции ГЭР, частота которого растет с возрастом. В России не менее чем у 18–46% взрослых диагностируют ГЭРБ, а заболевание нередко протекает бессимптомно [5, 6]. При этом наличие СОКТ или СОККТ в пределах 1 см выше и в области ПЖС (иррегулярная Z-линия) следует, вероятно, принять за варианты нормы, а не патологический ультракороткий сегмент железистой мета-

плазии слизистой оболочки пищевода, как предлагали расценивать ранее и позже справедливо отказались [1–6, 17–22]. Z-линия – динамичная структура, и ее локализация зависит прежде всего от функционального состояния желудка и нижнего пищеводного сфинктера. Отсутствие СОКТ и смещение Z-линии в кардиальный отдел желудка характерны, по-видимому, для состояний с пониженной кислотностью желудочного сока и наблюдаются, например, при атрофическом гастрите. КМ пищевода развивается, как видно, преимущественно на фоне СОКТ (возможно, и СОККТ). Остается неясным, как трактовать КМ в пределах 1 см в области ПЖС, тем более что известен ее крайне низкий потенциал онкологического риска [1–6, 17–22]. В кардиальном отделе желудка КМ, естественно, представляет собой одно из проявлений хронического атрофического гастрита.

Полученные нами данные не позволяют согласиться с мнением ряда авторов, полагающих, что в норме СОКТ либо отсутствует, либо, напротив, распространяется проксимальнее до 2 см от ПЖС, а дистальнее выстилает на большом протяжении кардиальный отдел желудка [3, 4]. Многие исследователи справедливо указывают на то, что представление о наличии в норме железистой слизистой оболочки в пищеводе проксимальнее 1 см от ПЖС приводит к риску запоздалой диагностики ПБ. В пределах СОКТ очаги КМ и дисплазии эпителия при рутинном эндоскопическом исследовании не визуализируются, необходимо гистологическое изучение правильно, в соответствии с протоколом исследования, взятых биоптатов, причем адекватного числа [1–6, 17–22].

Важно отметить, что риск неопластической трансформации не доказан для любых типов железистой слизистой оболочки пищевода, включая КМ, в пределах 1 см проксимальнее ПЖС. Для КМ в пределах такой иррегулярной Z-линии и слизистой оболочки кардиального отдела желудка, обусловленной обычно хроническим атрофическим гастритом, степень риска развития рака не отличается от таковой при локализации КМ в других отделах желудка [1–6, 17–22]. Именно поэтому в клинических рекомендациях, посвященных ГЭРБ и ее грозному осложнению – пищеводу Барретта, принято использовать этот термин при выявлении любой железистой метаплазии (английские и японские рекомендации) или КМ (российские и американские рекомендации) только проксимальнее 1 см от ПЖС и не расценивать как ПБ и предраковые изменения обнаружение даже КМ в области иррегулярной Z-линии в пределах 1 см от ПЖС [1–6, 17–22]. Естественно, что выявление очагов дисплазии (интраэпителиальной неоплазии) эпителия даже в пределах 1 см от ПЖС указывает на неопластический характер изменений, но развившееся из таких очагов новообразование бывает трудно отнести к раку пищевода или желудка, что послужило одной из причин выделения отдельной группы опухолей – аденокарцином ПЖС [1].

Заключение

Следует считать неправомерным вопрос, является ли СОКТ в области выше или ниже ПЖС на 1 см нормой или патологией. СОКТ в области ПЖС (± 1 см, с учетом иррегулярной Z-линии) является вариантом нормы, а большая часть кардиального отдела желудка выстлана СОФТ. Однако Z-линия – динамичная структура, и ее локализация зависит прежде всего от функционального состояния желудка и нижнего пищеводного сфинктера. Отсутствие СОКТ и смещение Z-линии в кардиальный отдел желудка являются, по-видимому, отклонениями от нормы и следствием гипоацидного состояния (при атрофическом гастрите). Появление СОКТ проксимальнее 1 см от ПЖС – развивающийся в ответ на ГЭР распространенный патологический процесс, частота которого растет с возрастом. КМ пищевода, ПЖС и кардиального отдела желудка – безусловно патологические процессы, но разные по своей сущности и прогнозу. КМ пищевода выше 1 см от ПЖС – предраковое состояние даже без явных признаков дисплазии, КМ в пределах 1 см от ПЖС близка к КМ кардиального отдела желудка по своему значению в канцерогенезе.

Литература/References

1. Зайратьянц О.В., Кононов А.В. Патологическая анатомия пищевода Барретта. Клинические рекомендации Российского общества патологоанатомов, 2016. <http://www.patolog.ru> [Zayratyants O.V., Kononov A.V. Barrett's esophagus pathology. Clinical guidelines of the russian society of pathology, 2016. <http://www.patolog.ru> (In Russ.)].
2. Зайратьянц О.В., Маев И.В., Смольяникова В.А., Мовтаева П.Р. Патологическая анатомия пищевода Барретта // Архив патологии. 2011. Т. 73 (3). С. 21–26. [Zayratyants O.V., Mayev I.V., Smolyannikova V.A., Movtayeveva P.R. Pathological anatomy of Barrett's esophagus // Arkhiv patologii. 2011. V. 73 (3). P. 21–26 (In Russ.)].
3. Chandrasoma P.T., DeMeester T.R. GERD: Reflux to Esophageal Adenocarcinoma. Burlington, USA: Academic Press, 2006. ISBN13:978-0-12-369416-4:447.
4. Chandrasoma P., Wijetunge S., DeMeester S. et al. Columnar-lined esophagus without intestinal metaplasia has no proven risk of adenocarcinoma // Am J Surg Pathol. 2012;36:1–7.
5. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Трухманов А.С., Баранская Е.К., Дронова О.Б., Зайратьянц О.В., Сайфутдинов Р.Г., Шептулин А.А., Лапина Т.Л., Пирогов С.С., Кучерявый Ю.А., Стороннова О.А., Андреев Д.Н. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению гастроэзофагеальной рефлюксной болезни // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2017. Т. 27 (4). С. 75–95. DOI: 10.22416/1382-4376-2017-27-4-75-95. [Ivashkin V.T., Mayev I.V., Trukhmanov A.S., Baranskaya Ye.K., Dronova O.B., Zayratyants O.V., Sayfutdinov R.G., Sheptulin A.A., Lapina T.L., Pirogov S.S., Kucheryavy Yu.A., Storonova O.A., Andreyev D.N. Diagnostics and treatment of gastroesophageal reflux disease: clinical guidelines of the Russian gastroenterological Association // Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii. 2017.

- V. 27 (4). P. 75–95. DOI: 10.22416/1382-4376-2017-27-4-75-95(In Russ.)].
6. *Ивашкин В.Т., Маев И.В., Трухманов А.С.* Пищевод Барретта. В 2 томах. М.: Шико, 2011. 624 с. [*Ivashkin V.T., Mayev I.V., Trukhmanov A.S.* Barrett's esophagus. Two volume set. M.: Shiko, 2011. 624 p. (In Russ.)].
 7. *Старков Ю.Г., Соколов В.В., Абакумов М.М., Ручкин Д.В., Годжелло Э.А., Белова Г.В., Трухманов А.С., Солоднина Е.Н., Шишин К.В., Калинин Д.В., Бордин Д.С., Заратьянц О.В., Шумкина Л.В.* Проект национальных клинических рекомендаций «Диагностика и лечение пищевода Барретта» (Мультидисциплинарная согласительная конференция «Современные методы диагностики и лечения больных с пищеводом Барретта» и XVIII съезд Общества эндоскопических хирургов России. 18 февраля 2015 года, Москва) (<http://общество-хирургов.рф/upload/barret.doc>). *Starkov Yu.G., Sokolov V.V., Abakumov M.M., Ruchkin D.V., Gozhello E.A., Belova G.V., Trukhmanov A.S., Solodinina E.N., Shishin K.V., Kalinin D.V., Bordin D.S., Zaratyants O.V., Shumkina L.V.* Project of National clinical guidelines «Barrett's Esophagus diagnostics and treatment» (Multidiscipline consensus conference «Barrett's esophagus patients modern methods of diagnostics and treatment» and XVIII Congress of Russian endoscopic surgeons society. 18.02.15, Moscow, 2015 (<http://общество-хирургов.рф/upload/barret.doc>) (In Russ.)].
 8. *Ronkainen J., Aro P., Storskrubb T. et al.* Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study // *Gastroenterology*. 2005;129:1825–31.
 9. *Kroep S., Lansdorp-Vogelaar I., Rubenstein J.H. et al.* An accurate cancer incidence in Barrett's esophagus: a best estimate using published data and modeling // *Gastroenterology*. 2015; 149:577–85.
 10. *Stein H.J., Siewert J.R.* Barrett's esophagus: pathogenesis, epidemiology, functional abnormalities, malignant degeneration, and surgical management // *Dysphagia*. 1993;8:276–88.
 11. *Gastrointestinal Pathology. Atlas and Text. 3d ed. / C.M. Fenoglio-Preiser, A.E. Noffsinger, G.N. Stemmermann, P.E. Lantz, P.G. Isaacson.* Lippincott: Williams & Wilkins Publishers, 2008. 1312 p.
 12. *Hayward J.* The lower end of the oesophagus // *Thorax*. 1961;16:36–41.
 13. *Paull A., Trier J.S., Dalton M.D. et al.* The histologic spectrum of Barrett's esophagus // *N Engl J Med*. 1976;295:476–80.
 14. *Cameron A.J., Lomboy C.T., Pera M. et al.* Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus // *Gastroenterology*. 1995;109:1541–6.
 15. *Ruol A., Parenti A., Zaninotto G. et al.* Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in Barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia // *Cancer*. 2000;88:2520–8.
 16. *Smith J., Garcia A., Zhang R. et al.* Intestinal metaplasia is present in most if not all patients who have undergone endoscopic mucosal resection for esophageal adenocarcinoma // *Am J Surg Pathol*. 2016;40:537–43.
 17. *Spechler S.J., Sharma P., Souza R.F., Inadomi J.M., Shaheen N.J.* American Gastroenterological Association medical position statement on the management of Barrett's esophagus // *Gastroenterology*. 2011Mar;140(3):1084–91.
 18. *Shaheen N.J., Falk G.W., Iyer P.G. et al.* ACG clinical guideline: diagnosis and management of Barrett's esophagus // *Am J Gastroenterol*. 2016;111:30–50.
 19. *Fitzgerald R.C., di Pietro M., Ragunath K.* British Society of Gastroenterology guidelines on the diagnosis and management of Barrett's oesophagus // *Gut*. 2014; 63 (1):7–42.
 20. *Takubo K., Aida J., Naomoto Y. et al.* Cardiac rather than intestinal-type background in endoscopic resection specimens of minute Barrett adenocarcinoma // *Hum Pathol*. 2009;40:65–74.
 21. *Kelty C.J., Gough M.D., Van Wyk Q. et al.* Barrett's oesophagus: intestinal metaplasia is not essential for cancer risk // *Scand J Gastroenterol*. 2007;42:1271–4.
 22. *Bennett C., Moayyedi P., Corley D.A. et al.* BOB CAT: a large-scale review and delphi consensus for management of Barrett's esophagus with no dysplasia, indefinite for, or low-grade dysplasia // *Am J Gastroenterol*. 2015;110:662–82.

STRUCTURAL VARIANTS OF DISTAL ESOPHAGEAL MUCOSA AND GASTRIC CARDIAC MUCOSA: WHAT IS CONSIDERED PATHOLOGY?

I.V. Mayev, O.V. Zayratyants, P.R. Movtaeva, G.O. Zayratyants, A.M. Tokmakov

The purpose of research was the study of the structural variants of distal esophageal mucosa and gastric cardiac mucosa using autopsy samples. We studied 1127 early autopsies collected within 6–8 hours after death in order to minimize autolysis from persons who died from cardiovascular diseases in hospitals (mean age 61,3±7,2 years). Patients with a history of gastroesophageal reflux (GER) and other diseases of the digestive system were excluded from the study. The mucosa of the 4 walls of esophagus and stomach was examined within 10 cm above and below the esophageal-gastric junction (EGJ) using stepped histological sections. Colocalization of Z-line and EGJ (plus minus 1 cm due to irregular Z-line) was revealed in 315 cases (28%), Z-line was higher than EGJ, at height varying from some millimeters up to 6 cm in 806 cases (71, 5%) and Z-line was below EGJ by 2 cm in gastric cardia in 6 cases (0, 5%), all histologically diagnosed as chronic atrophic pan-gastritis. The mucosa of cardiac type (MCT) was absent in 14 cases (1,2%), in 6 of these it at Z-line in gastric cardia and in 8 cases, at the level of EGJ plus minus 1 cm. MCT was revealed in 1113 cases (98,8%), from these its upper level was at height varying from some millimeters up to 6 cm above EGJ in 806 cases (71,5%), at the level of EGJ plus minus 1 cm in 307 cases (27,3%), and the lower bound of all cases in 1113 was below EGJ plus minus 1 cm in the gastric cardia for up to 1.5 cm. The fre-

quency of MCT detection and its length significantly ($p < 0.05$) increased with age, prevailing after 60 years in men, but not in women, in whom the frequency of SOCT, exceeding 1 cm in the area of PH, was 3.1 times lower. prevailing after 60 years in men, but not in women, in whom the frequency of MCT, exceeding 1 cm in the area of EGJ, was 3,1 times lower. Foci of intestinal metaplasia were found within esophageal MCT in 48 observations (4.3%) and in 11 (1%), in the region of EGJ and gastric cardia against the background of MCT or atrophic altered fundus mucosa (MFT). It was concluded that MCT in EGJ (plus minus 1 cm due to irregular Z-line) should be regarded as normal, wherein the most part of gastric cardia is lined with MFT. Lack of MCT and the shift of the Z-line in gastric cardia apparently are the abnormalities due to the effect of hypo-acid state (in atrophic gastritis). Localization of MCT proximal to 1 cm from PHL is a common pathological process, the frequency of which increases with age developing in response to GER. The intestinal metaplasia of esophagus, EGJ and gastric cardia are certainly pathological processes, but different in their essence and prognosis.

Key words: distal esophageal mucosa, gastric cardiac mucosa, structural variants, autopsy

Информация об авторах

Маев Игорь Вениаминович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии, первый проректор МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

Адрес: 127473, Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон +7 (495) 681 2229. E-mail: igormaev@rambler.ru

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 9217. E-mail: ovzair@mail.ru

Мовтаева Петимат Руслановна – врач республиканской клинической больницы скорой медицинской помощи им. У.И. Ханбиева.

Адрес: 364020, Грозный, ул. Тасуева, д. 8 Телефон +7 (917) 559 6886. E-mail: fatima.movtaeva@mail.ru

Зайратьянц Георгий Олегович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, заведующий патологоанатомическим отделением городской клинической больницы им. С.С. Юдина.

Адрес: 115446, Москва, Коломенский проезд, д. 4. Телефон +7 (903) 184 28 43. E-mail: goshaz@mail.ru

Токмаков Андрей Михайлович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения городской клинической больницы им. братьев Бахрушиных.

Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 7. Телефон +7 (985) 997 2696. E-mail: tokmak-ov@mail.ru

Контакты: Зайратьянц Олег Вадимович.

Телефон 8 (903) 184 9217. E-mail: ovzair@mail.ru

Материал поступил в редакцию 23 июля 2018 года

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА И СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ КОЛИТЕ У МЫШЕЙ С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ

*Д.Ш. Джалилова^{1,2}, Н.А. Золотова¹, М.А. Полякова²,
М.Е. Диатров¹, М.Т. Добрынина², О.В. Макарова^{1,2}*

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

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

Гипоксия способствует развитию воспалительных процессов, так как активирующийся при гипоксическом воздействии сигнальный путь HIF-1 взаимосвязан с воспалительным – NF-κB. Существуют индивидуальные генетически обусловленные различия как устойчивости организма к кислородной недостаточности, так и предрасположенности к развитию воспаления. Однако в литературе отсутствуют данные об особенностях воспалительного процесса у мышей с разной устойчивостью к гипоксии. Цель исследования – охарактеризовать особенности воспалительного процесса и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при хроническом колите, индуцированном декстрансульфатом натрия, у мышей C57Bl/6 с разной устойчивостью к гипоксии.

Устойчивость мышей к гипоксии определяли в барокамере по времени жизни на «высоте» 10 000 м. Хронический колит моделировали с помощью 1% декстрансульфата натрия (ДСН).

Показано, что по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии мышами низкоустойчивые характеризуются более высоким уровнем смертности, более выраженными клиническими проявлениями колита, большим процентом воспалительного инфильтрата в проксимальном отделе ободочной кишки. У низкоустойчивых к гипоксии мышей наблюдается снижение числа всех субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови, что свидетельствует о развитии вторичного иммунодефицита, а также меньшее количество иммуносупрессорных Т-регуляторных клеток.

Выявлены различия тяжести течения хронического колита у животных, отличающихся по устойчивости к гипоксии: у низкоустойчивых к гипоксии мышей течение хронического колита тяжелее и более выражены изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови.

Ключевые слова: гипоксия, мыши, устойчивость к гипоксии, хронический колит, воспаление, субпопуляции лимфоцитов

В работах последних лет установлено, что недостаток кислорода способствует развитию воспаления, так как сигнальные пути, активирующиеся при гипоксическом воздействии, взаимосвязаны с воспалительными [7, 9, 18, 23]. Гипоксия активирует транскрипционный фактор HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), который тесно связан с ядерным фактором, регулирующим процессы воспаления, – NF-κB (nuclear factor κB). Активация этих факторов транскрипции наблюдается при разных воспалительных заболеваниях, в том числе при язвенном колите [7, 9, 16]. У мутантных мышей на модели острого колита, индуцированного 2,4,6-тринитробензолсульфоновой кислотой (ТНБС) и оксазолоном, по-

казано, что HIF, несмотря на свою провоспалительную функцию, оказывает также и противовоспалительное действие. Дефицит HIF-1α в эпителиальных клетках кишечника у животных с колитом приводил к высокой смертности, а у выживших мышей – к более тяжелым клиническим проявлениям [13]. HIF-1α контролирует множество протективных барьерных генов, регулирующих продукцию таких молекул как β-дефензины и муцины, он способствует дифференцировке противовоспалительных Т-регуляторных лимфоцитов и уменьшает апоптоз эпителиальных клеток [10, 14, 20]. У мышей на моделях острого колита, индуцированного декстрансульфатом натрия (ДСН), установлено, что ингибиторы

пролилгидроксилазы PHD2 (prolyl hydroxylase domain-containing protein 2), которая способствует разрушению HIF-1 α , уменьшают выраженность воспаления [8, 20].

На модели ДСН-индуцированного язвенного колита показано, что клинические проявления и морфологические изменения в ободочной кишке имеют индивидуальную вариабельность и отличаются у мышей разных линий [1, 3, 15, 19, 22]. Одним из возможных механизмов, лежащих в основе индивидуальных различий течения острого и хронического колита, может быть устойчивость к недостатку кислорода. По данным литературы, высокоустойчивые и низкоустойчивые к гипоксии животные отличаются по эффективности антиоксидантной защиты, уровню метаболических процессов, содержанию HIF-1 α и других параметров [4, 6, 12]. Показано, что животные с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии имеют различные адаптационные возможности и предрасположенность к развитию воспалительных заболеваний: у низкоустойчивых после гипоксической нагрузки повышается содержание маркера окислительного стресса 8-изопростана, что сопряжено с повреждением клеточных макромолекул и увеличением уровня TGF- β [4]. Тем не менее данные об особенностях воспалительного процесса при хроническом язвенном колите у мышей с разной устойчивостью к гипоксии в литературе отсутствуют. Выявление взаимосвязи между механизмами воспаления и гипоксии при хроническом колите у высокоустойчивых и низкоустойчивых животных послужит основой для разработки новых индивидуальных подходов к профилактике и лечению этого заболевания у человека.

Цель исследования – охарактеризовать особенности воспалительного процесса и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при индуцированном декстрансульфатом натрия хроническом колите у мышей C57Bl/6 с разной устойчивостью к гипоксии.

Материалы и методы

Работа выполнена на половозрелых самцах мышей C57Bl/6 (n=64) массой тела 18–20 граммов (филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России). Животных содержали по восемь особей в клетке при естественном освещении, температуре +20 \pm 2 $^{\circ}$ C и относительной влажности воздуха 60–70%. Доступ к воде и пище был свободным. Эксперименты проводили в осенне-зимний период. При работе с экспериментальными животными руководствовались Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики», утвержденным и введенным в действие приказом Ростехрегулирования от 02.12.2009 (№ 544-ст, ГОСТ Р 53434-2009) и ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами». На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека.

С целью определения устойчивости к гипобарической гипоксии мышей помещали в барокамеру на критическую «высоту» 10 000 м [2], подъем осуществляли со скоростью 80 м/с. В помещении, где проводился эксперимент, поддерживалась температура 20–22 $^{\circ}$ C. Устойчивость к гипоксии определяли по времени жизни на «высоте», соответствующему временному интервалу от момента подъема до принятия бокового положения. К высокоустойчивым к гипоксии животным относили мышей, время жизни которых составляло более 10 минут (n=23), а к низкоустойчивым – менее 3 минут (n=17). Среднеустойчивых к гипоксии животных (время жизни от 3 до 10 минут) в экспериментах не использовали.

Моделирование хронического язвенного колита (по [17]) проводили через месяц после определения устойчивости к гипоксии с использованием 1% водного раствора ДСН (Dextran sulfate sodium salt, Mr ~40,000, AppliChem, Германия). Экспериментальная группа мышей вместо питьевой воды получала раствор ДСН на 1–4-е, 12–14-е и 22–26-е сутки. Мыши контрольной группы получали питьевую воду в течение всего исследования. Ежедневно оценивали общее состояние мышей опытных и контрольных групп, а также клинические проявления колита по наличию диареи и крови в фекалиях. Выраженность клинических проявлений колита определяли полуколичественно в баллах (диарея – 1 балл, кровь – 2 балла). Животных выводили из эксперимента на 60-е сутки путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом.

Для морфологического исследования ободочную кишку фиксировали в жидкости Буэна в течение 24 часов, изготавливали гистологические срезы толщиной 4–6 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином. На гистологических препаратах трех отделов кишки – проксимальном, медиальном и дистальном, окрашенных гематоксилином и эозином, при $\times 50$ проводили оценку выраженности язвенно-воспалительного процесса в слизистой оболочке. В программном пакете для обработки биомедицинских изображений ImageJ (НИН) 1.51h в варианте Fiji измеряли длину язв с явлениями эпителизации и без них, а также распространенность воспалительного инфильтрата.

Забор периферической крови из шейных вен проводили в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Для анализа субпопуляций лимфоцитов использовали антитела, конъюгированные с FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), PE-Cy5 и PE-Cy7, к CD3 $^{+}$ (Т-лимфоциты), CD3 $^{+}$ CD19 $^{+}$ (В-лимфоциты), CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ (Т-хелперы), CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ (регуляторные Т-лимфоциты) фирмы eBioscience (США). Для выявления субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов использовали набор Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #3 (eBioscience). Лизис эритроцитов в образцах цельной крови осуществляли с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution (Beckman Coulter, США). Абсолютное

количество лейкоцитов в крови подсчитывали с помощью гематологического анализатора Celltac alpha MEK-6400 (Nihon Kohden, Япония). Процентное содержание Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) и В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) в периферической крови вычисляли по отношению к абсолютному количеству лимфоцитов; процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) – по отношению к абсолютному количеству Т-хелперов.

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Statistica 8.0. Данные выражали в виде медианы и интерквартильного размаха (Ме (25%–75%)). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни и критерия множественного сравнения Крускала–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В процессе развития хронического колита выживаемость высокоустойчивых животных составила 83,3%, в то время как низкоустойчивых только 45,5% (рис. 1).

При клиническом наблюдении за животными и у высокоустойчивых, и у низкоустойчивых мышей отмечалось наличие диареи и крови в кале. По результатам полуколичественной оценки на 14-е сутки эксперимента проявления хронического колита у низкоустойчивых к гипоксии мышей были более выраженными ($p=0,0015$) по сравнению с высокоустойчивыми. Максимальные проявления заболевания как у высокоустойчивых, так и у низкоустойчивых мышей наблюдались на 27-е сутки исследования, однако лишь у низкоустойчивых показатели статистически значимо различались (рис. 2).

В процессе развития хронического колита только у низкоустойчивых к гипоксии мышей наблюдалось статистически значимое ($p=0,002$) снижение массы тела на 14-е сутки эксперимента (рис. 3). У высокоустойчивых животных масса в течение всего исследования не изменялась.

По данным литературы, более выраженные клинические проявления (высокий уровень смертности, снижение массы тела, наличие диареи и крови) свидетельствуют о более тяжелом течении заболевания [13].

При морфологическом исследовании ободочной кишки у низкоустойчивых и высокоустойчивых к гипоксии мышей наблюдалась картина хронического колита. Выявлялись язвы с эпителизацией (рис. 4), щелевидной или пирамидальной формы. Поверхность язв

была выстлана кубическим эпителием, дно представлено грануляционной тканью, в которой определялись фибробласты, фиброциты, лимфоциты и плазмоциты. В краях язв выявлялись деформированные крипты, бокаловидных клеток мало. Подслизистая основа инфильтрирована, преимущественно плазмоцитами и лимфоцитами, просветы лимфатических сосудов расширены. Наряду с зонами, где воспалительные изменения были выраженными, определялись участки без них.

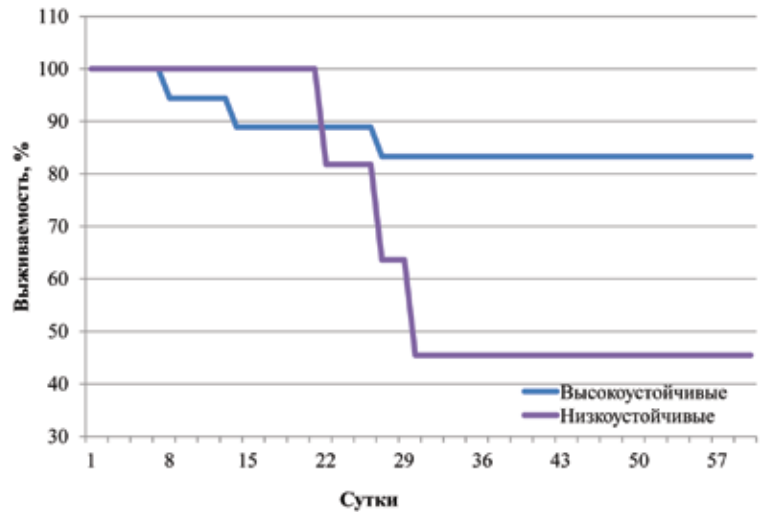


Рис. 1. Выживаемость высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии мышей в процессе развития хронического колита



Рис. 2. Полуколичественная оценка клинических проявлений хронического колита у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии мышей

* – различия ($p < 0,05$) по сравнению с началом эксперимента (критерий Крускала–Уоллиса)

^ – по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии мышами (критерий Манна–Уитни)

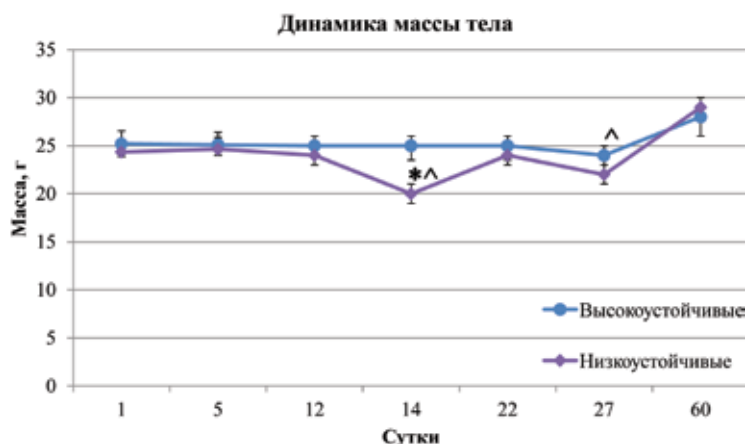


Рис. 3. Динамика массы тела в процессе развития хронического колита у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии мышей, Ме (25%; 75%)

* – различия ($p < 0,05$) по сравнению с началом эксперимента (критерий Крускала–Уоллиса)
 ^ – по сравнению с высокоустойчивыми к гипоксии мышами (критерий Манна–Уитни)

Как у низкоустойчивых, так и у высокоустойчивых мышей при морфологическом исследовании дистального и медиального отделов ободочной кишки выявлялись многочисленные язвы с эпителизацией и немногочисленные острые язвы без эпителизации (рис. 4). В проксимальном отделе и у высокоустойчивых, и у низкоустойчивых мышей распространенность язв с эпителизацией и воспалительного инфильтрата была статистически значимо ниже, чем в дистальном. Полученные данные согласуются с данными литературы: для ДСН-колита у мышей C57BL/6 и начальной стадии язвенного колита у человека [5, 15] характерна локализация язвенно-воспалительного процесса преимущественно в дистальном отделе толстой кишки.

По относительной распространенности язв с эпителизацией и без таковой в слизистой оболочке трех отделов ободочной кишки у высоко-

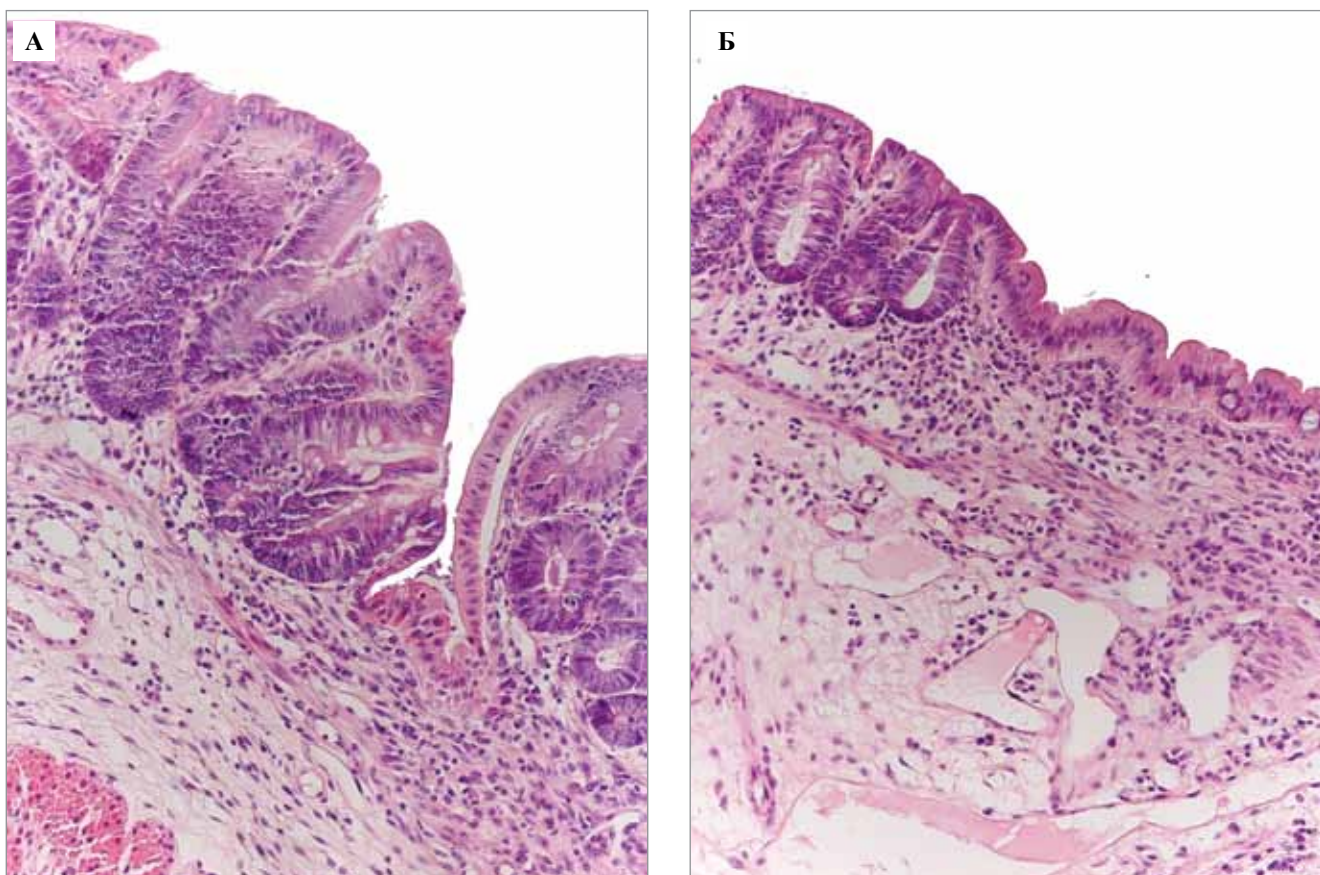


Рис. 4. Морфологические изменения ободочной кишки при хроническом колите у высокоустойчивых (А) и низкоустойчивых (Б) к гипоксии мышей.

А – щелевидная эпителизированная язва, ее поверхность выстлана эпителием, по краям язвы расположены деформированные крипты с регенераторными изменениями, воспалительная инфильтрация слабо выражена,

Б – эпителизированная язва и умеренная воспалительная инфильтрация.

Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

коустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии мышей статистически значимые различия не обнаружены (табл. 1).

Возможно, отсутствие различий по распространенности язв между высокоустойчивыми и низкоустойчивыми животными связано с гибелью более 50% низкоустойчивых к гипоксии мышей от тяжелых проявлений острого фульминантного колита.

Относительная распространенность воспалительного инфильтрата в проксимальном отделе толстой кишки у низкоустойчивых к гипоксии мышей была статистически значимо выше по сравнению с высокоустойчивыми (табл. 2), что свидетельствует о более тяжелом течении воспалительного процесса.

При анализе субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при хроническом коли-

те показано, что низкоустойчивые к гипоксии мыши характеризовались снижением абсолютного и относительного количества лимфоцитов, Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток и увеличением относительного числа В-лимфоцитов. У высокоустойчивых к гипоксии мышей в периферической крови наблюдалось уменьшение только относительного количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов и абсолютного количества Т-регуляторных клеток. Уменьшение количества всех субпопуляций Т-лимфоцитов у низкоустойчивых мышей свидетельствует о формировании вторичного иммунодефицита. По сравнению с низкоустойчивыми у высокоустойчивых мышей при хроническом колите выявлено большее абсолютное и относительное число Т-регуляторных клеток в периферической крови (табл. 3).

Таблица 1

Относительная распространенность язв в разных отделах ободочной кишки у высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии животных при хроническом колите, Ме (25%; 75%), критерий Манна–Уитни

Отдел кишки	Характер язв	Относительная длина язв, %		
		высокоустойчивые мыши (1)	низкоустойчивые мыши (2)	p (1–2)
Дистальный	с эпителизацией	15,5 (9,9–19,2)	18,1 (16,1–19,9)	0,46
	без эпителизации	0,0 (0,0–0,7)	0,0 (0,0–0,0)	0,52
	все	18,5 (9,9–19,2)	18,9 (16,1–19,9)	0,60
Медиальный	с эпителизацией	7,2 (5,9–8,2)	9,2 (4,5–9,4)	0,60
	без эпителизации	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,4)	0,52
	все	7,2 (5,9–8,7)	9,2 (4,8–9,4)	0,60
Проксимальный	с эпителизацией	0,3 (0,3–2,1)	4,9 (4,4–5,6)	0,12
	без эпителизации	0,0 (0,0–0,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,32
	все	0,3 (0,3–2,1)	4,9 (4,4–5,8)	0,12
Суммарно	с эпителизацией	6,1 (4,5–6,7)	9,6 (8,1–9,7)	0,17
	без эпителизации	0,1 (0,0–0,2)	0,1 (0,0–0,2)	0,91
	все	6,7 (4,6–6,9)	9,7 (8,1–9,9)	0,25

Таблица 2

Относительная распространенность воспалительного инфильтрата в разных отделах толстой кишки у мышей с разной устойчивостью к гипоксии при хроническом колите, Ме (25%; 75%), критерий Манна–Уитни

Отдел кишки	Относительная длина зон с инфильтратом, %		
	высокоустойчивые мыши (1)	низкоустойчивые мыши (2)	p (1–2)
Дистальный	69,8 (63,0–83,3)	70,3 (61,1–73,9)	0,46
Медиальный	47,0 (43,8–64,1)	62,0 (58,7–64,4)	0,60
Проксимальный	5,4 (3,3–6,7)	14,7 (12,2–23,0)	0,04*
Суммарно	33,7 (28,1–36,3)	38,2 (37,2–45,8)	0,12

* – статистически значимые различия, p<0,05

Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у мышей с разной устойчивостью к гипоксии в контроле и при хроническом колите, Ме (25%; 75%), критерий Манна-Уитни

		Контроль		Хронический колит		p			
		высокоустойчивые мыши (1)	низкоустойчивые мыши (2)	высокоустойчивые мыши (3)	низкоустойчивые мыши (4)	1-2	1-3	2-4	3-4
Лимфоциты	млн/мл	7,5 (6,0–9,3)	8,8 (8,1–10,2)	7,0 (5,6–9,45)	5,6 (5,6–7,0)	0,4	0,8	0,04*	0,4
Т-лимфоциты	% от лимфоцитов	27 (25,4–29,3)	27,7 (27,5–31,7)	24,3 (22,7–25,5)	22,6 (20,0–23,7)	0,33	0,03*	0,04*	0,4
	млн/мл	1,9 (1,6–2,6)	2,6 (2,4–2,8)	1,7 (1,2–2,3)	1,3 (1,1–1,6)	0,33	0,5	0,04*	0,36
Т-хелперы	% от лимфоцитов	16,8 (16,0–21,6)	14,9 (14,3–18,1)	12,3 (11,6–13,9)	10,5 (9,4–12,8)	0,33	0,01*	0,04*	0,16
	млн/мл	1,5 (1,1–1,7)	1,5 (1,3–1,5)	0,9 (0,7–1,2)	0,6 (0,5–0,9)	1,0	0,05	0,03*	0,15
Цитотоксические Т-лимфоциты	% от лимфоцитов	12,0 (10,4–12,5)	12,7 (12,0–12,8)	11,4 (10,0–12,7)	9,8 (9,1–10,9)	0,18	0,8	0,03*	0,15
	млн/мл	0,8 (0,7–1,04)	1,0 (1,0–1,3)	0,8 (0,7–1,0)	0,7 (0,5–0,7)	0,22	0,8	0,04*	0,24
В-лимфоциты	% от лимфоцитов	66,5 (64,8–69,0)	64,7 (61,6–66,2)	69,5 (66,6–70,5)	72 (69,8–76,1)	0,22	0,4	0,04*	0,09
	млн/мл	5,2 (3,9–6,3)	5,8 (5,0–6,6)	4,8 (3,7–5,6)	4,3 (4,1–4,9)	0,62	0,6	0,17	0,8
Регуляторные Т-лимфоциты	% от Т-хелперов	5,3 (3,7–7,9)	4,6 (3,6–5,7)	3,1 (2,2–4,5)	1,8 (1,1–1,8)	0,8	0,09	0,008*	0,01*
	млн/мл	0,09 (0,06–0,09)	0,05 (0,05–0,07)	0,03 (0,02–0,04)	0,009 (0,008–0,01)	0,62	0,03*	0,009*	0,005*

* – статистически значимые различия, $p < 0,05$

По данным литературы, регуляторные Т-клетки оказывают противовоспалительное действие при экспериментальном колите, их повышение считается благоприятным прогностическим маркером. При этом уменьшение Т-регуляторных клеток в крови наблюдается при активных формах воспалительных заболеваний кишечника у человека [11, 21]. Меньшее количество Т-регуляторных клеток в периферической крови у низкоустойчивых мышей по сравнению с высокоустойчивыми свидетельствует о более тяжелом течении заболевания у этих животных.

Заключение

Показано, что низкоустойчивые к гипоксии мыши характеризуются более тяжелым течением хронического колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, – повышенной смертностью, снижением массы тела, более выраженным снижением числа лимфо-

цитов периферической крови, меньшим количеством Т-регуляторных клеток. Выявленная взаимосвязь между течением воспаления и устойчивостью к гипоксии послужит основой для разработки новых подходов к профилактике и лечению воспалительных заболеваний с учетом индивидуальных особенностей.

Литература/References

1. Абдулаева С.О., Хомякова Т.И., Симонова Е.Ю., Цветков И.С., Добрынина М.Т., Макарова О.В., Яцковский А.Н. Сравнительная морфологическая, бактериологическая и иммунологическая характеристика индуцированного декстрансульфатом натрия острого язвенного колита у мышей Balb/c и C57BL/6 // Клиническая и экспериментальная морфология. 2013. № 4. С. 27–33 [Abdulayeva S.O., Khomyakova T.I., Simonova E.Yu., Tsvetkov I.S., Dobrynina M.T., Makarova O.V., Yatskovskiy A.N. Comparative morphological, bacteriological and immunological characteristics of severe ulcerative colitis

- induced by sodium dextran sulfate in Balb/C and C57Bl/6 mice // *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya*. 2013. V. 4. P. 27–33 (In Russ.).
2. Ведунова М.В., Сахарнова Т.А., Митрошина Е.В., Шishкина Т.В., Астраханова Т.А., Мухина И.В. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo* // *Современные технологии в медицине*. 2014. Т. 6, № 4. С. 38–47 [Vedunova M.V., Sakharanova T.A., Mitroshina E.V., Shishkina T.V., Astrakhanova T.A., Mukhina I.V. Antihypoxic and neuroprotective properties of BDNF and GDNF *in vitro* and *in vivo* under hypoxic conditions // *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2014. V. 6. No 4. P. 38–47 (In Russ.)].
 3. Гао Ю., Цыганова С.О., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Морфологическая характеристика экспериментального острого язвенного колита на фоне курсового интервального холодового воздействия // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2015. № 2. С. 4–9 [Gao Y., Tsyganova S.O., Dobrynina M.T., Zolotova N.A., Makarova O.V. Morphological characteristics of experimental acute ulcerative colitis associated with the course of interval cold exposure // *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya*. 2015. V. 2. P. 4–9 (In Russ.)].
 4. Джалилова Д.Ш., Диатроптов М.Е., Цветков И.С., Макарова О.В., Кузнецов С.Л. Экспрессия генов *hif-1a*, *nf-kb* и *vegf* в печени и содержание HIF-1a, эритропоэтина, VEGF, TGF- β , 8-изопростана и кортикостерона в сыворотке крови высокоустойчивых и низкоустойчивых к гипоксии крыс Вистар // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2018. Т. 165, № 6. С. 742–747 [Dzhalilova D.Sh., Diatroptov M.E., Tsvetkov I.S., Makarova O.V., Kuznetsov S.L. Expression of Hif-1a, Nf-kb and Vegf genes in the liver and the content of HIF-1a, erythropoietin, VEGF, TGF- β , 8-isoprostane and corticosterone in the blood serum in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats // *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2018. V. 165. No 6. P. 742–747 (In Russ.)].
 5. Золотова Н.А., Хочанский Д.Н., Поликарпова А.В., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Цитофизиологическая характеристика эпителиальных секреторных клеток разных отделов ободочной кишки при экспериментальном язвенном колите // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2016. № 2. С. 29–37 [Zolotova N.A., Khochansky D.N., Polikarpova A.V., Dobrynina M.T., Makarova O.V. Cytological and physiological characteristics of epithelial secretory cells from different parts of the colon in experimental ulcerative colitis // *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya*. 2016. V. 2. P. 29–37 (In Russ.)].
 6. Кирова Ю.И., Германова Э.Л., Лукьянова Л.Д. Фенотипические особенности динамики содержания HIF-1a в неокортексе крыс при различных режимах гипоксии // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012. Т. 154. № 12. С. 681–686 [Kirova Y.I., Germanova E.L., Lukyanova L.D. Phenotypic features of the dynamics of HIF-1a levels in rat neocortex in different hypoxia regimens // *Bulletin of Experimental biology and medicine*. 2012. V. 154. No 12. P. 681–686 (In Russ.)].
 7. Biddlestone J., Bandarra D., Rocha S. The role of hypoxia in inflammatory disease // *Int J Mol Med*. 2015;35:859–69.
 8. Cummins E.P., Seeballuck F., Keely S.J., Mangan N.E. et al. The hydroxylase inhibitor dimethylallylglycine is protective in a murine model of colitis // *Gastroenterology*. 2008;134:156–65.
 9. Eltzschig H.K., Carmeliet P. Hypoxia and inflammation // *N Engl J Med*. 2011;364(7):656–65.
 10. Fluck K., Breves G., Fandrey J., Winning S. Hypoxia-inducible factor 1 in dendritic cells is crucial for the activation of protective regulatory T cells in murine colitis // *Mucosal Immunol*. 2016;9:379–90.
 11. Fonseca-Camarillo G., Yamamoto-Furusho K. Immunoregulatory pathways involved in inflammatory bowel disease // *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(9):2188–93.
 12. Jain K., Suryakumar G., Prasad R., Ganju L. Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hypoxia-responsive proteins imparts tolerance to acute hypobaric hypoxia // *High alt med biol*. 2013;14(1):65–77.
 13. Karhausen J., Furuta G.T., Tomaszewski J.E., Johnson R.S. et al. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis // *J Clin Invest*. 2004;114(8):1098–106.
 14. Louis N.A., Hamilton K.E., Canny G., Shekels L.L. et al. Selective induction of mucin-3 by hypoxia in intestinal epithelia // *J Cell Biochem*. 2006;99:1616–27.
 15. Mahler M., Bristol I.J., Leiter E.H., Workman A.E. et al. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis // *American Journal of Physiology*. 1998;274(3):G544–51.
 16. Manresa M.C., Taylor C.T. Hypoxia inducible factor (HIF) hydroxylases as regulators of intestinal epithelial barrier function // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;3:303–15.
 17. Melgar S., Karlsson A., Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL / 6 but not in BALB / c mice: correlation between symptoms and inflammation // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(6):G1328–38.
 18. Palazon A., Goldrath A.W., Nizet V., Johnson R.S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity // *Immunity*. 2014;41(16):518–28.
 19. Perse M., Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks // *J Biomed Biotechnol*. 2012;1–13. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/718617>
 20. Robinson A., Keely S., Karhausen J., Gerich M.E., Furuta G.T., Colgan S.P. Mucosal protection by hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase inhibition // *Gastroenterology*. 2008;134(1):145–55.
 21. Saruta M., Yu Q.T., Fleshner P.R., Mantel P.Y. et al. Characterization of FOXP3+CD4+regulatory T cells in Crohn's disease // *Clin Immunol*. 2007;125:281–90.
 22. Stevceva L., Pavli P., Buffinton G., Wozniak A., Doe W.F. Dextran sodium sulphate-induced colitis activity varies with mouse strain but develops in lipopolysaccharide-unresponsive mice // *J Gastroent Hepat*. 1999;14(1):54–60.
 23. Taylor C.T., Doherty G., Fallon P.G., Cummins E.P. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells // *J Clin Invest*. 2016;126(10):3716–24.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF THE INFLAMMATORY PROCESS AND SUBPOPULATION PATTERN OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES DURING CHRONIC COLITIS IN MICE EXHIBITING DIFFERENT RESPONSES TO HYPOXIA

D.Sh. Dzhaliyeva, N.A. Zolotova, M.A. Polyakova, M.E. Diatropov, M.T. Dobrynina, O.V. Makarova

Hypoxia contributes to the development of inflammatory processes, since the signaling pathway HIF-1, activated by hypoxic exposure, is interconnected with the inflammatory pathway NF- κ B. There are individual genetically determined differences in both the body's resistance to oxygen deficiency and its susceptibility to the development of inflammation. However, there are no data in the literature on the features of the inflammatory process in mice with different resistance to hypoxia.

The purpose of the study was to characterize the features of the inflammatory process and the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in chronic dextran sulfate-induced colitis in C57Bl / 6 mice with different resistance to hypoxia.

The resistance of mice to hypoxia was determined in a pressure chamber by the gasping time at the "height" of 10,000 m. Chronic colitis was modeled using 1% sodium dextran sulfate.

It was shown that low resistant ones were characterized by greater death rate, more pronounced clinical manifestations of colitis, and higher prevalence of inflammatory infiltrate in the proximal colon compared with mice that are highly resistant to hypoxia. In mice with low hypoxia resistance, a decrease in the number of all subpopulations of T-lymphocytes in peripheral blood was observed, which indicates the development of secondary immunodeficiency, as well as a smaller number of immunosuppressive T-regulatory cells.

It was concluded that the differences in the course of chronic colitis were revealed in animals differing in resistance to hypoxia: in mice with low resistance to hypoxia, chronic colitis is more severe and changes in the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes are more pronounced.

Key words: hypoxia, mice, resistance to hypoxia, chronic colitis, inflammation, lymphocyte subpopulations

Информация об авторах

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

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: juliajal93@mail.ru

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

Полякова Маргарита Андреевна – студентка кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. E-mail: ma.seagull88@gmail.com

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

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

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 30 августа 2018 года

© Коллектив авторов, 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-28-4-21-27

УДК 616.36.018.74 – 091.8: 618.33 – 002 828] – 092. 9

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КЛЕТОК КУПФЕРА И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ПРИ ВНУТРИУТРОБНОМ КАНДИДОЗНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ У НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШЕЙ ОППОЗИТНЫХ ЛИНИЙ СВА И С57В1/6

С.П. Мозолева¹, А.П. Надеев^{1, 2}, С.В. Позднякова¹, Л.Ю. Костина¹

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск

² НИИ экспериментальной и клинической медицины при Федеральном исследовательском центре «Фундаментальная и трансляционная медицина», Новосибирск

Цель исследования – изучение ультраструктуры клеток Купфера и структурных изменений в печени новорожденных мышей двух оппозитных линий – СВА и С57В1/6 – после внутриутробного кандидозного инфицирования.

Новорожденные мышата линий СВА и С57В1/6 были разделены на четыре группы: 1-я (линия СВА) и 2-я (линия С57В1/6) группы – мышата после внутриутробного кандидозного инфицирования, 3-я (линия СВА) и 4-я (линия С57В1/6) группы – контрольные мышата.

При внутриутробной кандидозной инфекции в печени новорожденных мышей обеих линий наблюдали деструктивные изменения, более масштабные у мышей линии С57В1/6. Репаративная регенерация паренхимы печени у мышей линии С57В1/6, внутриутробно инфицированных *Candida albicans*, была меньшей, чем у мышей линии СВА и контрольной групп. В клетках Купфера у мышей линии С57В1/6, внутриутробно инфицированных *C. albicans*, выявили снижение белково-синтетической функции клетки, а у мышей линии СВА – и энергетической функции. Внутриутробное кандидозное инфицирование и деструктивные изменения в паренхиме печени обусловили прирост вакуолярного аппарата клеток Купфера за счет фагосом с персистенцией грибов *C. albicans* и аутофагосом, более выраженном у мышей линии С57В1/6.

Ключевые слова: клетки Купфера, новорожденные мыши линий СВА и С57В1/6, печень, внутриутробное кандидозное инфицирование

Внутриутробная инфекция занимает ведущее место в структуре перинатальной заболеваемости и летальности. Внутриутробный кандидоз, основным возбудителем которого являются грибы рода *Candida albicans*, относят к генерализованным формам кандидоза, характеризующимся поражением внутренних органов плода и новорожденного [6, 12].

Печени принадлежит важная роль в механизмах защиты плода, особенно при гематогенном и смешанном пути инфицирования, поскольку печень – первый орган, куда попадают все трофические субстраты и микроорганизмы, поступающие к плоду от матери. Клетки Купфера (КК), резидентные макрофаги печени, не только формируют эффективную систему фильтрации частиц, участвуют в противо-

микробной защите, но и выступают как регуляторы процессов регенерации паренхимы печени при ее повреждении [10, 11, 14].

Реакции организма на стрессовые воздействия, включая биологические возбудители, генетически детерминированы [8]. Анализ индивидуальных особенностей реагирования печени и КК на внутриутробное инфицирование имеет существенное значение для оценки вклада генетической изменчивости в реакцию организма.

Цель исследования – изучение ультраструктуры КК и структурных изменений в печени новорожденных мышей двух оппозитных линий – СВА и С57В1/6 – после внутриутробного кандидозного инфицирования (ВКИ).

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на беременных мышках линий СВА (36 самок) и С57В1/6 (85 самок) и их потомстве. Животные-производители были получены из лаборатории разведения экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск).

Для моделирования внутриутробного кандидозного инфицирования под наркозом мышам-самкам на 13-й день беременности в область плаценты каждого плода вводили 0,04 мл раствора с суточной культурой *C. albicans* из расчета $2,5 \times 10^6$ клеток возбудителя в 0,2 мл изотонического раствора натрия хлорида [5].

Однодневные мышата линий СВА и С57В1/6 были разделены на четыре группы по 10 животных в каждой: 1-я (линия СВА) и 2-я (линия С57В1/6) группы – мышата после ВКИ, 3-я (линия СВА) и 4-я (линия С57В1/6) группы – интактные (контрольные) мышата. Новорожденных мышей в течение первых суток после рождения выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом.

Выбор линий СВА и С57В1/6 обусловлен тем, что они являются оппозитными по ряду параметров органов и систем. Например, имеются различия в ультраструктуре клеток Купфера [4], иммунной системе, касающиеся соотношения клеточной популяции Т- и В-лимфоцитов [9], а также чувствительности к инфекционным агентам, в том числе к *Mycobacterium tuberculosis* и *C. albicans* [5].

Все манипуляции с лабораторными животными проводили, соблюдая Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных (Страсбург, 1986), принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС), Принципы надлежащей лабораторной практики (ГОСТ Р 53434-2009 от 01.03.2010, идентичен GLP OECD).

Образцы печени подвергали стандартной проводке. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином, дрожжевые клетки и мицелий *C. albicans* выявляли, используя окраску по Шабдашу [1].

Морфометрическое исследование печени мышей проводили с помощью специализированного программного обеспечения ImageJ. Подсчитывали объемную плотность (V_v) очагов гемопоэза, зон некроза гепатоцитов, двуядерных гепатоцитов; численную плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов, гепатоцитов в состоянии митоза (тестовая площадь $5,56 \times 10^5$ мкм²).

Для электронномикроскопического исследования образцы печени объемом 1 мм³ в количестве 7–8 от одного животного фиксировали в 1% растворе OsO₄ и подвергали стандартной обработке [3]. Электронномикроскопическое исследование КК выполняли с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM-100/ASID/SEGZ (Япония) при конечном увеличении 56 000.

Морфометрическое исследование ультраструктур КК проводили по негативным изображениям их срезов, спроецированных на многоцелевую квадратную открытую тестовую систему. Параметры тестовой системы для морфометрии ультраструктур КК: шаг 3 см, 88 точек, с учетом конечного увеличения длина тестовой линии (Lt) 47,135 мкм, тестовая площадь (At) 25,22 мкм². Прикрепленные рибосомы подсчитывали в малых квадратах (1 см²), At=0,03 мкм².

На электроннограммах КК подсчитывали объемную плотность (V_v) первичных и вторичных лизосом, фагосом и аутофагосом, митохондрий, гранулярной эндоплазматической сети (ГЭПС); поверхностную плотность (S_v) мембран митохондрий, ГЭПС, для оценки плотности внутренних мембран митохондрий и ГЭПС рассчитывали соотношение показателей S_v/V_v митохондрий и ГЭПС; численную плотность (N_{ai}) первичных и вторичных лизосом, митохондрий, фагосом и аутофагосом.

Статистическую обработку данных морфометрического исследования проводили с использованием лицензированного пакета программ статистики Microsoft Excel 2010 с определением средней величины (M), стандартной ошибки средней (m). Достоверность статистически значимых различий средних величин в сравниваемых группах рассчитывали по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$. При расчетах учитывали нормальность распределения исследуемого количественного признака (медиана близка к среднему значению (расхождение не более 20%).

Результаты и обсуждение

При микроскопическом исследовании органов новорожденных мышей с ВКИ выявляли дрожжевые клетки и мицелий *C. albicans* в плаценте, печени, в ее синусоидах и сосудах (рис. 1), клетках Купфера, желудочно-кишечном тракте, легких, что свидетельствует о генерализованном характере внутриутробного кандидозного инфицирования.

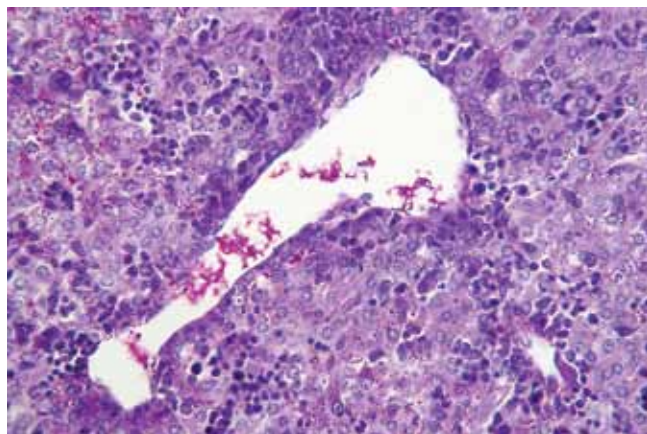


Рис. 1. Дрожжевые клетки и мицелий *C. albicans* в синусоидах и сосудах печени (центр поля зрения) новорожденной мыши линии С57В1/6, внутриутробно инфицированной *C. albicans*. Окраска по Шабдашу. $\times 400$

В отличие от новорожденных мышей контрольных групп (рис. 2 А) в печени новорожденных мышей обеих линий с ВКИ отмечали неравномерное полнокровие сосудов, балочное строение печени было нарушено, гепатоциты находились в состоянии крупно-, средневacuольной дистрофии, с участками баллонной дистрофии; обнаруживали очаги микронекроза (рис. 2 Б).

Объемная плотность (V_v) очагов некроза гепатоцитов была большей у новорожденных мышей линии С57В1/6, перенесших ВКИ, по сравнению с аналогичным показателем у новорожденных мышей 4-й (контрольной) группы на 62,3% и по сравнению с мышами линии СВА с ВКИ – на 82,3%. У мышей линии СВА с ВКИ объемная плотность (V_v) некроза в печени была большей по сравнению с аналогичным показателем у

мышей этой линии 3-й контрольной группы – на 50,8% (табл. 1). Деструктивные изменения в печени обусловлены токсическим действием самого гриба *C. albicans* и его метаболитов [7].

В печени новорожденных мышей обеих линий с ВКИ объемная плотность (V_v) очагов гемопоэза была большей в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей контрольных групп: у мышей линии СВА – на 33,0%, а у мышей линии С57В1/6 – на 27,6% (табл. 1), что можно рассматривать как компенсаторный процесс, обусловленный развитием вторичной гипоксии в связи с внутриутробным кандидозным инфицированием [2], которая также способствовала развитию деструктивных изменений в печени.

Показатели репаративной регенерации в печени тоже существенно различались у мышей оппозитных

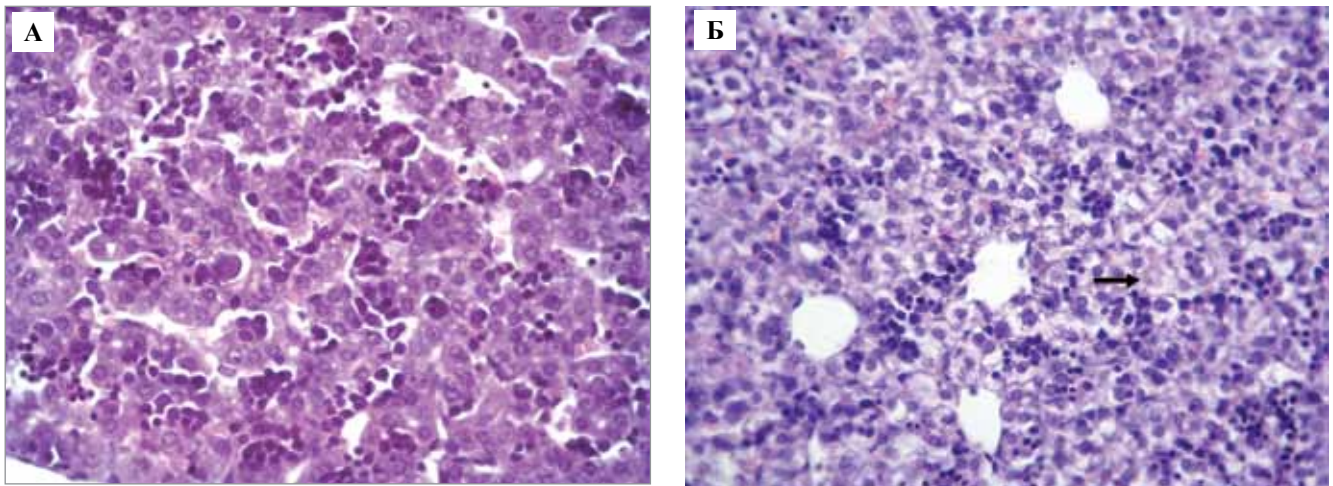


Рис. 2. Печень новорожденных мышей линии СВА.

А – контрольной группы: балочные структуры гепатоцитов, очаги гемопоэза, мегакариоциты. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Б – при внутриутробном кандидозном инфицировании: балочное строение печени нарушено, средне-, крупновacuольная дистрофия и очаги микронекроза гепатоцитов (стрелка), очаги гемопоэза. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Таблица 1

Результаты морфометрического исследования структурной организации печени новорожденных мышей оппозитных линий С57В1/6 и СВА, внутриутробно инфицированных *C. albicans* ($M \pm m$)

Параметры исследования	Группы			
	животные контрольных групп		животные, перенесшие внутриутробное кандидозное инфицирование	
	СВА	С57В1/6	СВА	С57В1/6
Очаговые микронекрозы (V_v)	0,3 ± 0,19*	1,3 ± 0,37*	0,61 ± 0,09 ^a *	3,45 ± 0,62 ^{*a}
Двуядерные гепатоциты (V_v)	7,9 ± 0,79	8,8 ± 0,84	12,53 ± 0,85 ^{a*}	6,01 ± 0,62*
Двуядерные гепатоциты (N_{ai})	5,6 ± 0,25	5,7 ± 0,31	9,19 ± 0,37 ^{a*}	4,8 ± 1,25*
Гепатоциты в состоянии митоза (N_{ai})	0,4 ± 0,09*	1,2 ± 0,14*	0,48 ± 0,07	0,48 ± 0,07 ^a
Очаги гемопоэза (V_v)	15,5 ± 0,94	18,1 ± 1,21	23,14 ± 1,06 ^a	25,0 ± 1,13 ^a

a – достоверные различия средних величин параметров от соответствующих в группе контроля, $p < 0,05$

* – достоверные межгрупповые различия величин соответствующих параметров, $p < 0,05$

линий: величины объемной (V_v) и численной (N_{ai}) плотности двуядерных гепатоцитов были большими в печени новорожденных мышей линии СВА с ВКИ (1-я группа) по сравнению с таковыми у мышей 3-й контрольной группы этой линии на 36,95% и 39,1%, соответственно.

У новорожденных мышей линии С57В1/6 выраженные некротические изменения гепатоцитов не сопровождалось адекватным восстановлением паренхимы печени: количество двуядерных гепатоцитов у мышей этой линии, перенесших ВКИ (2-я группа), оставалось на уровне показателей у животных контрольной 4-й группы, а численная плотность (N_{ai}) гепатоцитов в состоянии митоза уменьшилась на 60% (табл. 1). Объемная (V_v) и численная (N_{ai}) плотность двуядерных гепатоцитов в печени новорожденных мышей линии С57В1/6 с ВКИ (2-я группа) была меньшей по сравнению с таковыми у мышей линии СВА (1-я группа) на 52,0% и 47,8%, соответственно (табл. 1).

При электронномикроскопическом исследовании КК у мышей линии С57В1/6 с ВКИ (2-я группа) по сравнению с аналогичными показателями у мышей 4-й контрольной группы выявили снижение белково-синтетической функции КК: уменьшение показателей объемной (V_v), поверхностной (S_v) плотности ГЭПС и соотношения величин S_v/V_v ГЭПС на 15,99%, 42,5% и 35,3%, соответственно. Уменьшилась и величина численной плотности (N_{ai}) прикрепленных рибосом ГЭПС в тестовой площади у мышей линии С57В1/6 с ВКИ на 56,7% в сравнении с аналогичным показателем у мышей контрольной 4-й группы (табл. 2). У мышей линии С57В1/6 с ВКИ (2-я группа) показатели численной (N_{ai}), объемной (V_v) и поверхностной (S_v) плотно-

сти митохондрий не отличались от величин у мышей 4-й контрольной группы, показатель соотношения поверхностной и объемной плотности (S_v/V_v) митохондрий уменьшился на 22,7%, но при этом в сравнении с мышами линии СВА с ВКИ (1-я группа) оставался большим на 11,8% (табл. 2).

У мышей линии СВА с ВКИ по сравнению с аналогичными показателями у мышей 3-й контрольной группы этой же линии выявили снижение белково-синтетической и энергетической функций органелл КК: уменьшились показатели объемной (V_v) и поверхностной (S_v) плотности ГЭПС на 25,5% и 25,7%, соответственно, но не изменились соотношение величин S_v/V_v ГЭПС и величина численной плотности (N_{ai}) прикрепленных рибосом в тестовой площади в сравнении с аналогичными показателями у мышей 3-й контрольной группы (табл. 2). Численная плотность (N_{ai}) митохондрий уменьшилась на 59,5% у мышей линии СВА с ВКИ в сравнении с аналогичным показателем у мышей 3-й контрольной группы (табл. 2).

Межлинейные различия и отличия от показателей мышей контрольных групп по величинам численной плотности (N_{ai}) первичных и вторичных лизосом в сравниваемых группах мышей с ВКИ не выявлены (табл. 3).

Объемные плотности (V_v) фагосом и аутофагосом у мышей с ВКИ увеличились в сравнении с таковыми у мышей контрольных групп: у мышей линии С57В1/6 – в 2,3 раза и 3 раза, соответственно, у мышей линии СВА только аутофагосом – в 2,76 раза. Также выявлены межлинейные различия объемных плотностей (V_v) фагосом у мышей с ВКИ: данный показатель был большим у мышей линии С57В1/6 в сравнении с таковым у мышей линии СВА в 2,34 раза (табл. 3).

Таблица 2

Результаты морфометрического исследования ультраструктурной организации клеток Купфера новорожденных мышей опозитных линий С57В1/6 и СВА, внутриутробно инфицированных *C. albicans* (M=m)

Параметры исследования	Новорожденные мыши контрольных групп		Мыши, перенесшие внутриутробное кандидозное инфицирование	
	СВА	С57В1/6	СВА	С57В1/6
Митохондрии (N_{ai})	2,99±0,29*	1,59±0,30*	1,21±0,23 ^a	1,11±0,18
Митохондрии (V_v)	14,57±1,56	11,45±0,97	11,72±1,20	11,15±1,35
Митохондрии (S_v)	2,12±0,21	2,25±0,29	1,59±0,19	1,96±0,21
Митохондрии (S_v/V_v)	0,13±0,01*	0,22±0,01*	0,15±0,006*	0,17±0,006**
ГЭПС (V_v)	54,16±1,56	65,85±1,34	41,2±2,55**	55,32±2,05**
ГЭПС (S_v)	5,97±0,26*	11,38±0,45*	4,78±0,34**	6,43±0,35**
ГЭПС (S_v/V_v)	0,11±0,003*	0,17±0,003*	0,11±0,002	0,11±0,003 ^a
Прикрепленные рибосомы (N_{ai})	1,54±0,36*	4,18±0,41*	1,70±0,39	1,81±0,21 ^a

a – достоверные различия средних величин параметров от соответствующих в группе контроля, $p < 0,05$

* – достоверные межлинейные различия величин соответствующих параметров, $p < 0,05$

Таблица 3

Результаты морфометрического исследования вакуолярного аппарата клеток Купфера новорожденных мышей оппозитных линий C57Bl/6 и CBA, внутриутробно инфицированных *C. albicans* (M±m)

Параметры исследования	Новорожденные мыши контрольных групп		Мыши, перенесшие внутриутробное кандидозное инфицирование	
	CBA	C57Bl/6	CBA	C57Bl/6
Первичные лизосомы (N _{li})	0,26±0,1	0,40±0,17	0,05±0,03	0,12±0,08
Первичные лизосомы (V _{li})	2,45±1,2	3,45±0,75	0,07±0,06	1,91±0,82
Вторичные лизосомы (N _{li})	4,28±0,76	5,50 ±0,96	1,54±0,171	2,09±0,37
Вторичные лизосомы (V _{li})	13,84±1,92	17,28±2,31	12,44±2,07	19,55±2,17
Фагосомы (N _{ai})	0,55±0,13	0,80±0,15	0,64±0,11	0,41±0,18
Фагосомы (V _{ai})	57,1±9,14	58,12±10,23	58,34±3,79	136,5±24,95 ^{a*}
Аутофагосомы (N _{ai})	0,36±0,14	0,08 ±0,04	0,23±0,08	0,13±0,08
Аутофагосомы (V _{ai})	58,2±7,09	42,29±6,01	160,6±28,88 ^a	127,38±9,79 ^a

a – достоверные различия средних величин параметров от соответствующих в группе контроля, p<0,05

* – достоверные межлинейные различия величин соответствующих параметров, p<0,05

Прирост фагосом и аутофагосом у мышей с ВКИ может быть обусловлен отбором и уничтожением измененных, поврежденных клеточных компонентов и приводит к активации макрофагов, характерной для острого стресса [8]. В части фагосом КК были выявлены *C. albicans* (рис. 3), что обуславливает длительную персистенцию живого возбудителя в вакуолярном аппарате КК при внутриутробном инфицировании животных и возможность генерализации инфекционного процесса [5].

Одним из механизмов, обеспечивающих репаративную регенерацию печени, является пролиферация оставшихся неповрежденными клеток. В настоящее

время признано, что макрофаги способны регулировать дифференцировку клеток печени при ее повреждении [10, 13, 14]. По-видимому, активация КК сменяется в условиях ВКИ в конечном счете их морфофункциональным истощением, что указывает на катаболическую направленность обменных процессов. Кроме того, фагоцитируя клетки *C. albicans*, КК усиливают деструктивные процессы в паренхиме печени, что приводит, вероятно, к снижению уровня репаративной регенерации печени [15]. Так, объемная и численная плотность фагосом значительно больше у мышей линии C57Bl/6, однако компенсаторные процессы у мышей этой линии оказались меньшими в сравнении с мышами линии CBA.

Несмотря на сходство общих реакций печени и КК при ВКИ, существуют различия между линиями, выраженность которых генетически детерминирована. Изучение индивидуальных особенностей организма может быть положено в основу методических подходов для прогнозирования факторов рисков заболеваний у детей.

Выводы

При внутриутробной кандидозной инфекции в печени новорожденных мышей обеих линий наблюдали деструктивные изменения, более масштабные у мышей линии C57Bl/6. Тем не менее репаративная регенерация паренхимы печени у мышей линии C57Bl/6, внутриутробно инфицированных *C. albicans*, была меньшей, чем у мышей линии CBA и контрольной групп.

В клетках Купфера у мышей линии C57Bl/6, внутриутробно инфицированных *C. albicans*, выявили выраженное снижение белково-синтетической функции

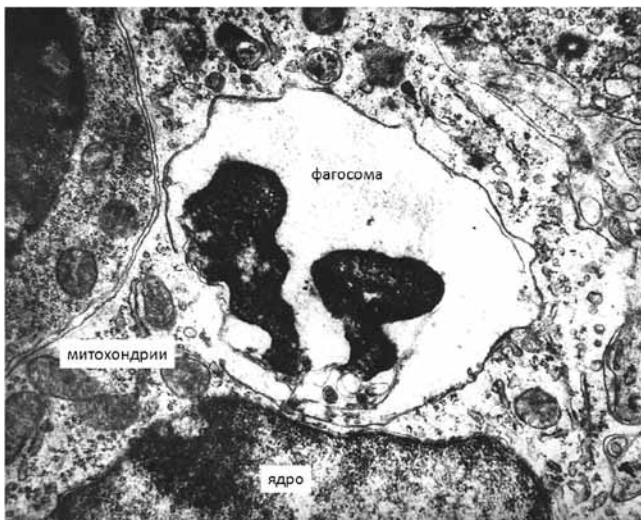


Рис. 3. Фагосома клетки Купфера, содержащая элементы *C. albicans*, у новорожденных мышей линии C57Bl/6, внутриутробно инфицированных *C. albicans*. ×56 000

клетки, а у мышей линии СВА – и энергетической функции.

Внутриутробное кандидозное инфицирование и деструктивные изменения в паренхиме печени обусловили прирост вакуолярного аппарата клеток Купфера за счет фагосом с персистенцией грибов *C. albicans* и аутофагосом, более выраженном у мышей линии С57В1/6.

Литература/References

1. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит, 2010. 96 с. [Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. Fundamentals of histological technique. SPb.: SpecLit, 2010. 96 p. (In Russ.).]
2. Кутенова О.Л. Изменение парциального напряжения углекислого газа и его влияние на оксигенацию гемоглобина в эритроцитах крови беременных при цитомегаловирусной инфекции на разных сроках гестации // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2015. № 56. С. 98–102. [Kutenova O.L. Change in partial voltage of carbon dioxide and its effect on oxygenation of hemoglobin in blood erythrocytes of pregnant women with cytomegalovirus infection at different gestation times // Bulletin of physiology and pathology of breathing. 2015. V. 56. P. 98–102 (In Russ.).]
3. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука, 1994. 400 с. [Mironov A.A., Komissarchik Y.Yu., Mironov V.A. Methods of electron microscopy in biology and medicine. SPb: Nauka, 1994. 400 p. (In Russ.).]
4. Мозолева С.П., Надеев А.П., Позднякова С.В., Залавина С.В. Структурная организация печени и звездчатых макрофагов у новорожденных мышей линий СВА и С57В1/6 // Морфология. 2017. Т. 152, № 4. С. 44–48. [Mozoleva S.P., Nadeev A.P., Pozdnyakova S.V., Zalavina S.V. Structural organization of the liver and stellate macrophages in newborn CBA and C57B1/6 mice // Morphology. 2017. V. 152, No. 4. P. 44–48 (In Russ.).]
5. Надеев А.П., Шкурпуный В.А., Маринкин И.О. Печень и плацента в пре- и постнатальный периоды при патологии: Клинико-экспериментальное исследование. Новосибирск: Наука, 2014. 242 с. [Nadeev A.P., Shkurpunny V.A., Marinkin I.O. Liver and placenta in pre- and postnatal periods in pathology: Clinical and experimental research. Novosibirsk: Nauka, 2014. 242 p. (In Russ.).]
6. Самсыгина Г.А., Буслаяева Г.Н. Кандидоз новорожденных и детей первых месяцев жизни. М.: 2008. 46 с. [Samsygi-na G.A., Buslaeva G.N. Candidiasis of newborns and children of the first months of life. M.: 2008. 46 c. (In Russ.).]
7. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение. М.: Триада-Х, 2001. 472 с. [Sergeev A. Yu., Sergeev Yu.V. Candidiasis. Nature of infection, mechanisms of aggression and protection, laboratory diagnostics, clinic and treatment. M.: Triada-X, 2001. 472 p. (In Russ.).]
8. Шкурпуный В. А. Ультраструктура клеток печени при стрессе. Новосибирск: Наука, 1989. 144 с. [Shkurpunny V.A. Ultrastructure of the liver cells under stress. Novosibirsk: Nauka, 1989. 144 p. (In Russ.).]
9. Шкурпуный В.А., Ткачев В.О., Потанова О.В., Лузгина Н.Г., Бугримова Ю.С., Обединская К.С., Зайцева Н.С., Чечушков А.В. Морфофункциональные особенности иммунной системы у мышей линий СВА и С57В1/6 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. Т. 150, № 12. С. 2–5 [Shkurpunny V.A., Tkachev V.O., Potanova O.V., Luzgina N.G., Bugrimova Yu.S., Obedinskaya K.S., Zaitseva N.S., Chechushkov A.V. Morphofunctional features of the immune system in mice of CBA and C57B1 / 6g lines // Bulletin of experimental biology of medicine 2010. V. 150, No 12. P. 2–5 (In Russ.).]
10. Элбакидзе Г.М., Меденцев А.Г. Внутриорганные и внутриклеточные механизмы регуляторных воздействий клеток Купфера на гепатоциты // Вестник Российской академии наук. 2013. № 2. С. 50–55 [Elbakidze G.M., Medentsev A.G. Intraorganism and interstitial mechanisms of regulatory effects of Kupffer cells on hepatocytes // Vestnik Rossiiskoi akademii nauk. 2013. V. 2. P. 50–55. (In Russ.).]
11. Abdullah Z., Knolle P.A. Liver macrophages in healthy and diseased liver // Pflugers Arch. 2017;469(3–4):553–60. doi: 10.1007/s00424-017-1954-6.
12. Blaszkowska J., Góralaska K. Parasites and fungi as a threat for prenatal and postnatal human development // Annals of Parasitology. 2014;60(4):225–34.
13. Ju C., Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies // Cellular Molecular Immunology. 2016;13:316–27.
14. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases // J Hepatol. 2017;66(6):1300–12. doi: 10.1016/j.jhep.2017.02.026.
15. Zhu S., Zhang J., Zhang L., Ma W. et al. Inhibition of Kupffer Cell Autophagy Abrogates Nanoparticle-Induced Liver Injury // Adv Healthc Mater. 2017;6(9). doi: 10.1002/adhm.201601252.

ELECTRON-MICROSCOPIC STUDY OF KUPFFER CELLS AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN LIVER FOR INTRAUTERINE CANDIDA ALBICANS INFECTION IN NEWBORN MICE OF OPPOSITE LINES CBA AND C57BL/6

S.P. Mozoleva, A.P. Nadeev, S.V. Pozdnyakova, L.Yu. Kostina

The aim of the study was to study the ultrastructure of Kupffer cells and the structural changes in the liver of newborn mice of two opposite lines CBA and C57B1/6 after intrauterine *Candida* infection. Newborn CBA and C57B1/6 mice were divided into 4 groups, 10 animals in each: group1 CBA and group 2 C57B1/6, mice after intrauterine *Candida* infection; group 3 SBA and group4 C57B1/6, control animals.

In the liver of newborn mice of both lines with intrauterine *Candida* infection, severe destructive changes were observed, more extensive in C57Bl/6 mice. The process of reparative regeneration of liver parenchyma in C57Bl/6 mice infected *in utero* with *Candida albicans*, was less pronounced than in CBA mice and in control groups. In Kupffer cells in C57Bl/6 mice, *in utero* infected with *C. albicans*, a marked decrease in the protein-synthetic cell function was revealed. In CBA mice energy functions of the Kupffer cell was also noted. Intrauterine *Candida* infection and destructive changes in the liver parenchyma caused an increase in vacuoles of Kupffer cells due to phagosomes with *C. albicans*, and autophagosomes were more pronounced in C57Bl/6 mice.

Key words: Kupffer cells, newborn CBA and C57Bl/6 mice, liver, intrauterine *Candida* infection

Информация об авторах

Мозолева Софья Павловна – аспирант кафедры патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета.

Адрес: 630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52.

Надеев Александр Петрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета.

Адрес: 630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52. Телефон + 7 (913) 928 8034. E-mail: nadeevngma@mail.ru

Позднякова Светлана Васильевна – доктор биологических наук, профессор кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины Новосибирского государственного медицинского университета.

Адрес: 630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52.

Костина Лариса Юрьевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии Новосибирского государственного медицинского университета.

Адрес: 630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52.

Материал поступил в редакцию 17 сентября 2018 года

ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ НИЗКОДОЗОВОМ СВЕТОДИОДНОМ ОБЛУЧЕНИИ

Н.Б. Серезникова^{1,2}, Л.С. Погодина¹, А.В. Творогова¹, П.П. Зак², А.Е. Донцов²

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

² ФГБУН «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН», Москва

Методами флуоресцентной микроскопии и спектрофотометрии показано, что низкодозовое (0,2–3,5 Дж/см², 12 минут) светодиодное облучение клеток ретинального пигментного эпителия приводит к повышению их митохондриального мембранного потенциала на 16–33% при синем свете (λ 450 нм), а при красном (λ 630 нм) – более чем вдвое.

Ключевые слова: ретинальный пигментный эпителий, митохондрии, цитохром *c* оксидаза, фотобиомодуляция, синий свет

Фотобиомодуляция активности живых клеток – востребованное направление современной биологии и медицины [10, 16]. В число наиболее важных мишеней фотобиомодуляции входит митохондриальный фермент цитохром *c* оксидаза (ЦСО), обеспечивающий синтез АТФ [3, 5, 10]. У позвоночных животных ЦСО имеет высокое оптическое поглощение в синей области спектра ($\lambda_{\text{макс}}$ 450 нм), создаваемое активными центрами фермента [6, 10]. Избирательное поглощение синего света митохондриями оказывается чрезвычайно опасным при световой передозировке ($\lambda_{\text{макс}}$ 450, ≥ 10 –50 Дж/см²) и является известной причиной фотохимического повреждения сетчатки и ретинального пигментного эпителия (РПЭ) [8, 18]. Ранее в биохимических исследованиях мы показали, что низкодозовое синее облучение ($\lambda_{\text{макс}}$ 450, ≤ 1 Дж/см²) клеток РПЭ японского перепела *Coturnix japonica* приводит к увеличению их митохондриального потенциала и активации общеклеточного метаболизма, то есть активации клеточной жизнедеятельности [1]. Эти данные открывают перспективу использования низкодозового синего облучения в фотобиомодуляционной терапии ретинальных заболеваний. Настоящая работа выполнена в развитие этих исследований на культуре клеток РПЭ человека (ARPE-19) методами прижизненной микроскопии. Измерения проводили в сопоставлении с фотобиомодуляционной эффективностью красного облучения ($\lambda_{\text{макс}}$ 630 нм), применяемого в современной терапевтической офтальмологии [8, 14, 15]. Исследование

дополнено биохимическими измерениями на клетках РПЭ перепела для оценки идентичности фотомодуляционного действия света на митохондриальные процессы РПЭ человека и на РПЭ других позвоночных животных.

Цель исследования – оценить возможность использования низкодозового синего света для фотобиомодуляции митохондриальных процессов в РПЭ.

Материалы и методы

Изменения митохондриального потенциала оценивали по флуоресценции специфического потенциалзависимого красителя – митотрекера TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester) (Sigma, США).

Объектом исследований методом флуоресцентной микроскопии были клетки культуры РПЭ человека – ARPE-19. Идентичность культуры на биохимическую специфичность РПЭ была отконтролирована по положительной реакции связывания с антителами к маркерному белку RPE65 в сравнении с отрицательной реакцией других видов эпителиальных клеток человека. Для этого использовали иммуноцитохимическое окрашивание моноклональным антителом к РПЭ65, конъюгированным с флуорохромом DyLight 650 (ThermoFisher Sci., США). Клетки ARPE-19 выращивали в чашках Петри 35×10 мм с центральным отверстием, закрытым покровным стеклом, что позволяло проводить их микроскопию непосредственно в этих чашках. Использовали общепринятые для данной культуры состав среды и условия культивирования:

DMEM/F12 1:1 с глутамином и 10% фетальной бычьей сыворотки (ПанЭко, Россия), 37°C и 5% CO₂. Уровень мембранного потенциала митохондрий оценивался по флуоресценции TMRE (λ_{ex} 540 нм, λ_{em} 595 нм) в концентрации 20 нМ. Перед облучением клетки инкубировали с TMRE в течение 12 минут с последующим отмыванием средой культивирования. Клетки облучали синим (λ 450 нм, 0,5 Дж/см²) и красным (λ 630 нм, 0,2 Дж/см²) светодиодами при 37°C. В качестве контроля использовали культуры, содержащиеся в темноте. После облучения чашки с культурой клеток переносили под объектив флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Япония) и анализировали при увеличениях объектива 20 и 60 при сохранении условий культивирования. Для освещения микроскопических препаратов использовалась газоразрядная дуговая ртутная лампа высокого давления OSRAM HBO 103W/2. Стабильность работы лампы обеспечивалась подключением ее к сети через стабилизатор и предварительным прогреванием. Количественная оценка интенсивности флуоресценции контрольных и облученных препаратов проводилась на цифровых изображениях клеток с использованием компьютерной программы Image J, при этом площади клеток определяли на фазовоконтрастных изображениях (см. рис. 2 В). Интенсивность флуоресценции определяли для каждой клетки, всего было проанализировано не менее 50 клеток для опыта и для контроля. Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Statistica 7 с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, различия признавались значимыми при $p < 0,05$.

В биохимических исследованиях использовали клетки РПЭ самок японского перепела, выделенные из глаз декапитированных животных. Содержание животных и выведение их из эксперимента выполнялись в соответствии с Правилами лабораторной практики Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708н от 23.08.2010). Животных предварительно адаптировали к темноте в течение 30 минут для отслоения РПЭ от нейральной сетчатки за счет ретиномоторного сокращения длины фоторецепторов. Конечным препаратом для фотооблучения был глазной бокал заднего отрезка глаза с естественным положением РПЭ, обращенным в сторону фотооблучения светозащитной меланиновой стороной. Нейральную сетчатку удаляли, чтобы исключить вклад ретинальных пигментов в ослабление фотооблучения. Полученный препарат облучали синим светодиодом (λ 450 нм, 3,5 Дж/см², 30 минут) в фосфатном буфере при 37°C. После облучения РПЭ пинцетом извлекали из склеры и мягко гомогенизировали до получения суспензии из мелких кластеров и отдельно плавающих клеток. Эффективность гомогенизации оценивалась микроскопическим контролем. Полученную суспензию инкубировали с TMRE в течение 20 минут при 37°C с последующим отмыванием при 2-кратном центрифугировании и очисткой 0,2% бычьим сывороточным альбумином. По окончании

центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в фосфатном буфере и измеряли величины флуоресценции TMRE (λ_{ex} 549 нм, λ_{em} 575 нм) с перемешиванием на магнитной мешалке при 37°C. Использовались две величины концентраций TMRE: 700 нМ и 125 нМ. При таких 5-кратных различиях в концентрациях величины флуоресценции различались в 10 раз. Величины флуоресценции приводили по отношению к содержанию белка на 1 мг/мл суспензии, определяемого по методу Лоури.

Результаты

Как видно на рисунке 1, на 2–3-й день культивирования клетки использованной нами для экспериментов культуры ARPE-19 образуют многоклеточные группы в виде характерных для эпителия монослойных пластов с четко выраженными краями; в центральной части пластов располагаются более мелкие клетки, по периферии – более крупные. Встречаются и одиночные хорошо распластаные клетки, в том числе весьма большого размера, с увеличенным по сравнению с обычным, видимо полиплоидным, ядром (рис. 2). Как правило, клетки характеризуются полигональной формой, округлыми или овальными ядрами с 1–2 крупными ядрышками и четко выраженным слоем пристеночного гетерохроматина. В цитоплазме присутствуют мелкогранулярные включения и тонкофибриллярные структуры. Подобная морфология клеток ARPE-19 описана и в литературе [4, 13].

Окрашивание клеток антителами к специфическому для РПЭ белку РПЭ65 показало (рис. 1 Б) его присутствие в цитоплазме клеток РПЭ в разных количествах, что зависит, видимо, от степени дифференцированности клеток и стадии клеточного цикла. Как известно, белок РПЭ65 принимает участие во внутриклеточном метаболизме РПЭ и необходим для осуществления зрительного цикла сетчатки, он присутствует в клетках РПЭ в основном в связи с мембранами гладкого эндоплазматического ретикула [12]. Наблюдаемое нами окрашивание преобладало в околядерной части, где в основном сосредоточены органоиды и элементы эндоплазматической сети клеток.

Результаты флуоресцентного анализа митохондриома клеток ARPE-19 с TMRE приведены на рисунке 2. Митохондрии клеток культуры, окрашенные TMRE, характеризуются интенсивной флуоресценцией, то есть высокой потенциалобразующей активностью. В разных клетках и в пределах одной клетки интенсивность флуоресценции отдельных митохондрий неоднородна. При этом основная масса митохондрий сосредоточена в околядерной области, и, соответственно, там флуоресценция ярче. В этой зоне можно наблюдать как ярко светящиеся гранулы, так и короткие фрагменты. На периферии клеток хондриом представлен длинными нитевидными митохондриями, иногда образующими сеть.

Кратковременное облучение синим и красным светом не привело к заметному изменению морфологии

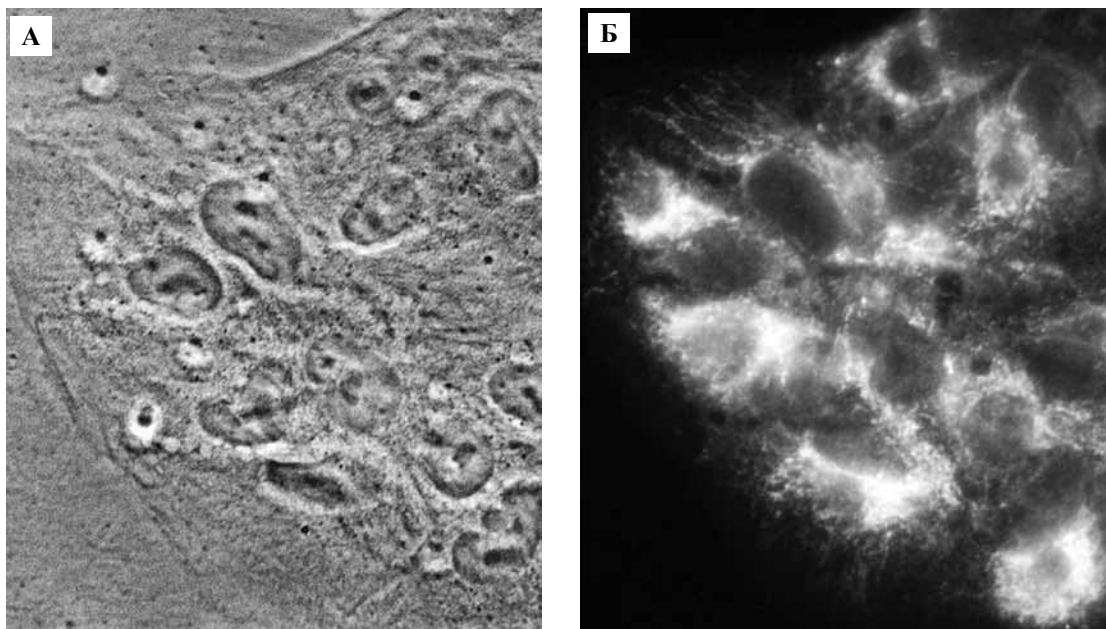


Рис. 1. Клетки культуры ARPE-19. А – фазово-контрастная микроскопия, Б – иммунофлуоресцентная микроскопия, окрашивание антителами к белку РПЭ65. Объектив $\times 60$

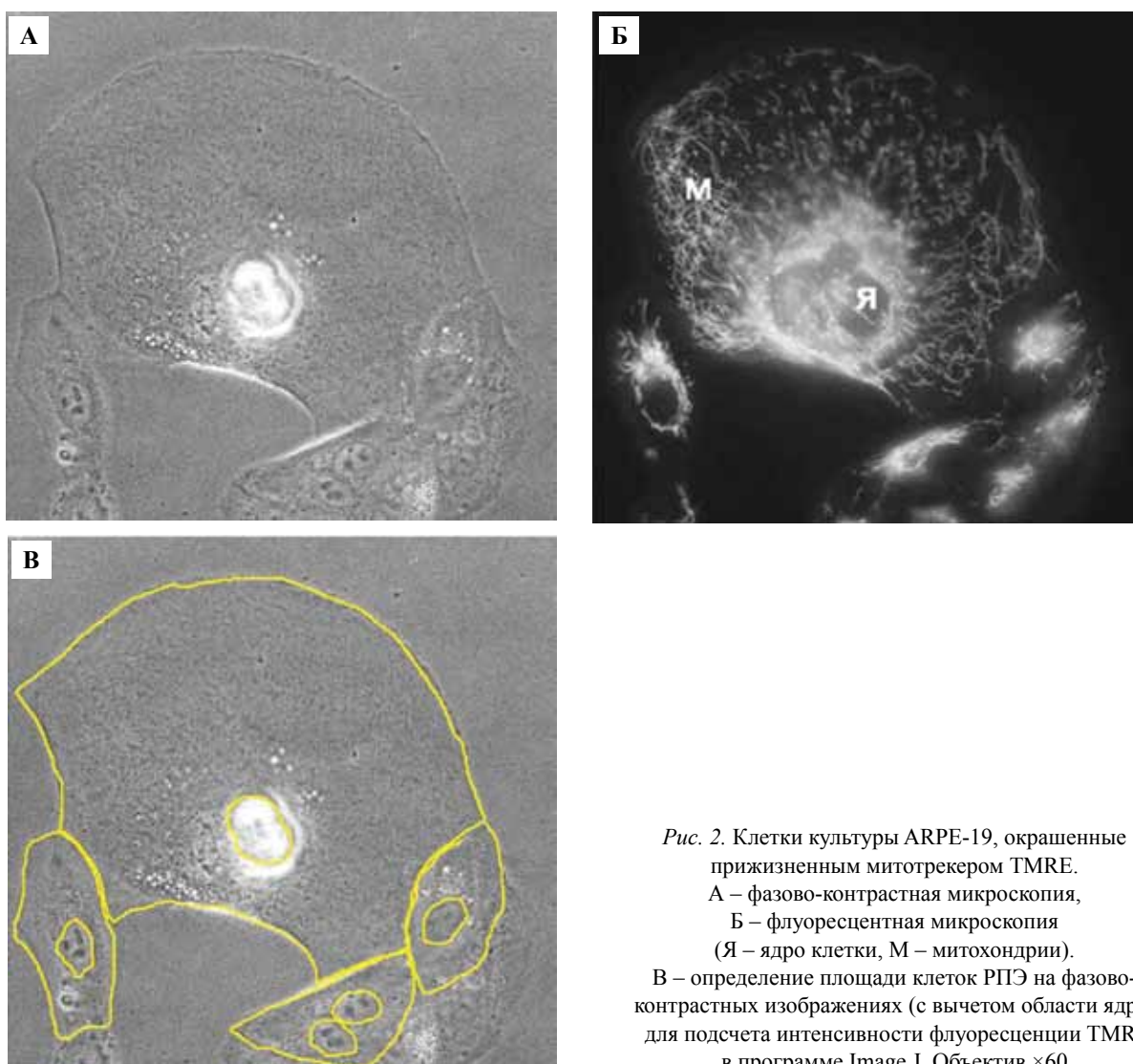


Рис. 2. Клетки культуры ARPE-19, окрашенные прижизненным митотрекером TMRE. А – фазово-контрастная микроскопия, Б – флуоресцентная микроскопия (Я – ядро клетки, М – митохондрии). В – определение площади клеток РПЭ на фазово-контрастных изображениях (с вычетом области ядра) для подсчета интенсивности флуоресценции TMRE в программе Image J. Объектив $\times 60$

клеток ARPE-19. Визуальный анализ интенсивности флуоресценции TMRE после этого воздействия дал представление о незначительном увеличении мембранного потенциала их митохондрий (рис. 3, рис. 4), однако количественная обработка выявила существенную разницу между уровнями флуоресценции митохондрий при синем и красном светодиоде освещении (табл. 1).

Нами было установлено, что синий свет вызвал повышение интенсивности флуоресценции митохондрий

на 16% по сравнению с контролем, тогда как красный свет – более, чем в 2,5 раза (табл. 1).

Оценка величины митохондриального мембранного потенциала в клетках РПЭ японского перепела спектрофотометрическим методом также показала (табл. 2), что синее освещение приводит к увеличению поглощения митохондриального потенциалзависимого красителя TMRE, что свидетельствует о повышении митохондриального мембранного потенциала в облученных клетках. При разных концентрациях TMRE

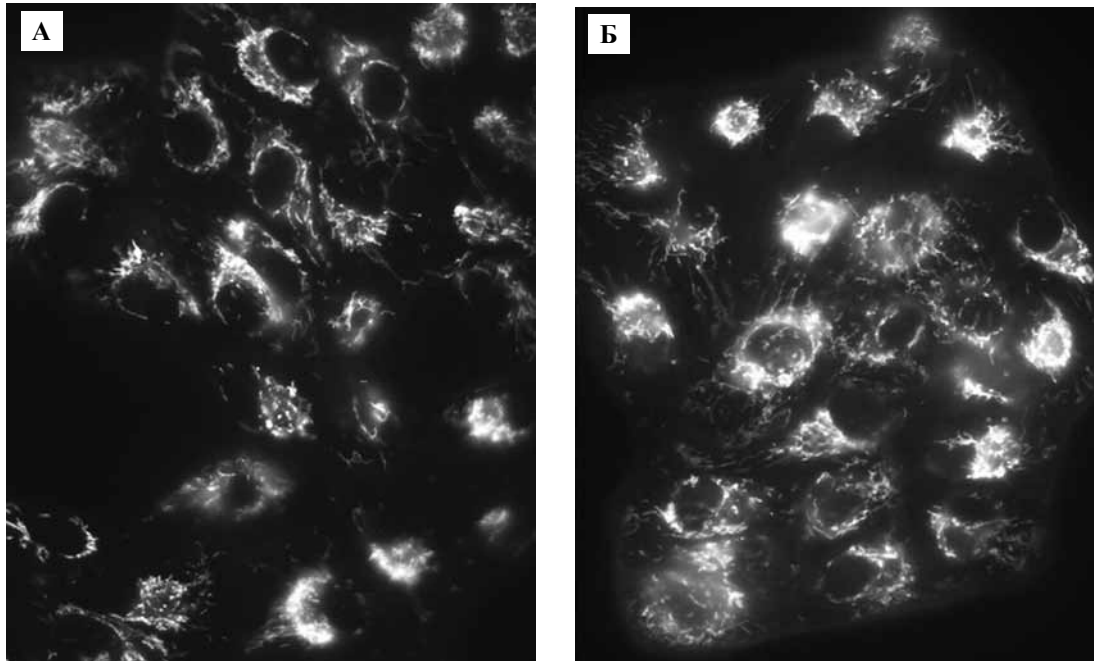


Рис. 3. Клетки культуры ARPE-19, окрашенные TMRE
А – темновой контроль, Б – после 12-минутного облучения красным светом ($\lambda=630$ нм, $0,2$ Дж/см²).
Флуоресцентная микроскопия, объектив $\times 60$

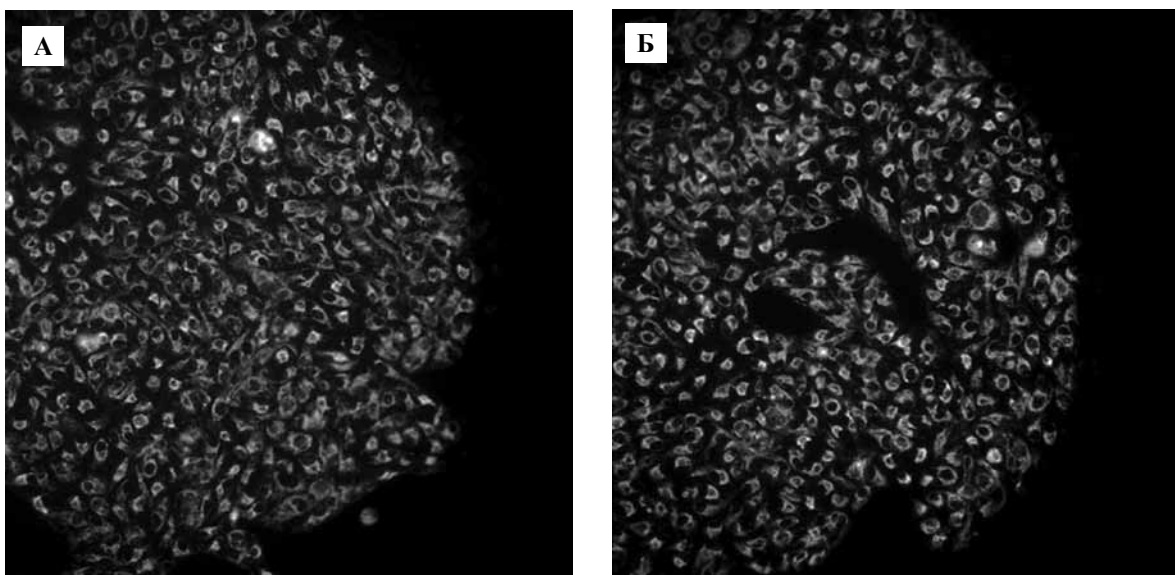


Рис. 4. Клетки культуры ARPE-19, окрашенные TMRE.
А – темновой контроль, Б – после 12-минутного облучения синим светом ($\lambda=450$ нм, $0,5$ Дж/см²).
Флуоресцентная микроскопия, объектив $\times 20$

Таблица 1

Изменения интенсивности флуоресценции TMRE в митохондриях клеток культуры ARPE-19 при низкодозовом синем и красном светодиодном освещении

Условия облучения	Флуоресценция, отн. ед.	Разница с контролем, %
Контроль (темнота)	735,13±34,84	–
Синее облучение	* 854,67±28,90	+16
Красное облучение	*1911,08±56,36	+260

Данные представлены в относительных единицах, приведенных на одну клетку РПЭ, в виде М±SEM

* p<0,05 по сравнению с контролем

Таблица 2

Изменения интенсивности флуоресценции TMRE в митохондриях клеток РПЭ японского перепела при низкодозовом синем светодиодном освещении

Условия облучения	Концентрация TMRE	Флуоресценция, отн. ед.	Разница с контролем, %
Контроль (темнота)	125 нМ	485±106	–
Синее облучение	125 нМ	* 646±187	+33
Контроль (темнота)	700 нМ	50,9±10,2	–
Синее облучение	700 нМ	* 65,4±15,6	+27

Данные представлены в относительных единицах, приведенных на 1 мг белка, в виде М±SEM.

* p<0,05 по сравнению с контролем

(125 нМ и 700 нМ) было показано сходное увеличение флуоресценции в клетках РПЭ по сравнению с контролем – на 30%.

Обсуждение

Из результатов нашей работы следует, что низкодозовое светодиодное облучение клеток РПЭ в полосах поглощения дыхательных ферментов способно повышать митохондриальный потенциал этих клеток. Согласно известным механизмам энергетического обеспечения клеток, увеличение митохондриального потенциала должно приводить к повышению синтеза АТФ и усилению клеточных метаболических процессов. В литературе есть данные о повышении митохондриального мембранного потенциала и увеличении уровня внутриклеточного АТФ, об изменении редокс-состояния цитоплазмы в самых разных клеточных объектах после низкоинтенсивного светового воздействия в красном или инфракрасном диапазонах спектра [10]. Также было показано в экспериментах *in*

vitro, что красный свет усиливает фагоцитоз и лизосомальную активность в клетках РПЭ человека – важные клеточные процессы, связанные с уменьшением воспаления и усилением репарации сетчатки [9]. При этом подобных исследований, связанных с изучением возможного фотомодуляционного действия слабого синего света на ретинальные обменные процессы, проведено не было: наши данные являются принципиально новыми и вместе с тем согласуются с полученными ранее результатами. Ранее нами было продемонстрировано [1, 2], что синий свет в низких дозах (<1 Дж/см²) при кратковременной экспозиции может оказывать благотворное влияние на суспензию клеток РПЭ японского перепела, повышая их метаболическую и антиоксидантную активность и активируя митохондриальный метаболизм (увеличиваются митохондриальный мембранный потенциал и активность цитохром с оксидазы). Также в экспериментах *in vivo* мы показали, что одной из возможных причин фотоиндуцированного повышения метаболической митохондриальной активности в клетках РПЭ может быть увеличение суммарного объема хондриома. Действительно, по нашим прежним электронномикроскопическим данным [1], однократное кратковременное воздействие на глаза птиц синим светом в столь же низких дозах вызывало увеличение численности и удельного объема митохондрий без изменения их ультраструктуры. Эти результаты сходны с данными других авторов [16], показавших увеличение численности митохондрий после низкодозового лазерного и светодиодного облучения светом красного диапазона.

Заключение

Полученные новые данные о стимулирующем действии низкодозового синего света на митохондриальную активность клеток РПЭ согласуются с данными современной литературы и создают научное обоснование для фотобиомодуляции ретинальных процессов синим светом.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 17-04-00708).

Литература/References

1. Донцов А.Е., Воробьев И.А., Зольникова И.В., Погодина Л.С., Поташишникова Д.М., Серезникова Н.Б., Зак П.П. Фотобиомодулирующее действие низкодозового светодиодного облучения синего диапазона (450 нм) на митохондриальную активность // Сенсорные системы. 2017. Т. 31, № 4. С. 311–320. [Dontsov A.E., Vorobjev I.A., Zolnikova I.V., Pogodina L.S. et al. Photobiomodulating effect of low-dose LED blue range (450 nm) radiation on mitochondrial activity // Sensory Systems. 2017. V. 31, No 4. P. 311–320 (In Russ.).]
2. Донцов А.Е., Серезникова Н.Б., Погодина Л.С., Гурьева Т.С., Зак П.П. Фотоактивация цитохром с оксидазной активности митохондрий печени японского перепела терапевтическими дозами синего и красного светодиодного облучения // Пато-

- логическая физиология и экспериментальная терапия. 2018. Т. 62, № 3. С. 25–30. [Dontsov A.E., Sereznikova N.B., Pogodina L.S., Gurieva T.S. et al. Photoactivation of cytochrome c oxidase activity in liver mitochondria of Japanese quail by therapeutic doses of blue and red LED irradiation // Pathological physiology and experimental therapy. V. 62, No 3. P. 25–30 (In Russ.)]
3. Кару Т.И. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром *c*-оксидазы: Сборник трудов ИПЛИТ РАН «Современные лазерно-информационные и лазерные технологии». 2005. С. 131–143. [Karu T.Y. Universal cellular mechanism of laser biostimulation: photoactivation of the respiratory chain enzyme cytochrome c oxidase // Digest scientific works IPLIT RAS «Modern laser-information and laser technologies». 2003. P. 131–143. (In Russ.)].
 4. Abu Khamidakh A.E., Juuti-Uusitalo K., Larsson K., Skottman H. et al. Intercellular Ca² wave propagation in human retinal pigment epithelium cells induced by mechanical stimulation // Exp Eye Res. 2013;108: 29–39.
 5. Beirne K., Rozanowska M., Votruba M. Photostimulation of mitochondria as a treatment for retinal neurodegeneration // Mitochondrion. 2017;36:85–95.
 6. Buravlev E.A., Zhidkova T.V., Osipov A.N., Vladimirov Y.A. Are the mitochondrial respiratory complexes blocked by NO the targets for the laser and LED therapy? // Laser Med Sci. 2015;30:173–80.
 7. Chen E., Söderberg P.G., Lindström B. Cytochrome oxidase activity in rat retina after exposure to 404 nm blue light // Curr Eye Res. 1992;11(9):825–31.
 8. Cheng Y., Du Y., Liu H., Tang J. et al. Photobiomodulation inhibits long-term structural and functional lesions of diabetic retinopathy // Diabetes. 2018;67(2):291–98.
 9. Fuma S., Murase H., Kuse Y., Tsuruma K. et al. Photobiomodulation with 670 nm light increased phagocytosis in human retinal pigment epithelial cells // Molecular Vision. 2015; 21:883–92.
 10. Hamblin M.R. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation // Photochem. Photobiol. 2018;94:199–12.
 11. Heiskanen V., Hamblin M.R. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? // Photochem Photobiol Sci. 2018;17(8): 1003–17.
 12. Kiser P.D., Palczewski K. Membrane-binding and enzymatic properties of RPE65 // Prog Retin Eye Res. 2010;29(5):428–42.
 13. Luo Y., Zhuo Y., Fukuhara M., Rizzolo L.J. Effects of culture conditions on heterogeneity and the apical junctional complex of the ARPE-19 cell line // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47(8):3644–55.
 14. Merry G.F., Munk M.R., Dotson R.S., Walker M.G. et al. Photobiomodulation reduces drusen volume and improves visual acuity and contrast sensitivity in dry age-related macular degeneration // Acta Ophthalmol. 2017;95:e270–7.
 15. Osborne N.N., Núñez-Álvarez C., Del Olmo-Aguado S., Merayo-Llodes J. Visual light effects on mitochondria: The potential implications in relation to glaucoma // Mitochondrion. 2017;36:29–35.
 16. Passarella S., Karu T. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation // Photochem Photobiol B. 2014;140:344–58.
 17. Shanks S., Leisman G. Perspective on Broad-Acting Clinical Physiological Effects of Photobiomodulation // Adv Exp Med Biol. 2018;1096:41–52.
 18. Van Norren D., Gorgels T.G. The action spectrum of photochemical to the retina: a review of monochromatical threshold data // Photochem Photobiol. 2011;87:747–53.

STUDY OF THE MITOCHONDRIAL ACTIVITY OF THE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CELLS AT LOW-DOSE LED IRRADIATION

N.B. Sereznikova, L.S. Pogodina, A.V. Tvorogova, P.P. Zak, A.E. Dontsov

By fluorescence microscopy and spectrophotometry it is shown that low-dose LED irradiation (0.2–3.5 J / cm², 12 min) of retinal pigment epithelium cells leads to increase in their mitochondrial membrane potential by 16% – 33% with blue light (λ 450 nm), and more than twice – with red light (λ 630 nm).

Key words: retinal pigment epithelium, mitochondria, cytochrome *c* oxidase, photobiomodulation, blue light

Информация об авторах

Сережникова Наталья Борисовна – учебный мастер кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, младший научный сотрудник ИБХФ РАН им. Н.М. Эмануэля.

Адрес: 119899, Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12. Телефон 8 (916) 262 3087. E-mail: natalia.serj@yandex.ru

Погодина Лариса Сергеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Адрес: 119899, Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 12. E-mail: lpogod@mail.ru

Творогова Анна Владимировна – инженер НИИ физико-химической биологии имени МГУ им. М.В. Ломоносова.

Адрес: 119899, Москва, Воробьевы горы, д. 1, стр. 40. E-mail: yogurtovskaya@mail.ru

Зак Павел Павлович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ИБХФ РАН им. Н.М. Эмануэля.

Адрес: 119334, Москва, улица Косыгина, д. 4. E-mail: pavelzak@mail.ru

Донцов Александр Евгеньевич – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ИБХФ РАН им. Н.М. Эмануэля.

Адрес: 119334, Москва, улица Косыгина, д. 4. E-mail: adontsovnick@yahoo.com

Материал поступил в редакцию 7 сентября 2018 года

СПОСОБ ДЕКАЛЬЦИНАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

И.А. Шурыгина, М.Г. Шурыгин

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск

В статье представлен оригинальный способ подготовки костной ткани к морфологическому исследованию. Он обеспечивает сохранность гистологических структур кости и окружающих тканей, сохранность антигенных эпитопов, а также снижает трудоемкость и сокращает сроки изготовления препарата. Предложенный авторами метод позволяет получить препараты высокого качества, пригодные как для рутинного гистологического исследования, так и для проведения иммуногистохимических и иммунофлуоресцентных исследований.

Ключевые слова: декальцинация, костная ткань, иммуногистохимические исследования, иммунофлуоресцентные исследования

Гистологическое исследование костной ткани является обязательным компонентом диагностики многих заболеваний и состояний и применяется как в клинических, так и в экспериментальных исследованиях. При этом качество препарата играет решающую роль в постановке диагноза и в установлении тканевых взаимоотношений.

В рутинной практике широко применяют и кислотные, и бескислотные методы декальцинации. От особенностей декальцинации зависит качество последующих гистологических окрасок и сохранность структур, подвергающихся анализу [5].

Кислотные способы обеспечивают, как правило, большую скорость декальцинации, но уступают бескислотным по степени сохранности структуры ткани [7].

Так, известен способ приготовления фрагментов костной ткани к исследованию, включающий фиксацию в забуференном 10% растворе нейтрального формалина в течение 24–48 часов, промывание в воде в течение 24–48 часов, декальцинацию в 5–7,5% растворе азотной кислоты до полной декальцинации, последующую обработку препарата костной ткани в 5% растворе сульфата натрия или лития в течение 1 суток, промывание в воде в течение 24–48 часов, обезвоживание в спиртах и заливку в парафин [2]. Тем не менее, данный способ не позволяет добиться хорошей сохранности клеточных структур, особенно в окружающих мягких тканях (мышца, надкостница, костный мозг), значительно ухудшает качество стандартных гистологических окрасок, а также делает невозможным последующее проведение иммуногистохимических (ИГХ) и иммунофлуоресцентных (ИФ) исследований из-за повреждения вторичной структуры белковых эпитопов.

Бескислотные методы декальцинации, основанные на применении этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и ее солей, позволяют реализовывать иммуноморфологические методы окрашивания [1], но очень

длительны [4, 6], значительно снижают качество рутинных методов окраски.

Целью настоящего исследования являлась разработка способа приготовления препарата костной ткани, пригодного для гистологического и иммуноморфологического исследования.

Материалы и методы

Фиксацию образца костной ткани проводили в течение 24 часов в молекулярном фиксаторе, в состав которого не входят альдегиды, например раствором FineFix (Milestone, Италия) на спиртовой основе, содержащем FineFix и 96° спирт в соотношении 280 мл FineFix + 720 мл 96° спирта.

FineFix – бесформалиновый фиксатор, включающий в себя следующие компоненты: вода, 1,2-пропанедиол, поливиниловый спирт и от 0,05 до 2,00 весовых процентов мономерного карбогидрата, содержащего не менее трех атомов углерода и второе средство для сохранения этанола [12].

Затем образцы без отмывания помещали в индивидуальные хорошо закрывающиеся емкости в 5% забуференный раствор муравьиной кислоты. Концентрированный раствор декальцинатора, так называемый матричный раствор, готовили из расчета 40 г лимоннокислого натрия, 100 мл 90% раствора муравьиной кислоты, 300 мл дистиллированной воды (раствор пригоден для длительного хранения при комнатной температуре в хорошо укуренной емкости). Перед употреблением раствор доводили дистиллированной водой до получения 5–8% раствора муравьиной кислоты. Для каждого образца соотношение образцов: декальцинирующий раствор составляло 1:20.

Ежедневно оценивали полноту декальцинации кальций-оксалатным методом (3 мл использованной декальцинирующей жидкости, довести pH до 7,0 концентрированным (25%) раствором аммиака, затем добавить

5 мл насыщенного раствора оксалата аммония, хорошо взболтать и оставить на 30 минут, если жидкость останется прозрачной, декальцинация завершена). При наличии кальция в использованном декальцинирующем растворе образцы помещали в свежую порцию декальцинатора [3].

После завершения декальцинации проводили промывание образцов водой в течение 5 минут и повторно помещали в спиртовой раствор FineFix на 12 часов.

Затем проводили дегидратацию в спиртах с возрастающей концентрацией начиная с 70° раствора и заканчивая 100° спиртом. Заливку в парафин осуществляли по общепринятой методике [2].

Проводили рутинные гистологические, иммуногистохимическое и иммунофлуоресцентное окрашивание образцов по методикам, принятым в лаборатории авторов [8, 9, 10], а также подготовку для исследования методом конфокальной микроскопии [11].

Первичные антитела, испытанные для окрашивания образцов костной ткани, приведены в таблице.

Результаты

Предлагаемым способом изготовлено 162 блока образцов костной ткани. Исследовали как образцы, полученные от экспериментальных животных (крысы, хомяки, мыши, кролики), так и интраоперационные биоптаты костной ткани. Высококачественные гистологические препараты получены при применении и рутинных методов окрашивания (окрашивание гематоксилином и эозином, по Пикро–Маллори), и иммуноморфологических методов. При этом удалось добиться

хорошего качества окраски образцов костной ткани и окраски окружающих тканей (мышца, надкостница, костный мозг).

Для окраски гематоксилином и эозином примеры приведены на рисунках 1–3. Так, на рисунке 1 представлено формирование костной мозоли в зоне перелома, при этом на препарате одновременно визуализируется костная, хрящевая, мышечная ткань с хорошей сохранностью. Аналогично на рисунке 2 показаны костная, мышечная ткань, надкостница, костный мозг.

Хорошая сохранность мышечной ткани после того как образец был подвергнут процедуре декальцинации, продемонстрирована на рисунке 3.

Окраска по методу Пикро–Маллори также продемонстрировала хорошие результаты (рис. 4, 5).

Сохранность антигенных эпитопов в образцах после декальцинации подтверждена удовлетворительными результатами иммуногистохимической и иммунофлуоресцентной окраски образцов (рис. 6, 7).

Заключение

Разработанный способ обеспечивает сохранность гистологических структур кости и окружающих тканей, доступность антигенных эпитопов для иммунных меток, а также позволяет снизить трудоемкость и сократить сроки изготовления препарата. Так, сроки декальцинации компактной кости мелких лабораторных животных (мыши, крысы, хомяки) составляют 2–4 суток, кроликов – 4–5 суток, фрагментов костной ткани человека – 4–5 суток. При этом исключается токсическое воздействие формалина на исследователя.

Таблица

Антитела, испытанные для окрашивания образцов костной ткани

Мишень антитела	Источник, рабочее разведение	Применяемая методика
Костный морфогенетический белок 11 (BMP-11)	Epitomics, Cat. N 5177-1, 1:500	ИГХ
CD34	Santa Cruz, Cat. N Sc-7324, 1:300	ИГХ
СУВ5R3	Epitomics, Cat. N 3265-1, 1:250	ИГХ
Металлопротеаза 9 (MMP9)	Epitomics, Cat. N 2551-1, 1:200	ИГХ
Глутатионсинтетаза (GSS)	Epitomics, Cat. N 5220-1, 1:100	ИГХ
Карбоангидраза типа 2 (CA2)	Epitomics, Cat. N 5204-1, 1:250	ИГХ
OxPhos Complex IV subunit I	Invitrogen, Cat. N D 0589, 1:200	ИФ
Golgin-97	Invitrogen, Cat. N A-21270, 1:200	ИФ
Костный морфогенетический белок 4 (BMP4)	Epitomics 2052, Cat. N , 1:200	ИФ
p38 MAPK	Epitomics, Cat. N 1544-1, 1:200	ИФ
p38 MAPK Phospho	Epitomics, Cat. N 1229-1, 1:200	ИФ
p44 MAPK (Erk1)	Epitomics, Cat. N 3739-1, 1:200	ИФ
p53 Phospho	Epitomics, Cat. N 1644-1, 1:200	ИФ
JNK1 Phospho (pT183) / JNK2 Phospho (pT183) / JNK3 Phospho (pT221) (MAPK10)	Epitomics, Cat. N 3893-1, 1:200	ИФ
Stat-3 Phospho	Epitomics, Cat. N 2236-1, 1:200	ИФ

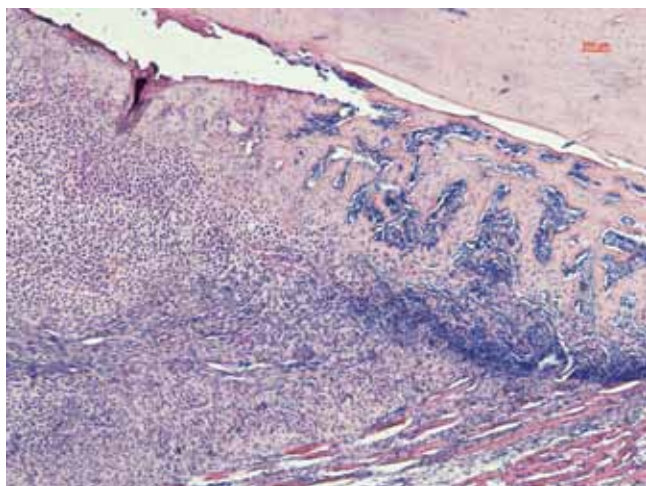


Рис. 1. Образование костной мозоли в зоне перелома бедренной кости.
Крыса, окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$

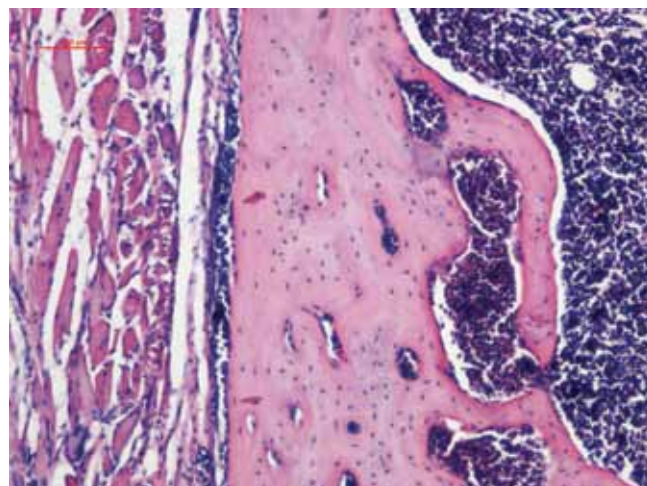


Рис. 2. Большеберцовая кость.
Хомяк, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

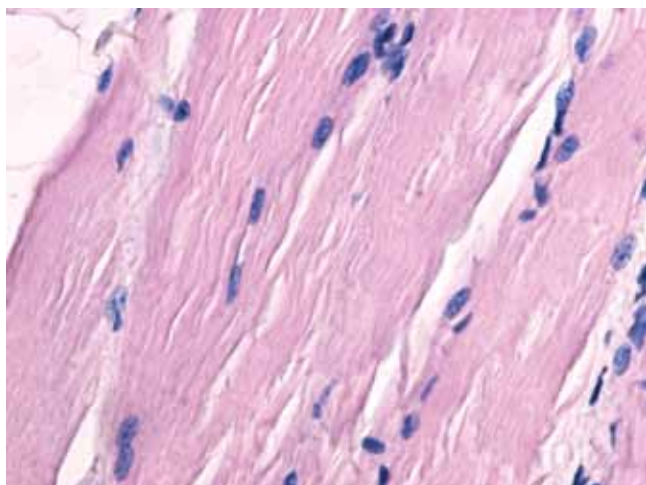


Рис. 3. Мышечная ткань.
Кролик, окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$



Рис. 4. Костная ткань.
Кролик, окраска по Пикро-Маллори, $\times 400$



Рис. 5. Хрящевая ткань.
Кролик, окраска по Пикро-Маллори, $\times 400$

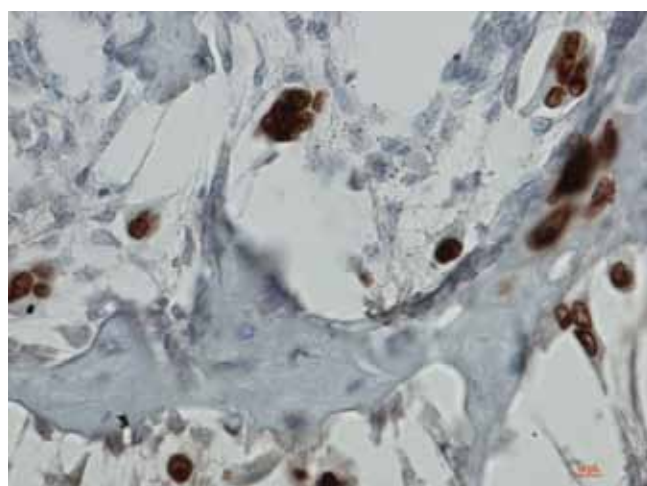


Рис. 6. Костная ткань. Крыса. Иммуногистохимия (краситель DAB, первичные антитела к карбоксиангидразе типа 2, докрасивание гематоксилином), $\times 400$

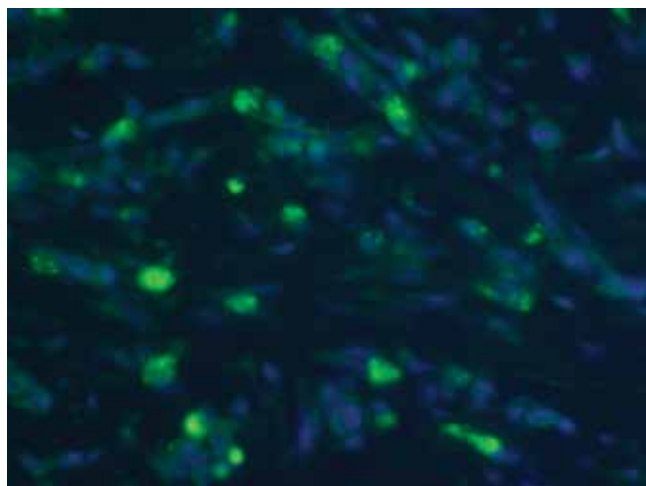


Рис. 7. Зона образования костной мозоли. Крыса. Иммунофлуоресценция (первичные антитела к anti-OxPhos, вторичные антитела, меченные Alexa fluor 488, докраска DAPI), $\times 400$

Полученные с использованием данного способа препараты высокого качества пригодны как для рутинного гистологического исследования, так и для проведения иммуногистологических исследований.

Литература/References

1. Коржевский Д.Э., ред. Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: Руководство. СПб.: СпецЛит, 2014. 118 с. [Korzhevsky D.E., ed. Theoretical bases and practical application of immunohistochemistry methods: Manual. SPb.: SpetsLit, 2014. 118 p. (In Russ.)].
2. Саркисов Д.С., Петров Ю.Л., ред. Микроскопическая техника. М.: Медицина, 1996. 544 с. [Sarkisov D.S., Petrov Yu.L., eds. Microscopic technology. M.: Medicina, 1996. 544 p. (In Russ.)].
3. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Способ приготовления препарата костной ткани и набор для его осуществления. Патент RU 2500104, 05.03.2012. [Shurygina I.A., Shurygin M.G. Method of preparation of a bone tissue and a set for its implementation. Patent RU 2500104, 05.03.2012.]
4. Choi S.E., Hong S.W., Yoon S.O. Proposal of an appropriate decalcification method of bone marrow biopsy specimens in the era of expanding genetic molecular study // J Pathol Transl Med. 2015;49(3):236–42. doi: 10.4132/jptm.2015.03.16.
5. Park S.H., Choi H., Han J.S., Park Y.B. Comparative study of decalcification versus nondecalcification for histological evaluation of one-wall periodontal intrabony defects in dogs // Microsc Res Tech. 2015;78(1):94–104. doi: 10.1002/jemt.22449.
6. Prasad P., Donoghue M. A comparative study of various decalcification techniques // Indian J Dent Res. 2013;24(3):302–8. doi: 10.4103/0970-9290.117991.
7. Savi F.M., Brierly G.I., Baldwin J., Theodoropoulos C., Woodruff M.A. Comparison of different decalcification methods using rat mandibles as a model // J Histochem Cytochem. 2017;65(12):705–22. doi: 10.1369/0022155417733708.
8. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Dremina N.N., Kanya O.V. Endogenous progenitors as the source of cell material for ischemic damage repair in experimental myocardial infarction under conditions of changed concentration of vascular endothelial growth factor // Bull Exp Biol Med. 2015;158(4):528–31. doi: 10.1007/s10517-015-2801-4.
9. Shurygin M.G., Shurygina I.A., Kanya O.V., Dremina N.N., Lushnikova E.L., Nepomnyashchikh R.D. Morphological evaluation of oxidative phosphorylation system in myocardial infarction under conditions of modified vascular endothelial growth factor concentration // Bull Exp Biol Med. 2015.159(3):402–5. doi: 10.1007/s10517-015-2974-x.
10. Shurygina I.A., Kanya O.V., Dremina N.N., Shurygin M.G. Pathomorphological assessment method of myocardial infarction age // Sovremennyye tehnologii v medicine. 2017;9(2):126–30.
11. Shurygina I.A., Rodionova L.V., Shurygin M.G., Popova L.G., Dremina N.N., Sukhov B.G., Kuznetsov S.V. Using confocal microscopy to study the effect of an original pro-enzyme Se/arabinogalactan nanocomposite on tissue regeneration in a skeletal system // Bull Russ Acad Sci Phys. 2015;79(2):256–8. doi: 10.3103/S1062873815020276.
12. Visinoni F. Fixative. Patent EP1455174 B1, 15.12.2004.

METHOD OF DECALCINATION OF BONE TISSUE

I.A. Shurygina, M.G. Shurygin

The original method of preparation of bone tissue for morphological investigation is presented in the article. The method ensures the preservation of the histological structures of the bone and surrounding tissues, the preservation of antigenic epitopes, and also allows reducing labor intensity and shortening the time of preparation. The method proposed by the authors allows obtaining high quality preparations suitable for routine histological examination, as well as for immunohistochemical and immunofluorescence studies.

Key words: decalcification, bone tissue, immunohistochemical studies, immunofluorescence studies

Информация об авторах

Шурыгина Ирина Александровна – доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе и заведующая лабораторией функциональной морфологии и патофизиологии клетки Иркутского научного центра хирургии и травматологии.

Адрес: 664003, Иркутск, ул. Борцов революции, д. 1. Телефон: +7 (908) 660 0679. E-mail: irinashurygina@gmail.com

Шурыгин Михаил Геннадьевич – доктор медицинских наук, заведующий научно-лабораторным отделом Иркутского научного центра хирургии и травматологии.

Адрес: 664003, Иркутск, ул. Борцов революции, д. 1. E-mail: mshurygin@gmail.com

Материал поступил в редакцию 4 сентября 2018 года

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ПАРОДОНТА

**Т.Б. Бухарова¹, А.В. Васильев^{1,2}, Е.В. Галицына¹, Р.Н. Магомедов²,
В.С. Кузнецова², О.В. Махнач¹, О.А. Зорина², Д.В. Гольдштейн¹**

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

² ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва

Рассмотрены результаты экспериментальных исследований регенерации пародонта с использованием гистологического и морфометрического анализа как основного доказательства регенерации. Обсуждены возможные причины расхождений результатов в разных исследованиях. Сделан вывод, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки различного происхождения могут оказывать положительное влияние на регенерацию пародонта. Для успешной регенерационной терапии необходимо выбрать оптимальное сочетание клеток-предшественников, сигнальных молекул и скаффолдов и определить временную и пространственную последовательность их применения.

Ключевые слова: регенерация, кость, морфометрия, пародонт, ММСК

Болезнями пародонта страдает примерно 20–60% населения мира, причем 7,4% (538 000 000 человек) – в тяжелых формах [18]. Пародонтит характеризуется прогрессирующим разрушением компонентов пародонта – десны, цемента, альвеолярной кости и периодонтальной связки (ПДС) [37]. Традиционная терапия в основном направлена на уменьшение бактериальной нагрузки и воспаления и не позволяет получить полноценную регенерацию тканей [29, 30, 40]. В течение последних нескольких десятилетий для улучшения восстановления пародонта и биомеханической интеграции тканей были разработаны и использованы разные подходы: трансплантация ксеногенной или аллогенной кости, направленная регенерация тканей пародонта (стимуляция регенерации тканей при помощи разделительных мембран), протестировано множество различных методов и биоматериалов *in vitro*, *in vivo* и в клинических условиях.

Для оценки восстановления тканей пародонта решающее значение имеет выбор объективного критерия. Самым надежным доказательством регенерации тканей являются результаты гистологического и морфометрического анализа [35]. Так, при пересадке различных типов костных трансплантатов рентгенологически было показано заполнение дефектов кости, при котором отмечено улучшение прикрепления зубов. Тем не менее гистологический анализ показал минимальную остеоиндуктивную и цементагенную активность и развитие плотной волокнистой соединительной ткани на месте дефекта [4]. Наряду с этим отмечено, что при использовании костных заменителей их частицы мед-

ленно резорбируются, на протяжении нескольких месяцев могут находиться в пределах исходных дефектов и при рентгенологическом исследовании учитываться как новая кость [19, 26].

Обобщению результатов морфологических исследований мешают методические недостатки экспериментов (нередкое отсутствие характеристики клеточных культур, условий и сроков эксперимента, количественных данных, необходимых контрольных групп, систематические ошибки вследствие неправильного отбора данных и т.п.). Так, по данным обзора, посвященного роли мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в регенерации пародонта на экспериментальных моделях [35], только 22 из выявленных в поиске 2357 морфологических исследований соответствовали принципам утверждения предпочтительных отчетов для систематических обзоров и метаанализов (PRISMA-P) [21] и успешно прошли оценку систематической ошибки в рандомизированных исследованиях, разработанную Кокрановским сотрудничеством [15].

В большинстве экспериментальных исследований по регенерации пародонта использовали биосовместимые матрицы – скаффолды, предназначенные для доставки биоактивных молекул (факторы роста, лекарства) или стволовых клеток, обеспечения механической поддержки регенерирующих тканей, а также имитации внеклеточного матрикса, инициирующего участие клеток в регенерации и препятствующего воспалительному процессу, поскольку устойчивое воспаление может ухудшить ход регенерации [7, 22].

Гистологические исследования показали, что скаффолды сами по себе могут стимулировать образование кости и цемента [5, 28]. В частности, недавно разработанный трехслойный скаффолд из пористого гидрогеля, содержащего хитин-поли(молочно-ко-гликолевую кислоту), обогащенного цементным белком 1 (СЕМР1), фактором роста фибробластов 2 (FGF2) и факторами роста богатой тромбоцитами плазмы (БотП), был имплантирован в дефекты пародонта кроликов. Через 1 и 3 месяца гистологически продемонстрировано полное заживление пародонта и новообразование костной ткани [32].

Тем не менее практика показывает, что наилучшим вариантом терапии дефектов пародонта является сочетание костных трансплантатов, ММСК, направленной регенерации тканей с использованием синтетических биомембран или каркасов, а также добавление факторов, стимулирующих функционирование биоактивных молекул [8, 42].

ММСК способны дифференцироваться в том числе в остеобластическом и цементнобластном направлении [11]. Полученные из различных источников культуры должны соответствовать минимальным критериям для подтверждения принадлежности культивируемых клеток к ММСК, предложенным ISCT (the International Society for Cell Therapy) в 2006 году [9].

Из зубов и периодонтальных тканей были выделены стволовые клетки, которые обладают сходными свойствами *in vitro* с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками из костного мозга (КМ-ММСК).

В рассмотренных ниже экспериментальных исследованиях по репарации хирургически созданных дефектов пародонта были использованы аутогенные [12, 19, 20, 24–27, 31, 33, 34, 36, 44], аллогенные [6, 10, 13, 23, 41] и ксеногенные ММСК [16, 43] различного происхождения: КМ-ММСК [6, 24, 26, 31, 39, 41, 44], ММСК периодонтальной связки (ПДС-ММСК) [13, 23, 25, 27, 33, 34, 38], ММСК пульпы [19, 27], ММСК края десны [12, 43], индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) [10, 16], а также ММСК, полученные из жировой ткани [1, 2, 36], ММСК из цемента [25] и зубного фолликула [27]. Заявленные различия с контролем были статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Наиболее многочисленны исследования о влиянии КМ-ММСК на регенерацию пародонта.

Аллогенные КМ-ММСК усиливали образование костной ткани: 50,6% против 23,5% в области фенестрации через 3 недели после операции (п/о) [41] и дефектов фуркации корней III степени: 89,1% против 36,8% через 8 недель п/о [24], но не оказывали влияния на регенерацию кости при трехстенных дефектах альвеолярной кости [6]. Увеличение образования цемента при воздействии КМ-ММСК в смеси с ателлоколлагеном было получено при дефекте фуркации III степени: 65,6% против 31,1% через 8 недель п/о [24] и в области фенестрации: 60,0% против 30,0%

[41]. КМ-ММСК способствовали регенерации ПДС и упорядочиванию ориентации волокон в области фенестрации [41] и при трехстенных дефектах [6]. КМ-ММСК, применяемые совместно с коллагеновыми и вспененными политетрафторэтиленовыми мембранами, стимулировали образование кости: 83,7% против 24,7% через 8 недель п/о и высота 2,02 мм против 0,33 мм через 6 недель п/о, соответственно, цемента: 100% против 21% и высота 3,34 мм против 2,12 мм через 6 недель п/о, а также ПДС в дефектах фенестрации: 100% против 24,8% и высота 2,02 мм против 0,44 мм через 6 недель п/о [20, 44], но не повлияли на формирование ПДС [44].

Таким образом, было показано, что КМ-ММСК способствуют регенерации пародонта, стимулируя новообразование альвеолярной кости и формирование цемента и ПДС, однако трудности, связанные с получением этих клеток в условиях клиники путем инвазивной аспирации костного мозга, заставили исследователей обратить внимание на более доступные источники стволовых клеток [14].

Преимуществом использования стромальных клеток жировой ткани (ЖТ-ММСК) в регенеративной терапии пародонта является их простое и малоинвазивное получение. Было показано, что ЖТ-ММСК, смешанные с БотП, способствуют усилению остеогенеза [1, 2] и, в частности, регенерации альвеолярной кости и ПДС у крыс: 84,7% против 61,7% через 8 недель п/о [36]. Тем не менее добавление ЖТ-ММСК или КМ-ММСК к БотП не увеличило образование кости и цемента в дефектах фуркации класса II [31] и класса III у собак по сравнению с группой БотП [36]. Возможно, различия не были выявлены из-за недостаточной мощности статистических тестов [35].

Аутологичные ПДС-ММСК усиливали формирование альвеолярной кости (высота 7,0 мм против 1,0 мм через 8 недель п/о) и цемента в модели апикального периодонтита у собак [27] и дефектах фенестрации у крыс (костная ткань 80,0% против 30,0%, высота цемента 0,3 мм против 0,05 мм через 3 недели п/о) [13]. В трехстенных дефектах у собак ПДС-ММСК оказали положительное влияние только на регенерацию цемента: высота 4,07 мм против 1,56 мм через 3 месяца п/о [25]. В сочетании с биодegradуемыми мембранами ПДС-ММСК усиливали регенерацию кости, ПДС и цемента в дефектах фуркации класса II (костная ткань – площадь 9,02 мм² против 7,01 мм², высота цемента 8,08 мм против 6,0 мм, длина ПДС 7,26 мм против 3,94 мм через 3 месяца п/о) [34] и класса III у собак (костная ткань – высота 5,45 мм против 1,89 мм, высота цемента 4,01 мм против 1,7 мм, высота ПДС 3,43 мм против 0,69 мм через 3 месяца п/о) [33]. В аналогичных экспериментах на овцах введение ПДС-ММСК усиливало остеогенез (площадь 0,84 мм² против 0,26 мм² через 3 недели п/о) и не изменяло темпы регенерации цемента и ПДС по сравнению с группой, где использовали только мембраны [23].

Таким образом, данные о влиянии ПДС-ММСК на остеогенез были противоречивыми, но их использование неизменно приводило к усилению регенерации цемента и ПДС [13, 25, 38]. Известно, что в отличие от других ММСК ПДС-ММСК активно синтезируют некоторые ПДС-специфические белки (периостин, склераксис и α -SMA) и способны к формированию структур ПДС и цемента *in vivo*. По этим причинам предположили, что ПДС-ММСК наиболее подходят для регенерации пародонта [38]. Впрочем, проведенный недавно метаанализ показал, что регенерационные потенциалы ПДС-ММСК и КМ-ММСК практически не различаются [42].

Противоречивые результаты использования ММСК могут быть вызваны различиями в биологическом виде и возрасте доноров и гетерогенностью выделенных субпопуляций, количеством вводимых клеток и составом скаффолда [35]. Большое значение имеют также различия в протоколах изоляции и культивирования, определяющих регенеративный потенциал и эффективность ММСК. Например, КМ-ММСК эндоостеального и субэндоостеального происхождения функционально различаются [3]. Необходимы исследования по выявлению фенотипов ММСК *in vitro* с предсказуемым регенеративным потенциалом, проявляющимся *in vivo*.

Наряду с другими ММСК, используемыми для стимуляции регенерации пародонта, ММСК края десны успешно стимулировали регенерацию кости, цемента и ПДС в дефектах пародонта у собак (костная ткань 47,11% против 10,37%, длина цемента 68,0% против 24,0% от размера дефекта через 8 недель п/о) [43] и мини-свиней [12].

ММСК пульпы и ММСК зубного фолликула стимулировали регенерацию альвеолярной кости, ПДС и цемента (костная ткань – высота 4,0 мм и 5,0 мм, соответственно, против 1,0 мм через 8 недель п/о), а также периферического нерва и кровеносных сосудов, но менее активно по сравнению с аутологичными ПДС-ММСК [27]. ММСК, полученные из зубного цемента, увеличили образование цемента в трехстенных дефектах (3,98 мм² против 1,56 мм² через 3 месяца п/о), но не оказали влияния на регенерацию кости [25].

Ксеногенные ММСК, полученные из ИПСК человека, способствовали формированию кости, ПДС, цемента (минерализованная ткань – 51,31% против 23,8% через 2 недели п/о) и увеличению плотности кости у бестимусных мышей [16]. Усиление остеогенеза в дефектах фенестрации наблюдалось при использовании этих клеток совместно с производными эмалевой матрицы [10], которые ускоряют остеобластическую дифференцировку ММСК [17]. В свете того, что регенерация зависит от координированного действия ММСК и сигнальных молекул [14], результаты позволяют предположить, что стратегии терапии должны предусматривать сочетание ММСК с белками, участвующими в регенерации пародонта.

Выводы

Полное и контролируемое восстановление утраченных тканей пародонта остается еще нерешенной проблемой регенеративной медицины. Требуется разработка новых стратегий, способствующих контролируемой регенерации дефектов пародонта. Количественные результаты экспериментальных морфометрических исследований указывают на то, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки различного происхождения могут оказывать благотворное влияние на регенерацию пародонта. Вместе с тем существует необходимость в стандартизации методик морфологического анализа при проведении экспериментов на пародонте с целью повышения объективности при сравнении данных. Для успешной регенерационной терапии необходимо выбрать оптимальное сочетание клеток-предшественников, сигнальных молекул и скаффолдов и определить временную и пространственную последовательность их применения.

Работа выполнена в рамках госзаданий для ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» и ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России.

Литература/References

1. Бухарова Т.Б., Арутюнян И.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Федюнина И.А., Логовская Л.В., Волков А.В., Ржанинова А.А., Григорьян А.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и материала «Остеоматрикс» для регенерации костной ткани // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 3. С. 167–173. [Bukharova T.B., Arutyunyan I.V., Shustrov S.A., Alekseeva I.S., Fedyunina I.A., Logovskaya L.V., Volkov A.V., Rzhaniнова A.A., Grigor'yan A.S., Kulakov A.A., Gol'dshtein D.V. Tissue-engineering design based on multipotent stromal cells of adipose tissue and Osteomatrix material for bone tissue regeneration // Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine. 2011. V. 3. P. 167–173 (In Russ.).]
2. Бухарова Т.Б., Волков А.В., Антонов Е.Н., Вихрова Е.Б., Попова А.В., Попов В.К., Гольдштейн Д.В. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля // Гены и клетки. 2013. № 4. С. 61–68. [Bukharova T.B., Volkov A.V., Antonov E.N., Vikhrova E.B., Popova A.V., Popov V.K., Gol'dshtein D.V. Tissue-engineering design based on multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue, polylactide carriers and platelet gel // Geny i kletki. 2013. V. 4. P. 61–68 (In Russ.).]
3. Balduino A., Mello-Coelho V., Wang Z., Taichman R.S. et al. Molecular signature and in vivo behavior of bone marrow endosteal and subendosteal stromal cell populations and their relevance to hematopoiesis // Exp Cell Res. 2012;318:2427–37.

4. *Bartold P.M., Xiao Y., Lyngstaadas S.P., Paine M.L. et al.* Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration // *Periodontol.* 2000. 2006;41:123–35.
5. *Batool F., Strub M., Petit C., Bugueno I.M. et al.* Periodontal Tissues, Maxillary Jaw Bone, and Tooth Regeneration Approaches. From Animal Models Analyses to Clinical Applications // *Nanomaterials (Basel)*. 2018;May, 16;8(5). pii: E337.
6. *Cai X., Yang F., Yan X., Yang W. et al.* Influence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells pre-implantation differentiation approach on periodontal regeneration in vivo // *J Clin Periodontol.* 2015;42:380–9.
7. *Carmagnola D., Tarce M., Dellavia C., Rimondini L. et al.* Engineered scaffolds and cell-based therapy for periodontal regeneration // *J Appl Biomater Funct Mater.* 2017;Nov, 10;15(4):e303–e312.
8. *Cosgarea R., Gasparik C., Dudea D., Culic B. et al.* Peri-implant soft tissue colour around titanium and zirconia abutments: a prospective randomized controlled clinical study // *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(5): 537–44.
9. *Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I. et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
10. *Duan X., Tu Q., Zhang J., Ye J., Sommer C. et al.* Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration // *J Cell Physiol.* 2011;226:150–7.
11. *Estrela C., Alencar A.H., Kitten G.T., Vencio E.F. et al.* Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration // *Braz Dent J.* 2011;22:91–8.
12. *Fawzy El-Sayed K.M., Paris S., Becker S.T., Bähr T. et al.* Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study // *J Clin Periodontol.* 2012;39:861–70.
13. *Han J., Menicanin D., Marino V., Ge S. et al.* Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model // *J Periodontol Res.* 2014a;49:333–45.
14. *Han J., Menicanin D., Gronthos S., Bartold P.M.* Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration // *Australian Dental Journal.* 2014b;59:(1 Suppl): 117–30.
15. *Higgins J.P., Altman D.G., Gøtzsche P.C., Jüni P. et al.* The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials // *BMJ.* 2011;343:d5928.
16. *Hynes K., Menicanin D., Han J., Marino V. et al.* Mesenchymal stem cells from iPS cells facilitate periodontal regeneration // *J Dent Res.* 2013;92:833–39.
17. *Jue S.S., Lee W.Y., Kwon Y.D., Kim Y.R. et al.* The effects of enamel matrix derivative on the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells // *Clin Oral Implant Res.* 2010;21:741–6.
18. *Kassebaum N.J., Smith A.G., Bernabé E., Fleming T.D. et al.* Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors // *J Dent Res.* 2017;Apr;96(4):380–7.
19. *Khorsand A., Eslaminejad M.B., Arabsofghar M., Paknejad M. et al.* Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue // *J Oral Implantol.* 2013;39:433–43.
20. *Li H., Yan F., Lei L., Li Y. et al.* Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs // *Cells Tissues Organs.* 2009;190:94–101.
21. *Moher D., Shamseer L., Clarke M., Ghersi D. et al.* Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement // *Syst Rev.* 2015;Jan 1;4:1.
22. *Morand D.N., Davideau J.L., Clauss F., Jessel N. et al.* Cytokines during periodontal wound healing: Potential application for new therapeutic approach // *Oral Dis.* 2017;23, 300–11.
23. *Mrozik K.M., Wada N., Marino V., Richter W. et al.* Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model // *Regen Med.* 2013;8:711–23.
24. *Nagahara T., Yoshimatsu S., Shiba H., Kawaguchi H. et al.* Introduction of a mixture of beta-tricalcium phosphate into a complex of bone marrow mesenchymal stem cells and type I collagen can augment the volume of alveolar bone without impairing cementum regeneration // *J Periodontol.* 2015;86:456–64.
25. *Nuñez J., Sanz-Blasco S., Vignoletti F., Muñoz F. et al.* Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells // *J Periodontol Res.* 2012;47:33–44.
26. *Paknejad M., Eslaminejad M.B., Ghaedi B., Rokn A.R. et al.* Isolation and assessment of mesenchymal stem cells derived from bone marrow: histologic and histomorphometric study in a canine periodontal defect // *J Oral Implantol.* 2015;41:284–91.
27. *Park J.Y., Jeon S.H., Choung P.H.* Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis // *Cell Transplant.* 2011;20:271–85.
28. *Park J.S., Choi S.H., Moon I.S., Cho K.S. et al.* Eight-week histological analysis on the effect of chitosan on surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs // *J Clin Periodontol.* 2003;30(5): 443–53.
29. *Reddy M.S., Aichelmann-Reidy M.E., Avila-Ortiz G., Klokkevold P.R. et al.* Periodontal regeneration—furcation defects: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop // *J Periodontol.* 2015;86:S131–S133.
30. *Reynolds M.A., Kao R.T., Camargo P.M., Caton J.G. et al.* Periodontal regeneration—intrabony defects: a consensus report from the AAP Regeneration Workshop // *J Periodontol.* 2015;86:S105–S107.
31. *Simsek S.B., Keles G.C., Baris S., Cetinkaya B.O.* Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in the treatment of class II furcation defects in dogs // *Clin Oral Invest.* 2012;16:251–8.
32. *Sowmya S., Mony U., Jayachandran P.* Tri-layered nanocomposite hydrogel scaffold for the concurrent regeneration of cementum, periodontal ligament, and alveolar bone // *Adv Healthc Mater.* 2017;6(7):1601251.
33. *Suaid F.F., Ribeiro F.V., Gomes T.R., Silvério K.G. et al.* Autologous periodontal ligament cells in the treatment of Class III furcation defects: a study in dogs // *J Clin Periodontol.* 2012;39:377–84.
34. *Suaid F.F., Ribeiro F.V., Rodrigues T.L., Silvério K.G. et al.* Autologous periodontal ligament cells in the treatment of class II furcation defects: a study in dogs // *J Clin Periodontol.* 2011;38: 491–8.

35. Tassi S.A., Sergio N.Z., Misawa M.Y.O., Villar C.C. Efficacy of stem cells on periodontal regeneration: Systematic review of pre-clinical studies // J Periodontal Res. 2017;Oct;52(5): 793–812.
36. Tobita M., Uysal C.A., Guo X., Hyakusoku H. et al. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model // Cytotherapy. 2013;15:1517–26.
37. Tonetti M.S., Christiansen A.L., Cortellini P. Vertical subclassification predicts survival of molars with class II furcation involvement during supportive periodontal care // J. Clin. Periodontol. 2017;44,1140–4.
38. Tsumanuma Y., Iwata T., Kinoshita A., Washio K. et al. Allogeneic transplantation of periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cell sheets in canine critical-size supra-alveolar periodontal defect model // Biores Open Access. 2016;5: 22–36.
39. Tsumanuma Y., Iwata T., Washio K., Yoshida T. et al. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model // Biomaterials. 2011;32:5819–25.
40. Villar C.C., Cochran D.L. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration // Dent Clin North Am. 2010;54:73–92.
41. Yang Y., Rossi F.M., Putnins E.E. Periodontal regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells // Biomaterials. 2010;31:8574–82.
42. Yan X.-Z., Yang F., Jansen J.A., de Vries R.B. et al. Cell-based approaches in periodontal regeneration: a systematic review and meta-analysis of periodontal defect models in animal experimental work // Tissue Eng Part B Rev. 2015;21(5): 411–26.
43. Yu X., Ge S., Chen S., Xu Q. et al. Human gingiva-derived mesenchymal stromal cells contribute to periodontal regeneration in beagle dogs // Cells Tissues Organs. 2013;198:428–37.
44. Zhou W., Mei L. Effect of autologous bone marrow stromal cells transduced with osteoprotegerin on periodontal bone regeneration in canine periodontal window defects // Int J Periodontics Restorative Dent. 2012;32:e174–e181.

MORPHOMETRIC CRITERIA OF PERIODONT TISSUE REGENERATION

T.B. Bukharova, A.V. Vasiliev, E.V. Galitsyna, R.N. Magomedov, V.S. Kuznetsova, O.V. Makhnach, O.A. Zorina, D.V. Goldshtein

The results of experimental studies of periodontal regeneration using histological and morphometric analysis as the main evidence of regeneration are considered. The possible reasons for the discrepancy between the results in different studies are discussed. It is concluded that mesenchymal stem cells of various origin can have a beneficial effect on periodontal regeneration. For successful regenerative therapy, it is necessary to specify the optimal combination of progenitor cells, signal molecules and scaffolds and to determine the temporal and spatial sequence of their application.

Key words: regeneration, bone, morphometry, periodontium, MSC

Информация об авторах

Бухарова Татьяна Борисовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра.

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1. Телефон 8 (499) 324 2024. E-mail: bukharova-rmt@yandex.ru

Васильев Андрей Вячеславович – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела общей патологии ЦНИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, старший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра.

Адрес: 119991, Москва, ул. Тимура Фрунзе, д. 16. Телефон 8 (499) 246 1334. E-mail: vav-stom@yandex.ru

Галицына Елена Валерьевна – младший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра.

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1. Телефон 8 (499) 324 2024. E-mail: snowbars888@yandex.ru

Магомедов Раджаб Низамиевич – аспирант ЦНИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Адрес: 119991, Москва, ул. Тимура Фрунзе, д. 16. Телефон 8 (499) 246 1334. E-mail: Lakec007@mail.ru

Махнач Олег Владимирович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра.

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1. Телефон 8 (499) 324 2024. E-mail: dv@rm7.ru

Кузнецова Валерия Сергеевна – аспирант ЦНИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Адрес: 119991, Москва, ул. Тимура Фрунзе, д. 16. Телефон 8 (499) 246 1334. E-mail: tilia7@ya.ru

Зорина Оксана Александровна – доктор медицинских наук, начальник научно-учебного отдела ЦНИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Адрес: 119991, Москва, ул. Тимура Фрунзе, д. 16. Телефон 8 (499) 246 1334. E-mail: zorina-cniis@yandex.ru

Гольдштейн Дмитрий Вадимович – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра.

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1. Телефон 8 (499) 324 2024. E-mail: dvgoldrm7@gmail.com

Материал поступил в редакцию 20 сентября 2018 года

© Епишкина А.А., Кузнецов С.С., 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-28-4-43-49

УДК: 616.155.191-021.3

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕ АССОЦИИРОВАННЫХ С ФИЛАДЕЛЬФИЙСКОЙ ХРОМОСОМОЙ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

А.А. Епишкина, С.С. Кузнецов

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород

В обзоре с современных позиций рассмотрена дифференциальная диагностика Ph-негативных миелопролиферативных неоплазий.

Хронические миелопролиферативные заболевания либо характеризуются длительным течением с закономерной трансформацией в заболевание, неотличимое от острого лейкоза, либо претерпевают диспластические изменения, которые приводят к неэффективному гемопоэзу, а в ряде случаев замещению костного мозга фиброзной тканью, что делает прогноз при данной нозологии не всегда благоприятным. Эта группа заболеваний отличается разнообразием клинических проявлений, особенно в дебюте болезни, что создает сложности их дифференциальной диагностики. Поиск дополнительных критериев диагностики Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний в настоящее время представляет собой актуальную проблему патологоанатомического исследования в гематологии.

Ключевые слова: онкогематология, миелопролиферативные заболевания, дифференциальная диагностика

Рассматривая особенности онкогематологической патологии, на долю которой в структуре онкологической заболеваемости населения приходится 4,7% (по данным Всемирной организации здравоохранения и ведущих российских онкологических учреждений), следует заметить, что 15–20% из них составляют хронические миелопролиферативные (МПФ) опухоли [1, 7]. Более того, за последние 10 лет число пациентов с этой формой гемобластозов увеличилось в 1,5 раза и продолжает неуклонно расти [8, 30]. Особого внимания в этой группе заслуживают филадельфийски-негативные миелопролиферативные (Ph-негативные МПФ) заболевания: истинная полицитемия (ИП), первичный миелофиброз (ПМФ) и эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), диагностика которых в целом и дифференциальная диагностика в частности в немалом числе случаев представляют трудности, что в первую очередь обусловлено отсутствием четких клинических критериев в дебюте заболеваний [15].

Следует сказать, что Ph-негативные МПФ опухоли либо характеризуются длительным течением с закономерной трансформацией в заболевание, неотличимое от острого лейкоза, либо претерпевают диспластические изменения, которые приводят к неэффективному

гемопоэзу, а в ряде случаев замещению костного мозга фиброзной тканью, что делает прогноз при данной нозологии не всегда благоприятным [21].

Таким образом, поиск дополнительных критериев диагностики Ph-негативных МПФ заболеваний в настоящее время представляет собой актуальную проблему патологоанатомического исследования в гематологии [45].

Всемирная организация здравоохранения в связи с появлением новых данных совершенствует и корректирует критерии постановки диагноза при ЭТ, ИП, ПМФ [9, 46]. Ниже мы приводим круг методик исследования, используемых на современном этапе для диагностики этой группы заболеваний.

Молекулярные критерии постановки диагноза

Поводом для оптимизации критериев диагностики МПФ состояний послужило открытие в 2005 году мутации V617F в гене *JAK2* [11].

Известно, что эта мутация приводит к независимому от цитокинов росту гемопоэтических предшественников и, следовательно, перепроизводству линии миелоидных клеток.

С 2008 года к большим критериям диагностики Ph-негативных МПФ заболеваний стали относить наличие мутации *JAK2V617F* [46].

У всех пациентов с ИП, как правило, выявляется мутация *JAK2*: в 96% случаев мутация в 14-м экзоне этого гена, и в 2% наблюдений мутация затрагивает 12-й экзон [29, 43]. При ЭТ мутация *JAK2V617F* определялась в 55% наблюдений. При ПМФ исследователям удалось обнаружить ее в 45–68% случаев [12, 34, 36, 43]. В свою очередь, авторы отмечают, что мутация в 12-м экзоне гена *JAK2* практически не встречается при ЭТ и ПМФ [36].

Как было показано в дальнейших исследованиях James et al. (2005; 2006), *JAK2V617F* мутация определялась у 43/45 пациентов с диагнозом «истинная полицитемия» (96%), в то время как при эссенциальной тромбоцитемии она присутствовала в 30% случаев, а при первичном миелофиброзе в 50% [18, 19].

Peter J. Campbell et al. в 2005 году установили различия в картине костного мозга, частоте и характере осложнений у пациентов с *JAK2V617F* мутацией и без нее [13, 31].

В работах Ayalew Tefferi et al. подчеркивается, как важен поиск других тирозинкиназовых мутаций при миелофиброзе, эссенциальной тромбоцитемии и истинной полицитемии у пациентов с отсутствием мутации *JAK2V617F* [33]. Помимо мутации *JAK2* у пациентов с миелопролиферативными заболеваниями (МПЗ) выявляют мутации и в других генах. Мутация гена *MPL* (наиболее часто *MPLW515L*), открытая в 2006 году, обнаруживается у пациентов с ПМФ и ЭТ в 8% и 4% случаев, соответственно, и практически не встречается при ИП [28].

В 2013 году T. Klampfl обнаружил у пациентов с ПМФ, не имеющих мутаций *MPL*, *JAK2* мутацию гена *CALR*. Мутации были выявлены у 67% пациентов с ЭТ и у 88% с ПМФ при негативных мутациях *MPL*, *JAK2* [20].

С 2016 года мутации *CALR* и *ML* также включены в критерии молекулярной диагностики ПМФ и ЭТ [9]. Со временем были открыты и другие соматические мутации генов *TET2*, *EZH2*, *DNMT3A* и *ASXL1*, которые могут происходить до появления клона с мутацией *JAK2*, одновременно или как позднее молекулярное событие во время прогрессирования заболевания [44].

Мутации генов *JAK2*, *MPL*, *CALR* не являются строго специфичными для МПЗ. Современные знания и открытый вопрос о том, как *JAK2* мутация может проявляться тремя фенотипами заболевания, свидетельствуют, что мутация *JAK2V617F* может быть вторичным событием в патогенезе МПН [6].

Несмотря на то, что молекулярные перестройки играют важную роль в диагностике Ph-негативных МПФ неоплазий, диагноз при отсутствии мутаций *JAK2*, *MPL*, *CALR* устанавливается после исключения других заболеваний, в первую очередь хронического миелолейкоза [17].

Для уточнения роли иных молекулярных событий в формировании фенотипа каждой отдельной нозологии в группе Ph-негативных МПФ необходимы дополнительные исследования. Молекулярные механизмы до конца не изучены и не могут выступать в качестве стандарта дифференциальной диагностики хронических МПФ заболеваний [26].

Морфологическое исследование трепанобиопсии костного мозга

Наряду с молекулярно-генетическими данными важную роль в диагностике Ph-негативных МПФ заболеваний отводят гистологическому исследованию трепанобиоптатов костного мозга. С 2008 года трепанобиопсия костного мозга с последующим морфологическим исследованием стала обязательным методом для постановки диагноза ЭТ и ПМФ, а с 2017-го, после пересмотра критериев диагностики миелопролиферативных опухолей ВОЗ, гистологическое исследование костного мозга включено в стандарты обследования пациентов с подозрением на ИП [5, 46].

Истинная полицитемия

Истинная полицитемия (эритремия, болезнь Вакеза, истинная красная полицитемия) – хроническое миелопролиферативное заболевание, характеризующееся поражением гемопоэтической стволовой клетки с последующей мутацией, ведущей к пролиферации эритроидного, мегакариоцитарного, гранулоцитарного ростков миелопоэза, с преимущественной пролиферацией эритроидного ростка кроветворения, увеличением числа эритроцитов и повышением уровня гемоглобина, тромбоцитозом, лейкоцитозом в периферической крови (панцитоз), независимостью эритропоэза от нормальных механизмов регуляции [35].

Почти все пациенты с ИП являются носителями мутации *JAK2V617F* или другой функционально сходной мутации, упоминавшейся выше. Критерии для установления (постановки) диагноза «истинная полицитемия», используемые с 2017 года, отражены в таблице 1 [9].

Таблица 1

Критерии диагностики истинной полицитемии (2017)

Большие критерии
Гемоглобин >165 г/л у мужчин, 160 г/л у женщин или гематокрит >49% у мужчин, >48% у женщин
Гиперклеточный костный мозг, трехростковая пролиферация – мегакариоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, наличие плеоморфных зрелых мегакариоцитов
Наличие мутации <i>JAK2V617F</i> или мутаций в 12-м экзоне гена <i>JAK2</i>
Малые критерии
Субнормальный уровень эритропоэтина

В ИП до трансформации выделяют два периода – начальный и фазу постполицитемического миелофиброза. В начальной стадии (пролиферативной/полицитемической) морфологическая картина трепанобиоптата костного мозга характеризуется гиперплазией миелоидной ткани за счет всех ее ростков, происходит увеличение клеточности костного мозга по сравнению с возрастной нормой, лейкоэритробластическое соотношение приближается к 1:1. В эритроидном ростке клетки нормобластичны, разной степени зрелости, компактных островков эритропоэза не наблюдается. В гранулоцитарном ростке созревание сохраняется, преобладают созревающие и зрелые гранулоциты. Количество мегакарицитов повышается, их размеры увеличиваются, наблюдается клеточный полиморфизм, однако гиперлобулярные ядра и ядра резко уродливой формы встречаются редко. Ретикулиновый фиброз не выражен. Неоостеогенез отсутствует [25].

При переходе в постполицитемический миелофиброз в костном мозге преобладают изменения в виде ретикулинового и коллагенового фиброза. Клеточность костного мозга уменьшается из-за редукции эритроцитарного ростка. В гранулоцитарном ростке увеличивается количество незрелых форм. Мегакарициты располагаются группами, выражен полиморфизм. Позднее развивается остеосклероз [4].

В исследовании, включавшем 71 пациента, U. Gianelli et al. показали, как важна трепанобиопсия костного мозга в дифференциальной диагностике ИП и префиброзной стадии миелофиброза. У некоторых пациентов с клинико-лабораторной картиной, соответствующей диагнозу «истинная полицитемия», костный мозг был нормоклеточный, мегакарициты характеризовались атипией, определялся фиброз MF 1–2-й степени, что стало решающим фактором в постановке диагноза миелофиброза [16].

Первичный миелофиброз

Первичный миелофиброз (хронический идиопатический миелофиброз, агногенная миелоидная метаплазия, миелосклероз с миелоидной метаплазией, сублейкемический миелоз, хронический гранулоцитарно-мегакариоцитарный миелоз) – это хроническое миелопролиферативное новообразование, возникающее *de novo*, характеризуется клональной пролиферацией стволовых клеток, аномальной экспрессией цитокинов, фиброзом костного мозга, гепатоспленомегалией, экстрамедуллярным гемопоэзом, симптомами опухолевой интоксикации, кахексией, лейкоэритробластозом в периферической крови, лейкоэмической прогрессией и низкой выживаемостью пациентов [3].

Эксперты ВОЗ в пересмотренной классификации 2017 года предложили критерии для выделения двух стадий ПМФ – префиброзной/ранней и фиброзной. Особо оцениваются при первичном миелофиброзе показатель минимального фиброза (MF) и изменения

мегакариоцитов. Критерии диагностики первичного миелофиброза отображены в таблице 2 [9].

Изменения микроскопической картины костного мозга в зависимости от стадий заболевания следующие. Для префиброзной стадии первичного миелофиброза характерной является гиперплазия мегакариоцитарного и гранулоцитарного ростков (с незначительным сдвигом влево). Эритроидный росток нормобластический, сужен. Количество ретикулиновых волокон небольшое (MF0-1). Количество мегакариоцитов увеличено, они образуют рыхлые отдельные плотные компактные группы. Размеры мегакариоцитов крайне переменчивы – от микроформ до гигантских. Ядра с выраженной дольчатостью, видны нарушения конденсации хроматина. Располагаются чаще всего группы мегакариоцитов возле кровеносных синусоидов и паратрабекулярно, что в норме для них нехарактерно [41].

По мере эволюции наступает миелофибротическая стадия, характеризующаяся нарастающим фиброзом и уменьшением клеточности костного мозга. В гранулоцитарном и эритроцитарном ростках видны признаки слабой атипии. Степень минимального фиброза – MF2-3. Среди мегакариоцитов преобладают гиполобулярные и гиперхромные ядра. Кровеносные синусы расширены, в их просвете обнаруживаются атипичные мегакариоциты. В последующем происходит остеомиелосклероз, в ходе которого можно наблюдать патологический прямой остеогенез, из-за чего костномозговые трабекулы утолщаются, а костномозговое пространство сужаются [37, 39, 42].

Эссенциальная тромбоцитемия

Эссенциальная тромбоцитемия (первичный тромбоцитоз, идиопатический тромбоцитоз, геморрагическая тромбоцитемия) – клональное миелопролиферативное заболевание с неконтролируемой пролиферацией мегакариоцитов, характеризующееся повышенным числом крупных и гигантских мегакариоцитов в костном мозге, тромбоцитозом в периферической крови ($>450 \times 10^9/\text{л}$) и клинически – с риском развития сосудистых тромбозов и тромбоэмболий [2].

Истинную эссенциальную тромбоцитемию с учетом пересмотренной классификации ВОЗ необходимо диагностировать на основе морфологического изучения трепанобиоптатов костного мозга, принимая во внимание отсутствие или наличие ретикулинового фиброза (табл. 3) [9].

При гистологическом исследовании трепанобиопсии костного мозга обнаруживается нормо- и гиперклеточный (реже) вариант, иногда имеет место гипоклеточный. Лейкоэритробластическое соотношение близко к норме. В гранулоцитарном ростке преобладают зрелые формы, эритроидный росток нормобластический. Ретикулиновых волокон мало, однако встречаются случаи, где ретикулиновый фиброз выражен. Существенные изменения наблюдаются в мегакариоцитах, их количество в биоптате костного мозга может быть существен-

Критерии диагностики первичного миелофиброза (2017)

Большие критерии	
Префиброзная стадия ПМФ	Фиброзная стадия ПМФ
Пролиферация и атипия мегакариоцитов при отсутствии фиброза более 1-й степени, а также увеличение клеточности костного мозга, расширение гранулоцитопоза и сужение эритропоза	Пролиферация и атипия мегакариоцитов при наличии ретикулинового и/или коллагенового фиброза 2-й или 3-й степени
Несоответствие критериям ВОЗ ИП, ПМФ, МДС, BCR/ABL1-позитивного хронического миелолейкоза или другого заболевания	Несоответствие критериям ВОЗ ИП, ПМФ, МДС, BCR/ABL1-позитивного хронического миелолейкоза или другого заболевания
Наличие мутаций в генах <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> или <i>MPL</i> либо другого клонального маркера, отсутствие вторичного характера фиброза в костном мозге	Наличие мутаций в генах <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> или <i>MPL</i> либо другого клонального маркера, отсутствие вторичного характера фиброза в костном мозге
Малые критерии	
Анемия	Анемия
Увеличение уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ)	Увеличение уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ)
Пальпируемая спленомегалия	Пальпируемая спленомегалия
Лейкоциты $\geq 11 \times 10^9/\text{л}$	Лейкоциты $\geq 11 \times 10^9/\text{л}$
	Лейкоэритробластическая картина крови

Таблица 3

Критерии диагностики эссенциальной тромбоцитемии (2017)

Большие критерии
Гемоглобин >165 г/л у мужчин, 160 г/л у женщин или гематокрит $>49\%$ у мужчин, $>48\%$ у женщин
Гиперклеточный костный мозг, трехростковая пролиферация – мегакариоцитов, гранулоцитов, эритроцитов, наличие плеоморфных зрелых мегакариоцитов
Наличие мутации <i>JAK2V617F</i> или мутаций в 12-м экзоне гена <i>JAK2</i>
Малые критерии
Субнормальный уровень эритропоэтина

но увеличено, при этом расположены они диффузно. Мегакариоциты достигают гигантских размеров, ядра гиперплоидные с выраженной дольчатостью [14].

Таким образом, детально описанные структурные изменения костного мозга при Ph-негативных МПФ новообразованиях на сегодняшний день представляют собой базис для их дифференциальной диагностики в случаях развернутой клинической картины, но могут быть недостаточны при начале заболевания. Довольно часто обнаруживается, что пациенты, поступившие в клинику с диагнозом «эссенциальная тромбоцитемия», на самом деле находятся на ранней стадии ПМФ с выраженной тромбоцитемией. Или, например,

продромальная фаза ИП, которая в ряде случаев имитирует ЭТ, не может быть распознана по традиционным клиническим критериям, но имеет характерную гистопатологическую картину [32, 38, 40].

Иммуногистохимическое исследование

В дополнение к обычному морфологическому анализу трепанобиопсии костного мозга в диагностике Ph-негативных МПФ новообразований используют иммуногистохимический метод.

Облигатным исследованием при Ph-негативных миелолипролиферативных новообразованиях является определение уровня экспрессии CD34 – иммуногистохимического маркера трансмембранного белка стволовых клеток, незрелых клеток миелопоэза, эндотелиальных клеток капилляров и фибробластов.

Помимо этого, ведутся научные разработки использования других маркеров и биологически активных субстанций, участвующих в гемопоэзе, но зачастую выясняется, что ценность их невелика. Например, в исследованиях С. Wickenhauser et al. были получены достоверные различия численности популяции клеток, экспрессирующих CD3, CD34, CD61, MPO и GYPA при Ph-негативных МПФ новообразованиях [47, 38].

Кроме того, разница в экспрессии маркеров между ИП, ПМФ и ЭТ обычно присутствует только на ранних этапах заболевания и ее выявление субъективно [22].

В связи с этим немецкой группой исследователей К. Aumann et al. был предложен NF-E2 (ядерный фактор эритроцитов 2) в качестве иммуногистохимиче-

ского маркера для дифференциальной диагностики ЭТ и ПМФ. По результатам исследования в 92% случаев диагноз «первичный миелофиброз» был поставлен правильно и лишь в 8% идентифицирован неверно [10].

Новые способы диагностики

В настоящее время работа в этом направлении ведется по линиям изучения и оценки состояния костного мозга с акцентом на его архитектуру, изменения его биохимических свойств, качество и структуру клеточных форм гемопоэтической ткани, состав экстрацеллюлярного матрикса.

В частности, с целью более подробного изучения морфологии мегакариоцитов при хронических миелопролиферативных заболеваниях М. Muth et al. рассматривали proplatelet formation, или псевдоподии, у мегакариоцитов – длинные цитоплазматические расширения, участвующие в генерации тромбоцитов [27]. Авторы выяснили, что при измерении методом конфокальной микроскопии флуоресценции безъядерной цитоплазмы псевдоподий, меченных антителами к маркеру тромбоцитов CD42b, наблюдается их значительное расширение при префибротической фазе ПМФ ($p < 0,05$) и ЭТ ($p < 0,05$) по сравнению с нормальным гематопозом ($p < 0,001$). Тем не менее существенной разницы между псевдоподиями при ПМФ и ЭТ обнаружено не было.

L.G. Lundberg et al. в 2000 году и Н.М. Kvasnicka, J. Thiele в 2004 году выделили в качестве нового способа дифференциальной диагностики хронических миелопролиферативных заболеваний оценку ангиогенеза и архитектуры сосудистого русла. В сравнении с нормальным в костном мозге при хронических миелопролиферативных заболеваниях наблюдается значительное увеличение плотности микрососудов, функционально связанное с повышенными уровнями ангиогенных цитокинов. Структура сосудов была изменена, показав большую неправильность формы и извилистость. При ПМФ определялись короткие, извитые сосуды, их плотность составляла 14,4 условные единицы (у.е.). Для ЭТ характерны прямые, более извитые сосуды, плотность микрососудов составляла 5,9 у.е. (норма – 5,3 у.е.) [23, 24].

Заключение

Диагностика Ph-негативных миелопролиферативных новообразований ведется по многим направлениям изучения структурных особенностей этих заболеваний, в том числе с использованием различных методов морфологического исследования. Тем не менее вопросы дифференциального диагноза остаются не до конца решенными. Таким образом, разработка новых способов и критериев морфологической оценки является оправданным шагом на пути изучения этой группы болезней и требует поиска новых алгоритмов исследований с целью оптимизации диагностического процесса и повышения его достоверности.

Литература/References

1. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С., Абдулкадырова А.С., Удалева В.Ю., Головченко Р.А., Зотова И.И., Полушкина Л.Б., Фоминых М.С., Жернякова А.А. Первичный миелофиброз: 20-летний опыт диагностики и лечения // Гематология и трансфузиология. 2014. № 1. С. 32. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S., Abdulkadyrov A.S., Udaleva V.Yu., Golovchenko R.A., Zotova I.I., Polushkina L.B., Fominykh M.S., Zhernyakova A.A. Primary myelofibrosis: 20 years of experience in diagnosis and treatment // Gematologiya i transfuziologiya. 2014. V. 1. P. 32 (In Russ.).]
2. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С., Удалева В.Ю., Фоминых М.С. Современные представления о диагностике и лечении эссенциальной тромбоцитемии // Вестник гематологии. 2014. № 1. С. 4–39. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S., Udaleva V.Yu., Fominykh M.S. Modern concepts of diagnosis and management of essential thrombocythemia // Vestnik gematologii. 2014. V. 1. P. 4–39 (In Russ.).]
3. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Первичный миелофиброз: собственный опыт и новое в диагностике и лечении // Онкогематология. 2015. № 2. С. 26–36. doi: 10.17650/1818-8346-2015-10-2-26-36. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S. Primary myelofibrosis: own experience and news from diagnostic and treatment // Onkogematologiya. 2015. V. 2. P. 26–36. (In Russ.).]
4. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С., Шихбабаева Д.И. Современные представления о диагностике и лечении истинной полицитемии // Вестник гематологии. 2015. № 11(1). С. 4–46. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S., Shikhbabaeva D.I. Modern concepts of diagnosis and treatment of polycythemia vera // Vestnik gematologii. 2015. V. 11(1). P. 4–46 (In Russ.).]
5. Глузман Д.Ф., Склярченко Л.М., Ивановская Т.С., Коваль С.В., Завелевич М.П., Украинская Н.И., Теплегеев Г.Д., Дыбков М.В. Новое в классификации ВОЗ миелоидных новообразований и острых лейкозов (пересмотр 2016 г.) // Онкология. 2016. № 18(3). С. 184–191. [Gluzman D.F., Sklyarenko L.M., Ivanivskaya T.S., Koval S.V., Zavelevich M.P., Ukrainskaya N.I., Telegееv G.D., Dybkov M.V. New in the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia (revision 2016) // Onkologiya. 2016. V. 18(3). P. 184–191 (In Russ.).]
6. Меликян А.Л., Суборцева И.Н. Биология миелопролиферативных новообразований // Клиническая онкогематология. 2016. № 9(3). С. 314–325. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-314-325 [Melikyan A.L., Subortseva I.N. Biology of Myeloproliferative Malignancies // Clinical oncohematology. 2016. V. 9(3). P. 314–325 (In Russ.).]
7. Петрова Г.В., Грецова О.П. Злокачественные новообразования у детей. В кн.: Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2017. С. 246–247 [Petrova G.V., Gretsova O.P. Malignant neoplasms in children. In: Malignant neoplasms in Russia in 2015 (incidence and mortality) / Eds.

- by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. M.: MNIОI imeni P.A. Gercena – filial FGBU “NMIC radiologii” Minzdrava Rossii, 2017. P. 246–247 (In Russ.).
8. *Петрова Г.В., Каприн А.Д., Грецова О.П., Старинский В.В.* Злокачественные новообразования в России (обзор статистической информации за 1993–2013 гг.) / Под ред. А.Д. Каприн, В.В. Старинского. М.: МНИОИ имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2015. С. 488–510 [*Petrova G.V., Kaprin A.D., Gretsova O.P., Starinskii V.V.* Malignant neoplasms in Russia (the review of statistical information for 1993-2013) / Eds. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky. M.: MNIОI imeni P.A. Gercena – filial FGBU “NMIC radiologii” Minzdrava Rossii, 2015. P. 488–510 (In Russ.)].
 9. *Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J. et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. // *Bloodjournal*. 2016;127:2391–405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
 10. *Aumann K., Frey A.V., May A.M., Hauschke D. et al.* Subcellular mislocalization of the transcription factor NF-E2 in erythroid cells discriminates prefibrotic primary myelofibrosis from essential thrombocythemia // *Blood*. 2013;Jul 4:122(1):93–9. doi: 10.1182/blood-2012-11-463257.
 11. *Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., East C. et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // *Lancet*. 2005;365(9464):1054–61. doi:10.1016/S0140-6736(05)71142-9.
 12. *Campbell P.J., Scott L.M., Baxter E.J., Bench A.J. et al.* Methods for the detection of the JAK2 V617F mutation in human myeloproliferative disorders // *Methods Mol Med*. 2006;125:253–64. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16502590>.
 13. *Campbell P.J., Scott L.M., Buck G., Wheatley K. et al.* Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study // *Lancet*. 2005;366:1945–53. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67785-9.
 14. *Flora R., Lloyd T., Luqmani A., Naresh K.N.* Bone marrow trephine biopsy findings in essential thrombocythemia // *Am J Hematol*. 2011;Aug;86(8):697–8. doi: 10.1002/ajh.22059.
 15. *Gianelli U., Bossi A., Cortinovis I., Sabbatini E. et al.* Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms // *Modern Pathology*. 2014;27,814–22. doi:10.1038/modpathol.2013.196.
 16. *Gianelli U., Cattaneo D., Bossi A., Cortinovis I. et al.* The myeloproliferative neoplasms, unclassifiable: clinical and pathological considerations // *Mod Pathol*. 2017;30(2):169–79. doi: 10.1038/modpathol.2016.182.
 17. *Gong J.Z., Cook J.R., Greiner T.C., Hedvat C. et al.* Laboratory Practice Guidelines for Detecting and Reporting JAK2 and MPL Mutations in Myeloproliferative Neoplasms // *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013;15(6):733–44. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.07.002.
 18. *James C., Delhommeau F., Marzac C., Teyssandier I. et al.* Detection of JAK2 V617F as a first intention diagnostic test for erythrocytosis // *Leukemia*. 2006;20:350–3. doi: 10.1038/sj.leu.2404069.
 19. *James C., Ugo V., Le Couédic J.P., Staerk J. et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera // *Nature*. 2005;434:1144–8. doi:10.1038/nature03546.
 20. *Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S., Nivarthi H. et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms // *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379–90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347.
 21. *Kreipe H., Hussein K., Göhring G., Schlegelberger B.* Progression of myeloproliferative neoplasms to myelofibrosis and acute leukaemia // *J Hematopathol*. 2011;4:61–8. <https://doi.org/10.1007/s12308-011-0096-6>
 22. *Kvasnicka H.M., Griesshammer M.* Differenzial diagnose myeloproliferativer Neoplasien // *Trillium Krebsmedizin*. 2015;24(6): 356–60.
 23. *Kvasnicka H.M., Thiele J.* Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders // *Histol Histopathol*. 2004;19(4):1245–60. doi: 10.14670/HH-19.1245.
 24. *Lundberg L.G., Lerner R., Sundelin F. et al.* Bone marrow in polycythemia vera, chronic myelocytic leukemia, and myelofibrosis has an increased vascularity // *Am J Pathol*. 2000;Jul;157(1):15–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64511-7.
 25. *Michiels J.J.* Bone marrow histopathology and biological markers as specific clues to the differential diagnosis of essential thrombocythemia, polycythemia vera and prefibrotic or fibrotic agnogenic myeloid metaplasia // *Hematol J*. 2004;5:93–102. doi: 10.1038/sj.thj.6200368.
 26. *Morgan K.J., Gilliland D.G.* A role for JAK2 mutations in myeloproliferative diseases // *Annu Rev Med*. 2008;59:213–22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919086>
 27. *Muth M., Büsche G., Bock O., Hussein K. et al.* Aberrant proplatelet formation in chronic myeloproliferative neoplasms // *Leuk Res*. 2010;34(11):1424–9. doi: 10.1016/j.leukres.2010.03.040.
 28. *Pardanani A., Lasho T.L., Finke C.M., Tefferi A.* Infrequent occurrence of MPL exon 10 mutations in polycythemia vera and post-polycythemia veramyelofibrosis // *Am J Hematol*. 2011;86:701–2. doi: 10.1002/ajh.22058.
 29. *Pardanani A., Lasho T.L., Finke C., Hanson C.A. et al.* Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera // *Leukemia*. 2007;21:1960–3. doi: 10.1038/sj.leu.2404810. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17597810>
 30. *Rollison D.E., Howlander N., Smith M.T., Strom S.S. et al.* Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs // *Blood journal*. 2008;112:45–52. doi:10.1182/blood-2008-01-134858.
 31. *Rumi E., Cazzola M.* Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms // *Blood*. 2017;129(6):680–92. doi:10.1182/blood-2016-10-695957.
 32. *Sanchez S., Ewton A.* Essential thrombocythemia: a review of diagnostic and pathologic features // *Arch Pathol Lab Med*. 2006;Aug.130(8):1144–50. doi: 10.1043/1543-2165(2006)130[1144:ET]2.0.CO;2.
 33. *Tefferi A., Sirhan S., Lasho T.L., Schwager S.M. et al.* Concomitant neutrophil JAK2V617F mutation screening and PRV-1 ex-

- pression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia // *Br J Haematol.* 2005;131:166–71. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05743.x.
34. *Tefferi A., Thiele J., Orazi A., Kvasnicka H.M. et al.* Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: Recommendations from an ad hoc international expert panel // *Blood.* 2007;110:1092–7. doi: 10.1182/blood-2007-04-083501.
 35. *Tefferi A., Vainchenker W.* Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies // *J Clin Oncol.* 2011;29(5):573–82. doi:10.1200/JCO.2010.29.8711.
 36. *Tefferi A.* Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia // *J Clin Oncol.* 2005;23(33):8520–30. doi: 10.1200/JCO.2004.00.9316.
 37. *Thiele J., Kvasnicka H.M., Schmitt-Graeff A., Diehl V.* Bone marrow histopathology following cytoreductive therapy in chronic idiopathic myelofibrosis // *Histopathology.* 2003;Nov.43(5):470–9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636273>
 38. *Thiele J., Kvasnicka H.M., Schmitt-Graeff A., Zirbes T.K. et al.* Bone Marrow Features and Clinical Findings in Chronic Myeloid Leukemia – A Comparative, Multicenter, Immunohistological and Morphometric Study on 614 Patient // *Leuk Lymphoma.* 2000;36(3–4):295–308. doi: 10.3109/10428190009148850.
 39. *Thiele J., Kvasnicka H.M., Werden C., Zankovich R. et al.* Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact // *Leuk Lymphoma.* 1996;Jul.22(3–4):303–17. doi:10.3109/10428199609051762.
 40. *Thiele J., Kvasnicka H.M.* Clinicopathology and histochemistry on bone marrow biopsies in chronic myeloproliferative disorders—a clue to diagnosis and classification // *Pathol Biol (Paris).* 2001;49(2):140–7. doi: 10.1016/S0369-8114(00)00019-5.
 41. *Thiele J., Kvasnicka H.M.* Myelofibrosis – what’s in a name? Consensus on definition and EUMNET grading // *Pathobiology.* 2007;74(2):89–96. doi: 10.1159/000101708.
 42. *Thiele J., Kvasnicka H.M., Facchetti F., Franco V. et al.* European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity // *Haematologica.* 2005;90(8):1128–32. doi: 10.1159/000101708.
 43. *Vannucchi A.M., Antonioli E., Guglielmelli P., Pardanani A. et al.* Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: A critical reappraisal // *Leukemia.* 2008;22:1299–307. doi: 10.1038/leu.2008.
 44. *Vannucchi A.M., Lasho T.L., Guglielmelli P., Biamonte F. et al.* Mutations and prognosis in primary myelofibrosis // *Leukemia.* 2013;27(9):1861–9. doi: 10.1038/leu.2013.119.
 45. *Vannucchi A.M., Guglielmelli P., Tefferi A.* Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms // *A Cancer Journal for Clinicians.* 2009;59(3):171. doi: 10.3322/caac.20009.
 46. *Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D. et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes // *Blood.* 2009;114:937–51. doi: 10.1182/blood-2009-03-209262.
 47. *Wickenhauser C., Pérez F., Siebolts U. et al.* Structural, antigenetic and transcriptional characteristics in peripheral blood CD34+ progenitor cells from polycythemia vera patients: evidence for delayed determination // *International Journal of Oncology.* 2003;23(2):437–43. doi: 10.3892/ijo.23.2.437.

HISTOLOGIC DIFFERENTIAL DIAGNOSIS FOR PHILADELPHIA CHROMOSOME-NEGATIVE MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASM: PROBLEM STATEMENT

A.A. Epishkina, S.S. Kuznetsov

The review considers current perspectives on differential diagnosis for Ph-negative myeloproliferative neoplasm. Chronic myeloproliferative diseases are characterized either by a long course with regular transformation into a disease indistinguishable from acute leukemia, or undergo dysplastic changes that lead to ineffective hematopoiesis, and in some cases, to bone marrow replacement with fibrous tissue, which makes the prognosis for this nosology not always favorable. This group of diseases is featured by a variety of clinical manifestations, especially on the onset of the disease, which creates difficulties on differential diagnosing. The search for additional criteria for the diagnosis of Ph-negative myeloproliferative diseases is currently an urgent problem of histopathological examination in hematology.

Key words: oncohematology, myeloproliferative disease, differential diagnosis

Информация об авторах

Кузнецов Сергей Станиславович – доктор медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Приволжского исследовательского медицинского университета.

Адрес: 603005, Нижний Новгород, площадь Минина и Пожарского, д. 10/1.

Епишкина Анна Алексеевна – аспирант кафедры патологической анатомии Приволжского исследовательского медицинского университета.

Адрес: 603005, Нижний Новгород, площадь Минина и Пожарского, д. 10/1. Телефон +7 902 784 3777. E-mail:afina-nn@mail.ru

Материал поступил в редакцию 19 сентября 2018 года

РОЛЬ ДЕЦИДУАЛИЗАЦИИ ЭНДОМЕТРИЯ В НАСТУПЛЕНИИ И РАЗВИТИИ БЕРЕМЕННОСТИ

И.М. Богданова, Т.В. Фокина, И.И. Степанова, М.Н. Болтовская, А.П. Милованов

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва

В течение репродуктивного периода женщин эндометрий матки претерпевает циклические постовуляторные морфофункциональные изменения, индуцированные подъемом уровня прогестерона. Ключевым событием в становлении и прогрессировании беременности является децидуализация – процесс дифференцировки эндометриальных стромальных клеток в специализированные секреторные децидуальные клетки. Морфологическая трансформация клеток стромы сопровождается функциональным репрограммированием – продукцией широкого спектра биологически активных молекул, включая цитокины, хемокины, гормоны, ферменты, факторы роста. В обзоре описаны молекулярные механизмы децидуализации эндометрия, функциональная роль децидуальных клеток в важнейших процессах, определяющих успешное развитие беременности, таких как имплантация, цитотрофобластическая инвазия, регуляция гемостаза, обеспечение иммунной толерантности матери к полуаллогенному плоду и резистентности к инфекции и окислительному стрессу.

Ключевые слова: эндометрий, децидуализация, децидуальные клетки, иммунные клетки

В течение всего репродуктивного периода женщины эндометрий претерпевает циклические изменения, которые у человека инициируются в секреторной фазе менструального цикла в ответ на постовуляторный подъем уровня прогестерона (ПГ). Этот процесс перестройки эндометрия, направленный на подготовку к имплантации эмбриона и продолжающийся при наступлении беременности, известен как децидуализация и проявляется изменениями желез матки, дифференцировкой эндометриальных стромальных клеток (ЭСК) в секреторные децидуальные клетки (ДК), а также притоком маточных естественных киллерных (uterine natural killer, uNK) клеток и макрофагов, ремоделированием кровеносных сосудов [6, 18, 20]. Более ограниченное определение децидуализации означает морфофункциональную дифференцировку ЭСК в ДК с высокой секреторной активностью [18]. Механизмы децидуализации включают сложное координированное взаимодействие сигнальных путей, факторов транскрипции и морфогенов. После стимуляции децидуализации дифференцирующиеся ЭСК секретируют ряд цитокинов, обеспечивающих продолжение этого процесса. Прогестеронзависимая морфологическая перестройка фибробластоподобных ЭСК в эпителиоидные ДК сопровождается изменением продукции сигнальных молекул, транскрипционных факторов, гормонов, цитокинов, хемокинов, ростовых и ангиогенных факторов, адгезионных молекул, рецепторов и лигандов,

регуляторов клеточного цикла и компонентов внеклеточного матрикса.

Децидуализация эндометрия является необходимым условием наступления и развития беременности. Ее нарушения и дисбаланс секреторных продуктов ДК могут приводить к имплантационным потерям, раннему прерыванию беременности и ее осложнениям, таким как преэклампсия, внутриутробная задержка роста плода, преждевременные роды [16, 20, 34].

Децидуальная трансформация эндометриальных стромальных клеток

У человека, в отличие от некоторых видов млекопитающих, дифференцировка ЭСК в специализированные ДК не зависит от эмбриональных сигналов, но происходит в каждом цикле независимо от присутствия зародыша (спонтанная децидуализация) [7, 20]. Некоторые авторы рассматривают этот процесс как предецидуализацию, а дифференцированные ЭСК как предецидуальные клетки, предшественники ДК gravidного эндометрия [9, 20].

Гормональная регуляция децидуализации осуществляется стероидными гормонами яичников – эстрадиолом и прогестероном. Высокий уровень эстрадиола в пролиферативной фазе цикла усиливает экспрессию эндометриальных рецепторов к ПГ, что обеспечивает ответ эндометрия на постовуляторное повышение уровня ПГ в секреторной фазе цикла [28, 47]. Прогестерон

воздействует на ЭСК путем связывания с ядерным рецептором к ПГ – членом суперсемейства лигандактивируемых факторов транскрипции. Обязательным индуктором децидуализации является также циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) – продукт воздействия фермента аденилатциклазы на АТФ. После овуляции эндометрий подвергается воздействию разнообразных локальных и эндокринных факторов, таких как простагландин E_2 , релаксин, кортикотропин-рилизинг гормон, гипофизарный гонадотропин, которые способны стимулировать продукцию цАМФ в ЭСК. В экспериментах *in vitro* установлено, что для полной дифференцировки ЭСК в ДК необходимо взаимодействие сигнальных путей ПГ и цАМФ [17, 31, 34, 47]. Начиная с 23-го дня цикла наблюдается значительное увеличение объема цитоплазмы ЭСК, окружающих терминальные спиральные артерии (предецидуальная трансформация) (рис. 1 А). С 25-го дня процесс распространяется в субэпителиальной строме, зоны децидуализации сливаются, формируя крупные пласты предецидуальных клеток, которые на 27-й день составляют верхние две трети функционального слоя эндометрия. В процессе децидуализации удлиненные фибробластоподобные ЭСК увеличиваются в размерах, округляются, приобретают эпителиоподобную форму. В поздней секреторной фазе ДК морфологически сходны с ДК промежуточного типа (диаметр 15–25 мкм), выявляемыми на ранних сроках беременности. Зрелые ДК эпителиодного типа – самые крупные (>25 мкм в диаметре) стромальные клетки, максимальное количество которых отмечается в конце I триместра беременности [20]. В менструальном цикле выраженная децидуализация с гипертрофией стромальных клеток наблюдается при прегравидарной подготовке женщин с использованием препарата дюфастон – аналога природного ПГ (рис. 1 Б). На разных стадиях дифференцировки ДК экспрессируют белки цитоскелета – гладкомышечный альфа-актин, десмин, виментин, но не цитокератин, что демонстрирует их сходство с фибробластами и миофибробластами [20].

Процесс децидуализации характеризуется выраженными изменениями состава внеклеточного матрикса (ВКМ). ДК, продуцируя фибронектин, ламинин, коллаген IV типа, декорин, гепарансульфатсодержащие протеогликаны, формируют ВКМ, с которым взаимодействуют инвазивные клетки трофобласта. Коллагены I, III и VI типов остаются диффузно распределенными в строме эндометрия, тогда как коллаген IV типа и ламинин концентрируются вокруг ДК. В децидуализирующихся ЭСК усиливается продукция фибулина (FBLN1) – секреторного гликопротеина, ассоциированного с фибронектин- и эластинсодержащими волокнами, который является компонентом ВКМ, влияющим на клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток [20, 34].

Для процесса дифференцировки ЭСК важны клеточные взаимодействия стромы и эпителия. Так, лейкоингибирующий фактор (leukemia inhibitory factor,

LIF) – критически важный для имплантации цитокин, секретлируемый эпителиальными клетками эндометрия, усиливает децидуализацию ЭСК [20, 46].

На молекулярном уровне морфологические изменения ЭСК происходят одновременно с функциональным репрограммированием, включающим изменение экспрессии рецепторов стероидных гормонов, секрецию ростовых и регуляторных факторов и ферментов, продукцию цитокинов и хемокинов, ремоделирование внеклеточного матрикса и перестройку цитоскелета, индукцию модуляторов апоптоза и специфических децидуальных факторов транскрипции [17]. После инициации децидуализации дифференцирующиеся ЭСК начинают секретировать цитокины, в том числе интерлейкины (interleukin, IL) IL-6, IL-11, которые участвуют в сохранении децидуального фенотипа ЭСК и продолжении процесса децидуализации через аутокринные и паракринные пути [11].

В отсутствие беременности падение уровня ПГ вызывает переключение секреторного репертуара ДК и запуск каскада событий, приводящих к гибели клеток, локальной деградации внеклеточного матрикса, зависящей от баланса матриксных металлопротеиназ (MMPs) и их тканевых ингибиторов (TIMPs), протеолитическому разрушению функционального слоя эндометрия и его отторжению. ДК рассматриваются как основной источник MMP [6].

При наступлении беременности ПГ, концентрация которого сохраняется на высоком уровне до момента родов, и эмбриональные стимулы, модулирующие маточное микроокружение, создают гормональную среду для продолжения децидуальной реакции вплоть до полной децидуализации гравидарного эндометрия [6, 14, 18, 34]. Одними из первых молекулярных сигналов, продуцируемых бластоцистой, являются хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) и IL-1 β . ХГЧ *in vitro* стимулирует морфофункциональную дифференцировку ЭСК в ДК, проявляющуюся в усилении продукции пролактина [22]. IL-1 β способствует морфологической трансформации ЭСК и имплантации бластоцисты, повышая экспрессию в ЭСК $\alpha v \beta 3$ интегрина – ключевой имплантационной адгезивной молекулы – и усиливая активность MMP-3 [42]. Воздействие IL-1 β на культивируемые ЭСК, полученные в секреторной фазе цикла, индуцировало в них экспрессию генов, ответственных за ангиогенез, рекрутирование лейкоцитов, ремоделирование ВКМ, регуляцию клеточного цикла, защиту от свободных радикалов, метаболизм жирных кислот [35]. Введение IL-1 β и ХГЧ в полость матки небеременным самкам бабуина вызывало изменения эндометрия, имитирующие раннюю беременность [42]. Это подчеркивает значимость сигналов бластоцисты в создании оптимального эндометриального микроокружения для ее имплантации.

Главными секреторными продуктами ДК являются пролактин (ПРЛ) и белок 1, связывающий инсулиноподобные факторы роста (insulin-like growth factor

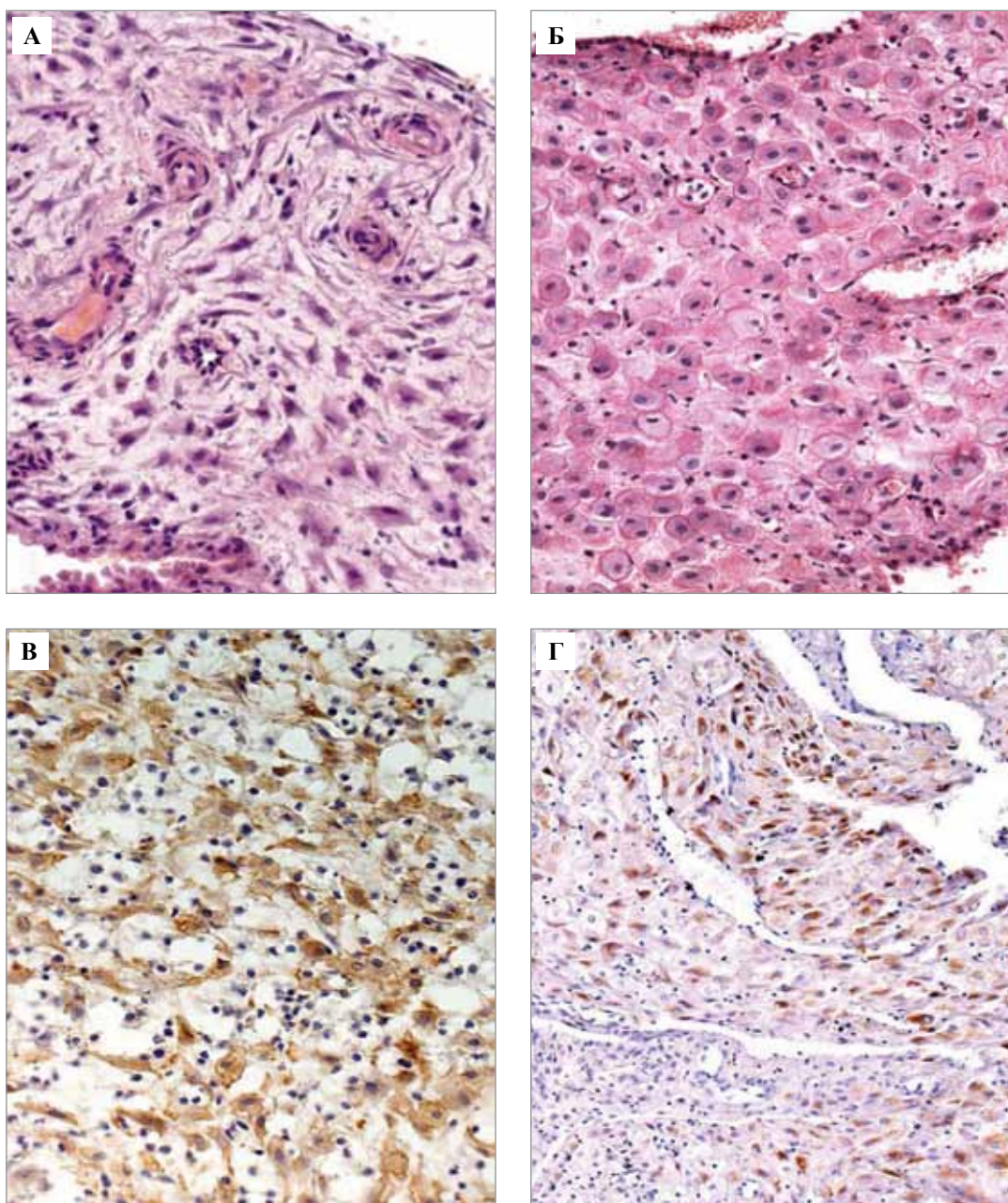


Рис. 1. Этапы трансформации эндометриальных стромальных клеток в поздней секреторной фазе цикла и на ранних сроках беременности.

А – начальный этап концентрации предецидуальных клеток вокруг спиральных артерий (26-й день цикла, биопсия эндометрия).

Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

Б – гипертрофия децидуальных клеток после прегравидарного лечения женщин дюфастонем – аналогом природного прогестерона (биопсия эндометрия).

Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$.

В – виментинположительные децидуальные клетки в строме париетального эндометрия (6 недель беременности, медицинский аборт).

Иммуногистохимическая реакция, $\times 400$.

Г – IGFBP-1-положительные децидуальные клетки в строме париетального эндометрия (8 недель беременности, медицинский аборт).

Иммуногистохимическая реакция, $\times 200$

binding protein-1, IGFBP-1), которые рассматриваются как маркеры дифференцированных ДК. ПРЛ начинает вырабатываться до начала беременности, на 22-й день цикла. В процессе развития беременности повышается доля ПРЛ-экспрессирующих клеток в децидуальной оболочке. Функциями ПРЛ в маточно-плацентарной области (МПО) являются стимуляция роста и инвазии цитотрофобласта, усиление ангиогенеза, повышение жизнеспособности uNK [20, 24, 41]. Белок, связывающий инсулиноподобные факторы роста (IGF)-1 (insulin-like growth factor-binding protein 1, IGFBP-1), – секреторный продукт ДК, в максимальной концентрации присутствующий в амниотической жидкости и в меньшей в сыворотке крови, его экспрессия достигает максимума на 16–18-й неделях гестации. IGFBP-1 определяет биодоступность IGF-1 и таким образом участвует в регуляции цитотрофобластической инвазии (ЦТИ), роста и развития плаценты и плода [20, 33].

Этапы дифференцировки ДК в менструальном цикле и при беременности со сменой фенотипа и характерных маркеров представлены в работе А.П. Милованова и соавт. [1].

Клетки-предшественники поздней секреторной фазы цикла – фибробласты и миофибробласты (маркер – десмин).

Предецидуальные клетки вокруг спиральных артерий – десмин-положительные.

ДК промежуточного типа, диаметр которых больше, чем у предецидуальных клеток. Характеризуются утратой десмина и экспрессией виментина. Пик плотности виментинположительных клеток наблюдается на 6–7-й неделе беременности (рис. 1 В).

ДК промежуточного типа, продуцирующие IGFBP-1, составляют около 15% виментинположительных клеток (рис. 1 Г).

ДК эпителиоидного типа – самые крупные стромальные клетки, не содержащие десмин и IGFBP-1.

ДК являются уникальными источниками пропротеин конвертазы 6 (PC6) – сериновой протеазы, активирующей ряд белков-предшественников путем посттрансляционного протеолиза. Продукция PC6 начинается в период имплантационного окна и усиливается после имплантации эмбриона. Секретируя PC6, ДК влияют на биологическую активность факторов роста, пептидных гормонов, белков внеклеточного матрикса, адгезионных молекул и интегральных мембранных белков [12]. ДК продуцируют также множество факторов, включая цитокины (IL-11), ростовые факторы (эпидермальный ростовой фактор), активин А и нейропептиды (соматостатин и грелин), которые усиливают децидуализацию. Кроме того, процесс дифференцировки стромы в средней и поздней секреторных фазах цикла индуцирует экспрессию многочисленных генов в эпителиальных клетках [11, 12].

Таким образом, ПГ-зависимая децидуализация стромы эндометрия, начинающаяся в секреторной фазе цикла и продолжающаяся при наступлении беремен-

ности, проявляется в морфологической трансформации и функциональном репрограммировании удлинённых веретеновидных ЭСК в полигональные эпителиоподобные ДК с секреторным фенотипом.

Имплантация и контроль цитотрофобластической инвазии

Одна из главных особенностей эндометрия, определяющая эффективность репродукции, – временное приобретение рецептивного фенотипа, необходимого для внедрения компетентной бластоцисты в оптимальное микроокружение в матке. В течение этого короткого периода, известного как окно имплантации (20–24-й дни менструального цикла), эндометрий экспрессирует эволюционно консервативный репертуар генов, определяющих ключевые события процесса имплантации, в который вовлечены цитокины, ростовые факторы и другие сигнальные молекулы, а также клетки иммунной системы [3, 46]. Процесс децидуализации эндометрия крайне важен, так как обеспечивает сигналы для завершения окна имплантации и определяет способность эндометрия распознавать и элиминировать имплантирующиеся дефектные эмбрионы [30, 37, 45].

Развитие бластоцисты, ее внедрение в децидуализированный эндометрий и формирование плаценты – критические периоды в процессе наступления и развития беременности. Для успешной имплантации необходима синхронизация между сигнальными молекулами бластоцисты и становлением рецептивного состояния эндометрия, способного отвечать на эти сигналы. Предполагается, что отсутствие рецептивного статуса является главной причиной бесплодия и низкой эффективности вспомогательных репродуктивных технологий [49].

Главное условие успешной имплантации – установление двунаправленного взаимодействия между бластоцистой и эндометрием, который в процессе подготовки к имплантации претерпевает ряд морфологических, биохимических и физиологических изменений [3, 14, 29, 46, 50]. В то же время оплодотворенная яйцеклетка, продвигаясь через фаллопиевы трубы, проходит несколько делений и к моменту достижения полости матки через 6–7 дней после зачатия развивается до состояния бластоцисты, состоящей из внешнего слоя клеток трофобласта, которые дают начало структурам плаценты, и внутренней клеточной массы (эмбриобласта), формирующей структуры зародыша. Клетки трофобласта первыми вступают в контакт с поверхностным эпителием матки (стадии присоединения и прикрепления), после чего бластоциста через эпителий и его базальную мембрану проникает в строму эндометрия. В случае успешной имплантации бластоциста полностью погружается в поверхностный слой эндометрия. При контакте со стромой трофобласт дифференцируется в инвазивный вневорсинчатый цитотрофобласт, который проникает в глубокие слои децидуальной оболочки [43]. Ключевыми механизмом

ЦТИ является деградация ВКМ, обусловленная продукцией MMPs, в частности MMP-2 и MMP-9 трофобластом. Протеолитическая активность MMPs регулируется эндогенными тканевыми ингибиторами TIMPs, секретируемыми ДК. Таким образом, ДК влияют на баланс между MMPs и TIMPs в зоне инвазии, определяющий активность ЦТИ [19, 44].

Данные экспериментальных исследований *in vitro* указывают на то, что децидуализированные ЭСК играют активную роль в процессе имплантации и развития бластцисты, обусловленную не только продукцией TIMPs, но и подвижностью ДК. Видеонаблюдение *in vitro* человеческих или мышинных бластоцист, помещенных на монослой ДК, показало, что для роста трофобласта необходимы миграция ДК и окружение ими зародышевого мешка. ДК создавали более благоприятное окружение для экспансии трофобласта, чем недифференцированные ЭСК, причем ДК активнее двигались в направлении бластоцист высокого качества [20].

Кооперативные взаимодействия между эндометрием и бластоцистой осуществляются с участием трех главных систем: цитокины, молекулы адгезии и иммунные клетки [51]. Важную роль в имплантации бластоцисты играют цитокины, принадлежащие к IL-6 семейству, которое включает IL-6, LIF, цилиарный нейротрофический фактор, онкостатин М и кардиотропин 1. На процесс имплантации влияют продуцируемые ДК молекулярные медиаторы, такие как IL-11 – мультифункциональный цитокин с противовоспалительными свойствами, обеспечивающий продолжение децидуализации, а также цитокины IL-1 семейства, которые включают два агониста, IL-1 α и IL-1 β , два клеточноповерхностных рецептора, IL-1R1 и IL-1R2, вспомогательный белок и естественный антагонист, IL-2ra. Молекулы семейства IL-1 в периимплантационный период стимулируют продукцию LIF эпителием желез эндометрия и повышают экспрессию $\alpha\upsilon\beta 3$ интегрин [12, 20].

В последние годы появились новые данные об участии ДК в регуляции ЦТИ. ДК продуцируют большое количество как проинвазивных (IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-13, IL-15, Eotaxin CCL11, IP-10, RANTES), так и противoinвазивных факторов (IL-10, IL-12, VEGF). Секреторные продукты ДК *in vitro* стимулируют миграционную активность клеток первичных культур трофобласта и модельных клеточных линий, регулируя протеазную активность клеток трофобласта и экспрессию ими интегрин. Подавление инвазии осуществляется через секрецию ДК антагонистов металлопротеиназ и/или активацию их тканевых ингибиторов [40]. Дифференцированные ДК, но не ЭСК, синтезируют широкий спектр хемокинов (CXCL1, CXCL2, CCL8, CCR1, CCR3 и т.д.), продукция которых усиливается в I триместре беременности. Вневорсинчатый цитотрофобласт, приобретая инвазивный фенотип, экспрессирует рецепторы к ряду хемокинов, а культу-

ральная среда, кондиционированная ДК, повышает его миграционную активность *in vitro*, что указывает на участие ДК в стимуляции ЦТИ [12, 20, 42].

Промежуточный цитотрофобласт якорных ворсин и вневорсинчатый инвазивный цитотрофобласт экспрессируют большое количество инсулиноподобного фактора роста (IGF)-II, который стимулирует пролиферацию и миграцию клеток трофобласта. Одним из основных секреторных белков дифференцированных ДК является белок, связывающий инсулиноподобные факторы роста, – IGFBP-1. Необратимо связывая IGF-II, IGFBP1 может ограничивать ЦТИ. В экспериментах *in vitro* было показано, что IGFBP1 подавляет пролиферацию и внедрение цитотрофобласта в многослойную культуру децидуализированных ЭСК стромы эндометрия [33]. Морфологические доказательства роли ДК в регуляции ЦТИ впервые были представлены в работах А.П. Милованова и соавт. [1]. Исследование точно датированной структурно-функциональной гравидарной перестройки эндометрия в сопоставлении с темпами и глубиной миграции цитотрофобласта (ЦТ) показало, что при неосложненной беременности начало первой волны ЦТИ (6-я неделя) протекает на фоне отсутствия IGFBP-1-положительных ДК промежуточного типа в МПО. На 7-й неделе в периферических зонах миграции появлялись двух- и многоядерные формы ЦТ, количество IGFBP-1-продуцирующих ДК в микроокружении ЦТ увеличивалось, достигая 15–20% всех ДК. Продолжение ЦТИ на 8-й неделе за счет как интерстициального, так и внутрисосудистого компонентов характеризовалось увеличением многоядерных элементов ЦТ и дальнейшим приростом IGFBP-1-положительных ДК в базальном эндометрии. В период завершения первой волны ЦТИ (9–10-я недели) IGFBP-1-продуцирующие ДК становились доминирующей популяцией стромальных клеток в МПО, они располагались в зонах, где отсутствовала активная миграция интерстициального и внутрисосудистого ЦТ, на участках продолжающейся инвазии выявлялись IGFBP-1-негативные ДК. Таким образом, резкое уменьшение активности ЦТ происходило на фоне увеличения количества IGFBP-1-продуцирующих ДК, что доказывает их роль в регуляции первой волны ЦТИ.

Для ЦТИ необходима протеолитическая деградация ВКМ, которую осуществляют MMPs, секретируемые цитотрофобластом. В то же время ДК продуцируют TIMPs, подавляющие ЦТИ [34, 40]. В экспериментальных исследованиях было установлено, что лейкоингибирующий фактор (LIF) – основной цитокин, влияющий на адгезию эмбриона и дифференцировку трофобласта в инвазивный фенотип, усиливает в ДК секрецию тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP-1, влияя на баланс MMP/TIMP в МПО [12]. Это указывает на роль ДК не только как стимуляторов, но и как локальных ограничителей ЦТИ.

Формирование иммунного микроокружения и ответ на патогены

Анализ клеточного состава децидуализированного эндометрия демонстрирует тесное взаимодействие между стромальными и иммунными клетками. Основными типами иммунных клеток эндометрия являются макрофаги и лимфоциты. В поздней секреторной фазе цикла повышается количество макрофагов и клеток, принадлежащих к фенотипически уникальной популяции uNK. Дальнейшее повышение числа uNK регистрируют на ранних сроках беременности. Их доля в I триместре составляет до 70% клеток костномозгового происхождения. Для uNK характерны высокий уровень экспрессии CD56 и отсутствие CD16 поверхностных маркеров. В отличие от классических циркулирующих NK (CD56 с низкой плотностью экспрессии и CD16+) uNK не обладают цитотоксической функцией. Маточные NK вырабатывают ряд хемокинов, цитокинов и ангиогенных факторов, включая фактор роста сосудистого эндотелия (vascular endothelial growth factor, VEGF), плацентарный ростовой фактор, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), IL-1 β , трансформирующий фактор роста (transforming growth factor, TGF)- β 1, макрофагальный CSF (M-CSF), LIF и интерферон (interferon, IFN)- γ , необходимых для успешного развития беременности. IL-8 и хемокиновый лиганд CXCL10, экспрессируемые uNK, стимулируют инвазию цитотрофобласта. Однозначно установлена роль uNK в ремоделировании спиральных артерий и регуляции ЦТИ, определяющих рост и развитие плода [25, 36, 48].

Маточные NK экспрессируют иммуномодуляторные молекулы галектин-1 и гликоделин А. Галектин-1 подавляет Т-клеточную пролиферацию и выработку провоспалительных цитокинов активированными Т-клетками. Гликоделин А ингибирует активацию Т-клеток через тирозинфосфатазный рецептор CD45 на поверхности Т-лимфоцитов [13, 15, 23]. В I триместре беременности NK и макрофаги обнаруживают в МПО в тесной близости с инвазивным вневорсинчатым цитотрофобластом. На этой стадии макрофаги составляют около 20–30% общей популяции децидуальных лейкоцитов, экспрессируют маркеры альтернативной активации и в отличие от uNK представлены в течение всего срока беременности. С использованием экспериментальных моделей показано, что децидуальные макрофаги ингибируют цитотоксичность NK и в кооперации с NK-клетками индуцируют иммуносупрессорные регуляторные Т-клетки (regulatory T cells, Tregs). Tregs принадлежат к подклассу CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ супрессорных Т-лимфоцитов и обеспечивают иммунологическую толерантность к собственным антигенам. В последние годы получено большое количество данных, свидетельствующих о важной роли Tregs в репродукции человека. Tregs в маточно-плацентарной области предотвращают отторжение полуаллогенного

плода, создавая толерантное микроокружение, которое характеризуется экспрессией супрессорных цитокинов, таких как IL-10, и трансформирующего ростового фактора TGF- β , а также гемоксигеназы-1. При физиологической беременности происходит увеличение числа материнских Tregs, специфичных к отцовским антигенам. Иммунорегуляторное влияние на генерирование периферических Tregs оказывают разные факторы, такие как цитокины, адипокины, гормоны беременности и семенная жидкость самца [4, 21, 27, 38].

Децидуализация эндометрия играет важную роль в обеспечении иммунотолерантности к полуаллогенному плоду и в защите матери и плода от патогенов. Дифференцированные ДК – главные модуляторы локального иммунитета в зоне контакта мать/плод. Они секретируют пролактин и широкий спектр хемокинов (CCL2/MCP1, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CX3CL1/fractalkine, CXCL10, CXCL11), интерлейкины (IL-6, IL-11, IL-15), которые являются направляющими, пролиферативными и дифференцирующими сигналами для специализированных иммунных клеток [12, 47]. ДК обеспечивают заселение маточно-плацентарной области uNK клетками и специализированными макрофагами, но не NKT клетками, В-лимфоцитами или дендритными клетками. IL-15, продуцируемый ДК под контролем ПГ и эстрадиола, регулирует пролиферацию и функции uNK [34]. В модельных экспериментах *in vitro* с клетками трофобласта и ДК, выделенными из ворсин плаценты и децидуальной оболочки I триместра беременности, было установлено, что ДК, секретируя хемоаттрактанты, привлекают Т-хелперы 17 (Th17), которые, в свою очередь, подавляют апоптоз цитотрофобласта, усиливают его пролиферацию и инвазивную активность за счет продукции IL-17 [50].

Помимо привлечения иммунокомпетентных клеток ДК имеют дополнительные механизмы создания иммунного микроокружения, оптимального для имплантации эмбриона и развития плаценты. Показано, что ДК обладают иммуномодулирующими свойствами и оказывают супрессорное действие на цитотоксичность NK и Т-лимфоцитов, индуцируют генерирование Tregs [10]. ДК продуцируют триптофан-катаболизирующий фермент индоламин 2,3-дезоксигеназу-1 (IDO-1), обладающий супрессивным действием на Т-зависимый воспалительный ответ против фетальных аллоантигенов. IDO-1 катализирует деградацию триптофана и образование его биологически активных метаболитов, таких как кинуренин и пиколиновая кислота, ингибирующих активацию Т- и NK-клеток [34]. ДК, как и маточные NK, являются продуцентами галектина-1 и экспрессируют Fas-лиганд, индуцирующий апоптоз активированных Т-лимфоцитов [20]. Таким образом, ДК в диалоге с иммунными клетками формируют иммунопривилегированное микроокружение, необходимое для имплантации эмбриона и развития плаценты.

Доминирующей популяцией иммунных клеток децидуализированного эндометрия являются макро-

фаги и uNK – клетки системы врожденного иммунитета. Одна из главных функций врожденного иммунитета – защита хозяина от патогенов через развитие иммунного ответа на инфекционные агенты. Быстро развивающийся иммунный ответ против микроорганизмов в маточно-плацентарной области и плодных оболочках существенно влияет на течение и исход беременности. В последние годы было установлено, что ДК, как и клетки системы врожденного иммунитета, реагируют на многочисленные патогены, включая вирусы и бактерии, через образраспознающие рецепторы (pattern-recognition receptors, PRRs). PRR распознают консервативные микробные структуры: патогенассоциированные молекулярные образы (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) различного происхождения, такие как сахара, флагеллин, компоненты клеточной стенки бактерий – пептидогликан и липополисахарид. Кроме того, PRR способны распознавать эндогенные молекулы, освобождаемые из разрушенных клеток, так называемые DAMP (damage-associated molecular patterns). К настоящему времени идентифицировано 4 класса PRRs – трансмембранные белки, такие как Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLRs) и лектиновые рецепторы С-типа, а также цитоплазматические белки, RIG-1-подобные рецепторы (retinoic acid inducible gene) и NOD-подобные рецепторы (nucleotide-binding oligomerization domain) или NLRs (NOD-like receptors) [26].

Существует ряд доказательств того, что ДК экспрессируют PRRs, включая NOD-подобные (NLRs) и Toll-

подобные рецепторы, распознают бактерии или PAMPs и проявляют воспалительный ответ (рис. 2). Экспрессия TLRs и NOD2 была обнаружена в ДК децидуальной оболочки I триместра беременности с помощью методов иммуногистохимического исследования, полимеразной цепной реакции и вестерн-блота. В экспериментах с первичными культурами ДК и иммортализованными линиями децидуализированных стромальных клеток человека доказана функциональная активность рецепторов, поскольку в присутствии бактериальных или вирусных лигандов в ДК усиливалась экспрессия генов сигнального пути NF-κB, в том числе моноцитарного хемоаттрактантного белка MCP-1, колониестимулирующего фактора CSF-2, IL-6, IL-8 и TNF-α. ДК *in vitro* отвечали на внесение в среду живых бактерий, выделенных из пародонта, продукцией провоспалительных цитокинов TNF-α и IL-6, зависящей от бактериальной нагрузки и особенностей микроорганизма. Таким образом, показана возможность участия ДК в ответе на патогены наряду со специализированными клетками врожденного иммунитета. Учитывая локализацию ДК, их можно рассматривать как первую линию защиты от восходящей инфекции из влагалища и шейки матки. Однако избыточная стимуляция TLR во время беременности может привести к сокращениям миометрия и разрыву плодной оболочки [5]. Дальнейшее изучение вклада ДК в каскад провоспалительных реакций в ответ на бактериальные и вирусные инфекции имеет существенное значение для уточнения патогенеза хориоамнионита и преждевременных родов.

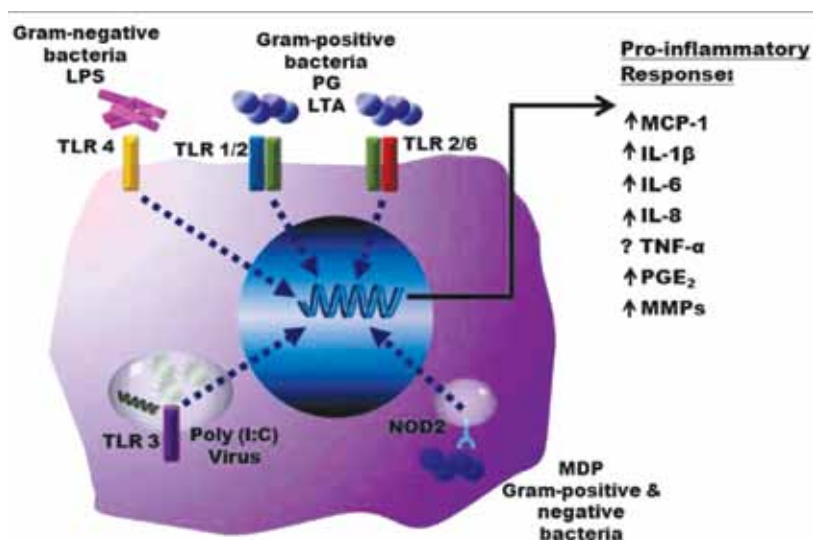


Рис. 2. Воспалительная реакция децидуальных клеток на патогенассоциированные молекулярные паттерны (PAMP).

Децидуальные клетки экспрессируют рецепторы распознавания образов (PRR), включая Toll-подобные рецепторы (TLR 1, 2, 3, 4 и 6) и нуклеотидсвязывающий рецептор домена олигомеризации 2 (NOD2). Связывание PAMP с PRR приводит к транскрипции и трансляции провоспалительных цитокинов, включая MCP-1 (моноцит-хемоаттрактантный белок-1), интерлейкин-1β (IL-1β), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли-α (TNF-α).

При инфекции ДСК усиливают продукцию простагландина E2 (PGE2) и матричных металлопротеиназ (MMP). LPS – липополисахарид, LTA – липотейхоевая кислота, MDP – мурамилдипептид, PG – пептидогликан, поли (I: C), полиинозиновая; полицитидиловая кислота (A.P. Anders, J.A. Gaddy, R.S. Doster, D.M. Aronoff, 2017)

Регуляция гемостаза

Наступление и развитие беременности связаны со значительным риском кровоизлияний во время имплантации бластоцисты, ЦТИ в децидуализированный эндометрий, становления начального лакунарного кровообращения и последующего притока материнской крови в результате ремоделирования спиральных артерий и артериол эндovasкулярным трофобластом. Для предотвращения возможных кровотечений необходима надежная регуляция локального гемостаза и фибринолиза.

В процессе децидуализации *in vivo* и *in vitro* в ЭСК усиливается экспрессия ключевых белков системы гемостаза, главным из которых является тканевой фактор (tissue factor, TF), инициирующий процесс свертывания крови. Преждевременный фибринолиз предупреждается другим продуктом ДК – ингибитором PAI-1, подавляющим активность тканевого активатора плазминогена tPA и активатора плазминогена урокиназного типа uPA, деградирующего ВКМ. Максимальная экспрессия TF и PAI-1 наблюдается в ДК, окружающих спиральные артерии. В отсутствие беременности падение уровня ПГ вызывает в ДК уменьшение экспрессии TF и PAI-1 и усиление продукции простагландина F2 α , фибринолитических и протеолитических белков, что приводит к физиологическому менструальному кровотечению [39]. При физиологической беременности на 5–8-й неделях в МПО ДК и секретируемый ими TF формируют локальную систему гемостаза, оптимальную для полноценной цитотрофобластической инвазии и последующего притока материнской артериальной крови в межворсинчатое пространство в конце I триместра [2]. Таким образом, ДК создают локальное гемостатическое микроокружение, способствующее имплантации, сохранению и развитию беременности. Нарушение системы гемостаза, связанного с недостаточностью децидуализации в I триместре, может привести к aberrантной плацентации, наблюдаемой при преэклампсии и внутриутробной задержке роста плода, преждевременным родам и гибели плода [39].

Защита от окислительного стресса при становлении маточно-плацентарного кровообращения

Успешное развитие плода зависит от формирования адекватного маточно-плацентарного кровообращения, обусловленного ремоделированием спиральных артерий эндovasкулярным цитотрофобластом. В течение физиологической беременности в маточно-плацентарной области регистрируют значительные колебания концентрации кислорода. Резкие изменения давления кислорода индуцируют окислительный стресс (ОС) с образованием кислородных радикалов и других активных форм кислорода (АФК). В отсутствие механизмов эффективной защиты АФК, включая супероксид анион (O₂⁻), перекись водорода и гидроксильные радикалы,

индуцируют разрушение белков, липидов и нуклеиновых кислот [8, 18]. Защитные механизмы, направленные на адаптацию клеток к ОС, включают конститутивную экспрессию ферментов, нейтрализующих АФК и способствующих восстановлению вызываемых ими повреждений. Кроме того, клетки способны отвечать на ОС продукцией антиоксидантных ферментов, таких как глутатион S-трансферазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы, а также активацией протективных и репарирующих генов, кодирующих белки теплового шока и GADD45 α , соответственно. В зависимости от выраженности ОС клетки могут подвергаться временному блоку клеточного цикла с последующим его восстановлением, физиологическому старению, апоптозу или некрозу.

ДК обладают большим арсеналом защитных механизмов, способных нейтрализовать АФК и предотвращать клеточную гибель, индуцируемую ОС, что свидетельствует об их важной роли в поддержании тканевого гомеостаза во время беременности. Децидуализация ассоциирована с индукцией скавенджеров свободных радикалов, таких как SOD2, моноаминоксидазы А и В, тио-, глутар- и пероксиредоксины. Кроме того, в число генов, активирующихся при дифференцировке ЭСК, входит GPx3, кодирующий глутатионпероксидазу-3 – секретируемый фермент с мощной антиоксидантной активностью, способный снижать уровни перекиси водорода и гидроксипероксидаз. ДК также проявляют высокий уровень экспрессии гена GADD45 α , кодирующего белки широкого спектра действия, которые участвуют в защите от ОС путем задержки клеточного цикла, ремоделирования хроматина и репарации ДНК [32]. Важную роль в защите МПО от повреждающего действия сигналов ОС, возникающих в ответ на интенсивное тканевое ремоделирование, приток воспалительных клеток, изменение локальной перфузии и давления кислорода, играет продукция в ДК антиоксидантного белка SGK1 (индуцируемая сывороткой и глюкокортикоидами киназа-1). ДК более устойчивы к ОС, чем недифференцированные ЭСК, и, окружая имплантированную бластоцисту, создают дополнительную защиту от стрессорных воздействий микроокружения [34]. Таким образом, ДК не только обладают механизмами восстановления и высокой устойчивостью к ОС, но и защищают бластоцисту и вневорсинчатый инвазивный цитотрофобласт от ОС через продукцию акцепторов свободных радикалов и секрецию GPx3 фермента.

Заключение

Децидуализация эндометрия является обязательным условием наступления и развития беременности. Прогестеронзависимая дифференцировка фибробластоподобных клеток стромы в специализированные децидуальные клетки с уникальным биосинтетическим и секреторным фенотипом обусловлена функциональным репрограммированием, в результате

которого они приобретают способность регулировать гемостаз, процессы имплантации и цитотрофобластической инвазии, обеспечивать локальную иммунную толерантность к фетальным аллоантигенам, устойчивость к инфекции и окислительному стрессу. Нарушение любой из этих функций децидуальных клеток может привести к прерыванию беременности или ее неблагоприятным исходам. Дальнейшее изучение механизмов децидуализации и функций децидуальных клеток будет способствовать расшифровке причин бесплодия и осложнений беременности, повышению эффективности вспомогательных репродуктивных технологий, позволит выявить биомаркеры и терапевтические мишени для разработки новых методов лечения нарушений репродукции.

Литература/References

1. Милованов А.П., Фокина Т.В., Старосветская Н.А., Назимова С.В. Децидуализация эндометрия как фактор, регулирующий цитотрофобластическую инвазию в течение I триместра беременности // Архив патологии. 2007. № 69. С. 31–34 [Milovanov A.P., Fokina T.V., Starosvetskaya N.A., Nazimova S.V. Endometrial decidualization as a factor that regulates cytotrophoblastic invasion during the first trimester of pregnancy // Arhiv patologii. 2007. V. 69. P. 31–34 (In Russ.)].
2. Милованов А.П., Кузнецова Н.Б., Фокина Т.В. Роль иммунораспределения тканевого фактора в становлении гемостаза в I триместре физиологической беременности // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2018. № 10 (166). С. 502–506 [Milovanov A.P., Kuznetsova N.B., Fokina T.V. Rol' immunoraspredeleeniya tkanevogo faktora v stanovlenii gemostaza v I trimestre fiziologicheskoy beremennosti // Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2018. V. 10 (166). P. 502–506 (In Russ.)].
3. Aghajanova L., Hamilton A.E., Gludice L.C. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers and transcriptomics // Semin Cell Dev Biol. 2008;19(2):204–11. doi: 10.1016/j.semcdb.
4. Alijotas-Reig J., Llubra E., Gris J.M. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells // Placenta. 2014;35(4):241–8. doi: 10.1016/j.placenta. 2014. 023.004.
5. Anders A.P., Gaddy J.A., Doster R.S., Aronoff D.M. Current concepts in maternal-fetal immunology: Recognition and response to microbial pathogens by decidual stromal cells // Am J Reprod Immunol. 2017;77(3):10.1111/aji.12623.
6. Brosens J.J., Gellersen B. Death or survival – progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma // J Molecular Endocrinology. 2006;36:389–98.
7. Brosens J.J., Parker M.G., McIndoe A., Pijnenborg R. et al. A role for menstruation in preconditioning the uterus for successful pregnancy // Am J Obstet Gynecol. 2009;200:615 e.001-e.006.
8. Burton G.J., Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia // J Soc Gynecol Investig. 2004; 11(6):342–52.
9. Conrad K.P., Rabaglino M.B., Post Uiterweer E.D. Emerging role for dysregulated decidualization in the genesis of preeclampsia // Placenta. 2017;60:119–29.
10. Croxatto P., Vacca F., Canegallo R., Conte P.L. et al. Stromal cells from human decidua exert a strong inhibitory effect on NK cell function and dendritic cell differentiation // PLoS ONE. 2014;9:e89906.
11. Dimitriadis E., Salamonsen L.A., Rohh L. Expression of interleukin-11 during the human menstrual cycle: coincidence with stromal cell decidualisation and relationship to leukaemia inhibitory factor and prolactin // Mol Hum Reprod. 2000;6(10):907–14.
12. Dimitriadis E., Nie G., Hannan N.J., Paiva P. et al. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface // Int J Dev Biol. 2010;54:313–22.
13. Erlebacher A. Immunology of the maternal-fetal interface // Annu Rev Immunol. 2013;31:387–411. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100003.
14. Fazleabas A.T., Strakova S. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment // Mol Cell Endocrinol. 2002;186(2):143–7.
15. Fu B., Wei H. Decidual natural killer cells and the immune microenvironment at the maternal-fetal interface // Sci China Life Sci. 2016;59(12):1224–31.
16. Garrido-Gomez T., Dominguez F., Quiñero A., Diaz-Gimeno P. et al. Defective decidualization during and after severe preeclampsia reveals a possible maternal contribution to the etiology // Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114(40):E8468-E8477.
17. Gellersen B., Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair // J Endocrinol. 2003;178(3):357–72.
18. Gellersen B., Brosens I.A., Brosens J.J. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions and clinical perspectives // Semin Reprod Med. 2007;25(6):445–53.
19. Gellersen B., Reimann K., Samalecos A., Aupers S. et al. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals // Hum Reprod. 2010;125(4):862–73.
20. Gellersen B., Brosens J.J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure // Endocr Rev. 2014;35(6):851–905. doi: 10.1210/er.2014-1045.
21. Gobert M., Lafaille J.J. Maternal-fetal immune tolerance, block by block // Cell. 2012;150(1):7–9. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.020.
22. Han S.W., Lei Z.M., Rao C.V. Treatment of human endometrial stromal cells with chorionic gonadotropin promotes their morphological and functional differentiation into deciduas // Mol Cell Endocrinol. 1999;147:7–16.
23. Hess A.P., Hamilton A.E., Talbi S., Dosiou C. et al. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators // Biol Reprod. 2007;76(1):102–17.
24. Jabbour H.N., Critchley H.O.D. Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy // Reproduction. 2001;121:197–205.
25. King A. Uterine leukocytes and decidualization // Hum Reprod Update. 2000;6:28–36.
26. Koga K., Izumi G., Mor G., Fujii T. et al. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy

- complications // *Am J Reprod Immunol*. 2014;72(2):192–205. doi: 10.1111/aji.12258.
27. *La Rocca C., Carbone F., Longobardi S., Matarese G. et al.* The immunology of pregnancy: regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus // *Immunol Lett*. 2014;162 (1 Pt A):41–48. doi: 10.1016/j.imlet.2014.06.013.
 28. *Ma W.G., Song H., Das S.K., Paria B.C. et al.* Estrogen is a critical determinant that the duration of the window of uterine receptivity for implantation // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(5):2963–8.
 29. *Makrigiannakis A., Minas V.* Mechanisms of implantation // *Reprod Biomed Online*. 2007;14(1):102–9.
 30. *Mansouri-Attia N., Sandra O., Auberr J., Degrelle S. et al.* Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:5687–92.
 31. *Maruyama T., Yoshimura Y.* Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium // *Endocr J*. 2008;55(5):795–810.
 32. *Myatt L.* Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta // *Placenta*. 2010;31 Suppl: S 66–9. doi: 10.1016/j.placenta.2009.12.021.
 33. *Nayak N.R., Giudice L.C.* Comparative Biology of the IGF System in Endometrium, Decidua, and Placenta, and Clinical Implications for Foetal Growth and Implantation Disorders // *Placenta*. 2003;24:281–96.
 34. *Okada H., Tsuzuki T., Murata H.* Decidualization of the human endometrium // *Reprod Med Biol*. 2018;17(3):220–7.
 35. *Rossi M., Sharkey A.M., Vigano P., Fiore G. et al.* Identification of genes regulated by interleukin-1b in human endometrial stromal cells // *Reproduction*. 2005;130(5):721–9.
 36. *Quenby S., Nik H., Innes B., Lash G. et al.* Uterine natural killer cells and angiogenesis in recurrent reproductive failure // *Hum Reprod*. 2009;24:45–54.
 37. *Salker M.S., Nautiyal J., Steel J.H., Lang F. et al.* Disordered IL-33/ST2 activation in decidualizing stromal cells prolong uterine receptivity in women with recurrent pregnancy loss // *PLoS One*. 2012;7(12):e52252. doi: 10.1371/journal.pone.0052252.
 38. *Samstein R.M., Josefowicz S.Z., Arvey A., Treuting P.M. et al.* Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict // *Cell*. 2012;150(1):29–38. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.031.
 39. *Schatz F., Guzeloglu-Kayisli O., Arlier S., Kayisli U.A., Lockwood Ch.J.* The role of decidual cells in uterine hemostasis, menstruation, inflammation, adverse pregnancy outcomes and abnormal uterine bleeding // *Hum Reprod Update*. 2016;22(4): 497–515.
 40. *Sharma S., Godbole G., Modi D.* Decidual Control of Trophoblast Invasion // *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(3):341–50.
 41. *Stefanoska I., Jovanovic-Krivokuca M., Vasilijic S. et al.* Prolactin stimulates cell migration and invasion by human trophoblast in vitro // *Placenta*. 2013;34:775–83.
 42. *Su R.W., Fazleabas A.T.* Implantation and Establishment of Pregnancy in Human and Nonhuman Primates // *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2015;216:189–213.
 43. *Suman P., Malhotra S.S., Gupta S.K.* LIF-STAT signaling and trophoblast biology // *JAKSTAT*. 2013;2(4):e25155. doi: 10.4161/jkst.25155.
 44. *Tapia-Pizarro A., Argandona F., Palomino W.A. et al.* Human chorionic gonadotropin (hCG) modulation of TIMP1 secretion by human endometrial stromal cells facilitates extravillous trophoblast invasion in vitro // *Hum Reprod*. 2013;28(8): 2215–27. doi: 10.1093/hurep/det136.
 45. *Teklenburg G., Salker M., Heijnen C. et al.* The molecular basis of recurrent pregnancy loss: natural embryo selection // *Mol Hum Reprod*. 2010;16(12):886–95. doi: 10.1093/molehr/gag079.
 46. *Van Mourik M.S., Macklon N.S., Heijnen C.J.* Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules and immune cells in establishing an implantation environment // *J Leukoc Biol*. 2009;85(1):4–19. doi: 10.1189/jlb.0708395.
 47. *Vinketova K., Mourdjeva M., Oreshkova T.* Human Decidual Stromal Cells as a Component of the Implantation Niche and a Modulator of Maternal Immunity // *J Pregnancy*. 2016; 2016: 8689436. doi: 10.1155/2016/8689436.
 48. *Wallace A.E., Fraser R., Cartwright J.E.* Extravillous trophoblast and decidual natural killer cells: a remodeling partnership // *Hum Reprod Update*. 2012;18(4):458–71. doi: 10.1093/humupd/dms015.
 49. *Wang H., Dey S.K.* Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models // *Nat Rev Genet*. 2006;7(3):185–99.
 50. *Wu H.X., Jin L.P., Xu B., Liang S.S., Li D.J.* Decidual stromal cells recruit Th17 cells into decidua to promote proliferation and invasion of human trophoblast cells by secreting IL-17 // *Cell Mol Immunol*. 2014;11(3):253–62.
 51. *Zhang S., Lin H., Kong S. et al.* Physiological and molecular determinants of embryo implantation // *Mol Aspects Med*. 2013;34(5):939–80. doi: 10.1016/j.mam

THE ROLE OF THE ENDOMETRIAL DECIDUALIZATION IN THE ESTABLISHMENT AND DEVELOPMENT OF PREGNANCY

I.M. Bogdanova, T.V. Fokina, I.I. Stepanova, M.N. Boltovskaya, A.P. Milovanov

During female reproductive period, uterine endometrium undergoes cyclical postovulatory morphofunctional changes induced by increased progesterone level. The key event in the occurrence and development of pregnancy is decidualization, the differentiation of endometrial stromal cells into specialized secretory decidual cells. Morphological transformation of stromal cells is accompanied by functional reprogramming, that is, production of biologically active molecules including cytokines, growth factors, and neuropeptides. The molecular mechanisms underlying onset and maintenance of decidualization are described in the review,

the functional role of decidual cells in the most important processes determining the success of pregnancy is analyzed, such as implantation, cytotrophoblastic invasion, ensuring the immune tolerance of the mother to the semi-allogenic fetus and resistance to infection and oxidative stress.

Key words: endometrium, decidualization, decidual cells, immune cells

Информация об авторах

Богданова Ирина Марковна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 916 132 0183. E-mail: malaj43@mail.ru

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

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

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

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

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

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120 8701. E-mail: morfolhum@mail.ru

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

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

Материал поступил в редакцию 24 мая 2018 года

© Коллектив авторов, 2018

DOI: 10.31088/2226-5988-2018-28-4-61-67

УДК:616.8-006

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ

А.Н. Копылов¹, П.Л. Гореликов¹, А.И. Алексеева^{1,2}

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

² Институт трансляционной медицины и биотехнологии научно-технологического парка медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

В обзоре охарактеризованы иммунофенотипические свойства стволовых клеток глиобластомы, их роль в ее росте. Глиобластома обладает гетерогенной структурой с различными зонами, которые имеют отличия в пролиферативной активности, особенностях процессов ангиогенеза и микроокружении. Стволовые клетки глиобластомы, в зависимости от зоны, могут изменять свой фенотип и метаболизм, что обеспечивает их резистентность к химио- и радиотерапии и способствует прогрессирующему росту опухоли. Элиминация стволовых клеток опухоли может быть перспективным методом лечения глиобластомы, поэтому ведется поиск маркеров ее стволовых клеток с целью создания таргетной терапии.

Ключевые слова: глиобластома, стволовые клетки глиобластомы, микроокружение

Глиобластома (ГБ) является одной из наиболее агрессивных опухолей мозга со 100-процентным летальным исходом. Несмотря на попытки лечения, включающие химиотерапию и хирургическое вмешательство, средний срок выживания пациентов не превышает 12–15 месяцев [3], а 5-летняя выживаемость составляет не более 5%. Одна из причин высокой агрессивности глиобластомы – разнообразный клеточный состав и присутствие стволовых клеток глиобластомы (СКГ) [4]. В норме стволовые и прогениторные клетки обеспечивают рост тканей и их восстановление после повреждения, в опухоли же стволовые клетки обуславливают ее прогрессирование и восстановление после удаления [22]. Стволовые клетки глиобластомы обладают резистентностью к лекарственным препаратам, лучевой терапии, способны к быстрой пролиферации и самообновлению [15], они могут запускать программу остановки клеточного цикла, связанную с их устойчивостью к противоопухолевым препаратам [15], находятся в тесном взаимодействии с микроокружением, мигроглией, сосудами, которые продуцируют стимулирующие пролиферацию и/или инвазию СКГ факторы роста, белки матрикса, цитокины [7, 34]. ГБ обладает гетерогенной структурой, имеет различные зоны – некроза, пролиферации и инвазии, которые характеризуются разными типами метаболизма и сигнальных путей, где происходит тесное взаимодействие между мигроглией и СКГ. В связи с этим изучение СКГ является актуальной задачей в онкологии.

Таргетная терапия, направленная на элиминацию ГСК, может быть перспективным методом лечения ГБ, поэтому необходимо выявить молекулы, экспрессируемые в СКГ, для создания направленной терапии ГБ. С этой целью проводится изучение корреляции между

уровнем экспрессии маркеров стволовых клеток или их количества в опухоли и продолжительностью жизни пациента. Предполагается, что именно СКГ ответственны за резистентность опухоли к лечению, что их количество находится в отрицательной обратной связи с продолжительностью жизни [3]. Следует также отметить, что важной проблемой является изучение влияния микроокружения на СКГ [22].

Стволовые клетки опухолей (СКО) были открыты в 1997 году. Авторы установили, что CD34⁺/CD38⁻ популяция клеток лейкемии способна индуцировать рост опухоли после трансплантации мышам [15]. Позднее СКО были обнаружены и в других типах опухолей, включая опухоли легких, поджелудочной железы, почек, печени [15]. Большое количество СКО приводит к снижению эффективности лечения, ухудшению прогноза [3].

В ГБ стволовые клетки опухолей впервые обнаружили S. Singh et al. В проведенном ими исследовании было выяснено, что СКГ – это CD133-положительные клетки, способные к самообновлению, пролиферации и дифференцировке. Введение мышам в головной мозг CD133-положительных клеток ГБ привело к развитию опухоли [39]. Данные клетки были резистентны к радиотерапии и темазоломиду, являющемуся золотым стандартом химиотерапии ГБ [24]. При культивировании *in vitro* такие клетки образуют нейросферы, клетки которых при введении животным способны вызывать рост опухоли [1].

Маркеры стволовых клеток глиобластомы

В настоящее время набор специфичных для СКГ маркеров окончательно не определен. Потенциальными маркерами СКГ могут быть мембранный белок CD133

(проминин), транскрипционный фактор Nanog, трансмембранный рецептор CD44, белок промежуточных филаментов нестин (табл) [3]. Выявлению маркеров СКГ и оценки степени их влияния на продолжительность жизни пациентов с ГБ посвящены многие исследования, в которых уровень экспрессии измеряется с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), а количество белка – с помощью вестерн-блота. В них показано, что продолжительность жизни пациентов зависит от выраженности экспрессии маркерных белков СКГ [3].

Наибольшее внимание исследователей привлекает маркер CD133 (проминин) – мембранный белок, который присутствует почти на всех клетках. Его функция точно неизвестна. Предположительно, он влияет на организацию топологии мембраны: были отмечены скопления CD133 в филоподиях «здоровых» клеток [8]. В опухолях его экспрессия повышена по сравнению с неопухолевыми тканями [3]. В исследованиях отмечена корреляция между экспрессией CD133 и резистентностью к химиотерапии и выживаемостью пациентов с ГБ. Так, повышенная экспрессия CD133 определяет низкую выживаемость больных, страдающих ГБ [24]. Повышенное содержание CD133 также было обнаружено в СКО других опухолей, например клетках рака почки. Терапия, нацеленная на CD133⁺ клетки, может быть перспективным методом лечения, определяющим направленное воздействие на ГСК [9], однако в ряде

исследований выявлены и CD133⁻ ГСК [3]. Так, интракраниальная имплантация CD133-негативных клеток крысе вызывает формирование опухоли с последующим ростом популяции CD133⁺ клеток. Полагают, что экспрессия CD133 может быть индуцирована как ответ на биоэнергетический стресс в клетке – гипоксию, дисфункцию митохондрий [3]. В зависимости от участка опухоли и ее типа в ней могут наблюдаться как повышенный, так и обычный уровень экспрессии CD133 [3].

J. He et al. показали, что экспрессия CD133 сочетается с экспрессией антигена тимоцитов CD90. Среди CD133⁺ клеток 100% составляют CD90⁺, но только 80% CD90⁺ несут на себе и CD133 [1]. CD133⁺/CD90⁺ и CD133⁻/CD90⁺ при культивировании образуют в 2 раза больше нейросфер, чем CD90⁻/CD133⁻ клетки [17].

Одним из важных потенциальных маркеров СКГ является CD95 (Fas-рецептор). Это рецептор, который индуцирует апоптоз после воздействия его лиганда – CD95L со стороны клеток иммунной системы. Опухолевые клетки ГБ резистентны к CD95-индуцированному апоптозу, более того, активация CD95 сигнального пути в клетках опухоли может приводить к повышению ее инвазивности [30]. Высокий уровень экспрессии CD95 в ГБ коррелирует со снижением выживаемости пациентов. В ряде исследований отмечено, что стимуляция CD95 при воздействии интерферонов 1-го типа может привести к появлению стволовых клеток опухоли, в этот процесс вовлечены STAT и Janus киназы [41],

Таблица

Потенциальные маркеры стволовых клеток глиобластомы

Маркер	Характеристика	Функциональная и прогностическая значимость
CD133	Трансмембранный гликопротеин, точная функция неизвестна, предположительно организация клеточной мембраны	Повышенное количество CD133 ⁺ клеток приводит к снижению продолжительности жизни пациентов с ГБ. Многие исследования указывают на него как на потенциальный маркер СКГ. Также обнаружен на СКГ других опухолей [3, 8]. Тем не менее существуют и CD133 ⁻ СКГ [1]
CD95	Рецептор к Fas-лиганду, индуктору апоптоза	Высокий уровень экспрессии CD95 в ГБ коррелирует с низкой выживаемостью пациентов [3]
CD44	Рецептор к гиалуронану	Уровень экспрессии CD44 не влияет на продолжительность жизни пациентов [1]
Nanog	Транскрипционный фактор, поддерживающий стволовость	Повышенное количество Nanog приводит к снижению продолжительности жизни пациентов с ГБ [3]
Nestin	Белок промежуточных филаментов	Повышенное количество нестина приводит к снижению продолжительности жизни пациентов, но имеются также исследования, не подтверждающие данную закономерность [3]
Sox-2	Транскрипционный фактор	Уровень экспрессии коррелирует со степенью злокачественности ГБ, максимальная концентрация отмечена в зонах опухоли с высокой пролиферацией [1]
Bmi-1	Белок – регулятор клеточного цикла	Прогностический маркер, высокая экспрессия данного белка является признаком неблагоприятного прогноза [1]
CD90	Антиген тимоцитов	Коэкспрессируется с CD133 [1]

блокировка STAT сигнального пути существенно ослабляет индукцию «стволового состояния» клеток в опухоли через CD95 [41].

Нестин – белок промежуточных филаментов, экспрессирующийся в нервной ткани. Он может быть потенциальным маркером СКГ, так как количество нестина в ткани опухоли выше, чем в неизменной нервной ткани мозга [3]. В ряде работ показано, что повышенный уровень нестина коррелирует со снижением выживаемости пациентов [3]. Тем не менее в некоторых исследованиях представлены данные, подтверждающие обратную зависимость [3].

Транскрипционный фактор Sox-2 выявляется в стволовых клетках в эмбриогенезе, плодном и постнатальном периодах. Отмечена корреляция между уровнем экспрессии Sox-2 и степенью злокачественности ГБ. Участки ГБ с высокой пролиферацией имеют максимальный уровень экспрессии Sox-2 [1].

Транскрипционный фактор Nanog присутствует в эмбриональных стволовых клетках и поддерживает их плюрипотентность. Кроме того, этот фактор присутствует в ряде опухолей, включая ГБ, он регулирует пролиферативную активность клеток. Обнаружена обратная корреляция между уровнем экспрессии Nanog и продолжительностью жизни пациентов [3].

Nanog активируется с помощью CD44 – рецептора гиалуроновой кислоты. В исследованиях было отмечено присутствие CD44 на ГБ у человека. В то же время CD44 коэкспрессируется с CD133 на клетках нейросфер, образующихся при культивировании СКГ *in vitro* [3]. После активации Nanog через STAT сигнальный путь активирует синтез белков множественной лекарственной устойчивости [5]. Ингибирование CD44 с помощью антител ослабляет прогрессирование глиобластомы у мышей, но в клинических исследованиях пациентов связь между уровнем экспрессии CD44 и продолжительностью их жизни не отмечена [3].

Белок Bmi-1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1) индуцирует активацию циклинзависимых киназ cdk2 и cdk4 путем ингибирования транскрипции гена ингибитора этих киназ p16, тем самым стимулируя пролиферацию. Bmi-1 считается прогностическим маркером ГБ. Высокий уровень экспрессии Bmi-1 является признаком неблагоприятного клинического прогноза [16].

Фенотип СКГ может различаться как у разных пациентов, так и в пределах одной опухоли. Проведенный генный анализ ГБ показал различия в уровнях экспрессии 117 генов в CD133⁺ и CD133⁻ фенотипах СКГ [2] и позволил выявить два типа СКГ. Первый тип имеет пронеуральный фенотип, он сходен с эмбриональными нейральными стволовыми клетками, обладает CD133 маркером, высоким уровнем экспрессии EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor), PDGDRa (Platelet Derived Growth Factor Receptor A), DCX (Doublecortin), низким уровнем CD44. Второй тип СКГ характеризуется главным образом мезенхимальным профилем

транскрипции, сходным с нейральными стволовыми клетками взрослых, не экспрессирует CD133, для него характерны низкие уровни EGFR, PDGDRa, DCX и высокий уровень экспрессии CD44. Как первый, так и второй фенотип отличаются от предшественников сниженной способностью к дифференцировке [1].

Поведение СКГ в опухоли, влияние микроокружения

Стволовые клетки глиобластомы могут изменять свой фенотип от предшественника к дифференцированной клетке и наоборот в зависимости от окружения: глия, сосуды. В исследованиях было отмечено, что микроглия способна стимулировать инвазивность ГБ [3], местная инактивация микроглии путем блокирования CSF-1R (рецептор к колониестимулирующему фактору роста 1) приводила к значительному уменьшению размера опухоли и увеличивала продолжительность жизни мышей [10].

В микроокружении СКГ можно выделить три разные зоны – периваскулярную, гипоксическую и инвазивную. Периваскулярная и инвазивная зоны находятся рядом с сосудами, а гипоксическая – в зоне некрозов [7]. Инвазивная зона расположена на границе опухоли – неизменная нервная ткань, присутствующие в ней СКГ разрушают стенки здоровых сосудов, тем самым осуществляя прогрессирующий рост опухоли [11]. Несмотря на то, что периваскулярная и инвазивные зоны контактируют с сосудами, их сигнальные пути различаются [7]. Периваскулярная зона содержит участки поддержки пролиферации, которые могут превращаться в участки инвазии. Для участков поддержки характерны высокий уровень CD44, аномальные сосуды, находящиеся в нем СКГ поддерживают «стволовое состояние» клеток и их самообновление. Окружающие ГБ ткани продуцируют ряд белков, влияющих на СКГ, такие как адгезивный гликопротеин ламинин $\alpha 2$, реализующий эффект на СКГ через интегрин $\alpha 6$, и сиалопротеин остеопоинтин, реализующий эффект через рецептор CD44 [7]. Эндотелий выделяет факторы роста FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2), TGF- β (Transforming Growth Factor β), SHH (Sonic Hedgehog) и оксид азота (NO) [7]. Межклеточные сигналы в периваскулярной зоне реализуются через Notch сигнальный путь. СКГ стимулируют ангиогенез как напрямую путем синтеза васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF) или дифференцировки в клетки эндотелия [33], так и косвенно, с помощью стимуляции секреции ангиокринных факторов в клетках эндотелия. На инвазивных участках СКГ характеризуются средним уровнем CD44. Стволовые клетки глиобластомы привлекаются хемоаттрактантами: SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) и брадикинином [7] и путем избыточной экспрессии рецепторов тирозин-киназ ephrin-B2 увеличивают просвет между формирующими гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) астроцитами, тем самым нарушая его целостность, после чего проникают внутрь сосуда. Это

приводит к нарушению целостности сосуда и индукции неоангиогенеза и превращению инвазивной зоны в зону с поддержкой пролиферации. СКГ в инвазивной и поддерживающей зонах представляют собой две разные клеточные популяции. Исследования показали, что СКГ из инвазивной зоны обладают более низкой пролиферативной активностью, высокой адгезивностью *in vitro* и не вызывают развития опухоли при ортотопической имплантации [31]. Различия этих двух популяций клеток обусловлены микроокружением, в зоне поддержки сосуда разрушены, поэтому в этих зонах развивается гипоксия, образуются факторы ангиогенеза и продуцируются медиаторы воспаления [7], в результате происходит стимуляция пролиферации, поддержание «стволового состояния» клеток. В зоне инвазии сосуда не имеют повреждений, в результате стимуляции пролиферации не происходит, но происходит активация инвазии [7]. Одно из различий стволовых клеток глиобластомы из инвазивной и поддерживающей зон – уровень экспрессии CD44. Средний уровень CD44 поддерживает миграцию СКГ [20], он присущ инвазивной зоне, высокие же уровни CD44 подавляют миграцию и стимулируют пролиферацию. Таким образом, внутри опухоли находятся регионы с большим количеством CD44⁺ клеток, где происходят обновление и пролиферация, а на периферии отмечен средний уровень CD44 и выявляется инвазия СКГ в сосуды [38]. Так называемым переключателем процессов инвазия–пролиферация может быть белок Olig-2 (Oligodendrocyte transcription factor). Если он фосфорилирован, СКГ находятся в состоянии пролиферации, если нет – инвазии [38]. В течение существования опухоли зоны могут переходить одна в другую, на участке инвазии сосуды и ГЭБ повреждаются и разрушаются, создавая зону поддержки [19]. Возможен и обратный процесс. Так, при лечении бевализумабом (антитела к VEGF) зона поддержки переходит в инвазивную [36].

Участки гипоксии в опухоли представлены многочисленными зонами некроза. Гипоксия вовлечена в прогрессирование, метастазирование и резистентность опухоли. В глиобластомах очаги некроза окружены псевдопалисадами – структурами, уникальными для ГБ [34]. Клетки псевдопалисадов экспрессируют повышенные уровни маркеров СКГ. Считается, что это волнообразный процесс перемещения СКГ из зоны гипоксии [6]. В исследованиях отмечено, что гипоксия индуцирует стволовое состояние и самообновление СКГ [34]. Клеточный ответ на гипоксию регулируется транскрипционными факторами HIF (Hypoxia-inducible-factor), экспрессия фактора HIF2a увеличивается при гипоксии и коррелирует с количеством CD133⁺ клеток [40]. Гипоксия повышает экспрессию маркеров стволовых клеток c-Myc, Oct4, Sox2 в СКГ c-Myc, Oct4, Sox2 [34]. Наряду с этим в СКГ при гипоксии активируется HIF1a. Так, устранение экспрессии HIF1a с помощью РНК-интерференции приводит к снижению количества CD133⁺ клеток и уменьшает

инвазивность СКГ [40]. При гипоксии фактор HIF1a активирует сигнальный путь Notch. При этом происходит снижение экспрессии E-кадгерина с последующей инвазией СКГ в сосуд [42], ингибирование Notch путем РНК-интерференции при гипоксии предотвращает инвазию СКГ и приводит к их апоптозу [42].

Значения pH в зоне ГБ снижены по сравнению со интактной тканью [18]. Снижение pH происходит вследствие ускоренного метаболизма и уменьшения уровня кислорода в ГБ. Низкий уровень pH активирует экспрессию HIF2a и маркеров стволовых клеток Oct4, Olig2, Nanog [18]. Закисление в сочетании с гипоксией индуцирует HIF факторы и стимулируют поддержку СКГ через путь HSP90 (heat shock protein). Ингибирование HSP90 замедляет самообновление СКГ, индуцированное закислением [34]. Еще один белок, вовлеченный в ответ на закисление в СКГ, – это натрий-протонный антипорт NHE1 [12]. Его экспрессия повышена в СКГ для сохранения внутриклеточного pH [34]. Данный белок стимулирует способность СКГ к миграции, изменяя активность матриксных металлопротеаз (ММР) и взаимодействия с белком эзрином, соединяющим мембрану клетки с актиновым цитоскелетом [13].

В ГБ найдено большое количество клеток микроглии [34]. В опухоли микроглия активирует прогрессирующий рост с помощью секреции гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [34]. Инактивация микроглии путем инъекции липосом с клодроновой кислотой, избирательно разрушающей макрофаги, предотвращает рост ГБ [26]. СКГ принимают активное участие в привлечении глии и активации ее туморогенных свойств [47]. ГБ также синтезирует колониестимулирующий фактор макрофагов, которые стимулируют экспрессию в микроглии белка IGFBR1, связывающего инсулиноподобный фактор роста, что приводит к индукции ангиогенеза [28]. Межклеточное вещество является препятствием для инвазии ГБ, но клетки опухоли синтезируют ММР для расщепления межклеточного вещества [27]. Клетки ГБ активируют экспрессию ММР мембранного типа (MT1-ММР) через P38 MAP-киназный сигнальный путь [24]. Это активирует ММР2, секретлируемый СКГ, и тем самым стимулирует рост опухоли [34]. Также микроглия синтезирует остеооптин, который через рецептор CD44 индуцирует агрессивный фенотип опухоли активацией HIF2a [32]. Микроглия синтезирует факторы роста, обработка клеток глиобластомы кондиционированной средой, в которой росла микроглия, приводит к активации сигнального пути цитоплазматической тирозинкиназы Pyc2 [35]. Это стимулирует инвазию с помощью MAPK каскада [23]. Глия также синтезирует эпидермальный фактор роста и усиливает проведение его сигналов в ГБ, ингибирование рецепторов к эпидермальному фактору роста предотвращает индуцированную микроглией инвазию [10].

Микроглия синтезирует трансформирующий фактор роста TGF- β в ГБ, где его сигнальный путь дефектен, и он принимает участие в инвазии влиянием на экспрессию MMP и интегринов [45]. Секретция микроглией TGF β 1 приводит к увеличенной экспрессии MMP9 и последующей инвазии опухолевых клеток [46]. Также в зонах СКГ были определены макрофаги [22], привлеченные в опухоль секретированным СКГ периостинном [48]. В опухоли макрофаги приобретают M2 фенотип и секретируют IL-6 и IL-10, которые стимулируют пролиферацию СКГ в зонах гипоксии [37].

Влияние нейральных стволовых клеток на СКГ остается предметом дискуссий. В проведенных исследованиях было обнаружено, что в ГБ среди CD133⁺ клеток от 20 до 60% составляют неопухолевые нейральные стволовые клетки, причем увеличение их количества положительно влияет на прогноз заболевания [29]. Благодаря своим противоопухолевым свойствам они мигрируют в ткань опухоли и выделяют супрессорные факторы, например BMP-7 [43]. Если СКГ имеет рецептор к BMP, происходит замедление пролиферации, дифференцировка по астроцитарному или нейрональному пути. Туморогенность, таким образом, снижается. Однако в случае отсутствия рецепторов к BMP начинается активная пролиферация СКГ [1].

Заключение

Стволовые клетки глиобластомы – это клетки, поддерживающие ее резистентность, обновление и инвазию, имеющие определенный набор маркеров. Результаты многочисленных исследований показали, что наиболее надежные маркеры данных клеток – CD133, CD95, Sox-2, Nanog, нестин – имеют прогностическую значимость. Тем не менее существует ряд данных, ставящих это под сомнение, поскольку были обнаружены CD133-негативные стволовые клетки глиобластомы, а в некоторых работах не отмечалась прогностическая значимость определенных маркеров. Глиобластома имеет гетерогенную структуру с разными зонами, среди которых можно выделить зоны поддержки пролиферации, инвазии и гипоксии. Микроокружение этих зон оказывает влияние на стволовые клетки глиобластомы с помощью факторов роста, pH, кровоснабжения. В зависимости от зоны стволовые клетки глиобластомы разделяются на отдельные популяции с разными фенотипами. Можно выделить две популяции – поддерживающую и инвазивную. Поддерживающая популяция стимулирует обновление и пролиферацию, инвазивная – прогрессирующий рост опухоли. Структура глиобластомы динамична, зоны поддержки популяции и инвазии могут переходить друг в друга, тем самым изменяя фенотип находящихся в них стволовых клеток глиобластомы. Многие особенности стволовых клеток глиобластомы еще не до конца выяснены. Их дальнейшее изучение позволит улучшить понимание механизмов опухолевой прогрессии и разработать новые подходы к повышению эффективности лечения.

Литература/References

1. Борисов К.Е., Сакаева Д.Д. Стволовые клетки глиальных опухолей головного мозга // Архив патологии. 2013. № 2. С. 43–52 [Borisov K.E., Sakaeva D.D. Glial brain tumor stem cells // Arkhiv patologii. 2013. V. 2. P. 43–52 (In Russ.)].
2. Beier D., Hau P., Proescholdt M., Lohmeier A. et al. CD133⁺ and CD133⁻ glioblastoma-derived cancer stem cells show different growth characteristics and molecular profiles // Cancer Res. 2007;67(9):4010–5.
3. Bien-Möller S., Balz E., Herzog S., Plantera L. et al. Association of Glioblastoma Multiforme Stem Cell Characteristics, Differentiation, and Microglia Marker Genes with Patient Survival // Hindawi Stem Cells International. 2018;doi: 10.1155/2018/9628289.
4. Binda E., Reynolds B., Vescovi A. Glioma stem cells: turpis omen in nomen? (the evil in the name?) // J Intern Med. 2014;276(1):25–40.
5. Bourguignon L., Peyrollier K., Xia W., Gilad E. Hyaluronan-CD44 Interaction Activates Stem Cell Marker Nanog, Stat3-mediated MDR1 Gene Expression, and Ankyrin-regulated Multidrug Efflux in Breast and Ovarian Tumor Cells // J Biol Chem. 2008;283(25):17635–51.
6. Brat D., Castellano-Sanchez A., Hunter S., Pecot M. et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population // Cancer Res. 2004;64(3): 920–7.
7. Brooks L., Parrinello S. Vascular regulation of glioma stem-like cells: a balancing act // Curr Opin Neurobiol. 2017;47:8–15.
8. Corro C., Moch H. Biomarker discovery for renal cancer stem cells // J Pathol: Clin Res. 2018;4:3–18.
9. Choy W., Nagasawa D., Trang A., Thill K. et al. CD133 as a marker for regulation and potential for targeted therapies in glioblastoma multiforme // Neurosurg Clin N Am. 2012;23(3):391–405.
10. Coniglio S., Eugenin E., Dobrenis K., Stanley E. et al. Microglial stimulation of glioblastoma invasion involves epidermal growth factor receptor (EGFR) and colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) signaling // Molecular Medicine. 2012;18: 519–27.
11. Cuddapah V., Robel S., Watkins S., Sontheimer H.A. Neurocentric perspective on glioma invasion // Nat Rev Neurosci. 2014;15:455–65.
12. Chiche J., Brahim-Horn M., Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer // J Cell Mol Med. 2010;14(4):771–94.
13. Cong D., Zhu W., Shi Y., Pointer K. et al. Upregulation of NHE1 protein expression enables glioblastoma cells to escape TMZ-mediated toxicity via increased H(+) extrusion, cell migration and survival // Carcinogenesis. 2014;35(9):2014–24.
14. Griguer C., Oliva C., Gobin E., Marcocelles P. et al. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma // PLoS One. 2008;3(11):e3655. doi: 10.1371/journal.pone.0003655
15. Hanh Phi L., Sari I., Yang Y., Hyun S. Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment // Hindawi Stem Cells International. 2018doi:10.1155/2018/5416923
16. Hayry V., Tynninen O., Haapasalo H., Wolfer J. et al. Stem cell protein BMI-1 is an independent marker for poor prognosis

- in oligodendroglial tumors // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2008;34(5):555–63.
17. He J., Liu Y., Zhu T., Zhu J. et al. CD90 is identified as a marker for cancer stem cells in primary high-grade gliomas using tissue microarrays // *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(6): M111.010744. doi: 10.1074/mcp.M111.010744.
 18. Hjelmeland A., Wu Q., Heddleston J., Choudhary G. et al. Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype // *Cell Death Differ.* 2011;18(5):829–40.
 19. Holash J., Maisonpierre P., Compton D., Boland P. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF // *Science.* 1999;284:1994–8.
 20. Klank R., Decker S., Bangasser B., Forster C. et al. Biphasic dependence of glioma survival and cell migration on CD44 expression level // *Cell Rep.* 2017;18:23–31.
 21. Lathia J., Heddleston J., Venere M., Rich J. Deadly teamwork: neural cancer stem cells and the tumor microenvironment // *Cell Stem Cell.* 2011;8(5):482–5.
 22. Lathia J., Mack S., Mulkearns-Hubert E., Valentim C., Rich J. Cancer stem cells in glioblastoma // *Genes dev.* 2015;29:1203–17.
 23. Lipinski C., Tran N., Menashi E., Rohl C. et al. The tyrosine kinase pyk2 promotes migration and invasion of glioma cells // *Neoplasia.* 2005;7(5):435–45.
 24. Liu G., Yuan X., Zeng Z., Tunici P. et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma // *Mol Cancer.* 2006;5(1):67.
 25. Liu W., Lin C., Hsiao M., Gean P. Minocycline inhibits the growth of glioma by inducing autophagy // *Autophagy.* 2011;7(2):166–75.
 26. Markovic D., Glass R., Synowitz M., Rooijen N. et al. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metal-loprotease-2 // *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64:754–62.
 27. Nakada M., Okada Y., Yamashita J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion // *Front Biosci.* 2003;8:261–9.
 28. Nijaguna M., Patil V., Urbach S., Shwetha S. et al. Glioblastoma-derived macrophage colony-stimulating factor (MCSF) induces microglial release of insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1) to promote angiogenesis // *J Biol Chem.* 2015;290(38):23401–15.
 29. Pallini R., Ricci-Vitiani L., Montano N., Mollinari C. et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis // *Cancer.* 2011;59(1):162–74.
 30. Peter M., Hadji A., Murmann A., Brockway S. et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer // *Cell Death Differ.* 2015;22:549–59.
 31. Piccirillo S., Combi R., Cajola L., Patrizi A. et al. Distinct pools of cancer stem-like cells coexist within human glioblastomas and display different tumorigenicity and independent genomic evolution // *Oncogene* 2009;28:1807–11.
 32. Pietras A., Katz A., Ekstrom E., Wee B. et al. Osteopontin-CD44 signaling in the glioma perivascular niche enhances cancer stem cell phenotypes and promotes aggressive tumor growth // *Cell Stem Cell.* 2014;14(3):357–69.
 33. Ricci-Vitiani L., Pallini R., Biffoni M., Todaro M. et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells // *Nature.* 2010;468:824–8.
 34. Roos A., Ding Z., Loftus J., Tran N. Molecular and Microenvironmental Determinants of Glioma Stem-Like Cell Survival and Invasion // *Front Oncol.* 2017;7:120. doi: 10.3389/fonc.2017.00120
 35. Rolon-Reyes K., Kucheryavykh Y., Cubano L., Inyushin M. et al. Microglia activate migration of glioma cells through a Pyk2 intracellular pathway // *PLoS One.* 2015;10(6):e0131059. doi:10.1371/journal.pone.0131059
 36. Rubenstein J., Kim J., Ozawa T., Zhang M. et al. Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption // *Neoplasia.* 2000;2:306–14.
 37. Samaras V., Piperi C., Korkolopoulou P., Zisakis A. et al. Application of the ELISPOT method for comparative analysis of interleukin (IL)-6 and IL-10 secretion in peripheral blood of patients with astroglial tumors // *Mol Cell Biochem.* 2007;304(1):343–51.
 38. Singh S., Fiorelli R., Kupp R., Rajan S. et al. Post-translational modifications of OLIG2 regulate glioma invasion through the TGF-beta pathway // *Cell Rep.* 2016;16:950–66.
 39. Singh S., Clarke I., Terasaki M., Bonn V. et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors // *Cancer Res.* 2003;63(18):5821–8.
 40. Soeda A., Park M., Lee D., Mintz A. et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha // *Oncogene.* 2009;28(45):3949–59.
 41. Qadir A., Ceppi P., Brockway S., Weichselbaum R. CD95/Fas Increases Stemness in Cancer Cells by Inducing a STAT1-Dependent Type I Interferon Response // *Cell Rep.* 2017;18:2373–86.
 42. Qiang L., Wu T., Zhang H., Lu N. et al. HIF-1alpha is critical for hypoxia-mediated maintenance of glioblastoma stem cells by activating Notch signaling pathway // *Cell Death Differ.* 2012;19(2):284–94.
 43. Walzlein J., Synowitz M., Engels B., Markovic D. et al. The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age // *Stem Cells.* 2008;26(11):2945–54.
 44. Wang J., Sakariassen P., Tsinkalovsky O., Immervoll H. et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells // *Int J Cancer.* 2008;122(4):761–7.
 45. Yamada N., Kato M., Yamashita H., Nister M. et al. Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I and type-II receptors in human glioblastoma // *Int J Cancer.* 1995;62(4):386–92.
 46. Ye X., Xu S., Xin Y., Yu S. et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway // *J Immunol.* 2012;189(1):444–53.
 47. Yi L., Xiao H., Xu M., Ye X. et al. Glioma-initiating cells: a predominant role in microglia/macrophages tropism to glioma // *J Neuroimmunol.* 2011;232(1):75–82.
 48. Zhou W., Ke S., Huang Z., Flavahan W. et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth // *Nat Cell Biol.* 2015;17(2):170–82.

STEM CELLS OF GLIOBLASTOMA

A.N. Kopylov, P.L. Gorelikov, A.I. Alekseeva

The review describes the immunophenotypic properties of the stem cells of glioblastoma and their role in tumor growth. Glioblastoma is a heterogeneous tumor which regions differ in proliferative activity, features of angiogenesis and secondary changes caused by inconsistent microenvironment. Stem cells of glioblastoma may vary in phenotype and metabolism depending on their regional location, that ensures their resistance to chemotherapy and radiotherapy and contributes to the invasive growth of the tumor. Elimination of stem cells of glioblastoma may be a promising method for the treatment of glioblastoma. Therefore, a search for markers of stem cells of glioblastoma is conducted in order to develop targeted therapy.

Key words: glioblastoma, stem cells of glioblastoma, microenvironment

Информация об авторах

Копылов Алексей Николаевич – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 128 8682. E-mail: dreadnought88@gmail.com

Гореликов Петр Леонидович – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией нейроморфологии НИИ морфологии человека.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 128 8682.

Алексева Анна Игоревна – младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека, младший научный сотрудник лаборатории направленных транспортных систем Института трансляционной медицины и биотехнологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8.

Материал поступил в редакцию 28 сентября 2018 года

РЕЦЕНЗИЯ

на монографию Н.В. Ягловой, С.С. Обернихина «Развитие иммунной системы потомства после иммуностимулирующего воздействия в ранние сроки беременности». М.: ИНФРА-М, 2017. – 220 с., ил.

Монография написана высококвалифицированными специалистами в области гистологии, цитологии и физиологии иммунной системы и посвящена влиянию реакций иммунной системы матери в ранние сроки беременности на постнатальное развитие и функционирование органов иммунной защиты потомства. Возможность влияния реакций материнской иммунной системы при воздействии на ее организм различных патогенов, лекарственных препаратов и т.д. в ранние сроки беременности, еще до начала формирования у эмбриона органов иммунной защиты, и последствия этих влияний на антенатальное и постнатальное развитие потомства являются мало изученной проблемой. Актуальность подобных исследований обусловлена увеличением иммунопатологий детского возраста, особенно ростом показателей аллергических, аутоиммунных и опухолевых заболеваний.

Монографию открывает раздел «Введение», в котором авторы дают краткую характеристику проблеме исследования и обосновывают актуальность ее дальнейшего изучения.

Глава 1 посвящена обзору данных литературы по изменениям иммунной системы потомства и механизмам этих изменений при воздействии различных факторов в пренатальном периоде. Авторы обобщают имеющиеся сведения, касающиеся воздействия на материнский организм в середине и второй половине беременности, и приводят данные об изменениях врожденного, приобретенного и пассивного иммунитета у потомства и о роли гормонов и цитокинов в этих изменениях.

Глава 2 представляет собой обзор данных о пренатальном и постнатальном развитии органов иммунной защиты и кроветворения. В ней изложены современные представления о формировании и развитии тимуса и селезенки. Авторами проведено сравнение особенностей развития органов у человека и мыши как наиболее часто используемого вида животных для экспериментальных исследований в области иммунологии.

Глава 3 посвящена оценке критических периодов уязвимости в развитии иммунной системы по данным токсикологических, эмбриологических и иммунологических исследований.

Глава 4 содержит описание использованных авторами оригинальных моделей иммуностимулирующего воздействия на организм беременных самок мышей, в котором обосновывают выбор конканавалина А в качестве иммуностимулятора и сроки его введения, а также приводят данные об изменениях в продукции цитокинов, пролиферации клеток и морфологических изменениях органов иммунной системы беременных

самок после однократной стимуляции. Для исключения прямого действия конканавалина А на эмбрион авторы проводят адоптивный перенос ранее активированных сингенных клеток селезенки.

Авторы показывают, что данная модель вызывает увеличение секреции цитокинов и пролиферации лимфоцитов, усиливает физиологические изменения в иммунной системе, происходящие во время беременности, но не вызывает гибель плодов.

Глава 5 посвящена морфофункциональным изменениям тимуса потомства самок, мышей, подвергшихся иммуностимуляции в ранние сроки беременности, в постнатальном онтогенезе. Авторы подробно описывают морфологические изменения органа, изменения субпопуляционного состава и пролиферативной активности лимфоцитов тимуса в препубертатном, пубертатном и постпубертатном периоде.

Особую ценность представляют данные о содержании в разные периоды постнатального онтогенеза малоизученных малых субпопуляций лимфоцитов тимуса – NK-, NKT-, B-, V1 и активированных B-клеток в норме и после пренатального воздействия. В конце главы авторы проводят анализ гистологических и цитологических характеристик постнатального морфогенеза тимуса и обобщают данные об изменениях развития органа.

В главе 6 изложены сведения о морфологических изменениях селезенки, изменениях субпопуляционного состава и пролиферативной активности лимфоцитов органа в препубертатном, пубертатном и постпубертатном периодах. Авторы приводят данные об изменениях возрастной динамики основных показателей развития селезенки.

В главе 7 описаны изменения продукции основных пролиферативных, антипролиферативных, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов клетками тимуса и селезенки потомства самок контрольной группы и самок, подвергшихся иммуностимулирующему воздействию в ранние сроки беременности. Авторы проводят комплексную оценку функциональной активности клеток, так как оценивают продукцию цитокинов *in vitro* у нестимулированных клеток, а также при воздействии на них T- и B-клеточных митогенов. Эти исследования наряду с изучением пролиферативной активности клеток и численностью различных субпо-



пуляций клеток в органах позволяют оценить процессы дифференцировки лимфоцитов в центральных и периферических органах иммунной системы, а также выявить изменения функционального состояния органов.

Глава 8 посвящена оценке функциональной активности иммунной системы потомства самок, подвергшихся иммуностимуляции в ранние сроки беременности, в экспериментах *in vivo*. Авторы моделируют системный воспалительный ответ введением эндотоксина *Escherichia coli* и опухолевый процесс введением клеток меланомы. Большой интерес представляют данные об отличиях в реагировании центральных и периферических органов иммунной системы при развитии системного воспалительного ответа. Установленные авторами механизмы нарушения реагирования иммунной системы обладают большой научно-практической значимостью.

Завершает монографию раздел «Заключение», в котором авторы обобщают приведенные в главах данные и формируют концепцию о возможности и о характере изменений постнатального развития иммунной системы потомства вследствие однократного усиления пролиферации лимфоцитов матери и секреции ими цитокинов в ранние сроки беременности, до начала формирования лимфоидных органов эмбриона.

Результаты исследования расширяют представления о закономерностях и особенностях постнатального развития органов иммунной защиты и показывают значительную роль, которую играет стимулирующее

воздействие на иммунную систему матери в ранние сроки беременности, до начала формирования органов иммунной защиты эмбриона, на их дальнейшее развитие, а также функционирование. Полученные данные дают новое направление исследованиям влияния пренатальных факторов в разные конкретные сроки эмбрионального развития на постнатальный морфогенез и функциональную активность органов и систем.

Монография хорошо иллюстрирована, содержит 118 авторских структурно-логических схем, графиков, диаграмм и фотографий микропрепаратов высокого качества. Цветные микрофотографии также представлены в облачном пространстве и доступны для ознакомления читателям.

Монография Н.В. Ягловой, С.С. Обернихина «Развитие иммунной системы потомства после иммуностимулирующего воздействия в ранние сроки беременности» представляет интерес для широкого круга гистологов, эмбриологов, цитологов, иммунологов, патофизиологов и всех врачей, интересующихся течением инфекционно-воспалительных и опухолевых заболеваний в детском возрасте.

*Л.Ф. Курило,
главный научный сотрудник лаборатории
генетики нарушений репродукции
Медико-генетического научного центра,
доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ*

НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МОРФОГЕНЕЗА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ»

1–2 ноября 2018 года в Научно-исследовательском институте морфологии человека прошла научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», организованная при поддержке Российского общества патологоанатомов. В работе конференции приняли участие аспиранты и сотрудники НИИ морфологии человека, биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и медицинских вузов, научно-исследовательских центров и институтов Российской Федерации и Республики Беларусь.

На конференции учеными и специалистами из Москвы, Санкт-Петербурга, Курска, Ростова-на-Дону, Екатеринбургa, Рязани, Смоленска, Оренбургa, Твери, Тюмени, Пущино, а также Гродно (Республика Беларусь) и Додомы (Танзания) было представлено 25 устных докладов, 23 стендовых сообщения, опубликовано 64 тезиса.

Научная программа конференции включала следующие разделы:

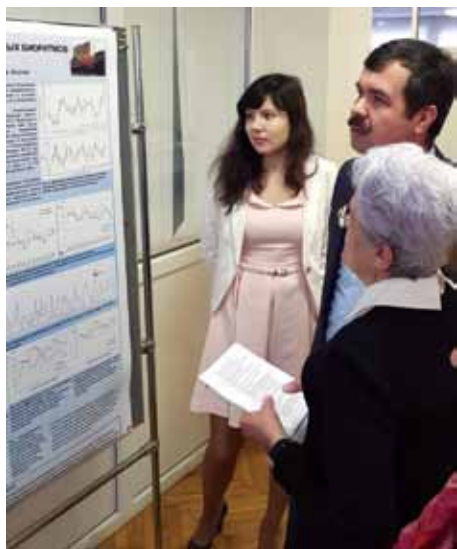
- морфологические аспекты регенерации и развития;
- структурные основы иммунологической реактивности и индивидуальной изменчивости;
- онкоморфология;
- экспериментальная морфология.

Конференцию открыли научный руководитель НИИ морфологии человека член-корреспондент РАН Л.В. Кактурский и председатель оргкомитета конфе-

ренции, главный научный сотрудник Института профессор О.В. Макарова, подчеркнувшие необходимость развития морфологических дисциплин и координации научно-практической деятельности морфологов страны, кадровый дефицит которых вызывает серьезную озабоченность.

Доклады пленарного заседания 1 ноября были посвящены регуляции пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени (доктор медицинских наук А.В. Ельчанинов, НИИ морфологии человека) и гистофизиологии щитовидной железы взрослого и развивающегося организма под воздействием эндокринного дисраптора ДДТ (доктор медицинских наук Н.В. Яглова, НИИ морфологии человека).

На заседании секции «Регенерация и развитие» прозвучали доклады, связанные со структурными особенностями гигантских многоядерных клеток при различных видах стимуляции репаративной регенерации в герниопластике (профессор, доктор медицинских наук М.А. Затолокина, Курский государственный медицинский университет), изучением динамики построения остова кожи в антенатальном и постнатальном онтогенезе (Е.С. Мишина, ЦИТО им. Н.Н. Приорова), перспективами иммуноморфологического подхода в исследованиях развития мозга (А.С. Харламова, НИИ морфологии человека) и развитием симпатической иннервации эндокринной части поджелудочной железы человека (Ю.С. Кривова, НИИ морфологии человека). В секции «Структурные основы иммуноло-





гической реактивности и индивидуальной изменчивости» обсуждались вопросы механизмов формирования нестабильной атеросклеротической бляшки (доктор биологических наук П.В. Пигаревский, В.А. Снегова, Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург), индивидуальных и половых различий течения воспалительных заболеваний (Н.А. Золотова, Д.Ш. Джалилова, НИИ морфологии человека).

Во второй день работы конференции проходили заседания секций «Онкоморфология» и «Экспериментальная патология». Доклады освещали вопросы иммуногистохимического фенотипа раннего рака желудка (А.Е. Бирюков, НИИ морфологии человека), плоскоклеточного рака шейки матки (профессор Е.М. Непомнящая, Ростовский научно-исследовательский онкологический институт), рака молочной железы (М.В. Мнихович, К.Ю. Мидибер, НИИ морфологии человека; В.А. Милованкин, Уральский государственный медицинский университет) и миксомы сердца (профессор К.А. Рогов, НИИ морфологии человека). Были представлены сообщения о гистофизиологии семенников мышей C57Bl/6 при длительном введении высокой дозы тестостерона (И.С. Цветков, НИИ морфологии человека), об анализе влияния пептидов Noggin и LDN193189 на нейрональную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых

клеток человека (Д.И. Салихова, Медико-генетический научный центр) и о сравнительной характеристике макрофагов эмбрионального и моноцитарного происхождения (А.В. Лохонина, НИИ морфологии человека).

В секции экспериментальной морфологии особый интерес участников конференции вызвал доклад Д.И. Салиховой (Медико-генетический научный центр), в котором авторами проведена успешная попытка индукции плюрипотентных стволовых клеток в нейральном направлении, что в дальнейшем несомненно будет использоваться в качестве нового источника ноотропных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Стендовая секция включала доклады, посвященные морфологическим исследованиям опухолей молочной железы, желудка, толстой кишки, а также экспериментальной глиобластоме, раневому заживлению, развитию поджелудочной железы и паркинсонизму. В постерной сессии были затронуты вопросы, касающиеся морфофункциональных изменений лимфоидных органов, энтеральной нервной системы, эндокринных желез, желудочно-кишечного тракта на различных экспериментальных моделях, в том числе ДСН-индуцированного колита, ацетоминофениндукцированной печеночной недостаточности, а также при воздействии эндокринных дисрапторов, липополисахарида. Кураторами стендовых секций отмечены отличное качество представленных постерных докладов и высокий уровень исследований.

На конференции были представлены новейшие достижения современных исследований в области клинической и экспериментальной морфологии. В результате активного обсуждения представленных докладов намечены дальнейшие перспективы развития морфологических исследований.

*А.М. Косырева,
руководитель научно-организационного отдела
НИИ морфологии человека,
М.Н. Болтовская,
заместитель директора НИИ морфологии человека
по научной работе*

ПАМЯТИ НИКОЛАЯ ПЕТРОВИЧА ОМЕЛЬЯНЕНКО

16 ноября 2018 года на 69-м году жизни скончался Николай Петрович Омеляненко.

Н.П. Омеляненко родился 20 марта 1950 года, в 1973-м окончил Первый Московский медицинский институт имени И.М. Сеченова. С 1973 по 1986 год работал в должности научного сотрудника в научно-исследовательской лаборатории биологических структур Минздрава СССР. С 1986 года до конца жизни Николай Петрович работал в Центральном институте травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова (ныне Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова) заведующим лабораторией электронной микроскопии, а затем лабораторией соединительной ткани с группой клинической генетики.

Николай Петрович Омеляненко был крупным ученым, посвятившим всю свою жизнь без остатка любимому делу – научному поиску. Он внес основополагающий вклад в развитие фундаментальных знаний о строении соединительной ткани.

Н.П. Омеляненко – доктор медицинских наук, профессор, лауреат премии Ленинского комсомола, лауреат премии Правительства Российской Федерации. Он был членом ряда профессиональных сообществ – Российской ассоциации морфологов, обществ по травматологии и ортопедии, по изучению соединительной ткани, заживлению ран, а также Нью-Йоркской академии наук. Николаем Петровичем Омеляненко опубликовано более 200 печатных работ, в том числе двух-



томная монография «Соединительная ткань: (гистофизиология и биохимия)», книга «Актуальные проблемы теоретической и клинической остеоартрологии». Под его руководством подготовлены десятки учеников, практикующих врачей, специалистов-морфологов.

Николай Петрович Омеляненко был и останется в нашей памяти настоящим ученым, искренне преданным своей специальности – морфологии. Его ученики обязаны этому замечательному человеку своим становлением и развитием. Память о Николае Петровиче Омеляненко будет жить в наших сердцах. Его уход из жизни – невосполнимая утрата для родных, близких, коллег, учеников, российской морфологической школы.

Коллектив Национального медицинского исследовательского центра травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Редакционная коллегия журнала «Клиническая и экспериментальная морфология»

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, мест(а) работы, 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 // {/ArticleTitle}{/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*. М.: 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 vrachev 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». М., 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. М., 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.