

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 8 | № 3 | 2019

ISSN 2226-5988 (print)
ISSN 2686-6749 (online)

**«Клиническая
и экспериментальная
морфология»**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Периодичность 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

Телефоны +7 (499) 120-13-34
+7 (499) 128-87-01

e-mail: sem.journal@mail.ru

www.sem-journal.ru

www.morpholhum.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 года.

© ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

Главный редактор

Кактурский Л.В., член-корреспондент РАН, доктор мед. наук, профессор

Заместители главного редактора

Зайратьянц О.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

Макарова О.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

Ответственный секретарь

Болтовская М.Н., доктор биол. наук, профессор, Москва, Россия

Редакционная коллегия

Александрова М.А., доктор биол. наук,
Москва, Россия

Алексеева Н.Т., доктор мед. наук,
профессор, Воронеж, Россия

Алиев Г.М., доктор мед. наук, профессор,
Сан Антонио, США

Андреева Е.Р., доктор биол. наук, доцент,
Москва, Россия

Банин В.В., член-корр. РАН, доктор
мед. наук, профессор, Москва, Россия

Большакова Г.Б., доктор биол. наук,
Москва, Россия

Буравков С.В., доктор мед. наук,
Москва, Россия

Гарновская М.Н., кандидат биол. наук,
доцент, Чарльстон, США

Ковригина А.М., доктор биол. наук,
профессор, Москва, Россия

Коршунов А.Г., доктор мед. наук,
профессор, Гейдельберг, Германия

Кочуков М.Ю., доктор мед. наук,
Хьюстон, США

Кушлинский Н.Е., член-корр. РАН, доктор
мед. наук, профессор, Москва, Россия

Марков И.И., доктор мед. наук,
профессор, Самара, Россия

Михалева Л.М., доктор мед. наук,
профессор, Москва, Россия

Никитюк Д.Б., член-корр. РАН,
доктор мед. наук, профессор, Москва,
Россия

Пауков В.С., доктор мед. наук, профессор,
Москва, Россия

Постнов А.Ю., доктор мед. наук,
Москва, Россия

Рогов Ю.И., кандидат мед. наук, доцент,
Минск, Республика Беларусь

Рыжова М.В., доктор мед. наук,
Москва, Россия

Савельев С.В., доктор биол. наук,
профессор, Москва, Россия

Туркина Е.В., кандидат биол. наук, доцент,
Чарльстон, США

Черняев А.Л., доктор мед. наук,
профессор, Москва, Россия

Яглова Н.В., доктор мед. наук, Москва,
Россия

Редакционный совет

Волощук И.Н., доктор мед. наук,
профессор, Москва, Россия

Воронин К.Э., доктор мед. наук, доцент,
Чарльстон, США

Доросевич А.Е., доктор мед. наук,
профессор, Смоленск, Россия

Ермолаева С.А., доктор мед. наук,
Москва, Россия

Ерофеева Л.М., доктор биол. наук,
профессор, Москва, Россия

Знойко И.Ю., кандидат биол. наук,
Чарльстон, США

Кондашевская М.В., доктор биол. наук,
доцент, Москва, Россия

Конов А.В., доктор мед. наук,
профессор, Омск, Россия

Кравцов В.Г., кандидат мед. наук,
Тель-Авив, Израиль

Милованов А.П., доктор мед. наук,
профессор, Москва, Россия

Мишнев О.Д., доктор мед. наук,
профессор, Москва, Россия

Мхитаров В.А., кандидат биол. наук,
Москва, Россия

Новоцадов В.В., доктор мед. наук,
профессор, Волгоград, Россия

Пархоменко Ю.Г., доктор мед. наук,
профессор, Москва, Россия

Рыбакова М.Г., доктор мед. наук,
профессор, Санкт-Петербург, Россия

Фатхудинов Т.Х., доктор мед. наук,
доцент, Москва, Россия

Черников В.П., кандидат мед. наук,
Москва, Россия

Яглов В.В., доктор мед. наук, профессор,
Москва, Россия

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.

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

With the support of the Russian Society of Pathology

Volume 8 | № 3 | 2019

ISSN 2226-5988 (print)
ISSN 2686-6749 (online)

«Clinical and Experimental Morphology»

SCIENTIFIC AND PRACTICAL
PEER-REVIEWED JOURNAL

Frequency: 4 issues per year

Founded in 2011

Listed in Higher Attestation
Commission (Vysshaya
Attestatsionnaya Komissiya,
VAK), presented in the RSCI
database (Russian Science
Citation Index)

Journal founder

FSBSI «Research Institute
of Human Morphology»

117418, Tsyurupy st., 3,
Moscow, Russia

Editorial office address

117418, Tsyurupy st., 3,
Moscow, Russia

Tel. +7 (499) 120-13-34
+7 (499) 128-87-01

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

www.morfolhum.ru

Edition of 500 copies

Publisher

„Gruppa MDV“
www.mdv-group.ru

Subscription index:

70045 according to the
„Rospechat“ Agency catalog

70045 according to the
„Ural-Press“ catalog

The mass media registration
certificate ПИ № ФС77-47183
dated November 2, 2011

Editor-in-chief

Kakturskiy Lev V., Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences,
Dr.Sci.Med., Professor

Deputies editor-in-chief

Zairatyants Oleg V., Dr.Sci.Med., Professor, Moscow, Russia

Makarova Olga V., Dr.Sci.Med., Professor, Moscow, Russia

Executive secretary

Boltovskaya Marina N., Dr.Sci.Biol., Professor, Moscow, Russia

Editorial board

Aleksandrova, Maria A., Dr. Sci. Biol.,
Moscow, Russia

Alekseeva, Natalia T., Dr. Sci. Med.,
Professor, Voronezh, Russia

Aliiev, Gjumrakch M., Dr. Sci. Med.,
Professor, San Antonio, USA

Andreeva, Elena R., Dr. Sci. Biol., Associate
Professor, Moscow, Russia

Banin, Victor V., Corresponding Member of
the RAS, Dr. Sci. Med., Professor, Moscow,
Russia

Bolshakova, Galina B., Dr. Sci. Biol., Moscow,
Russia

Buravkov, Sergey V., Dr. Sci. Med., Moscow,
Russia

Chernyaev, Andrey L., Dr. Sci. Med.,
Professor, Moscow, Russia

Garnovskaya, Maria N., Cand. Sci. Biol.,
Associate Professor, Charleston,
USA

Kochukov, Mikhail Yu., Dr. Sci. Med.,
Houston, USA

Korshunov, Andrey G., Dr. Sci. Med.,
Professor, Heidelberg, Germany

Kovrigina, Alla M., Dr. Sci. Biol., Professor,
Moscow, Russia

Kushlinsky, Nikolai E., Corresponding
member of the Russian Academy of Sciences,
Dr. Sci. Med., Professor, Moscow, Russia

Markov, Igor I., Dr. Sci. Med., Professor,
Samara, Russia

Mikhaleva, Lyudmila M., Dr. Sci. Med.,
Professor, Moscow, Russia

Nikityuk, Dmitriy B., Corresponding
Member of the RAS, Dr. Sci. Med., Professor,
Moscow, Russia

Paukov, Vyacheslav S., Dr. Sci. Med.,
Professor, Moscow, Russia

Postnov, Anton Yu., Dr. Sci. Med., Moscow,
Russia

Rogov, Yuri I., Cand. Sci. Med., Associate
Professor, Minsk, Republic of Belarus

Ryzhova, Marina V., Dr. Sci. Med., Moscow,
Russia

Savelyev, Sergey V., Dr. Sci. Biol., Professor,
Moscow, Russia

Turkina, Elena V., Cand. Sci. Med., Associate
Professor, Charleston, USA

Yaglova, Natalia V., Dr. Sci. Med., Moscow,
Russia

Editorial Review Board

Chernikov, Valeriy P., Cand. Sci. Med.,
Moscow, Russia

Dorosevich, Alexandr E., Dr. Sci. Med.,
Professor, Smolensk, Russia

Ermolaeva, Svetlana A., Dr. Sci. Med.,
Moscow, Russia

Erofeeva, Lyudmila M., Dr. Sci. Biol.,
Professor, Moscow, Russia

Fatkhudinov, Timur Kh., Dr. Sci. Med.,
Associate Professor, Moscow, Russia

Kondashevskaya, Marina V., Dr. Sci. Biol.,
Associate Professor, Moscow, Russia

Kononov, Alexey V., Dr. Sci. Med., Professor,
Omsk, Russia

Kravtsov, Vladimir G., Cand. Sci. Med.,
Tel Aviv, Israel

Milovanov, Andrey P., Dr. Sci. Med.,
Professor, Moscow, Russia

Mishnev, Oleko D., Dr. Sci. Med., Professor,
Moscow, Russia

Mkhitarov, Vladimir A., Cand. Sci. Biol.,
Moscow, Russia

Novochadov, Valeriy V., Dr. Sci. Med.,
Professor, Volgograd, Russia

Parkhomenko, Yuri G., Dr. Sci. Med.,
Professor, Moscow, Russia

Rybakova, Margarita G., Dr. Sci. Med.,
Professor, Saint Petersburg, Russia

Voloshchuk, Irina N., Dr. Sci. Med., Professor,
Moscow, Russia

Voronin, Konstantin E., Dr. Sci. Med.,
Associate Professor, Charleston, USA

Yaglov, Valentin V., Dr. Sci. Med., Professor,
Moscow, Russia

Znoyko Iya Yu., Cand. Sci. Biol., Charleston,
USA

Only articles prepared in accordance with the requirements of the editorial board are accepted for publication. The authors point of view may not coincide with that of the editorial board.

Reprinting and any reproduction of materials and illustrations in print or electronic form from the journal «Clinical and experimental morphology» are allowed only with the written permission of the publisher.

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

- В.Б. Соболев, Р.М. Худоевков*
Роль альфа-синуклеина
в нейродегенеративном процессе
- 5 *V.B. Sobolev, R.M. Khudoerkov*
The role of alpha-sinuclein in the neurodegenerative process
- Д.А. Отлыга, О.А. Юнеман,
Е.Г. Цветкова, С.В. Савельев*
Функциональная морфология сонного глотуса человека
- 13 *D.A. Otlyga, O.A. Junemann,
E.G. Tsvetkova, S.V. Saveliev*
Functional morphology of the human carotid body
- А.Ю. Пульвер, Б.Е. Лейбович, Р.А. Полтавцева,
А.Н. Шевцов, Н.А. Пульвер*
Разновидности бесклеточных каркасов в тканевой инженерии и способы их получения
- 21 *A.Yu. Pulver, B.E. Leibovich, R.A. Poltavtseva,
A.N. Shevtsov, N.A. Pulver*
Tissue engineering scaffold subtypes and methods for the production thereof

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCHES

- А.П. Милованов, А.Н. Шувалов,
Т.В. Фокина, В.А. Мхитаров*
Уменьшение количества вирусэкспрессирующих клеток в плаценте после лечения рекомбинантным интерфероном альфа 2в хронической микст-вирусной инфекции у беременных женщин
- 28 *A.P. Milovanov, A.N. Shuvalov,
T.V. Fokina, V.A. Mkhitarov*
Decrease in the number of virus-expressing cells in placentas of pregnant women with chronic mixed-viral infection after interferon alfa 2b treatment
- Х.М. Диаб, В.П. Быкова, Х.Ш. Давудов, П.У. Умаров,
А.А. Бахтин, Д.А. Загорская, С.Г. Рычкова*
Клинико-морфологическая характеристика югулотимпанальных параганглиом
- 35 *Kh.M. Diab, V.P. Bykova, H.Sh. Davudov,
P.U. Umarov, A.A. Bakhtin, D.A. Zagorskaya,
S.G. Richkova*
Clinical and morphological characteristics of jugulotympanic paraganliomas

Р.В. Янко, Е.Г. Чака, М.И. Левашов
Морфологические изменения щитовидной железы крыс после введения хлорида магния

41

R. V. Yanko, E. G. Chaka, M. I. Levashov
Morphological changes in the thyroid gland of rats after magnesium chloride ingestion

Г.В. Брюхин, С.Д. Антонов
Характеристика сперматогенного эпителия семенников половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа при действии иммобилизационного стресса

48

G. V. Bryukhin, S. D. Antonov
Characteristic of seminiferous epithelium of mature offspring of female rats with experimental type 1 diabetes under the influence of immobilization stress

МЕТОДЫ METHODS

Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, А.М. Косырева, М.В. Кондашевская, М.А. Диатроптова, И.С. Цветков, А.А. Степанов, Л.П. Михайлова, К.А. Артемьева
Сравнительная характеристика методов выделения клеток сперматогенного эпителия

55

E. A. Ponomarenko, O. V. Makarova, A. M. Kosyрева, M. V. Kondashevskaya, M. A. Diatroptova, I. S. Tsvetkov, A. A. Stepanov, L. P. Mikhailova, K. A. Artemeva
Comparative characteristics of spermatogenic cells isolation methods

Е.В. Бондаренко
Оптимизация фиксации и транспортировки биопсийно-операционного материала щитовидной железы

64

E. V. Bondarenko
Optimization of fixation method and transportation of surgical thyroid biopsies

Роль альфа-синуклеина в нейродегенеративном процессе

В.Б. Соболев, Р.М. Худоерков

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

В работе рассматриваются многие ключевые вопросы о месте и роли альфа-синуклеина и его модифицированных форм в патологическом процессе нейродегенерации при паркинсонизме. Обсуждаются данные патологической анатомии, цитологии и гистологии, генетики, полученные на материале человека, животных и клеточных моделях.

В статье уделяется внимание заблуждению, что агрегаты альфа-синуклеина, входящие в состав телец Леви, обнаруживаются только в структурах центральной нервной системы. Современные данные показывают активное включение периферической нервной системы в этот процесс.

Накопленные данные демонстрируют большое значение альфа-синуклеина при до сих пор не ясном механизме включения этого белка в патологический процесс.

Ключевые слова: альфа-синуклеин, паркинсонизм, прион, гипотеза Браака, патогенез болезни Паркинсона, тельца Леви

Для корреспонденции: Валерий Борисович Соболев. E-mail: vsobolev@outlook.com

Для цитирования: В.Б. Соболев, Р.М. Худоерков. Роль альфа-синуклеина в нейродегенеративном процессе. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(3):5-12. DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.5-12

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 12.04.2019. Получена после реценцирования 22.05.2019. Принята в печать 04.06.2019.

The role of alpha-synuclein in the neurodegenerative process

V.B. Sobolev, R.M. Khudoerkov

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Many key questions about the place and role of alpha-synuclein and its modified forms in the pathological process of neurodegeneration in parkinsonism are reported in this article. The data in pathological anatomy, cytology and histology, genetics obtained from human materials, animal and cellular models are discussed.

The review draws attention to the misleading fact that the aggregates of alpha-synuclein, which are the part of Lewy bodies, are found only in the central nervous system structures, modern data indicate active participation of peripheral nervous system in this process.

The accumulated data demonstrate the great importance of alpha-synuclein with an unclear mechanism of inclusion of this protein in the pathological process.

Key words: alpha-synuclein, parkinsonism, prion, Braak hypothesis, pathogenesis of Parkinson's disease, Lewy bodies

Corresponding author: Valeriy B. Sobolev. E-mail: vsobolev@outlook.com

For citation: V.B. Sobolev, R.M. Khudoerkov. The role of alpha-synuclein in the neurodegenerative process. Clin. exp. morphology. 2019; 8(2): 5-12. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.5-12

Funding. The work was performed in the framework of the state assignment.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 12.04.2019. Received in revised forms 22.05.2019. Accepted 04.06.2019.

Длительное время внимание исследователей, изучающих нейродегенеративные заболевания, в первую очередь болезнь Паркинсона (БП), было направлено на небольшой по размеру белок – альфа-синуклеин.

Альфа-синуклеин (α -Syn) составляет до 1% от общего белка цитозоля, что можно объяснить его большим значением во внутриклеточных процессах [1].

Молекула α -Syn состоит из трех частей: N-концевой спирали, центрального участка и отрицательно заряженного C-участка [1]. N-концевой участок обеспечивает липофильные свойства, что способствует фиксации белка с мембранными структурами с образованием липопротеиновых комплексов. Центральный участок молекулы взаимодействует с другими молекулами

α -Syn и формирует нерастворимые олиго- и полимерные белковые образования [2]. Взаимодействие с этой областью потенциально может влиять на агрегационные свойства белка [3]. Тем не менее функции α -Syn до сих пор не выяснены. Предполагается, что он участвует в стабилизации мембран, везикулярном транспорте и пресинаптической сигнализации [4, 5]. В нормальных условиях α -Syn существует преимущественно в мономерном состоянии, но в условиях стресса может формировать физиологически альтернативные конформации, как мономерные, так и димерные. Патологические ди- и полимерные формы, образующие фибриллы, превращаются в цитоплазматические включения – тельца и нейриты Леви [4, 6]. Последние рассматриваются как патоморфологические маркеры БП [2].

Нейротоксины, соли тяжелых металлов и другие факторы окружающей среды, как и мутации гена SNCA, повышают склонность α -Syn к полимеризации и агрегации [5]. Предполагаемые механизмы нейротоксичности измененного α -Syn и его агрегатов связаны с митохондриальной дисфункцией, протеолитическим стрессом, оксидативным повреждением и другими воздействиями [2, 5].

α -Syn: агрегаты, отложения и тельца Леви

Ключевым вопросом при БП являются белковые отложения α -Syn с формированием телец Леви (крупные аномальные агрегаты, включающие большое количество неправильно собранного белка) и, вероятно, вызывающие дисфункцию нейронов, которая затрагивает многие другие области мозга и нейротрансмиттерные системы [7–9].

Тельца Леви, если их расценивать как патоморфологический маркер БП, наиболее характерны для черной субстанции (ЧС) среднего мозга, но они также обнаруживаются в двигательных ядрах блуждающего нерва, базальных ядрах Мейнерта, голубом пятне и располагаются диффузно в других структурах на более поздних сроках болезни [6, 9, 10]. При этом агрегаты α -Syn могут быть маркерами и других нейродегенеративных заболеваний – деменции с тельцами Леви, мультисистемной атрофии, нейродегенераций с накоплением железа и т.д. При БП и деменции с тельцами Леви агрегаты выявляются не только в телах клеток, но и в отростках нейронов и глии [1, 6]. При мультисистемной атрофии эти агрегаты α -Syn видны как цитоплазматические включения в нейронах и клетках глии. При нейроаксональной дистрофии (нейродегенерации с накоплением железа II типа) они выявляются в виде аксональных сфероидов [6].

Выявление ранних патологических синуклеинопозитивных включений, телец и нейритов Леви легло в основу известной гипотезы Браака, предполагающей периферическое начало нейродегенеративного процесса при БП [4]. В поддержку этой гипотезы получено большое количество данных о периферической локализации иммуногистохимических маркеров, что также подтверждается работами на основе метаанализа [2].

Гипотеза Браака

Гипотеза Хейко Браака была предложена в 2003 году и состояла в том, что неизвестный патоген, например вирус или бактерия, может вызывать в пищеварительной системе условия для развития спорадической формы БП [4]. Браак с соавторами предложили схему ретроградного распространения патологии, предполагая, что на ранних стадиях повреждение при БП начинается не в дофаминергических структурах, в нижнем стволе головного мозга, а в обонятельных луковицах или периферической нервной системе и через обонятельный тракт и блуждающий нерв, соответственно, переносится к центральной нервной системе (ЦНС) и внутри нее.

Кишечный путь экспансии патологии связан с агрегацией α -Syn, попадающего из нервной системы кишечника в головной мозг ретроградно по блуждающему нерву. Вероятно, такое течение справедливо для части случаев спорадической формы болезни Паркинсона [4, 11].

Браак разработал классификацию предсимптомных стадий течения болезни Паркинсона [4]:

- на стадиях 1–2 патология ограничивается преимущественно продолговатым мозгом либо обонятельными луковицами и передним обонятельным ядром;
- на стадиях 3–4 поражаются черная субстанция и другие ядра среднего и переднего мозга и клинически проявляются первоначальные, незначительные нарушения, которые в дальнейшем усиливаются, проявляя себя как серьезные патологические изменения (в этот период предсимптоматический этап переходит в клинически выраженную форму патологии, как правило уже четко диагностируемую неврологами);
- на стадиях 5–6, конечных, патологический процесс поражает верхние отделы мозга, в том числе неокортекс, и болезнь проявляется во всех клинических изменениях [4].

После длительного обсуждения гипотезы Браака ее интерпретация была расширена – о вероятно двойном проникновении агента, через нейроны полости носа и нейроны кишечника [12]. Предполагалось, что на ранних стадиях БП начинается не в дофаминергических структурах, в нижнем стволе головного мозга, а в обонятельных луковицах или, возможно, в периферической вегетативной нервной системе, что объясняет раннее появление немоторных симптомов [4, 11, 14, 30]. Эта немоторная теория возникновения БП также имеет недостатки, поскольку применяется в основном к пациентам с ранним началом и длительно протекающим заболеванием. Не менее спорной является связь между появлением телец Леви и клиническими проявлениями БП [11].

В последнее десятилетие гипотеза Браака как критиковалась, так и подтверждалась разными исследованиями. В обзорных статьях последних лет [11, 13] авторы на основании обобщенного материала пришли к выводу, что гипотеза Браака подтверждается и *in vitro*,

и *in vivo*, и клиническими данными. Тем не менее указывается, что система стадий Браака описывает только определенную группу пациентов с ранним началом и длительной продолжительностью заболевания [11].

Моторная теория имеет недостатки, поскольку она применяется в основном к подгруппе пациентов с ранним началом и длительной продолжительностью заболевания. Спорна также связь между болезнью с тельцами Леви и особенностями клинических проявлений БП [11].

Блуждающий нерв

Важным элементом гипотезы Браака является распространение патологии α -Syn от периферической нервной системы кишечника до ЦНС через блуждающий нерв и его дорсальное моторное ядро. В рамках гипотезы объясняется распространение патологии от периферии до продолговатого мозга. Продолговатый мозг, как нижняя часть ствола мозга, выступает в роли перевалочного пункта по направлению к черной субстанции и в дальнейшем к неокортексу.

Некоторые авторы пишут о малом влиянии патологии, поражающей дорсальное ядро вагуса, на соседние ядра, приводя в пример ядро одиночного пути [11], однако известно, что БП влияет на функции других близко расположенных ядер (например, маскообразное лицо, гиперсаливация указывают на включение в патологию ядер подъязычного, тройничного, лицевого нервов) [14, 15]. Распространение патологии и поражение структур по времени, а не по принципу ближайшего их расположения объясняется, вероятно, тем, что играет роль не только близость локализации самих структур и/или наличие синаптических связей [16], но и действие явления, похожего на волну распространения [17].

В нейронах экзосомальное высвобождение увеличивается благодаря деполяризации, в случае с α -Syn оно зависит от кальция [11, 18]. Эндцитоз, по крайней мере в нервных окончаниях и терминалах, также усиливается благодаря кальцию [11].

Вероятно, важнейшую роль играет какой-то модификатор чувствительности, определяющий восприимчивость клеток к молекулам α -Syn, которые приобрели прионные свойства. Одной из ключевых особенностей маловосприимчивых нейронов, возможно, является значительно повышенная концентрация цитозольного кальция [17].

Огромная площадь аксонального ветвления также может служить мощным каналом для распространения α -Syn, и если для этих целей требуется изменение уровня цитозольного кальция, повышающееся после увеличения активности клеток [17], то паттерн патологии становится более понятным. Это также означало бы, что на уязвимые нейроны идет воздействие в двух направлениях: метаболическом и протеостатическом [17].

У пациентов с БП и болезнью с тельцами Леви были обнаружены патологические изменения в блуждающем нерве [19] и в дорсальном моторном ядре (ДМЯ) ва-

гуса [6, 19]. Наряду с этим сообщалось о потере у пациентов с БП клеток в ДМЯ [20]. Было показано, что патология с тельцами Леви встречается в блуждающих нервах и ДМЯ до того, как распространяется в другие образования ЦНС [4, 15, 19, 21], такие как черная субстанция, голубое пятно, мезокортекс и неокортекс [4]. Кроме того, ваготомия в области усечения нервного ствола, вероятно, уменьшает долгосрочный риск и/или замедляет развитие БП, а возможно, и предотвращает ее проявления. Такие эффекты препятствуют распространению через блуждающий нерв патологических изменений [11], но насколько такой подход корректно переносить на человека, в первую очередь зависит от специфичности распространения процесса через блуждающий нерв.

Когда α -Syn вводили в стенку желудка и двенадцатиперстной кишки крыс, он распространялся по блуждающему нерву к ДМЯ [11]. Если на подобной модели крысам дополнительно вводили ротенон, α -Syn распространялся через нервную систему желудка и кишечника по блуждающему нерву в ДМЯ и затем в ЧС, вызывая гибель ее нейронов [15]. Для проверки специфичности распространения α -Syn на фоне введения ротенона у животных проводили ваготомию [15].

В результате можно сделать заключение, что блуждающий нерв необходим для распространения патологии α -Syn от кишечного отдела периферической нервной системы (ПНС) к ЦНС, по крайней мере у мышей и крыс. Вероятно, этот путь распространения α -Syn справедлив и для отдельных случаев развития БП у людей.

Генетика альфа-синуклеина

В гене α -Syn (SNCA) было обнаружено несколько точечных мутаций, приводящих к БП (A31P, A53T, E46K, H50Q и G51D) или дупликацией локуса) или его трипликацией [8, 22, 23].

Мутации в гене α -Syn, связанные с аутосомно-доминантными ранними формами БП [24], способствуют конверсии *in vitro* изначально развернутого белка без постоянной формы [25]. Предполагается, что упорядоченные префибриллярные олигомеры, а не сама фибрилла могут вызвать прогрессирующую гибель клеток [26]. Замечено, что протофибриллы измененного α -Syn заметно отличаются от фибрилл по взаимодействию с синтетическими мембранами [26].

Причина избирательной гибели дофаминергических нейронов при БП до конца неизвестна, но накопление α -Syn в культивируемых дофаминергических нейронах человека приводит к их апоптозу, который требует эндогенной продукции дофамина и опосредуется активными формами кислорода. Тем не менее α -Syn нетоксичен для недофаминергических нейронов головного мозга человека и, возможно, оказывает нейропротекторное действие [27]. Дофаминзависимая нейротоксичность опосредуется 54 растворимыми белковыми комплексами, содержащими α -Syn и белки 14-3-3, количество которых избирательно выше в ЧС при БП. Таким об-

разом, вероятно, накопление растворимых белковых комплексов α -Syn может сделать эндогенный дофамин токсичным, что предполагает потенциальный механизм селективной потери нейронов при БП [27, 28].

Альфа-синуклеин является основным компонентом фибриллярных агрегатов, входящих в состав телец Леви, и почти 90% этих агрегатов составляет α -Syn, фосфорилированный по серину-129 (Ser-129), однако его роль в биогенезе телец Леви остается не до конца ясной [28].

В работе на трансгенных мышах, экспрессирующих человеческий α -Syn, было продемонстрировано, что нарушения работы кишечника у этих животных проявляются уже на 3–6-м месяце жизни, а после 9-го месяца у них наблюдаются патологические процессы в ЦНС [29].

На животных моделях с применением МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), а также при анализе ликвора пациентов с БП было показано выявление салсолинола (N-methyl(R)salsolinol), который, вероятно, может играть определенную роль в патологическом процессе при БП [30, 31].

Пока в паузине взаимодействий генетических факторов и окружающей среды разобраться до конца не представляется возможным, но исследовательская работа в этом направлении идет [8]. Возможно, что как экологические, так и генетические факторы взаимодействуют, вызывая спорадические формы БП. В результате поиск потенциальных факторов окружающей среды продолжается и на моделях животных, и в эпидемиологических исследованиях на человеке.

Прионная гипотеза

Нейротоксичность α -Syn объясняет предположение, что он, подобно приону, распространяется по нервной системе при БП [25]. В рамках прионной теории патологический неправильно свернутый – модифицированный α -Syn – представляет собой инфекционный белок, который распространяется по нервной системе, провяляя свои токсические свойства и являясь матрицей для неправильной сборки собственного белка в клетке. В результате ранее здоровый белок α -Syn превращается в токсичный белок [25], приводя в дальнейшем к образованию телец и агрегатов Леви [32] и гибели клеток [33].

Прионоподобная теория вписывается в гипотезу Браака [25, 11], поскольку система стадий у него основана на региональном наличии (или отсутствии) агрегатов белков и телец Леви и их распространении, все это увязывается с тяжестью заболевания [4].

Токсичность α -Syn в целом не определена до конца, и в литературе еще обсуждаются эксперименты о цитопротекторной роли агрегированного α -Syn [11]. В то же время есть предположение, что олигомерная форма α -Syn является наиболее токсичной [11, 34] по сравнению с мономерами [18], а также более высока токсичность олигомеров, связанных с экзосомами [35], по сравнению со свободными молекулами олигомеров α -Syn [36].

Обобщенные данные о работе с привнесением чужеродного α -Syn показывают, что происходит ин-

дуцирование копирования чужеродной формы α -Syn и образование агрегатов, подобных агрегатам и тельцам Леви, в нейронах реципиента [33]. Отмечено, что патологический процесс происходит и при нормальной, и при повышенной экспрессии [31].

Интересным моментом является то, что передача патологических молекул между клетками была показана даже от собственных клеток к трансплантированным, в которых выявляются патологические белки и даже агрегаты и тельца Леви [11]. Передача α -Syn от реципиента к трансплантату также была показана для нейрональных стволовых клеток мыши [33] и эмбриональных дофаминергических нейронов [32], имплантированных трансгенным мышам с повышенной экспрессией α -Syn человека. Похожие результаты продемонстрированы и на крысах при использовании эмбриональных дофаминергических нейронов с повышенной экспрессией α -Syn человека на фоне истощения дофаминового пула [11, 37].

Таким образом, показано, что здоровые нейроны в ЦНС чувствительны к патологическому процессу, вероятно, поглощая патологические белки и агрегаты из окружающей среды, в которую те попадают из пораженных нейронов [11].

Пока транспорт α -Syn и фрагментов телец Леви через нервную систему не до конца объяснен, в том числе непонятно, почему распространение идет по определенной схеме, например, как предполагает гипотеза Браака.

Как нейрональные клеточные линии, так и первичные нейроны способны выделять α -Syn мономеры, олигомеры и фрагменты фибрилл через нетрадиционный кальцийзависимый экзоцитоз из везикул или через экзосомы [15, 16, 18, 36].

Если α -Syn появляется в окружающей среде, то клетки, вероятно, поглощают свободные или связанные с экзосомой фибриллы и олигомеры посредством эндоцитоза, после чего они расщепляются в лизосомах. Это показано на культуральной клеточной линии SH-SY5Y до дифференциации [18] или независимо от дифференциации [33], в то время как мономеры, по-видимому, могут диффундировать через клеточную мембрану и не подвергаться лизису и не деградировать [16, 33, 36].

Также на клеточных линиях SH-SY5Y была продемонстрирована передача специфических молекул α -Syn между клетками при культивировании двух модификаций линий, отличающихся флуорохромами либо красного, либо зеленого цвета [32]. Совместное культивирование привело к двойным меченым нейронам, показывая процесс последующего выделения и поглощения α -Syn соседними клетками [32].

Поглощенный подобным образом α -Syn может транспортироваться антероградно или ретроградно через аксоны и передаваться другим нейронам [11, 15], обеспечивая потенциальный путь для распространения патологии между связанными областями нервной системы у пациентов с БП [12].

В литературе описана гипотеза о передаче α -Syn от нейрона к нейрону, связанная с LAG3 геном (ген активации трансмембранного белка лимфоцитов 3) [11]. Вероятно, LAG3 может связывать предварительно сформированные α -Syn фибриллы (PFFs) с высоким показателем аффинности и инициирует эндоцитоз и последующую передачу и токсичность PFF α -Syn, что показано на клетках линии SH-SY5Y. В исследовании на мышах, лишенных белка LAG3, обнаруживали замедление патологии, вызванной предварительно сформированными фибриллами (PFF) α -Syn [11]. Известно, что нейроны головного мозга, пораженные патологией с формированием телец и агрегатов Леви при БП, имеют специфические характеристики, которые, вероятно, связаны с высокой метаболической нагрузкой, что делает эти нейроны особенно чувствительными к окислительному стрессу и неправильному сворачиванию α -Syn [11]. Эти нейроны имеют высокий уровень эндогенного α -Syn, что само по себе не является определяющим параметром, так как областей с высокой экспрессией α -Syn много по всему мозгу [38], но они в основном используют моноаминовые нейротрансмиттеры, имеют длинные и сильно разветвленные по разным областям мозга аксоны с отсутствием миелинизации или плохой миелинизацией и характерными паттернами непрерывной активности [4, 17, 39]. Все условия вместе могли бы объяснить, почему патология БП развивается по определенным принципам, близким к схеме, предложенной Брааком [11].

Кроме того, на аутопсийном материале обонятельных луковиц выявляли агрегаты α -Syn в 95% у пациентов с БП и лишь в 7% случаев у пожилых неврологически здоровых людей [40].

Микробиота

Около 20 лет в литературе обсуждается гипотеза участия микробиоты кишечника в течении нейродегенеративного заболевания.

Группа исследователей под руководством С. Мажманьяна провела ряд экспериментов, демонстрирующих, что трансплантация микробиома от больных паркинсонизмом приводит к развитию патологии у животных, особенно у линии с повышенной экспрессией α -Syn [41].

Кроме того, обсуждается вероятное влияние микробиома кишечника на ЦНС, в том числе на микроглию [42]. К сожалению, систематическая группа бактерий или их некая совокупность не определены, так же, как неизвестен механизм влияния, но предположительными агентами влияния микробиома могут выступать короткие цепочки жирных кислот [42].

Изменение рациона питания животных может существенно влиять на состав кишечного микробиома, возможно, как количественно, так и качественно [11].

Комменсальная, то есть симбиотическая, микрофлора процветает на субстрате, доступном для ферментации в толстой кишке, избегая вышележащей тонкой кишки [11]. Классический пример – увеличение

роста бактерий толстой кишки, которые производят короткие цепочки жирных кислот, при употреблении в пищу продуктов, богатых клетчаткой. Эти короткие цепочки жирных кислот, вероятно, обладают системным противовоспалительным действием [43] и, следовательно, могут влиять на патогенез БП через данный механизм или его нарушение, опосредованное изменением микрофлоры кишечника.

Примером изменения диеты с сокращением доли клетчатки является вариант с высоким содержанием насыщенных жиров и рафинированных углеводов, получивший распространение при современном образе жизни в крупных городах. Подобный рацион может привести к дисбиотическому нарушению, изменению состава микробиоты, например снижению количества бифидобактерий, повышению числа фирмикотов и протеобактерий [11], что вызывает провоспалительные реакции и развитие α -Syn патологии [11]. Отсюда следует много вопросов о том, насколько этническое происхождение определяет встречаемость паркинсонизма и влияет на устойчивость к современной диете. Важно также уточнить, сохраняет ли показатель заболеваемости этническая группа с классическим рационом при жизни в другой стране и приобрела ли европейская популяция с современной диетой устойчивость к этим факторам.

Говоря о расовых или национальных особенностях, безусловно предполагаются данные генетики, в том числе наследственные формы, часто и редко встречаемые мутации и перестройки в генах [8, 11].

Таким образом, продолжение исследований рациона питания, генетических исследований микробиома, функциональных и морфологических исследований поможет определить механизм влияния состояния пищеварительной системы на патогенез БП.

Выявление α -Syn в органах и тканях

Локализация α -Syn в мономерной и олигомерной форме не исчерпывается только нервной системой, α -Syn представлен в эритроцитах, цереброспинальной жидкости, плазме крови, слюне [16], что плохо укладывается в концепцию исключительно внутриклеточной локализации белка. К настоящему времени исследование биологических жидкостей – цереброспинальной и плазмы крови – на различные изоформы α -Syn не давало надежных результатов с выявлением нейродегенеративного процесса [2, 16, 44]. На этом фоне поиск α -Syn в тканях, иннервируемых вегетативной нервной системой, выглядит более перспективным [25, 45].

В работах, подтверждающих гипотезу Браака, было показано присутствие телец, нейритов и агрегатов Леви в нейронах обонятельного тракта [40] и в нервной системе кишечника [4, 46]. Тяжелые формы агрегатов Леви коррелируют с запорами и двигательными проблемами у пациентов с БП [39]. Имеются также клинические данные о том, что агрегаты Леви в носовой и желудочно-кишечной областях потенциально предшествуют диагностике заболевания [4, 21, 46], что приводит к жа-

лобам на работу пищеварительного тракта и нарушение обоняния до появления двигательных расстройств [47].

При исследовании биопсий малых слюнных желез в полости рта α -Syn обнаружили в 60% случаев при БП и в 31% случаев в группе контроля [47]. Согласно другим оценкам, при исследовании слюнных желез специфичность и чувствительность иммуногистохимического метода на α -Syn при БП достигает 100% [2]. В нервах, иннервирующих область гортани, при БП плотность позитивных волокон, содержащих α -Syn, была выше у пациентов с дисфагией [44]. В образцах биопсий кожи α -Syn регистрировали лишь в 20% случаев при специфичности около 80% [2].

На биопсийном материале слизистой оболочки толстой кишки обнаружили 100% специфичность фосфорилированного α -Syn как маркера БП, но чувствительность данного метода не превышала 70–80% [39]. Есть данные, что выявляемость α -Syn в слизистом слое и подслизистом слое кишечника у пациентов с БП определялась на уровне 55%, а в контроле – у одного из 10 [48]. Включения α -Syn были обнаружены в метасимпатической нервной системе кишечника даже на ранних стадиях БП, при этом α -Syn также выявлялся в дорсальном моторном ядре вагуса [4].

В разных ганглиях и сплетениях ПНС показана разная частота выявления α -Syn. Так, в симпатических ганглиях агрегаты α -Syn находили в 80% случаев, в блуждающем нерве – в 73%, в седалищном нерве – в 50%, в желудочно-кишечном тракте – в 65%, в органах дыхательных путей (гортань, первичные бронхи, легкие) – в 12,5%, в эндокринных органах – в 22%, в мочеполовой системе – в 12,5% [2, 40]. При исследовании биопсий кожи показано выявление включений α -Syn [49] от чрезвычайно низкого уровня в контроле до 70% в биопсиях кожи пациентов с БП и с мультисистемной атрофией [49]. В образцах биопсий кожи спины (на уровне нижнего грудного и верхнего поясничного позвонка) α -Syn выявлялся в 16 пробах из 32 (52%), в биоптатах кожи проксимального отдела ноги (внутренняя поверхность бедра) – в шести, в дистальном отделе – в четырех, на указательном пальце – в пяти пробах [49].

Нервные волокна кожи, имеющие включения α -Syn, локализовались в немиелинизированных волокнах ЦНС [4]. Среди этих волокон показана преимущественная выявляемость в нейронах и их отростках, позитивно окрашиваемых на субстанцию Р (SP) и тирозингидроксилазу (ТН) [2, 49]. Также накопления α -Syn встречаются в волокнах, позитивных на вазоактивный интестинальный пептид (VIP) и пептид, связанный с геном кальцитонина (CGRP). Предполагается, что выявление α -Syn в SP-позитивных структурах может быть признаком ранних этапов развития заболевания [4, 49].

Заключение

Продолжительная работа по изучению роли α -Syn в патологическом процессе и нейродегенерации показала большое значение этого белка в распространении

и течения заболевания. При этом механизм перехода нормальной функции α -Syn в патологический процесс до сих пор в достаточной степени не раскрыт. И тем не менее нет сомнений, что даже если в будущем α -Syn выйдет из обсуждения первопричин заболевания, его роль в патологии останется первостепенной.

При болезни Паркинсона локализация агрегатов α -Syn не ограничивается структурами ЦНС. Они выявляются также в периферических тканях и органах, что может иметь большое значение для верификации патологического процесса в наиболее ранней (латентной) стадии, то есть еще до дебюта классических (моторных) признаков заболевания и гибели большей части нейронов черной субстанции [4].

Показано, что неправильное свертывание и агрегация α -Syn приводят к образованию телец Леви в выживших нейронах, и поэтому предполагается, что борьба с агрегацией α -Syn имеет потенциальную терапевтическую ценность [11].

Разнообразие данных до сих пор вызывало ряд вопросов, касающихся условий проводимой работы и стабильности получаемых результатов, и в большом совместном исследовании нескольких клинических центров, в которых проводился забор биопсийного материала и биологических жидкостей с целью оценки содержания α -Syn при болезни Паркинсона, было показано, что наиболее стабильные и высокие показатели выявляемости имел материал биопсий толстой кишки, слюнных желез и кожи [50]. Кроме того, эта работа показала высокую воспроизводимость результатов разными исследователями, что указывает на достаточный потенциал развития методов для применения в клинической практике.

Литература/References

1. *Uversky V.* Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J. Neurochem.* 2007;103:17–37. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04764.x.
2. *Malek N, Swallow D, Grosset KA, Anichtchik O, Spillantini M, Grosset DG.* Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease – a systematic review. *Acta Neurol. Scand.* 2014;130:59–72. doi:10.1111/ane.12247.
3. *Bernstein SL, Liu D, Wytenbach T, Bowers MT, Lee JC, Gray HB et al.* Alpha-synuclein: stable compact and extended monomeric structures and pH dependence of dimer formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004;15:1435–43. doi: 10.1016/j.jasms.2004.08.003.
4. *Braak H, Del Tredici K.* Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. *J. Parkinsons Dis.* 2017;7(s1):S71–S85. doi:10.3233/JPD-179001.
5. *Breydo L, Wu JW, Uversky VN.* Alpha-synuclein misfolding and Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1822:261–85. doi:10.1016/j.bbadis.2011.10.002.
6. *Jellinger KA, Korfczyn AD.* Are dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia the same disease? *BMC Med.* 2018;6;16(1):34. doi:10.1186/s12916-018-1016-8. MID: 29510692.

7. Левин О.С., Васенина Е.Е., Аникина М.А., Макотрова Т.А. Деменция с тельцами Леви. Журнал неврологии и психиатрии. 2012;10(2):3–12
Levin OS, Vasenina EE, Anikina MA, Makotrova TA. Dementia with Lewy bodies. Zhurnal neurologii i psikiatrii, 2012;10(2):3–12. (In Russ.).
8. Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона. Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2011;6:46–51
Pchelina SN. Alpha-synuclein as a biomarker of Parkinson's disease. Annaly klinicheskoi i eksperimental'noi neurologii. 2011;6:46–51 (In Russ.).
9. Kosaka K. Lewy body disease and dementia with Lewy bodies. Proc Jpn Acad, Ser B Phys Biol Sci. 2014;90(8):301–6. doi:10.2183/pjab.90.301.
10. Sal'kov VN, Khudoerkov RM, Voronkov DN. Morphometric Characteristics of Cell Structures in the Substantia Nigra in Humans. Neuroscience and Behavioral Physiology. 2017;47(3):366–9. doi:10.1007/s11055-017-0406-2.
11. Rietdijk CD, Perez-Pardo P, Garssen J, van Wezel RJ, Kraneveld AD. Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease. Front. Neurol. 2017;37(8). doi:10.3389/fneur.2017.00037.
12. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H. Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2009;1170:615–22. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04365.x.
13. Cova I, Priori A. Diagnostic biomarker for Parkinson's disease at a glance: where are we? J. Neural Transm. Vienna. 2018;125(10):1417–32. doi:10.1007/s00702-018-1910-4.
14. Залылова З.А. Гиперсаливация при болезни Паркинсона: причины и возможности лечения. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. 2015.115(10):71–77.
Zalyalova ZA. Hypersalivation in Parkinson's disease: causes and treatment options. Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova. Spetsvypuski. 2015.115(10):71–77. (In Russ.). doi:10.17116/jnevro201511510271-77.
15. Halliday G, Barker R, Rowe D. Non-dopamine Lesions in Parkinson's Disease. Ed. G. Oxford University Press, 2011. 314 p. doi:10.1093/med/9780195371086.001.0001.
16. Lee HJ, Suk JE, Bae EJ, Lee JH, Paik SR, Lee SJ. Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular α -synuclein. Int J. Biochem Cell Biol. 2008;40:1835–49. doi:10.1016/j.biocel.2008.01.017.
17. Surmeier DJ, Sulzer D. The pathology roadmap in Parkinson disease. Prion. 2013;7:85–91. doi:10.4161/pri.23582.
18. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. J.Neurosci. 2010;30: 6838–51. doi:10.1523/jneurosci.5699-09.2010.
19. Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. Acta Neuropathol. 2010;119:703–13. doi:10.1007/s00401-010-0665-2.
20. Gai WP, Blumbergs PC, Geffen LB, Blessing WW. Age-related loss of dorsal vagal neurons in Parkinson's disease. Neurology. 1992;42:2106–11. doi:10.1212/wnl.42.11.2106.
21. Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. α -Synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. Neuro-pathol Appl Neurobiol. 2006;32:284–95. doi:10.1111/j.1365-2990.2006.00727.x.
22. Nishioka K, Hayashi S, Farrer MJ, Singleton AB, Yoshino H, Imai H et al. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. Ann Neurol. 2006;59:298–309. doi:10.1002/ana.20753.
23. Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. Метилирование ДНК при нейродегенеративных заболеваниях. Генетика. 2019;55(3):247–254.
Fedotova EYU, Illarioshkin SN. Metilirovanie DNK pri nejrodegenerativnyh zabolevaniyah. Genetika. 2019;55(3):247–254 (In Russ.). doi:10.1134/S001667581903007X.
24. Shulskaya MV, Alieva AKh, Vlasov IN, Zyryn VV, Fedotova EYu, Abramychева NYu et al. Whole-exome sequencing in searching for new variants associated with the development of parkinson's disease. Frontiers in Aging Neuroscience. 2018;10:136. doi: 10.3389/fnagi.2018.00136.
25. Goedert M. Neurodegeneration. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -Synuclein. Science. 2015;7(349): 6248:1255555. doi:10.1126/science.1255555.
26. Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC et al. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. Biochemistry. 2001;40:7812–9. doi:10.1021/bi0102398.
27. Xu J, Kao SY, Lee FJ, Song W, Jin LW, Yankner BA. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. Nat. Med. 2002;8:600–6. doi:10.1038/nm0602-600.
28. Machiya Y, Hara S, Arawaka S, Fukushima S, Sato H, Sakamoto M et al. Phosphorylated alpha-synuclein at Ser-129 is targeted to the proteasome pathway in a ubiquitin-independent manner. J Biol Chem. 2010;285(52):40732–44. doi:10.1074/jbc.M110.141952.
29. Rota L, Pellegrini C, Benvenuti L, Antonioli L, Fornai M, Blandizzi C et al. Constipation, deficit in colon contractions and alpha-synuclein inclusions within the colon precede motor abnormalities and neurodegeneration in the central nervous system in a mouse model of alpha-synucleinopathy. Transl Neurodegener. 2019;8:5. doi:10.1186/s40035-019-0146-z5321.2045.
30. Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.Д., Бочаров Е.В. и соавт. Экспериментальное моделирование функциональной недостаточности nigrostriатной дофаминергической системы у мышей. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2010;96(3): 270–282.
Kozina EA, Khaindrava VG, Kudrin VS, Kucheryanu VG, Klodt PD, Bocharov EV et al. Experimental modeling of functional deficiency of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova. 2010;96(3):270–282 (In Russ.).
31. Угрюмов М.В., Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.М. и соавт. Моделирование паркинсонизма у мышей при помощи МФТП: от ранней до

- симптомной до поздней симптомной стадии. Технологии живых систем. 2011;8:3–14.
- Ugryumov MV, Kozina EA, Khaindrava VG, Kudrin VS, Kucheryanu VG, Klodt PM et al. Modeling of parkinsonism in mice using the MPTP: from the early pre-symptomatic to the late symptomatic stage. *Tekhnologii zhivyykh sistem*. 2011;8:3–14 (In Russ.).
32. Hansen C, Angot E, Bergstrom AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G et al. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest*. 2011;121:715–25. doi:10.1172/JCI43366.
 33. Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:13010–5. doi:10.1073/pnas.0903691106.
 34. Roberts HL, Brown DR. Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric alpha-Synuclein. *Biomolecules*. 2015;5:282–305. doi:10.3390/biom5020282.
 35. Кулабухова Д.Г., Штам Т.А., Пчелина С.Н. Роль экзосом в передаче альфа-синуклеина при болезни Паркинсона. В сб.: Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск, 2018. С. 189–197
 - Kulabukhova DG, Shtam TA, Pchelina SN. The role of exosomes in the transfer of alpha-synuclein in Parkinson's disease. V sb.: Molekulyarno-biologicheskie tekhnologii v meditsinskoj praktike. Novosibirsk, 2018. S. 189–197 (In Russ.).
 36. Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L et al. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener*. 2012;7:42. doi:10.1186/1750-1326-7-42.
 37. Kordower JH, Dodiya HB, Kordower AM, Terpstra B, Pautmier K, Madhavan L et al. Transfer of host-derived alpha synuclein to grafted dopaminergic neurons in rat. *Neurobiol Dis*. 2011; 43(3): 552–7. doi:10.1016/j.nbd.2011.05.001
 38. Voronkov DN, Khudoerko RM, Sal'nikova OV, Sobolev VB. Localization of alpha-Synuclein in the Rat Brain and Its Relationship with Dopaminergic Structures. *Neurosci. Behav. Physiol*. 2017;47:1147. doi:10.1007/s11055-017-0522-z.
 39. Lebowier T, Neunlist M, des Varannes SB, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM et al. Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*. 2010.5:e12728. doi:10.1371/journal.pone.0012728.
 40. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White III CL et al. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. 2010;119:689–702. doi:10.1007/s00401-010-0664-3.
 41. Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 2016;1;167(6):1469–80.e12. doi:10.1016/j.cell.2016.11.018.
 42. Abdel-Haq R, Johannes CM, Glass CK, Mazmanian SK. Microbiome-microglia connections via the gut-brain axis. *JEM Home*. 2019;216(1):41. doi:10.1084/jem.20180794.
 43. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padiya R, Shi H et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 2014;40:128–39. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.007.
 44. Mu L, Sobotka S, Chen J, Su H, Sanders I, Nyirenda T et al. Parkinson disease affects peripheral sensory nerves in the pharynx. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013;72: 614–23. doi:10.1097/NEN.0b013e3182965886.
 45. Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. Alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998;95:6469–73. doi:10.1073/pnas.95.11.6469.
 46. Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA et al. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012;27:709–15. doi:10.1002/mds.23838.
 47. Cersosimo MG, Raina GB, Pecci C, Pellene A, Calandra CR, Gutiérrez C et al. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. *J Neurol*. 2013;260:1332–8. doi:10.1007/s00415-012-6801-2.
 48. Pouclet H, Lebowier T, Coron E, des Varannes SB, Neunlist M, Derkinderen P et al. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol. Motil*. 2012;24:e202–205. doi:10.1111/j.1365-2982.2012.01887.x.
 49. Doppler K, Jentschke HM, Schulmeyer L, Vadasz D, Janzen A, Luster M et al. Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2017;133(4):535–45. doi:10.1007/s00401-017-1684-z.
 50. Chahine LM, Beach TG, Seedorff N, Caspell-Garcia C, Coffey CS, Brumm M et al. alpha-Systemic Synuclein Sampling study. Feasibility and Safety of Multicenter Tissue and Biofluid Sampling for alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: The Systemic Synuclein Sampling Study (S4). *J Parkinsons Dis*. 2018;8(4):517–27. doi:10.3233/JPD-181434.

Информация об авторах

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

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

Author information

Valeriy B. Sobolev – Junior Researcher, Laboratory of Functional Morphochemistry, Brain Research Department, Research Center of Neurology. <http://orcid.org/0000-0002-7704-1092>.

Rudolf M. Khudoerko – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Functional Morphochemistry, Brain Research Department, Research Center of Neurology, Brain Research Department, Research Center of Neurology. <http://orcid.org/0000-0002-6951-3918>.

Функциональная морфология сонного гломуса человека

Д.А. Отлыга¹, О.А. Юнеман¹, Е.Г. Цветкова², С.В. Савельев¹

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

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Параганглионарная система – одна из наименее изученных систем организма, тесно взаимодействующая с автономной нервной системой. Наиболее исследованным органом этой системы является сонный гломус – маленький орган, расположенный в области бифуркации общей сонной артерии. В обзоре обобщена более чем 250-летняя история изучения морфологии и физиологии сонного гломуса, рассмотрены его анатомические, гистологические, ультраструктурные особенности и иммуногистохимические характеристики. Являясь периферическим хеморецептором, сонный гломус реагирует на изменения рН крови, парциального давления кислорода и углекислого газа. Рефлекторным путем орган влияет на функции дыхательной и сердечно-сосудистой систем, регулируя частоту и глубину дыхания, тонус гладкой мускулатуры бронхов, частоту и силу сердечных сокращений. В связи со сложными взаимодействиями между параганглионарной и автономной нервной системами данный орган может быть мишенью при лечении таких заболеваний как бронхиальная астма, хроническая обструктивная болезнь легких и артериальная гипертензия. Несмотря на значительные успехи в изучении органа, до сих пор возникают противоречия и трудности, которые стоят перед учеными и практическими врачами. Так, до сих пор нет окончательного ответа о влиянии сонного гломуса на моторику бронхов и артериальных сосудов, что затрудняет создание стройной теории его роли в патогенезе бронхиальной астмы и гипертонической болезни. До настоящего времени практически не изучены синаптогенез и пролиферация клеток сонного гломуса в норме и при патологии, практически нет данных по эмбриональному развитию сонного гломуса человека. Целью дальнейших исследований должна стать разработка теорий, которые описывали бы работу этого органа в целом организме, а не ограничивались описанием группы молекул, выделяемых им в ответ на определенные стимулы.

Ключевые слова: сонный гломус, каротидное тело, параганглионарная система, хеморецепция, бронхиальная астма, ХОБЛ, артериальная гипертензия

Для корреспонденции: Дмитрий Александрович Отлыга. E-mail: otlyga@bk.ru

Для цитирования: Д.А. Отлыга, О.А. Юнеман, Е.Г. Цветкова, С.В. Савельев. Функциональная морфология сонного гломуса человека. Клини. эксп. морфология. 2019; 8(3): 13-20. DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.13-20

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 09.04.2019. Получена после рецензирования 14.05.2019. Статья принята в печать 04.06.2019.

Functional morphology of the human carotid body

D.A. Otlyga¹, O.A. Junemann¹, E.G. Tsvetkova², S.V. Saveliev¹

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

The paraganglionic system is one of the least studied systems of the body, closely interacting with the autonomous nervous system. The carotid body is an essential part of the paraganglionic system. The carotid body is a small organ located in the area of the common carotid artery bifurcation. The review summarizes more than 250-year history of studying the morphology and physiology of carotid body, considers its anatomical, histological, ultrastructural and immunohistochemical features. Being a peripheral chemoreceptor, the carotid body responds to the changes in pH-blood, partial pressure of arterial oxygen and carbon dioxide. The organ affects the functions of the respiratory and cardiovascular systems by complex reflexes, regulating the frequency and depth of breathing, the tone of the smooth muscles of the bronchi, the frequency and strength of heart contractions. Due to the complex interactions between the paraganglionic and autonomic nervous systems, this organ can be targeted in the treatment of diseases such as bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and arterial hypertension. Despite significant successes in the study of the organ, there are still contradictions

and difficulties faced by scientists and practitioners. So, there is still no final answer about the effect of carotid body on the motility of the bronchi and arterial vessels. It makes difficult to create the theory of its role in the pathogenesis of bronchial asthma and hypertension. The synaptogenesis and proliferation of carotid body cells have not been studied in normal and pathological conditions. There is practically no data on the embryonic development of the human carotid body. Further research should be aimed to create the theories that will describe the work of this organ in the whole organism and will not be limited to description of the group of molecules secreted by it in response to certain stimuli.

Key words: carotid body, paraganglionic system, chemoreception, bronchial asthma, COPD, arterial hypertension

Corresponding author: Dmitry A. Otlyga. E-mail: otlyga@bk.ru

For citation: D.A. Otlyga, O.A. Junemann, E.G. Tsvetkova, S.V. Saveliev. Functional morphology of the human carotid body. Clin. exp. morphology. 2019; 8(3): 13-20. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.13-20

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 09.04.2019. **Received in revised forms** 14.05.2019. **Accepted** 04.06.2019.

Сонный гломус – парный хеморецепторный орган, входящий в так называемую параганглионарную хеморецепторную систему. Последняя у многоклеточных организмов помимо связи с внешней средой участвует в поддержании гомеостаза, одним из важнейших внутренних показателей которого является газовый состав и рН крови. Посредством сложных рефлексов данный орган приводит к изменению функции легких и сердечно-сосудистой системы. Значительный вклад функции сонного гломуса в регуляцию дыхания и кровеносной системы может быть связан с различной патологией. Морфологические изменения органа, обнаруживаемые при различных патологиях – бронхиальной астме, хронической обструктивной болезни легких и артериальной гипертензии, могут влиять на течение последних [1–3]. Несмотря на успехи медицины в лечении перечисленных заболеваний, они остаются одними из самых распространенных причин снижения уровня жизни в развитых странах. К примеру, в 2005 году от астмы страдали около 327 миллионов человек, в 2015 году число больных увеличилось уже до 358 миллионов [4], астма стала причиной смерти 397 тысяч человек в 2015 году [5]. Хронической обструктивной болезнью легких в 2015 году страдали 174 миллиона человек [4], а умерли от нее 3,2 миллиона человек, что составляет почти 6% от общего числа умерших от различных заболеваний [5].

Однако даже при более чем двухвековом исследовании органа наши данные о нем остаются противоречивыми. Значительная вариабельность иннервации и кровоснабжения, быстрое нарастание посмертных изменений и подверженность ткани возникновению артефактов при изготовлении гистологических препаратов затрудняют интерпретацию полученных результатов. До сих пор нет окончательного ответа на вопрос о пользе резекции сонного гломуса у пациентов с бронхиальной астмой. Множество исследований, положительно отвечающих на данный вопрос, сосуществует вместе с работами, говорящими о наличии смертельно опасных осложнений и отсутствии эффективности данного вида операций. Вероятнее всего, подобные противоречия объясняются недооценкой индивидуальной измен-

чивости иннервации сонного гломуса, а также непониманием тонких механизмов регуляции, в которые вовлечен орган.

История исследования

Сонный гломус был впервые описан учеником Альбрехта фон Галлера (Albrecht von Haller) Гартвигом Таубе (Hartwig Taube) в диссертации 1743 года *Dissertationem inauguralem de vera nervi intercostalis origine* под названием *ganglion minutuum* [6]. В дальнейшем в своем известном труде *Elementa Physiologiae Corporis Humani* Albrecht фон Галлер приводит характеристику сонного гломуса, называя его *ganglion exiguum* (маленький ганглий) [7]. Галлер был одним из первых, кто практически верно описал иннервацию органа.

Параллельно в промежуток между 1751–1755 годами сонный гломус, называя его *gangliolum intercaroticum*, описывает Andersch. Neubauer в 1772-м также пишет о данном органе, но именует его *ganglion parvum*, а в 1833 году Mayer под названием *ganglion intercaroticum* заново его описывает. Он уточняет, что в иннервации гломуса участвует языкоглоточный нерв. Valentin в 1833 году описывает артерию, кровоснабжающую орган, а Svitzer приходит к ошибочному заключению, что он иннервируется исключительно языкоглоточным нервом и симпатические волокна не участвуют в его иннервации [6].

Во второй половине XIX века наука располагала лишь анатомическими работами, которые ничего не могли сказать о структуре и функции данного органа.

В 1862 году Luschka интерпретирует строение сонного гломуса как скопление железистых трубочек и в соответствии с этим называет данный орган каротидной железой – *glandula carotica*. В противоположность Luschka в 1865 году Arnold заявляет, что «железистые трубочки» являются всего лишь изогнутыми кровеносными сосудами, формирующими сосудистые клубочки, и вследствие этого дает органу название *glomeruli arteriosi intercarotici* [6].

Это противоречие разделило эмбриологов на два лагеря. Одни считали, что орган, будучи железой, имеет

эндодермальное происхождение, а вторые полагали, что у сонного гломуса мезодермальное происхождение.

Важной вехой в изучении нейроэндокринных органов стали работы Kohn, который впервые ввел понятие системы параганглиев. Используя методы окраски тканей солями хрома, открытыми впервые Werner в 1857 году и более подробно описанными Henle в 1865-м [8], Kohn предложил термин «хромаффинная клетка» для тех из них, которые окрашивались в коричневый цвет под действием солей хрома [9]. В дальнейшем он показал, что часть клеток сонного гломуса относится к хромаффинным, и усомнился в том, что орган является железой. С его работами вполне согласуется исследование Stilling, выделившего «типичные» клетки, которые формируют основную массу органа, и «хромофильные» клетки [6]. Тем не менее многие авторы отмечали, что хромаффинные клетки довольно редко встречаются в сонном гломусе, а зачастую вообще отсутствуют.

В 1900 году итальянские ученые Pagano и Siciliano предположили, что начальным звеном кардиореспираторного рефлекса у человека является синокаротидный регион. В 1920-х годах немецкий ученый Heinrich Hering продемонстрировал, что электрическое и механическое возбуждение каротидного синуса вызывает брадикардию и снижает артериальное давление [10]. В то время в научной среде доминировала теория французского ученого François-Franck. Революционная по своей сути, она предполагала начальное звено сосудодвигательного рефлекса в стволе головного мозга. Этим она входила в явное противоречие с наблюдениями Pagano, Siciliano и Hering. Несмотря на их правоту, данные работы оказались в первое время непризнанными и игнорировались.

Ключевыми в истории изучения структуры и функции сонного гломуса по праву являются выдающиеся работы испанского гистолога de Castro и бельгийских физиологов Jean-François Heymans и его сына Corneille Heymans.

В своих работах de Castro комплексно изучал как сонный гломус, так и каротидный синус. Автор тщательно исследовал нервные волокна органа и установил, что основную иннервацию гломус получает от ветви языкоглоточного нерва. Помимо этого, в орган входят волокна от симпатического верхнего шейного ганглия и в меньшей степени от блуждающего нерва. Суммируя данные своих экспериментов, de Castro впервые предположил, что функция органа состоит в обнаружении качественных изменений в химическом составе крови и влиянии на активность других органов посредством рефлекторного воздействия. Кроме того, в своих экспериментах он установил роль каротидного синуса в измерении давления в сонных артериях [10].

Параллельно с работами de Castro в Бельгии, в Генте, вели свое исследование Jean-Francois Heymans и его сын Corneille Heymans. Их меньше интересовал сонный

гломус, они делали акцент на каротидном синусе, пытаясь объяснить синокаротидный рефлекс. Именно из-за игнорирования наличия сонного гломуса они долго не могли понять, что давление и химический состав крови определяются в разных участках [10]. Однако, ознакомившись с работами de Castro, в 1931 году Corneille Heymans публикует работу, показывающую роль сонного гломуса в синокаротидном рефлексе в ответ на изменение химического состава крови [6, 10].

Таким образом, к концу 1930-х годов проявилась роль сонного гломуса и каротидного синуса в их физиологическом влиянии на организм. В 1938 году за открытие роли синусного и аортального механизмов в регуляции дыхания Corneille Jean François Heymans был награжден Нобелевской премией. Несмотря на значительный, можно сказать ключевой, вклад Fernando de Castro в изучение данной проблемы, его ни разу не выдвинули на получение Нобелевской премии [10].

Макроанатомия

В XX веке многие ученые и патологоанатомы активно занимаются изучением сонного гломуса. Исследуется практически все, от макроанатомии, гистологии до ультраструктуры с молекулярными механизмами хеморецепции.

Heath, Edwards и Harris изучают варибельность расположения сонного гломуса, его форму, массу и их изменения при различных патологических состояниях [11–13]. Из их работ видно, что орган обладает значительной индивидуальной изменчивостью, различаются как его размеры, так и форма с расположением. Heath совместно с Edwards, Jago и Smith изучает структуру гломических артерий – артерий, кровоснабжающих гломус [14–16]. Оказалось, что орган не всегда кровоснабжается одной артерией. Помимо этого перечисленные выше авторы не смогли обнаружить артериоловеноулярные анастомозы в сонном гломусе человека, хотя данные анастомозы были обнаружены de Castro в гломусе кошки [15], а Serafini-Fracassini и Volpin обнаружили их у собаки [17].

В 1937 году Boyd, исследовав 143 сонные артерии, установил значительную индивидуальную изменчивость синусного нерва [18]. Нервы, участвующие в иннервации сонного гломуса, образовывали большое количество анастомозов. Sheehan et al. продолжили исследовать индивидуальную изменчивость анатомии и топографии нервов органа [19]. Их данные полностью подтверждаются и дополняются современными исследованиями [20]. Таким образом, была показана значительная варибельность макроскопического строения сонного гломуса.

Физиология. Роль в регуляции вегетативных функций

Comroe в 1939 году, а затем Gernandt в 1946-м показали, что возбуждение периферических хеморецепторов у животных вызывает рефлекторную гипер-

вентиляцию легких, а также приводит к увеличению артериального давления [6]. Watt et al. обнаружили, что периферические хеморецепторы органа в первую очередь реагируют на аноксию, так как при выведении из рефлекторной дуги сонного гломуса и аортальных телец происходит угнетение ответа организма на отсутствие кислорода [6]. В дальнейшем исследования целого ряда физиологов установили, что сонный гломус реагирует на парциальное давление кислорода сильнее, чем на изменение парциального давления углекислого газа и pH крови [6, 21].

Патологическая повышенная активность сонного гломуса может быть одним из факторов развития стойкой артериальной гипертензии. В связи с этим многообещающе выглядят работы, направленные на снижение патологической импульсации органа у пациентов с неподдающейся медикаментозному лечению гипертонической болезнью [22].

Совсем недавние работы позволяют предположить, что помимо перечисленных выше функций сонный гломус может принимать участие в регуляции содержания глюкозы в плазме крови, а также играет некоторую роль в иммунном ответе [21, 23, 24].

Очень интересна для практического здравоохранения роль сонного гломуса в моторике бронхов. В 1951 году Daly и Schweitzer опубликовали работу, которая показала, что возбуждение хеморецепторов сонного гломуса вызывает бронходилатацию, в то время как активация барорецепторов каротидного синуса – бронхоконстрикцию [25]. В 1961 году американские физиологи Nadel и Widdicombe модифицировали эксперимент. Раздельно исследуя объем трахеи и сопротивление легких, они пришли к выводу, что активация сонного гломуса вызывает бронхоконстрикцию, возбуждение же барорецепторов каротидного синуса – бронходилатацию [26]. Данное противоречие, скорее всего, связано с применением различной анестезии этими группами авторов. Первые применяли для анестезии нембутал, вторые – хлоразол, уретан и морфин. Интересен следующий факт: Daly и Schweitzer упомянули, что применение хлоразола в качестве анестезии изменяло результаты эксперимента на прямо противоположные [25].

Данный факт натолкнул хирургов на возможность лечения бронхиальной астмы путем воздействия на сонный гломус. Первым из хирургов, выполнившим гломэктомии (удаление сонного гломуса) при бронхиальной астме, стал японец Nakayama [27]. В декабре 1961 года он представил свой способ лечения бронхиальной астмы, отработанный на 3914 пациентах. Результаты оказались ошеломляющими, поэтому уже вскоре многие западные и отечественные хирурги начали применять способ Nakayama. Проводилась односторонняя и двухсторонняя резекция сонного гломуса. К сожалению, преждевременная радость сменилась разочарованием [27]. Дальнейшее наблюдение за пациентами показало, что изначальное снижение частоты

и силы приступов астмы было временным. Вскоре у многих пациентов приступы удушья возвращались, и единиц они были к тому же более сильными. Помимо этого у лиц с двухсторонней гломэктомией также пропал респираторный рефлекс на гипоксию [27, 28]. Опубликованные результаты хирургов оказались противоречивыми. При тщательном рассмотрении работ выяснилось, что лишь малая доля из них включала в себя плацебо контроль. Очень часто не проводилась гистологическая верификация удаленных тканей, а там, где она осуществлялась, отмечался значительный процент отсутствия сонного гломуса в резецированном материале. Однако, несмотря на все это, многие хирурги до сих пор склоняются к возможности операции при далеко зашедшей тяжелой форме бронхиальной астмы [29].

Вслед за гломэктомией появились более современные методы хирургического лечения бронхиальной астмы. Их основа – не разрушение сонного гломуса и структур вегетативной нервной системы, а изменение их активности с помощью имплантируемых нейростимуляторов второго и третьего поколения. Как показала практика, целесообразнее оказывать с их помощью воздействие на синокаротидный нерв и на симпатический ствол. В настоящее время это единственный эффективный хирургический метод, который привел помимо снижения частоты и силы приступов к значимому снижению суточной потребности в адrenomimetиках и гормональных препаратах. Результаты работ хирургов дают надежду на то, что качество жизни страдающих столь инвалидизирующим заболеванием станет намного лучше [29].

Гистология и ультраструктура

С микроскопическим изучением сонного гломуса все оказалось сложно и запутанно. Как уже было сказано, Kohn и Stilling считали часть клеток данного органа хромаффинными. В последующем de Castro отверг хромаффинность гломуса, затем Watzka предложил отнести сонный гломус к нехромаффинным параганглиям [6].

Gomez в 1907 и 1908 годах подробнее описал гистологию органа, выделив в нем клетки двух типов [30]. Большую роль в исследовании гистологии гломуса сыграл L.L. de Kock. Применив технику серебрения по Холмсу, он подробно описал основные типы клеток органа, а также уточнил ход нервных волокон внутри него [31, 32]. Кроме того, de Kock обратил внимание на подверженность ткани органа аутолитическим изменениям, которые могут значительно влиять на результаты исследования. Помимо этого de Kock вслед за Meijling предположил нейральное происхождение клеток I типа [32]. Немного позднее Gould уточнил, что именно они получают иннервацию [33].

К середине XX века в исследованиях все активнее начинает применяться электронная микроскопия. Имея более высокое разрешение, она позволила глубже

понять структуру органа. К 1970-м годам благодаря этому методу проясняются особенности клеток I и II типов [21, 30]. Исследуются характеристики нервных волокон, проходящих внутри органа. Получает распространение теория, согласно которой первичными хемочувствительными элементами гломуса являются клетки типа I. Клетки типа II считаются аналогами глиальных клеток нервной системы. Однако с данной теорией, которая доминирует и в настоящее время, был категорически не согласен английский ученый Tim Biscoe [30]. Признавая роль клеток типа II, он не считал первичным элементом клетки типа I, а утверждал, что первичным сенсором являются свободные нервные окончания, обильно расположенные внутри органа, но затем отказался от своей первоначальной гипотезы [34].

Особняком стоит фундаментальная монография Н.А. Смиттен (1972). Используя сравнительно-анатомический метод исследования на обширном материале от круглоротых до человека, автор предположила рудиментарный характер сонного гломуса. По ее мнению, гломусы – следы филогенетического прошлого хроматинной ткани. Ее исследование показало, что параганглионарная ткань не развивается либо упрощается там, где идет атрофия сосудистых структур, например таких, как жаберные артериальные дуги. Из ее работы следует вывод: нет специальных хеморецепторных органов, а есть хеморецепторная функция, свойственная любому органу и обязанная своим существованием рефлекторной деятельности нервной системы. По Смиттен, сонный гломус вопреки общепринятому мнению необоснованно называют органом, тогда как правильнее считать его тканевой структурой, доставшейся млекопитающим в результате эволюции хроматинной ткани. Таким образом, параганглионарная ткань в эволюционном ряду теряет свою эндокринную функцию, сохраняя при этом хеморецепторную [35].

В целом мы принимаем гипотезу Смиттен, отлично объясняющую многие особенности сонного гломуса. Тем не менее мы категорически не согласны с необоснованным отнесением гломуса к тканевым структурам, а не к органам. На наш взгляд, в связи с усложнением нервной регуляции дыхания и артериального давления параганглионарная ткань, утратив свою эндокринную функцию, приобрела важную роль регулятора газового состава крови. Об этом свидетельствуют перечисленные выше эксперименты по резекции органа. Мы считаем, что, несмотря на верное замечание Смиттен о наличии у всех органов хеморецепторной функции, именно сонному гломусу наряду с дыхательными центрами головного мозга принадлежит ведущая роль системного сенсора парциального давления кислорода и углекислого газа крови, поэтому его вернее относить к органам, а не к тканевым структурам.

Иммуногистохимическая характеристика

С 1980-х годов и до настоящего момента изучение сонного гломуса перешло в область молекулярной био-

логии. Анализируется экспрессия генов в различных физиологических состояниях и при патологии [21]. Проявляются многие молекулярные особенности опухолевых клеток, предшественниками которых являются нормальные клетки сонного гломуса [36]. Данные методы косвенно помогли разобраться в гистогенезе органа [37].

Резюмируя все сказанное, по современным воззрениям, сонный гломус является производным нервного гребня, то есть нейроэктодермальной структурой. Орган состоит из клеток типа I и II. Клетки типа I имеют в основном округлую или полигональную форму. Они считаются хеморецепторными и синтезируют целый ряд нейрональных маркеров. Ключевые среди них – маркер цитоскелета bIII-тубулин [38–40], PGP9.5 [41, 42] и синаптофизин [41]. Часть клеток типа I осуществляет синтез гистидиндекарбоксилазы [43] и тирозингидроксилазы (ТН) [38, 39, 43], причем процент ТН-позитивных клеток у человека значительно ниже, чем у крыс и мышей [38, 43]. Помимо этого на данных клетках обнаружен целый ряд рецепторов: дофаминовые D2 [38,43], Н1- и Н3-рецепторы к гистамину [43], пуринорецепторы (A_{2A} и P2X₂) [38, 40], ГАМК-рецепторы [38] и никотиновые ацетилхолиновые рецепторы [38, 40]. Предполагается, что двупоровые калиевые (TASK-1) и кальцийзависимые ВК-каналы принимают участие в активации этого типа клеток в ответ на гипоксию [38, 40].

Клетки типа II имеют в основном веретенообразную форму. Они являются поддерживающими глиоподобными клетками и, по-видимому, не обладают хеморецепторной активностью. Данные клетки экспрессируют глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), виментин, нестин [38, 39] и белок S100 [44].

Клетки типа I образуют гнезда (гломерулы), окруженные клетками типа II. Между гломерулами проходят многочисленные нервные волокна. Скопления гломерул у человека окружены коллагеновыми волокнами соединительной ткани и образуют дольки (рис. 1 А, Б) [45].

Тем не менее, несмотря на все новейшие методы, многое остается неясным. В связи с тем, что большинство работ выполняется не на человеческом материале, а на материале лабораторных животных, адекватность переноса результатов экспериментов вызывает вопросы. Кроме того, уже известно, что наличие различных рецепторов, субъединиц рецепторов и регуляторных молекул в клетках сонного гломуса может значительно варьировать в зависимости от возраста, воздействия окружающей среды и изучаемого вида организма [38, 46].

Заключение

К настоящему времени выяснено, что сонный гломус отвечает в основном за чувствительность организма к изменению парциального давления кислорода. В ответ на снижение уровня кислорода в крови орган

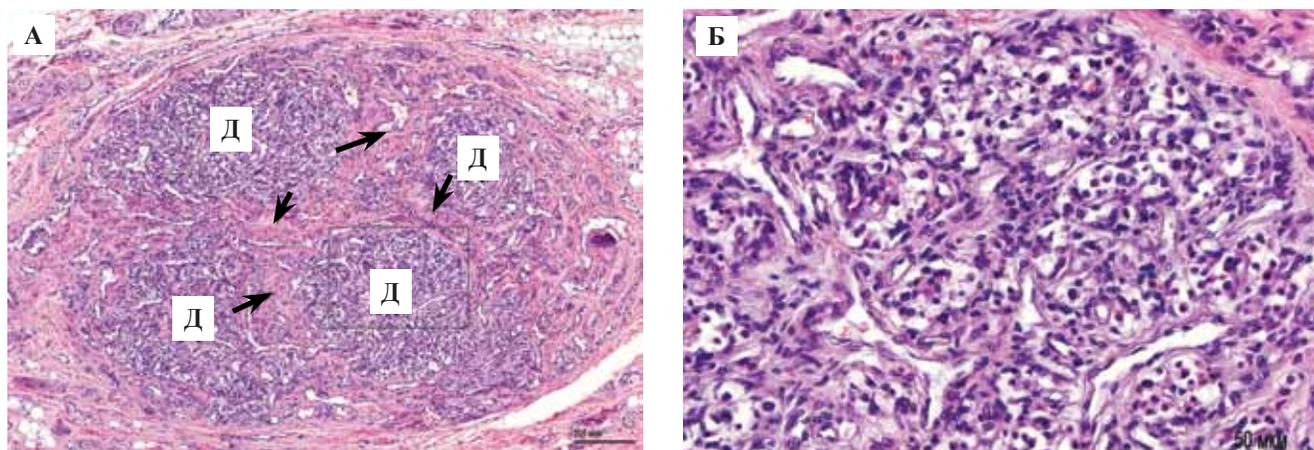


Рис. 1. Вертикальный срез сонного гломуса 24-летней женщины.

А – орган состоит из долек, разделенных соединительнотканными перегородками. Д – дольки, стрелки – окружающая дольки соединительная ткань, прямоугольником выделен фрагмент, представленный на рис. 1 Б, Б – долька сонного гломуса представлена скоплением клеток типа I и II. Окрашивание гематоксилином и эозином

Fig. 1. Vertical section through the carotid body of a 24-year-old woman.

А – The organ consists of lobules separated by connective tissue septa. Д – lobules, arrows – connective tissue surrounding lobules, the rectangle outlines the fragment presented in Figure 1 Б, Б – a lobule of the carotid body consists of a cluster of type I and II cells. H&E Stain

посылает в ствол мозга импульсы, вследствие чего рефлекторно увеличивается частота и глубина дыхания. Кроме того, вероятно, происходит изменение тонуса гладкой мускулатуры бронхов.

Однако, несмотря на значительные успехи в изучении органа, до сих пор возникают противоречия и трудности, которые стоят перед учеными и практическими врачами. Так, до сих пор нет окончательного ответа о влиянии сонного гломуса на моторику бронхов и артериальных сосудов. В связи с этим затруднено создание стройной теории его роли в патогенезе бронхиальной астмы и гипертонической болезни.

Значительная вариабельность анатомии и топографии нервов органа зачастую не учитывается хирургами при выполнении вмешательств в данной области. Незнание сложных взаимоотношений структур и их физиологического влияния часто приводит к плачевным последствиям. Послеоперационные гипертонические кризы, ночное апноэ, кровотечения – лишь краткий список осложнений, с которыми может столкнуться хирург.

Как уже было сказано, множество работ, особенно посвященных молекулярным процессам, выполнено и продолжает выполняться на лабораторных животных. Однако смелые переносы их результатов на человека пока не оправданны.

К настоящему времени практически не изучены синаптогенез и пролиферация клеток сонного гломуса в норме и при патологии. Несмотря на то, что в настоящее время появляются работы, посвященные данной проблеме, в этой области пока остается много вопросов.

Практически нет данных по эмбриональному развитию сонного гломуса человека. Отрывочные знания мы имеем лишь из работ, выполненных на лаборатор-

ных животных. Вся информация о человеке получена в XIX и XX веках и уже в значительной степени устарела.

Углубления в молекулярные механизмы строения и физиологии органа затуманивают общую картину функционирования целого организма. Следует разрабатывать теории, которые описывали бы работу органа в целом организме, а не ограничивались описанием группы молекул, выделяемых им на определенные стимулы.

Литература/References

1. Edwards C, Heath D, and Harris P. The carotid body in emphysema and left ventricular hypertrophy. *J Pathol.* 1971;104(1):1–13.
2. Narkiewicz K, Ratcliffe LE, Hart EC, Briant LJ, Chrostowska M, Wolf J et al. Unilateral Carotid Body Resection in Resistant Hypertension: A Safety and Feasibility Trial. *JACC Basic Transl Sci.* 2016;1(5):313–24.
3. Paton JF, Sobotka PA, Fudim M, Engelman ZJ, Hart EC, McBryde FD et al. The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension.* 2013;61(1):5–13.
4. Vos T, Allen C, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown A et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1545–602.
5. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1459–544.

6. *Zak FG, Lawson W.* The paraganglionic chemoreceptor system: physiology, pathology, and clinical medicine. New York: Springer-Verlag, 1982.
7. *von Haller A.* Elementa physiologiae corporis humani: tomus quartus, cerebrum, nervi, musculi. 1762.
8. *Carmichael SW.* The history of the adrenal medulla. Reviews in the Neurosciences. 1989;2(2):83–100.
9. *Kohn A.* Die paraganglien. Archiv für mikroskopische Anatomie. 1903;62(1):263–365. [In German].
10. *de Castro F.* Towards the sensory nature of the carotid body: Hering, De Castro and Heymans. Front Neuroanat. 2009;3:23.
11. *Heath D.* The human carotid body. Thorax. 1983;38(8):561.
12. *Heath D, Edwards C, Harris P.* Post-mortem size and structure of the human carotid body. Thorax. 1970;25(2):129–40.
13. *Khan Q, Heath D, Smith P.* Anatomical variations in human carotid bodies. J Clin Pathol. 1988;41(11):1196–9.
14. *Heath D, Edwards C.* The glomic arteries. Cardiovascular research. 1971;5(3):303–12.
15. *Heath D, Jago R, Smith P.* The vasculature of the carotid body. Cardiovascular research. 1983;17(1):33–42.
16. *Jago R, Heath D, Smith P.* Structure of the glomic arteries. The Journal of pathology. 1982;138(3):205–18.
17. *Serafini-Fracassini A, Volpin D.* Some features of the vascularization of the carotid body in the dog. Cells Tissues Organs. 1966;63(4):571–9.
18. *Boyd J.* Observations on the human carotid sinus and its nerve supply. Anat. Anz. 1937;84:386–99.
19. *Sheehan D, Mulholland J, Shafiroff B.* Surgical anatomy of the carotid sinus nerve. The Anatomical Record. 1941;80(4):431–42.
20. *Toorop RJ, Scheltinga MR, Moll FL, Bleys RL.* Anatomy of the carotid sinus nerve and surgical implications in carotid sinus syndrome. Journal of vascular surgery. 2009;50(1):177–82.
21. *Kumar P, Prabhakar NR.* Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. Compr Physiol. 2012;2(1):141–219.
22. *Iturriaga R.* Carotid Body Ablation: a New Target to Address Central Autonomic Dysfunction. Curr Hypertens Rep. 2018;20(6):53.
23. *Liu X, He L, Stensaas L, Dinger B, Fidone S.* Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;296(2): L158–66.
24. *Ribeiro MJ, Sacramento JF, Gonzalez C, Guarino MP, Monteiro EC, Conde SV.* Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. Diabetes. 2013;62(8):2905–16.
25. *Daly M, Schweitzer A.* Effects of Sino Aortic Nerve Stimulation on the Bronchi. Acta Physiologica. 1951;22(1):66–72.
26. *Nadel J, Widdicombe J.* Effect of changes in blood gas tensions and carotid sinus pressure on tracheal volume and total lung resistance to airflow. The Journal of physiology. 1962;163(1):13–33.
27. *Winter B.* Carotid Body Resection. The Annals of thoracic surgery. 1973;16(6):648–59.
28. *Chang KC, Morrill CG, Chai H.* Impaired response to hypoxia after bilateral carotid body resection for treatment of bronchial asthma. Chest. 1978;73(5):667–69.
29. *Карацуров С.Е., Карацуров Е.С., Гудовский Л.М., Добровольский С.П., Пасечник Т.М., Стояновский А.В.* Радиочастотная электростимуляция СКН при лечении бронхиальной астмы. Хирургия. 1999;(12):4–6.
30. *Karashurov S.E., Karashurov E.S., Gudovskii LM, Dobrovolskii SR, Pasechnik TM, Stoianovskii AV.* Radiofrequency electrostimulation of carotid sinus nerves for the treatment of bronchial asthma. Khirurgiia. 1999;(12):4–6 (In Russ.).
31. *Biscoe TJ.* Carotid body: structure and function. Physiol Rev. 1971;51(3):437–95.
32. *De Kock L.* Histology of the carotid body. Nature. 1951;167(4250):611.
33. *De Kock L.* The intra-glomerular tissues of the carotid body. Cells Tissues Organs. 1954;21(2):101–16.
34. *Gould R.* Fine innervation of the carotid body of the rhesus monkey. Nature. 1960;185(4707):183.
35. *Biscoe T, Duchon M.* Responses of type I cells dissociated from the rabbit carotid body to hypoxia. The Journal of physiology. 1990;428(1):39–59.
36. *Смиттен Н.А.* Симпато-адреналовая система в филогенезе и онтогенезе позвоночных. Москва: Наука, 1972.
37. *Smitten NA.* Sympatho-adrenal system in phylogenesis and ontogenesis. Moscow: Nauka, 1972 (In Russ.).
38. *Brown P, Rema A, Gartner F.* Immunohistochemical characteristics of canine aortic and carotid body tumours. Transboundary and Emerging Diseases. 2003;50(3):140–4.
39. *Kameda Y.* Mash1 is required for glomus cell formation in the mouse carotid body. Developmental biology. 2005;283(1):128–39.
40. *Fagerlund MJ, Kählin J, Ebberyd A, Schulte G, Mkrtchian S, Eriksson LI.* The human carotid body: expression of oxygen sensing and signaling genes of relevance for anesthesia. Anesthesiology. 2010;113(6):1270–9.
41. *Izal-Azcárate A, Belzunegui S, San Sebastián W, Garrido-Gil P, Vázquez-Claverie M, López B et al.* Immunohistochemical characterization of the rat carotid body. Respir Physiol Neurobiol. 2008;161(1):95–9.
42. *Kählin J, Eriksson LI, Ebberyd A, Fagerlund MJ.* Presence of nicotinic, purinergic and dopaminergic receptors and the TASK-1 K⁺-channel in the mouse carotid body. Respir Physiol Neurobiol. 2010;172(3):122–8.
43. *Habeck JO, Pallot DJ, Kummer W.* Serotonin immunoreactivity in the carotid body of adult humans. Histol Histopathol. 1994;9(2):227–32.
44. *Kent C, Rowe HL.* The immunolocalisation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP9.5) in developing paraneurons in the rat. Brain Res Dev Brain Res. 1992;68(2):241–6.
45. *Lazarov NE, Reindl S, Fischer F, Gratzl M.* Histaminergic and dopaminergic traits in the human carotid body. Respir Physiol Neurobiol. 2009;165(2-3):131–6.
46. *Kondo H, Iwanaga T, Nakajima T.* Immunocytochemical study on the localization of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body of rats. Cell Tissue Res. 1982;227(2):291–5.
47. *Smith P, Jago R, Heath D.* Anatomical variation and quantitative histology of the normal and enlarged carotid body. J Pathol. 1982;137(4):287–304.
48. *Shirahata M, Balbir A, Otsubo T, Fitzgerald RS.* Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. Respir Physiol Neurobiol. 2007;157(1):93–105.

Информация об авторах

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

Ольга Андреевна Юнеман – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Екатерина Глебовна Цветкова – студентка Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет).

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

Author information

Dmitry A. Otylga – Researcher of Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia.
<https://orcid.org/0000-0002-6719-3383>

Olga A. Junemann – Candidate of Medical Sciences, Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0001-5828-5393>

Ekaterina G. Tsvetkova – Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-7943-7760>

Sergey V. Saveliev – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-1447-7198>

Разновидности бесклеточных каркасов в тканевой инженерии и способы их получения

А.Ю. Пульвер¹, Б.Е. Лейбович^{1,3}, Р.А. Полтавцева², А.Н. Шевцов¹, Н.А. Пульвер¹

¹ НПО ООО «Институт биологии старения», Воронеж, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

³ Негосударственное учреждение здравоохранения «Дорожная клиническая больница на станции Воронеж-1 ОАО «РЖД»», Воронеж, Россия

Актуальность: создание рассматриваемых в статье основных разновидностей биоинженерных бесклеточных каркасов (внеклеточных матриц, ВКМ) стало признанным методом в бурно развивающейся области регенеративной медицины.

Цель исследования: анализ источников литературы, рассматривающих проблемы создания искусственных трехмерных каркасов, имитирующих состав и функции ВКМ, для обеспечения микроокружения, близкого к естественному, в дискурсе сравнения преимуществ использования различных нативных ВКМ, взятых из тканей и органов, а также синтезированных *in vitro* клеточными культурами.

Материалы и методы: обзор источников литературы.

Результаты: рассмотрены свойства ВКМ *in vivo* и *in vitro*, а также основные разновидности современных методов децеллюляризации, с упором на органо- и тканеспецифичные разновидности ВКМ.

Выводы: проведено развернутое сравнение преимуществ и недостатков различных типов бесклеточных каркасов.

Ключевые слова: 3D клеточные культуры, внеклеточный матрикс, мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки, тканевая инженерия

Для корреспонденции: Борис Ефимович Лейбович. E-mail: bel.46@mail.ru

Для цитирования: А.Ю. Пульвер, Б.Е. Лейбович, Р.А. Полтавцева, А.Н. Шевцов, Н.А. Пульвер. Разновидности бесклеточных каркасов в тканевой инженерии и способы их получения. Клини. эксп. морфология. 2019;8(3): 21-27. DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.21-27

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 31.07.2019. Получена после рецензирования 22.08.2019. Принята в печать 18.09.2019.

Tissue engineering scaffold subtypes and methods for the production thereof

A.Yu. Pulver¹, B.E. Leibovich^{1,3}, R.A. Poltavtseva², A.N. Shevtsov¹, N.A. Pulver¹

¹ R&B «Institute of Biology of Aging», LLC, Voronezh, Russia

² VI Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

³ Non-state health care facility «Road Clinical Hospital at the station Voronezh-1 of JSC «Russian Railways» (RZhD CST)», Voronezh, Russia

Relevance: the production of the main tissue-engineered acellular scaffolds (extracellular matrixes, ECM) described in this article has become a recognized method in the rapidly developing field of regenerative medicine.

The aim of the study was to review current literature that analyzes problems of creating artificial three-dimensional scaffolds mimicking natural ECM composition and functions and to compare the advantages of using different native ECMs obtained from tissues and organs, as well as synthesized *in vitro* are compared.

Materials and methods: literature review.

Results: in this work the ECM characteristics *in vivo* and *in vitro*, as well as the varieties of modern techniques of decellularization, with an emphasis on organ- and tissue-specific ECMs, were analyzed.

Conclusions: a detailed comparison of the advantages and disadvantages of various types of acellular scaffolds was carried out.

Key words: 3D cell cultures, extracellular matrix, mesenchymal multipotent stromal cells, tissue engineering

Corresponding author: Boris E. Leibovich. E-mail: bel.46@mail.ru

For citation: A. Yu. Pulver, B.E. Leibovich, R.A. Poltavtseva, A.N. Shevtsov, N.A. Pulver. Tissue engineering scaffold subtypes and methods for the production thereof. Clin. exp. morphology. 2019;8(3):21-27. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.21-27

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: Received in revised forms Accepted:

Тканевая инженерия, соединяющая воедино клетки, биологически совместимый материал клеточных каркасов и биологически активные молекулы, зарекомендовала себя в качестве многообещающего терапевтического подхода при лечении ряда заболеваний и травм, что особенно важно, учитывая разнообразие медицинских проблем, не поддающихся доступным на сегодняшний день методам лечения [1, 2].

Все трехмерные клеточные культуры по сути своей являются «органотипическими», в той или иной мере имитируют состав и функции внеклеточного матрикса (ВКМ), или бесклеточного каркаса определенной ткани. ВКМ не только представляют собой формообразующий фактор, но и контролируют функции клеток и стимулируют образование новых тканей [3]. Каркасы являются субстратом для засеянных на них клеток и обеспечивают физические и биологические сигналы, необходимые для адгезии и миграции клеток «на свои места», пролиферации и дифференцировки. С течением времени каркасы постепенно резорбируются, полностью замещаясь «родными» элементами ВКМ, синтезированными клетками. Для этого трехмерные каркасы должны быть биосовместимыми, биодеградируемыми, при этом регулировать клеточную пролиферацию, морфогенез и дифференцировку, подобно нативным ВКМ [4, 5]. Другие важные направления тканевой инженерии – двухмерные плоские подложки, которые используются для пассажа *in vitro* культур соматических и стволовых клеток, а также их трехмерные производные. Подобные подложки должны обладать способностью обеспечивать максимальный рост числа клеток, не влияя на их фенотип и генотип.

Наряду с этим ВКМ способны модулировать сигнальную трансдукцию, осуществляемую различными биологически активными молекулами, такими как факторы роста и цитокины [6]. Молекулярный состав и трехмерная структура ВКМ в каждой конкретной ткани и органе индивидуальны, постоянно динамично меняются и перестраиваются. В идеале каркасы и подложки, используемые в тканевой инженерии, должны обеспечивать для культивируемых клеток микроокружение, близкое к естественному. Естественные же ВКМ имеют очень сложную структуру, так что, несмотря на многочисленные исследования в этой области [7], до сих пор не установлено строение целого ряда входящих в их состав белков и гликопротеинов. Помимо трудности имитации со-

става ВКМ столь же трудно воссоздать его сложную микроструктуру и архитектуру молекулярных сетей. Из-за перечисленных проблем в ближайшем будущем у тканевой инженерии нет иных перспектив, кроме использования уже готовых ВКМ – либо из натуральных тканей и органов, либо синтезированных *in vitro* клеточными культурами.

Роль ВКМ *in vivo*

ВКМ различных тканей представляют собой сложные комплексы, состоящие из множества разнообразных полисахаридов, белков, гликопротеидов и протеогликанов. Адгезия клеток к ВКМ осуществляется с помощью специализированных рецепторов (интегринов), благодаря чему *in vivo* поддерживается тканевая архитектура. ВКМ способны не только поддерживать тканевую архитектуру, но и регулировать функции клеток несколькими способами [5]. Взаимосвязь между молекулами ВКМ и специфическими клеточными рецепторами напрямую активирует внутриклеточные сигнальные пути. Например, при отслойке клеток от матрикса сигнальная трансдукция, вызванная интегринными, запускает апоптоз [8]. Интегрины непосредственно активируют различные протеинкиназы [9] и даже Rho-киназу, тем самым вызывая сборку актиновых волокон [10]. Кроме прямой активации сигнальных путей ВКМ могут также активировать клеточные функции непрямыми способами. В настоящее время известно два таких способа: модуляция активности цитокинов путем их депонирования и связывания [11, 12], а также трансдукция механических сигналов [13].

Свойства ВКМ (состав, микроструктура и эластичность) меняются в зависимости от типа ткани и определяют тканеспецифичные функции клеток [7]. Более того, состав и морфология ВКМ различаются в зависимости от стадий развития и при разнообразных патологических состояниях, таких как фиброз, даже в пределах одной и той же ткани [14, 15].

Виды бесклеточных матриксов и методы децеллюризации

Для получения бесклеточных каркасов, имитирующих естественные ВКМ, из тканей селективно удаляются все клетки путем разрушения межклеточных связей, клеточных мембран и высвобождения клеточного содержимого, которое затем вымывается. Методы децеллюризации многочисленны и разнообразны [16–21]:

Физические методы:

- встряхивание;
- разрушение ультразвуком;
- механическое растирание;
- высокое гидростатическое давление (более 2500 атмосфер);
- замораживание/оттаивание.

Методы ферментативного воздействия:

- использование протеаз;
- использование нуклеаз.

Химические методы:

- обработка щелочами;
- обработка кислотами;
- обработка детергентами;
- обработка органическими растворителями;
- обработка хелатирующими реагентами;
- обработка гипо- или гипертоническими растворами.

У всех перечисленных методов имеется множество недостатков. С их помощью эффективно удаляются клеточные компоненты, но одновременно на состав, биологическую активность и биомеханические свойства остающегося в результате внеклеточного матрикса оказывается ряд неблагоприятных воздействий. Как правило, используется комбинация различных методов, чтобы усилить суммарный децеллюляризирующий эффект, одновременно ослабив возможное нежелательное воздействие на ВКМ. Считается, что для каждого органа и ткани методы децеллюляризации должны быть своими.

В настоящее время в тканевой инженерии применяются бесклеточные ВКМ-каркасы из большого числа разных тканей:

- сердца [22];
- сердечных клапанов [23];
- кровеносных сосудов [24, 20];
- подслизистой оболочки тонкой кишки [3];
- легких [25, 26];
- трахеи [27];
- кожи [28];
- нервов [29, 30];
- роговицы [31];
- пищевода [17, 32];
- печени [33, 34];
- почек [35];
- мочевого пузыря [17, 36];
- хрящевой ткани [37];
- связок [21];
- жировой ткани [38, 39];
- амниотической оболочки [40].

Производство некоторых из упомянутых каркасов было поставлено на промышленную основу для применения в терапевтических целях. Из числа коммерчески доступных бесклеточных ВКМ-каркасов наиболее широко используются продукты из подслизистой оболочки кишечника и из производных кожной ткани.

Культуральные ВКМ

При культивировании клеток *in vitro* молекулы ВКМ секретируются клетками на подложку в месте их прикрепления, благодаря чему образование, подобное ВКМ, может формироваться *in vitro* [41, 42]. После предварительной децеллюляризации такие матриксы могут быть использованы в качестве субстрата для новой культуры клеток. Особенно перспективен этот метод в сочетании с различными искусственными биосовместимыми материалами, начиная от шелка и заканчивая трехмерными полимерными наносетками сложной структуры.

Сформированные культивируемыми клетками ВКМ описываются начиная с 1970-х годов [43]. В настоящее время существует множество их разновидностей. Создан аналог базальной мембраны, образованный клетками легочного эпителия [44, 45], выращиваемыми на пластинах из высушенного коллагена с живыми фибробластами, или на так называемом матрикеле – коллагеновых пластинках, обогащенных белками базальной мембраны, продуцированными культурой клеток саркомы. Под слоем клеток в культуре образовывалась четко выраженная (электронно-микроскопически определяемая) базальная мембрана. Полученный субстрат в дальнейшем использовали для культивирования гепатоцитов. При этом на такой модели базальной мембраны первичные гепатоциты поддерживали жизнеспособность дольше, а уровень синтеза альбумина и экспрессии гена цитохрома P450 был существенно выше, чем при других условиях культивирования [45].

Матриксы, формируемые клетками, могут использоваться для модификации поверхностей биологически инертных материалов, например титана, сплавы которого не являются остеокондуктивными и имеют низкое сродство к клеткам. Для модификации титановых поверхностей на них культивировались остеобластоподобные клетки линии SAOS-2 [46]. После образования слоя белков ВКМ на металле клетки удаляли. Адгезия клеток к титану, покрытому бесклеточным матриксом, и рост культуры были существенно выше, чем при использовании чистых титановых и покрытых RGD-пептидом или фибронектином поверхностей.

Тканеспецифичные ВКМ

Для исследования первичных культур подавляющего большинства разновидностей клеток *in vitro* требуются по крайней мере аналоги тканеспецифичных ВКМ. Например, синусоидальные клетки эндотелия, обладая тропностью к ВКМ-каркасам из тканей печени, не заселяют матриксы, полученные из подслизистой оболочки тонкой кишки или базальной мембраны мочевого пузыря [47]. Первичные гепатоциты в неподходящем микроокружении (в первую очередь при культивировании *in vitro*) теряют способность к синтезу альбумина и метаболизму лекарственных препаратов. Потеря их специфических функций является

одной из главных проблем инженерии ткани печени. Первой успешной попыткой сохранения у первичных гепатоцитов специфических для клеток печени функций при культивировании был первичный матрикс из ткани печени, подвергнутой гомогенизации. К такому бесклеточному матриксу первичные гепатоциты могут прикрепляться, сохраняя при этом способность синтезировать альбумин в течение приблизительно 3 месяцев [33].

Органные ВКМ

Бесклеточные ВКМ целых органов получают, децеллюляризируя целые органы растворами (в том числе сверхкритическими), в частности флюидом CO₂ [48, 49] веществ-децеллюляризаторов, после чего пытаются «восстанавливать» их, заселяя различными типами клеток [26, 50].

Ott et al. первыми получили бесклеточные матриксы целых крысиных сердец [22] путем децеллюляции методом перфузии. После заселения матриксов неонатальными кардиомиоцитами уже через 4 недели невооруженным глазом наблюдались видимые сокращения, а еще через 8 дней появилась даже насосная функция (правда, не более 1% от производительности живого сердца). Подобным же способом (длительная перфузия раствором с повышающейся концентрацией детергентов после замораживания/оттаивания) были получены бесклеточные матриксы, приготовленные из целой печени крысы [34]. После заселения гепатоцитами и эндотелиальными клетками получившиеся «органы» демонстрировали характерные для печени функции: продукцию альбумина, синтез мочевины и детоксикацию; будучи гетеротопически подсажены крысам, успешно «работали» в течение 8 часов. В 2010 году три группы исследователей одновременно получили «восстановленное» легкое крысы из децеллюляризованного матрикса [25, 26, 50]. Для децеллюляции был также использован перфузионный метод. Полученные бесклеточные матриксы легких обладали относительно интактными структурами сосудистой сети, дыхательных путей и альвеол. После заселения (рецеллюляризации) клетками легочного эпителия и эндотелиальными клетками матриксы культивировали в биореакторе, имитирующем физиологические условия окружающей среды живого легкого. При ортотопической трансплантации «восстановленные легкие» нормально кровоснабжались и поддерживали внешнее дыхание и газообмен в течение нескольких часов. В 2009 году китайскими [51] и в 2010 году японскими исследователями [35] были получены бесклеточные матриксы почек макака-резуса. «Восстанавливать» почки эти специалисты, впрочем, не пытались: первые просто показали возможность получения ВКМ перфузионным методом, а вторые выращивали на секциях полученного матрикса фетальные почечные эксплантаты, наблюдая хорошее прикрепление, миграцию и рост клеток на матриксе.

Медицинские перспективы применения ВКМ

Методик, пригодных для клинического применения, то есть с достаточной массой живых клеток «восстановленных псевдоорганов» больших размеров из обезьяньего, человеческого, свиного и коровьего трупного материала, в настоящее время не существует. Самые крупные рецеллюляризованные органы ВКМ – почки макака-резуса [52] и печень крыс [53, 54]. Сердца и легкие крыс также не требуют значительного количества кислорода и питательных веществ, особенно с учетом того, что клеточная плотность «восстанавливаемых тканей» намного меньше, чем у здоровых органов, – все занимаются проверкой потенциальной применимости метода, а ни о каком практическом использовании речи идти не может. Тем не менее уже на этом уровне начинают проявляться лимитирующие свойства недостаточного содержания кислорода в культуральных средах, что порой заставляло исследователей включать в состав перфузата эритроциты.

К сожалению, пока адекватной перфузионной среды с газотранспортной функцией не существует [55]. Недавно, однако, претензию на создание такой среды выдвинула французская биотехнологическая компания HemaGina S.A, разработавшая ряд препаратов на основе внеклеточного дыхательного пигмента морских полихет *Arenicola marina* [56, 57]: кислородопереносящую биодобавку к биотехнологическим средам HEMOXCell®/HEMUP-Stream®, аддитив для растворов консервации органов HEMO2life®, универсальный кислородопереносящий кровезаменитель HEMOXYCarrier® и даже «оксигенирующий» перевязочный материал HEMHealing® (как они его называют, «новое терапевтическое решение для язв диабетической стопы и пролежней»).

Помимо отсутствия адекватной газотранспортной перфузионной среды [55] также имеются проблемы с доставкой клеточных элементов при попытках рецеллюляции ВКМ; к тому же способность к миграции присуща только некоторым специализированным клеточным типам, а не стволовым клеткам (последние к тому же обладают размерами, существенно превышающими просвет капилляров, зачастую вызывая эмболии при системном внутрисосудистом введении), которые наиболее перспективны с точки зрения будущего медицинского применения [58], и потому рецеллюляция производится при помощи банальных игольных инъекций в толщу скаффолда [22, 34, 35] с соответствующими повреждениями его структур, что негативно сказывается на конечных результатах.

Именно этими двумя причинами, на наш взгляд, и обусловлено отсутствие попыток клинического применения рецеллюляризованных органных ВКМ крупных животных, несмотря на уже 30-летний стаж тканевой инженерии как науки.

Литература/References

1. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002;295(5557):1009–14.
2. Langer R. Perspectives and challenges in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv Mater.* 2009;21(32–33):3235–6.
3. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* 2009;5(1):1–13.
4. Adachi E, Hopkinson I, Hayashi T. Basement-membrane stromal relationships: interactions between collagen fibrils and the lamina densa. *Int Rev Cytol.* 1997;173:73–156.
5. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285(5430):1028–32.
6. Rahman S, Patel Y, Murray J, Patel KV, Sumathipala R, Sobel M et al. Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells. *BMC Cell Biol.* 2005;6(1):8.
7. Manabe R, Tsutsui K, Yamada T, Kimura M, Nakano I, Shimono C et al. Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(35):12849–54.
8. Grossmann J. Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis--Anoikis”. *Apoptosis.* 2002;7(3):247–60.
9. Gu J, Fujibayashi A, Yamada KM, Sekiguchi K. Laminin-10/11 and fibronectin differentially prevent apoptosis induced by serum removal via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- and MEK1/ERK-dependent pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19922–8.
10. Gu J, Sumida Y, Sanzen N, Sekiguchi K. Laminin-10/11 and fibronectin differentially regulate integrin-dependent Rho and Rac activation via p130(Cas)-CrkII-DOCK180 pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(29):27090–7.
11. Gutierrez J, Osses N, Brandan E. Changes in secreted and cell associated proteoglycan synthesis during conversion of myoblasts to osteoblasts in response to bone morphogenetic protein-2: role of decorin in cell response to BMP-2. *J Cell Physiol.* 2006;206(1):58–67.
12. Kerever A, Schnack J, Vellinga D, Ichikawa N, Moon C, Arikawa-Hirasawa E et al. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells.* 2007;25(9):2146–57.
13. Alcaraz J, Xu R, Mori H, Nelson CM, Mroue R, Spencer VA et al. Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *EMBO J.* 2008;27(21):2829–38.
14. Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease. *J Pathol.* 2003;200(4):504–15.
15. Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 3):255–64.
16. Jackson DW, Grood ES, Cohn BT, Arnoczky SP, Simon TM, Cummings JF. The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73(2):201–13.
17. Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology.* 1998;51(2):221–5.
18. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology.* 1999;54(3):407–10.
19. McFetridge PS, Bodamyali T, Horrocks M, Chaudhuri JB. Endothelial and smooth muscle cell seeding onto processed ex vivo arterial scaffolds using 3D vascular bioreactors. *ASAIO J.* 2004;50(6):591–600.
20. McFetridge PS, Daniel JW, Bodamyali T, Horrocks M, Chaudhuri JB. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2004;70(2):224–34.
21. Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials.* 2005;26(35):7339–49.
22. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2004;14(2):213–21.
23. Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pautletto P et al. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO Project (Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingenioso Obtenibitur). *Ann Thorac Surg.* 2003;75(4):1274–82.
24. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res.* 1989;47(1):74–80.
25. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C., Pomerantseva I, Ikonomou L et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med.* 2010;16(8):927–33.
26. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science.* 2010;329(5991):538–41.
27. Jungebluth P, Go T, Asnaghi A, Bellini S, Martorell J, Calore C et al. Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138(3):586–93.
28. Wainwright D, Madden M, Luteran A, Hunt J, Monafu W, Heimbach D et al. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. *J Burn Care Rehabil.* 1996;17(2):124–36.
29. Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004;10(9–10):1346–58.
30. Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S, Hu CY, Lee K et al. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng.* 2004;10(11–12):1641–51.
31. Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S et al. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vis.* 2009;15:2022–8.
32. Ozeki M, Narita Y, Kagami H, Ohmiya N, Itoh A, Hirooka Y et al. Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for

- cultured esophageal epithelial cells. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(4):771–8.
33. *Rojkind M, Gatmaitan Z, Mackensen S, Giambone MA, Ponce P, Reid LM*. Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol*. 1980;87(1):255–63.
 34. *Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C et al*. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010;16(7):814–20.
 35. *Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF*. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue engineering. Part A*. 2010;16(7):2207–16.
 36. *Yang C, Hillas PJ, Baez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J et al*. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2004;18(2):103–19.
 37. *Stapleton TW, Ingram J, Katta J, Knight R, Korossis S, Fisher J et al*. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue engineering. Part A*. 2008;14(4):505–18.
 38. *Abberton KM, Bortolotto SK, Woods AA, Findlay M, Morrison WA, Thompson EW et al*. Myogel, a novel, basement membrane-rich, extracellular matrix derived from skeletal muscle, is highly adipogenic in vivo and in vitro. *Cells Tissues Organs*. 2008;188(4):347–58.
 39. *Uriel S, Huang JJ, Moya ML, Francis ME, Wang R, Chang SY et al*. The role of adipose protein derived hydrogels in adipogenesis. *Biomaterials*. 2008;29(27):3712–9.
 40. *Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E*. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2006;12(8):2117–29.
 41. *Grinnell F, Feld MK*. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. *J Biol Chem*. 1982;257(9):4888–93.
 42. *Hoshiya T, Cho CS, Murakawa A, Okahata Y, Akaike T*. The effect of natural extracellular matrix deposited on synthetic polymers on cultured primary hepatocytes. *Biomaterials*. 2006;27(26):4519–28.
 43. *Chen LB, Murray A, Segal RA, Bushnell A, Walsh ML*. Studies on intercellular LETS glycoprotein matrices. *Cell*. 1978;14(2):377–91.
 44. *Hosokawa T, Betsuyaku T, Nishimura M, Furuyama A, Katagiri K, Mochitate K*. Differentiation of tracheal basal cells to ciliated cells and tissue reconstruction on the synthesized basement membrane substratum in vitro. *Connect Tissue Res*. 2007;48(1):9–18.
 45. *Takashi H, Katsumi M, Toshihiro A*. Hepatocytes maintain their function on basement membrane formed by epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(1):151–6.
 46. *Pham MT, Reuther H, Maitz MF*. Native extracellular matrix coating on Ti surfaces. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66(2):310–6.
 47. *Sellaro TL, Ravindra AK, Stolz DB, Badyrak SF*. Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng*. 2007;13(9):2301–10.
 48. *Guler S, Aslan B, Hosseinian P, Aydin HM*. Supercritical Carbon Dioxide (sc-CO₂) Assisted Decellularization of Aorta and Cornea. *Tissue engineering. Part C, Methods*. 2017;23(9):540–7.
 49. *Gupta SK, Mishra NC, Dhasmana A*. Decellularization Methods for Scaffold Fabrication. *Methods Mol Biol*. 2018;1577:1–10.
 50. *Price AP, England KA, Matson AM, Blazar BR, Panoskaltsis-Mortari A*. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded. *Tissue engineering. Part A*. 2010;16(8):2581–91.
 51. *Liu CX, Liu SR, Xu AB, Kang YZ, Zheng SB, Li H*. Preparation of whole-kidney acellular matrix in rats by perfusion. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009;29(5):979–82.
 52. *Bonvillain RW, Scarritt ME, Pashos NC, Mayeux JP, Meshberger CL, Betancourt AM et al*. Nonhuman primate lung decellularization and recellularization using a specialized large-organ bioreactor. *J Vis Exp*. 2013;(82):e50825.
 53. *Shupe T, Williams M, Brown A, Willenberg B, Petersen BE*. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis*. 2010;6(2):134–6.
 54. *Struecker B, Butter A, Hillebrandt K, Polenz D, Reutzel-Selke A, Tang P et al*. Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(2):531–41.
 55. *Farris AL, Rindone AN, Grayson WL*. Oxygen delivering biomaterials for tissue engineering. *J Mater Chem B*. 2016;4(20):3422–32.
 56. *Le Pape F, Bossard M, Dutheil D, Rousselot M, Polard V, Ferrer C et al*. Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2015;43(3):186–95.
 57. *Le Pape F, Richard G, Porchet E, Sourice S, Dubrana F, Ferrer C et al*. Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human MSCs cultured under perfusion with a marine oxygen carrier on an allogenic bone substitute. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(1):95–107.
 58. *Poltavtseva RA, Poltavsev AV, Lutsenko GV, Svirshchevskaya EV*. Myths, reality and future of mesenchymal stem cell therapy. *Cell Tissue Res*. 2019;375(3):563–74.

Информация об авторах

Александр Юрьевич Пульвер – генеральный директор, заведующий лабораторией Института биологии старения

Борис Ефимович Лейбович – заведующий отделением, врач-патологоанатом Дорожной клинической больницы на станции Воронеж-1 РЖД; патологоанатом, гистолог, Институт биологии старения

Римма Алексеевна Полтавцева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова

Артем Николаевич Шевцов – старший научный сотрудник, Института биологии старения

Наталья Александровна Пульвер – ассистент, Институт биологии старения

Author information

Alexander Yu. Pulver – General Director, Head of the Laboratory, Institute of Biology of Aging

<https://orcid.org/0000-0001-6673-1859>.

Boris Ye. Leibovich – Head of the pathology department, pathologist, Non-state health care facility «Road Clinical Hospital at the station Voronezh-1 of Russian Railways» pathologist, Institute of Biology of Aging

<https://orcid.org/0000-0003-2259-7656>.

Rimma A. Poltavtseva – Cand. Sci. (Biol.) Senior Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, NMRC OGP named after V.I. Kulakov.

<https://orcid.org/0000-0001-8625-9205>.

Artyom N. Shevtsov – Senior Researcher, Institute of Biology of Aging

<https://orcid.org/0000-0001-8641-2847>

Natalya A. Pulver – Assistant, Institute of Biology of Aging

<https://orcid.org/0000-0003-4549-5476>.

Уменьшение количества вирусэкспрессирующих клеток в плаценте после лечения рекомбинантным интерфероном альфа 2в хронической микст-вирусной инфекции у беременных женщин

А.П. Милованов¹, А.Н. Шувалов², Т.В. Фокина¹, В.А. Мхитаров¹

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

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. В последние годы большое внимание уделяется микст-вирусным инфекциям как этиологическим причинам спонтанных выкидышей, неразвивающейся беременности, преждевременных родов и других акушерских осложнений. Остается много неясных вопросов о путях инфицирования матерей, проницаемости плацентарного барьера, тропности отдельных вирусов в отношении плацентарных и материнских клеток. Ведутся интенсивные поиски новых лечебных подходов в лечении вирусных инфекций у беременных женщин. Наиболее перспективной становится интерферонотерапия с помощью эндогенных интерферонов второго поколения: рекомбинантных интерферонов типа I – IFN- α , IFN- β . Цель исследования – оценка эффективности лечения интерфероном альфа 2в беременных женщин с ранее подтвержденной микст-вирусной инфекцией в цервико-вагинальных смывах (ПЦР анализ) с помощью иммуногистохимической визуализации вирусов в клетках плаценты и базальной оболочки.

Материалы и методы. Обследованы две группы по 30 женщин, у которых до беременности в смывах методом ПЦР обнаружены папилломавирус человека (HPV), цитомегаловирус (CMV) и вирус простого герпеса типа 2 (HSV2). Первая группа, кроме витаминов, не использовала другого лечения. Вторая, аналогичная группа женщин получала три цикла интерферона альфа 2в свечах по 500 000 МЕ 2 раза в сутки в течение 10 дней начиная с 14-й недели беременности, далее на 22–24-й и 32–34-й неделях. Родившиеся в срок плаценты изучены морфологическим методом с выявлением и подсчетом лимфолейкоцитарных очагов и иммуногистохимическим анализом в них вирусэкспрессирующих клеток. Проведен статистический анализ полученных данных с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. В плацентах второй группы беременных существенно уменьшилось количество воспалительных очагов (с 48,2 до 30,3%). Антивирусный эффект достоверно зафиксирован в клетках материнской крови между ворсин плацент, децидуальных клетках эндометрия, а также в инвазивных клетках цитотрофобласта. Синцитиотрофобласт ворсин подтвердил высокую устойчивость к CMV, а также особую уязвимость его к HPV и HSV2.

Заключение. Впервые получены морфологические доказательства положительного противовирусного действия этого интерферона на материнские клетки у беременных женщин с хронической микст-вирусной инфекцией.

Ключевые слова: микст-вирусная инфекция, HPV, CMV, HSV2, терапия, интерферон альфа 2в, иммуногистохимия, плацента

Для корреспонденции: Андрей Петрович Милованов. E-mail a_p_milovanov@mail.ru

Для цитирования: А.П. Милованов, А.Н. Шувалов, Т.В. Фокина, В.А. Мхитаров. Уменьшение количества вирусэкспрессирующих клеток в плацентах после лечения рекомбинантным интерфероном альфа 2в хронической микст-вирусной инфекции у беременных женщин. Клини. экп. морфология. 2019;8(3):28-34. DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.28-34

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 03.07.2019. Получена после рецензирования 29.08.2019. Принята в печать 18.09.2019.

Decrease in the number of virus-expressing cells in placentas of pregnant women with chronic mixed-viral infection after interferon alfa 2b treatment

A.P. Milovanov¹, A.N. Shuvalov², T.V. Fokina¹, V.A. Mkhitarov¹

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² N.F. Hamalei National Research Center of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

Introduction. In recent years, much attention is given to mixed viral infections as the etiological factors causing spontaneous miscarriages, missed miscarriage, preterm births and other obstetric complications. Many questions about the route of infection in women, the placental porosity, the tropism of individual viruses to placental and maternal cells remain unclear. New therapy approaches are being developed for the viral infections' treatment in pregnant women. Interferon therapy with endogenous second-generation interferons (recombinant type I interferons: IFN- α , IFN- β) is the most promising management tactics. The aim of the study was to evaluate the efficacy of interferon alfa-2 treatment in pregnant women with previously confirmed mixed viral infection in cervico-vaginal lavages (PCR analysis) by means of immunohistochemical imaging of viruses in the placenta cells and decidual membrane.

Materials and methods. Two groups of 30 women each were included in this research. Human papillomavirus (HPV), cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus-2 (HSV2) were detected in PCR lavages before pregnancy in each patient. The first group was treated with nothing but vitamins. The second group underwent three courses of 500000 IU alfa 2b interferon suppositories treatment, twice a day for 10 days starting at 14 week and then during 22-24 weeks and 32-34 weeks of pregnancy. The morphological evaluation of full-term placentas was carried out, lymphocyte and leukocyte infiltration foci were identified and counted, immunohistochemical analysis of virus-expressing cells in them was performed. Statistical analysis of the data was conducted using the Mann-Whitney U-test.

Results. The second group showed a substantial decrease in number of inflammatory sites (from 48,2% to 30,3%). The antiviral effect was observed in maternal blood between placental villi, in endometrium decidual cells, and in cytotrophoblastic invasive cells. Villi syncytiotrophoblast proved to be highly resistant to CMV, but quite vulnerable to HPV and HSV2.

Conclusion. A novel morphological data was obtained demonstrating the positive antiviral effect of the alfa 2b interferon on maternal cells in pregnant women with chronic mixed viral infection.

Key words: mixed virus infection, HPV, CMV, HSV2, treatment, interferon alfa 2b, immunohistochemistry, placenta

Corresponding author: Andrey P. Milovanov, a_p_milovanov@mail.ru

For citation: A.P. Milovanov, A.N. Shuvalov, T.V. Fokina, V.A. Mkhitarov. Decrease in the number of virus-expressing cells in placentas of preagnant women with chronic mixed-virus infection after treatment with interferon alfa 2b. Clin. exp. morphology. 2019;8(3):29-35. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.28-34

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 03.07.2019. Received in revised forms 29.08.2019. Accepted 18.09.2019.

Введение

В последние годы большое внимание уделяется микст-вирусным инфекциям как этиологическим причинам спонтанных выкидышей, неразвивающейся беременности, преждевременных родов и других акушерских осложнений. С помощью ПЦР анализа цервико-влагалищных смывов у женщин чаще определялись вирус простого герпеса типа 2 (HSV2), цитомегаловирус (CMV) и папилломавирус человека (HPV) либо их ассоциации. В этом разделе акушерства остается много неясных вопросов о путях инфицирования матерей, проницаемости плацентарного барьера, тропности отдельных вирусов в отношении плацентарных и материнских клеток. Тем не менее прямых иммуногистохимических исследований плацент мало; они касались поражений отдельными вирусами в различных по степени инфицирования группах беременных женщин.

Так, по данным T.L. Scatter et al. [1], среди женщин Новой Зеландии с родами в срок иммуногистохимическим методом диагностировано наличие HPV в эпителии эндометриальных желез, децидуальных клетках, синцитиотрофобласте и стромальных клетках ворсин плацент. Было подчеркнуто сопряжение пораженных клеток HPV с очагами лимфомакрофагальной инфильт-

рации эндометрия. В другой работе флуоресцентная иммуногистохимия подтвердила наличие HPV в синцитиотрофобласте ворсин при ранних выкидышах и доношенных родах у женщин Дании [2]. По мнению M. Uenaka et al. [3], в 35 плацентах женщин Японии, у которых родились дети с признаками CMV-инфекции, в 86% случаев этот вирус обнаружен в фибробластах и эндотелиоцитах сосудов ворсин. Структурные особенности уязвимости плацентарного барьера для HSV и CMV и других патогенов представлены в специальном обзоре D.P. Robbins et al. [4].

Согласно современным запросам здравоохранения, ведутся интенсивные поиски новых подходов в лечении вирусных инфекций у беременных женщин. Наиболее перспективной становится интерферонотерапия с помощью эндогенных интерферонов второго поколения: рекомбинантные интерфероны I типа (IFN α , IFN β), в том числе отечественный аналог – интерферон альфа 2в (IFN α 2в); он разрешен Минздравом России для применения с 14-й недели беременности. Появились первые отечественные работы, посвященные лечению IFN α у беременных женщин при субклинических формах HPV-инфекций [5] и плацентарной недостаточности [6]. Продолжением этих

клинических исследований стала морфометрическая работа, основанная на количественной оценке основных компонентов плацент после аналогичной цикловой терапии интерфероном альфа 2в беременных женщин с хронической НРV-инфекцией [7]. Интерферонотерапия привела к достоверному уменьшению воспалительных очагов, межворсинчатых кровоизлияний, незрелых ворсин и признаков плацентарной недостаточности за счет активизации компенсаторных реакций плацент.

Настоящее исследование основано на упомянутом выше материале плацент с акцентом на иммуногистохимическом выявлении вирусов при учете следующих предпосылок:

1) предварительный просмотр микропрепаратов плацент для отбора тех из них, в которых видны очаги воспаления с иммуновизуализацией вирусов;

2) выявление тропизма вирусного поражения основных материнских и плацентарных клеток.

Цель исследования – оценить эффективность лечения интерфероном альфа 2в у беременных женщин с ранее подтвержденной микст-вирусной инфекцией в цервико-вагинальных смывах (ПЦР анализ) с помощью иммуногистохимической визуализации вирусов в клетках плаценты и базальной оболочки.

Материалы и методы

После получения информированного письменного согласия пациенток в роддомах Московской области собраны плаценты двух групп беременных женщин. Первая группа (30 пациенток, средний возраст 26,5 года) соматически здоровые женщины. До беременности в цервико-влагалищных смывах при диагностике ПЦР у них выявлено носительство НРV (100%), преимущественно типов 16, 6, а также CMV – 76,6% и HSV2 – 46,6%. У трети женщин диагностированы внешние проявления НРV хронической инфекции (кондиломы – 26,6%, дисплазии шейки матки – 33,3%). Кроме витаминов женщины во время беременности не получали другого лечения. У всех пациенток были первые или вторые самостоятельные роды на 38–40-й неделях.

Вторая группа (30 пациенток) соответствовала первой по возрасту, паритету родов, доношенному сроку и отсутствию соматической патологии. До настоящей беременности у них в цервико-влагалищных смывах в 100% случаев выявлен НРV, а также CMV (40%) и HSV2 (33,3%). У женщин диагностированы наружный папилломатоз (23,3%) и дисплазии шейки матки (45,2%). Эти пациентки получали рекомбинантный интерферон альфа 2в + токоферол ацетат и аскорбиновую кислоту (ВИФЕРОН®) в свечах по 500 000 МЕ 2 раза в сутки в течение 10 дней начиная с 14-й недели, далее на 22–24-й неделе и на 32–34-й неделе (всего три цикла).

Сразу после самостоятельных родов из плацент вырезали полоску ткани шириной 2–3 см через всю толщу

и доставляли ее в НИИ морфологии человека, где забирала 5–7 кусочков из хориальной и базальной пластин. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, проводили по стандартной схеме, срезы окрашивали гематоксилином и эозином. После просмотра микропрепаратов в микроскопе Leica 2500 (Германия) отбирали срезы с очагами воспаления и использовали их для иммуногистохимического исследования со следующими антителами: 1) моноклональные мышинные антитела против НРV (типы 6, 11 и 18, клон 4с4, Novocastra, Германия); 2) моноклональные мышинные антитела против CMV (клон QB1/42, Novocastra, Германия); 3) поликлональные кроличьи антитела против HSV2 (клон 123, Cell Marque, США). Для демаскировки антигенов срезы помещали в микроволновую печь на 20 минут. Использована единая система детекции Novolink TM Polymer (Германия) с докраской срезов гематоксилином Майера. Иммуновизуализация вирусов осуществлялась в отобранных срезах плаценты с очагами воспаления, которые учитывали отдельно. В них определяли процент выявляемости вирусов в целом и по видам клеток плацент и базальных пластинок. Статистическую обработку данных проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. В качестве положительного контроля использованы три случая оперативно удаленных кондилом промежности (в первой группе один, во второй два).

Результаты

Первоначально получено подтверждение специфичности иммуногистохимической реакции с использованием положительного контроля – выявления НРV в оперативно удаленной кондиломе (рис. 1 А). При $\times 1000$ реакция антиген–антитело визуализирована в виде мелкоточечных коричневых включений в ядрах и цитоплазме клеток ростковой зоны эпидермиса кожи (поражение НРV).

В первой группе, нелеченных беременных женщин, носительниц микст-вирусной инфекции, в плацентах обнаружены разного объема лимфолейкоцитарные очаги в составе базальной пластины и межворсинчатом пространстве. По клеточному составу в них преобладали лимфоциты, макрофаги, отдельные плазматические клетки и сегментоядерные лейкоциты, то есть была картина хронического эндометрита (рис. 1 Б).

Из 120 проанализированных микропрепаратов подобные очаги выявлены в 58 (суммарно 48,2%), в основном в базальной оболочке и межворсинчатом пространстве. Важным разделом работы стало определение тропности конкретных вирусов в отношении плацентарных, инвазивных и материнских клеток в процентах к общему количеству вирусэкспрессирующих клеток (табл. 1).

Следовательно, в первой группе женщин наиболее часто определяются НРV-инфицированные инвазивные клетки, в частности интерстициальный цитотрофобласт, проникающий среди материнских клеток

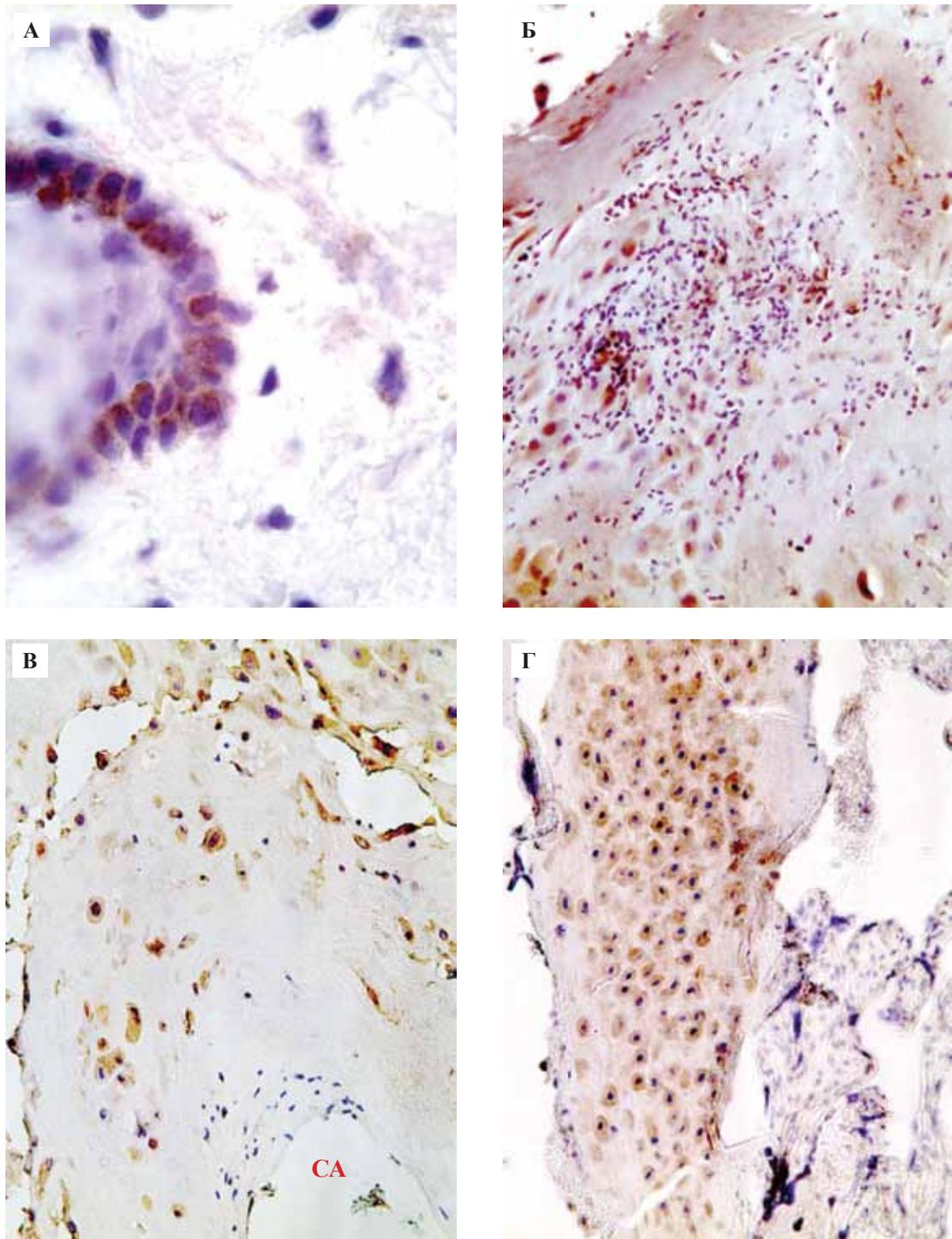


Рис. 1. Иммуногистохимическое выявление вирусов в нелеченой группе женщин.

- А – коричневые частички в цитоплазме и ядре (HPV) ростковых клеток эпидермиса в составе папилломы, $\times 1000$,
 Б – вирусэкспрессирующие клетки (HPV) в составе лимфолейкоцитарного очага базального эндометрия, $\times 200$,
 В – вирусэкспрессирующий цитотрофобласт (HSV2) в стенке преформированной спиральной артерии (СА), $\times 200$,
 Г – вирусэкспрессирующие децидуальные клетки (CMV) в базальном эндометрии, $\times 200$

Fig. 1. Immunohistochemical detection viruses in group of women without treatment.

- А – brown points in cytoplasm and nucleus (HPV) of growing cells of epidermis at papilloma, $\times 1000$,
 Б – virus-expressing (HPV) cells in party lympholeucocytated place of endometrium basalis, $\times 200$,
 В – virus-expressing (HSV2) cytotrophoblast in wall spiralis arteria (CA), $\times 200$,
 Г – virus-expressing (CMV) decidual cells in basalis endometrium, $\times 200$

Таблица 1 / Table 1

Тропность HPV к разным клеткам (%)
HPV tropism to different cells (%)

Вид клеток	Первая группа	Вторая группа
Интерстициальный цитотрофобласт	19,55 (8,8–20,1)	17,92 (17,3–18,2)*
Материнские клетки среди ворсин	5,42	0
Децидуальные клетки	13,35	0
Синцитиотрофобласт ворсин	13,3	0
Всего	38,83	17,92

*p<0,05

в сторону спиральных артерий эндометрия, поражая их стенки. На втором месте по частоте выявления были децидуальные клетки и клетки материнской крови в межворсинчатом пространстве плаценты. Столь же поражаемым оказался синцитиотрофобласт – важный компонент плацентарного барьера.

Другой вирус – HSV2 – в очагах воспаления выявлялся почти в 2 раза чаще, чем HPV, при изменении тропности поражаемых клеток (табл. 2).

При сохранении примерно такого же процента HSV2-пораженных инвазивных клеток, в том числе в стенках преформированных спиральных артерий (рис. 1 В), стало больше материнских элементов крови среди ворсин плаценты, децидуальных клеток и, главное, синцитиотрофобласта ворсин, что наглядно свидетельствовало о высокой проницаемости этого вируса через плацентарный барьер.

CMV занимал промежуточную позицию по степени поражения плацентарных и материнских клеток (табл. 3).

В отношении тропности CMV отмечена аналогичная поражаемость инвазивных клеток, синцитиотро-

фобласта ворсин, как при других инфекциях, с явным сохранением подобного показателя для децидуальных клеток (рис. 1 Г).

Следовательно, в нелеченой группе женщин иммуногистохимическое исследование выявило значительную инфицированность инвазивных клеток для всех исследованных вирусов, существенную для материнских клеток и разную для синцитиотрофобласта ворсин. Уязвимость плацентарного барьера выявлена при HPV- и HSV2-инфекции и отсутствии таковой для CMV.

Во второй группе женщин, которым проведено три цикла лечения интерфероном альфа 2в во время беременности, в доношенных плацентах сохранились небольшие очаги лимфоцитов и макрофагов. Из 112 микропрепаратов они обнаружены только в 34 (30,3%), преимущественно в базальной оболочке. Изучение тропности определяемых вирусов (табл. 1–3) показало отсутствие HPV в материнских клетках крови, децидуальных клетках и синцитиотрофобласте ворсин, поражения HSV2 материнских клеток крови, а также инфицированности CMV материнских клеток крови и синцитиотрофобласта ворсин. Другие клетки и интерстициальный цитотрофобласт подтвердили достоверное снижение их зараженности остальными типами вирусов. Главными объектами антивирусного действия интерферона альфа 2в стали материнские клетки крови и децидуальные клетки эндометрия (табл. 1–3). Особая вирусзависимая реакция обнаружена в синцитиотрофобласте ворсин – внешнем клеточном компоненте плацентарного барьера, контактирующем с инфицированной материнской кровью. Барьер оказался проницаемым для HPV, HSV с хорошим лечебным эффектом и непродоходимым для CMV.

Итак, во второй группе беременных женщин с подтвержденной микст-вирусной инфекцией цикловое лечение этим интерфероном зафиксировало его положительный эффект в отношении всех материнских вирусологических клеток и достоверное уменьшение

Таблица 2 / Table 2

Тропность HSV2 к разным клеткам (%)
HSV2 tropism to different cells (%)

Вид клеток	Первая группа	Вторая группа
Интерстициальный цитотрофобласт	20,35 (16,6–21,1)	22,85 (21,8–23,5)**
Материнские клетки среди ворсин	16,25	0
Децидуальные клетки	19,02 (18,6–20,7)	16,20 (12,4–17,1)**
Синцитиотрофобласт ворсин	16,90 (16,5–19,2)	12,21 (10,5–14,6)**
Всего	89,62	51,26

** p<0,001

Таблица 3 / Table 3

Тропность CMV к разным клеткам (%)
CMV tropism to different cells (%)

Вид клеток	Первая группа	Вторая группа
Интерстициальный цитотрофобласт	21,35 (20,2–21,9)	9,55 (8,9–10,5)**
Материнские клетки среди ворсин	5,46	0
Децидуальные клетки	12,72 (13,2–14,3)	9,86 (8,2–13,0)**
Синцитиотрофобласт ворсин	0	0
Всего	39,59	19,41

** p<0,001

количества инфицированного интерстициального цитотрофобласта. Особого внимания заслуживали факт высокой поражаемости плацентарного барьера для HSV2 в первой группе женщин и достоверное уменьшение количества инфицированного синцитиотрофобласта во второй группе.

Обсуждение

Ухудшение репродуктивного здоровья женщин России связано с ростом частоты вирусного поражения. Вирусоносительство или хроническая микст-вирусная инфекция представляют серьезную угрозу для беременных. Распространяясь гематогенным путем, микст-вирусы попадали в плаценту, которая служила основным барьером для их проникновения к эмбриону или плоду. Проницаемость плацентарного барьера определялась степенью его зрелости в зависимости от срока беременности [7]. Например, HPV легко проходил несовершенный барьер в I триместре, вызывая от 16 до 60% выкидышей с преобладающим вирусным поражением синцитиотрофобласта ворсин. Во II триместре вирусы обуславливали разрывы плодных оболочек и преждевременные роды. В III триместре плацентарный барьер оказался более устойчивым к вирусному повреждению.

Наши данные по иммуногистохимической визуализации HPV близки аналогичным материалам T.L. Sletter et al. [1]. В отношении других вирусов подтвердилась большая частота поражения интерстициального цитотрофобласта в сравнении с относительной устойчивостью синцитиотрофобласта ворсин доношенной плаценты [4]. Важными для акушерства явились исследования, в которых предпринимались попытки интерферонотерапии вирусных инфекций у беременных женщин. Наиболее перспективными в этом плане оказались рекомбинантные интерфероны I типа, в частности интерферон альфа 2в, который подтвердил свою пользу при субклинических формах HPV [5] и плацентарной недостаточности [6, 7]. В связи с этим определяющей стал вопрос, насколько эффективно цикловое лечение данным интерфероном беременных женщин с подтвержденным носительством микст-вирусной инфекции. При ответе на него следует учитывать следующие доказанные факты.

1. В леченой группе беременных женщин в децидуальной оболочке уменьшилось количество очагов воспаления, в них исчезли вирусопораженные клетки материнского происхождения (клетки крови в межворсинчатом пространстве, децидуальные клетки). Цикловое применение интерферона в свечах поддерживало постоянную высокую концентрацию интерферона в организме беременных женщин.

2. Синцитиотрофобласт ворсин как важнейший компонент плацентарного барьера подтвердил высокую поражаемость для HPV и HSV2 и отсутствие таковой для CMV при достоверном лечебном эффекте интерферонотерапии.

Заключение

При констатации у женщин до беременности микст-вирусной инфекции в цервико-вагинальных смывах цикловое лечение рекомбинантным интерфероном альфа 2в начиная с 14-й недели гестации подтвердило его противовирусный эффект даже при наличии у женщин ассоциации вирусов. На клеточном уровне организации плаценты и базальной пластины получена морфологическая доказательная база эффективности цикловой интерферонотерапии при хронической микст-вирусной инфекции у беременных женщин.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.П. Милованов, А.Н. Шувалов, Т.В. Фокина.

Сбор и обработка материала – Т.В. Фокина, А.П. Милованов, В.А. Мхитаров

Написание текста – А.П. Милованов.

Редактирование – А.П. Милованов, Т.В. Фокина, А.Н. Шувалов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment: A.P. Milovanov, A.N. Shuvalov, T.V. Fokina.

Collected the data and performed the analysis: T.V. Fokina,

A.P. Milovanov, V.A. Mkhitarov.

Wrote the paper: A.P. Milovanov.

Edited the manuscript: A.P. Milovanov, T.V. Fokina, A.N. Shuvalov.

Литература/References

- Slatter TL, Hung NG, Clow WM, Royds JA, Devenish CJ, Hung NA. A clinicopathological study of episomal papillomavirus infection of the human placentas and pregnancy complications. *Mod. Pathol.* 2015;28:1369–82.
- Ambuhl LMM, Villadsen AB, Baandrup U, Dybkaer K, Sørensen S. HPV16 E6 and E7 upregulate interferon-induced Antiviral Response Genes ISG15 in Human Trophoblast Cells. *Pathogens.* 2017;6(3). Pii: E40.
- Uenaka M, Morizane M, Tanimura K, Deguchi M, Kanzawa M, Itoh T. Histopathological analysis of placentas with congenital cytomegalovirus infection. *Placenta.* 2019;75:62–7.
- Robbins JR, Bakardiyeva AI. Pathogens and the Placental Fortress. *Curr. Opin Microbiol.* 2012;15(1):36–43.
- Зароченцева Н.В., Метелева Е.А., Торшина З.В. Вирус папилломы человека и беременность. *Вестник Ферона.* 2013;1:17–20. Zarochentseva NV, Meteleva EA, Torshina ZV. Virus papillomy`cheloveka i beremennost`. *Vestnik Ferona.* 2013;1:17–20 (In Russ.).
- Логутова Л.С., Малиновская В.В., Новикова С.В., Агажданова Е.А., Инванчук Л.И., Черныавская Л.В. Место интерферонкорректирующей терапии в лечении плацентарной недостаточности. *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2011;3:81–83. Logutova LS, Malinovskaya VV, Novikova SV, Agazhdanova EA, Invanchuk LI, Chernyavskaya LV. Place of interferon-modulatory therapy in the management of placental insufficiency. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa.* 2011;3:81–83 (In Russ.).
- Милованов А.П., Малиновская В.В., Выжлова Е.Н., Зароченцева Н.В., Кешьян Л.В., Фокина Т.В., Микаэлян А.В.

Противовоспалительный эффект препарата Виферон® при хронической папилломавирусной инфекции беременных женщин по данным морфометрии плацент. Клиническая и экспериментальная морфология. 2017;2:28–33. *Milovanov AP, Malinovskaya VV, Vyzhlova EN, Zaro-*

chentseva NV, Keshyan LV, Fokina TV, Mikaelyan AV. Anti-inflammatory effect of domestic medicinal preparation Viferon in chronic papillomavirus infection of pregnant women according morphometry of placenta. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya morfologiya.* 2017;2:28–33 (In Russ.).

Информация об авторах

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

Александр Николаевич Шувалов – кандидат медицинских наук, научный сотрудник Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи.

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

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

Author information

Andrey P. Milovanov – Dr. Sci. (Med.), Head Researcher Reproduction Pathology Laboratory, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0001-8804-0258>

Alexandr N. Shuvalov – Cand. Sci. (Med.), Researcher of National Medical Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Academician N.F. Gamalei of Ministry Healthcare of Russian Federation.

Tatyana V. Fokina – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher Reproduction Pathology Laboratory, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-2467-7660>

Vladimir A. Mkhitarov – Cand. Sci. (Biol.), Head of the group of informatics and morphometry of the Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-4427-1991>

Клинико-морфологическая характеристика югулотимпанальных параганглиом

Х.М. Диаб^{1,2}, В.П. Быкова¹, Х.Ш. Давудов¹, П.У. Умаров¹, А.А. Бахтин¹, Д.А. Загорская¹, С.Г. Рычкова¹

¹ ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Яремно-барабанная параганглиома – достаточно редкая опухоль, которая возникает из клеток нехромаффинных параганглиев, называемых также гломусными тельцами. Параганглиомы могут быть обнаружены в различных органах и тканях, чаще всего это доброкачественные опухоли. Тем не менее, по данным литературы, даже через несколько лет после удачно проведенной операции в редких случаях может наблюдаться метастазирование. Практически все параганглиомы среднего уха или височной кости относятся к югулотимпанальным. Для верификации новообразований соответственно определенному гистологическому типу строения опухолей необходим сравнительный анализ данных морфологического исследования хирургических находок в сопоставлении с результатами лучевой диагностики. Цели исследования – определить клинико-морфологическую характеристику югулотимпанальных параганглиом, сравнить полученные результаты с данными лучевой диагностики и хирургическими находками.

Материал и методы. За период с февраля 2015 по декабрь 2017 года на базе Научно-клинического центра оториноларингологии обследованы и прооперированы 33 пациента с параганглиомами височной кости (пятеро мужчин и 28 женщин) в возрасте от 33 до 82 лет (средний возраст – 62 года). Всем пациентам хирургически удалена параганглиома, в ходе операции выполнен забор материала для гистологического исследования. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 12 часов с последующим изготовлением парафиновых блоков и срезов. Срезы окрашивали по стандартному протоколу гематоксилином и эозином.

Результаты. По данным лучевых методов исследования в зависимости от распространенности опухолевого процесса пациенты были разделены на три клинические группы по классификации U. Fisch. Параганглиома типа А была выявлена у шести пациентов, которые составили группу I. В группу II вошел 21 пациент с опухолями типа В. Группу III составили шесть пациентов, у которых была диагностирована параганглиома типа С. Морфологическое исследование операционного материала пациентов разных клинических групп в зависимости от количества и расположения гломусных клеток, сосудов, нервных стволиков и фиброзных прослоек позволило разделить опухоли на следующие морфологические типы: альвеолярный, аденомоподобный, ангиомоподобный, компактный и смешанный.

Выводы. В зависимости от места локализации и степени распространения процесса каждому клиническому типу новообразований соответствовал определенный гистологический тип строения опухолей: для опухолей типа А (18,2%), ограниченных промонториумом, характерен аденомоподобный или компактный тип строения опухоли, для опухолей типа В (63,6%), характерны аденомоподобный, ангиомоподобный и смешанный тип, а у пациентов с опухолью типа С (18,2%) преобладал смешанный тип.

Ключевые слова: параганглиомы височной кости, хирургическое лечение, клинико-морфологическая характеристика

Для корреспонденции: Загорская Дарья Алексеевна. E-mail: leunina.d@yandex.ru

Для цитирования: Х.М. Диаб, В.П. Быкова, Х.Ш. Давудов, П.У. Умаров, А.А. Бахтин, Д.А. Загорская, С.Г. Рычкова. Клинико-морфологическая характеристика югулотимпанальных параганглиом. Клини. эксп. морфология. 2019;8(3):35-40. DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.35-40

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Статья поступила 01.04.2019. Получена после рецензирования 07.05.2019. Принята в печать 04.06.2019.

Clinical and morphological characteristics of jugulotympanic paragangliomas

Kh.M. Diab^{1,2}, V.P. Bykova¹, H.Sh. Davudov¹, P.U. Umarov¹, A.A. Bakhtin¹, D.A. Zagorskaya¹, S.G. Richkova¹

¹ Federal Research Clinical Center of Otorhinolaryngology of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

² Department of Otorhinolaryngology, Faculty of Postgraduate education, Pirogov Russian National Reserch Medical University, Moscow, Russia

Introduction. The jugulotympanic paraganglioma is a rather rare tumor that arises from nonchromaffin paraganglia cells, also known as glomus bodies. Paragangliomas can be found in various organs and tissues, in most cases these are benign lesions. Nevertheless, according to the literature, metastasis rarely occur even a several years after a successful surgical treatment. In the middle ear or temporal bone almost all paragangliomas are jugulotympanic. Comparative analysis of the morphological data of surgical specimens and its correlation to the radiology findings is necessary for verification of a certain histological type of tumor.

The aim of the study was to determine the clinical and morphological features of jugulotympanic paragangliomas and to compare the results with radiology and surgical findings.

Materials and methods. 33 patients with temporal paragangliomas (five men and 28 women) aged 33 to 82 years (mean age 62 years) were examined and underwent surgical removal of the tumor in the Research Clinical Center of Otorhinolaryngology from February 2015 to December 2017. Specimens for histological examination were taken during the surgery. The samples were fixed in 10% buffered formalin for 12 hours, followed by the routine manufacture of paraffin blocks and microscopical slides. The slides were stained by hematoxylin and eosin according to the standard protocol.

Results. The patients were divided into three clinical groups based on the Fisch classification according to the radiological data and tumor extent. Group I consisted of six patients who had type A paraganglioma, group II included 21 patients with type B tumors and group III consisted of 6 patients who were diagnosed with type C paraganglioma. The jugulotympanic paragangliomas were divided into the following morphological types: alveolar, adenoma-like, angioma-like, compact and mixed based on the pathological examination of the surgical specimens from patients of different clinical groups, depending on the number and location of glomus cells, blood vessels, nerve trunks and fibrous septa in the tumors.

Conclusions. Depending on the location and extent of the neoplasm, each clinical type of paraganglioma correlated with a certain histological type. In type A tumors (18.2%) in which the tumor is limited to the promontorium adenoma-like or compact type were observed; for type B tumors (63.6 %) the adenoma-like, angioma-like and mixed type were typical, and the mixed type was predominant in patients with type C tumor (18.2%).

Key words: temporal bone paraganglioma, surgical treatment, clinical and morphological characteristics

Corresponding author: Daria A. Zagorskaya. E-mail: leunina.d@yandex.ru

For citation: Kh.M. Diab, V.P. Bikova, H.Sh. Davudov, P.U. Umarov, A.A. Bakhtin, D.A. Zagorskaya, S.G. Richkova. Clinical and morphological characteristics of jugulotympanic paragangliomas. Clin. exp. morphology. 2019;8(3):35-40. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.35-40

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 01.04.2019. Received in revised forms 07.05.2019. Accepted 04.06.2019.

Яремно-барабанная параганглиома – достаточно редкая опухоль, которая возникает из клеток нехром-аффинных параганглиев, называемых также гломусными тельцами. При описании этих новообразований используются такие синонимы как гломусная опухоль, опухоль яремного и барабанного гломусов, хемодекто-ма, рецептома, нехромаффинная параганглиома и т.д. Параганглиомы могут быть обнаружены в различных органах и тканях, чаще всего это доброкачественные опухоли. Тем не менее, по данным литературы, даже через несколько лет после удачно проведенной операции в редких случаях может наблюдаться метастазирование. Опухоли, склонные к малигнизации, характеризуются медленным ростом, тенденцией к инвазии в костные структуры и твердую мозговую оболочку, обильной васкуляризацией, частым рецидивированием [1].

Параганглиома височной кости чаще встречается у пациентов от 40 до 50 лет, хотя может появиться в любом возрасте. По данным литературы, женщины страдают чаще, чем мужчины [2, 3].

При микроскопическом исследовании отмечается органоидность представленной опухоли: гломусные клетки формируют гнезда, тяжи, данные структуры,

как правило, располагаются периваскулярно, однако в большинстве случаев может наблюдаться явный инфилтративный рост вдоль сосудистых щелей, фиброзных прослоек. В опухоли условно можно выделить стромальный и паренхиматозный компоненты. Стромальный компонент представлен соединительнотканной стромой, развитой в разной степени, фиброзными прослойками, сосудами и нервными стволиками. Паренхиматозный компонент состоит из двух видов клеток: светлых крупных (главных) и темных, эозинофильных, компактных, несколько меньших размеров (поддерживающих). При электронной микроскопии в них обнаруживаются электронноплотные гранулы, содержащие в себе моноамины (катехоламины, гломинсеротонин, допамин), что подтверждает нейроэндокринную природу образования [4].

В зависимости от соотношения паренхиматозного и стромального компонентов выделяют пять типов гломусной опухоли: альвеолярный, аденомоподобный, ангиомоподобный, компактный и смешанный. При альвеолярном типе отмечается альвеолярно-трабекулярная компоновка опухоли, группы гломусных клеток ограничены тонкими соединительнотканными септами

и тесно прилегают к синусоидным сосудам. Альвеолярный тип в основном состоит из крупных светлых полигональных, образующих симпласт клеток. При аденоподобном варианте клетки формируют структуры, напоминающие железистую ткань, за счет однослойного расположения клеток на соединительнотканном матриксе с формированием альвеолярноподобных структур. Аденоподобный тип по своему строению морфологически напоминает карциноид (рис. 1 Д), ведущим компонентом в опухоли является сосудистый. Отмечаются множество сосудов, в основном тонкостенных, синусоидного типа, и небольшое количество периваскулярно расположенных гломусных клеток. Ангиомоподобный тип следует дифференцировать от сосудистых опухолей, где гломусные клетки могут имитировать перичитарный компонент. Компактный тип характеризуется стертой органоидности, плотным расположением гломусных клеток, преобладанием более мелких темных клеток над светлыми и полигональными. Смешанный тип характеризуется наличием участков различного строения, свойственным указанным выше гистологическим типам. Несмотря на то, что хемодектома относится к группе доброкачественных новообразований, некоторые авторы выделяют также ее злокачественный вариант, обладающий потерей органоидности, наличием отчетливого инфильтративного роста, утратой клеточно-сосудистых комплексов, атипизмом и полиморфизмом паренхиматозного компонента [5–7].

Практически все параганглиомы среднего уха или височной кости относятся к югулотимпанальным. Наиболее часто анатомически параганглиомы берут свое распространение от луковицы яремной вены в полости среднего уха над улитковым мысом и по ходу нерва Якобсена (барабанная ветвь IX) или нерва Арнольда

(ушной ветви X). Около 85% югулотимпанальных параганглиом возникает из луковицы яремной вены, в области среднего уха – 12% и лишь 3% образуются в наружном слуховом проходе, вероятнее всего из параганглиев, связанных с нервом Арнольда [1]. Существует также клиническая классификация югулотимпанальных параганглиом, предложенная в 1988 году U. Fisch и переработанная в 2013-м M. Sanna, где ведущим критерием является распространенность опухоли (табл. 1).

Цели исследования – определить клинико-морфологическую характеристику югулотимпанальных параганглиом, сравнить полученные данные с данными лучевой диагностики и хирургическими находками.

Материалы и методы

За период с февраля 2015 по декабрь 2017 года на базе Научно-клинического центра оториноларингологии обследованы и прооперированы 33 пациента с параганглиомами височной кости (пятеро мужчин и 28 женщин) в возрасте от 33 до 82 лет (средний возраст составил 62 года). Всем пациентам хирургически удалена параганглиома, в ходе операции выполнен забор материала для гистологического исследования. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 12 часов с последующим изготовлением парафиновых блоков и срезов. Срезы окрашивали по стандартному протоколу прописи гематоксилином и эозином.

Результаты

По результатам лучевых методов исследований в зависимости от распространенности процесса пациенты были разделены на три клинические группы (табл. 2).

Таблица 1 / Table 1

Классификация параганглиом височной кости по U. Fisch (1988) в модификации M. Sanna (2013)
Classification of temporal bone paragangliomas according to U. Fisch (1988) as modified by M. Sanna (2013)

Тип А	Опухоль в пределах промонториума
Тип В	Опухоль распространяется в гипотимпанум, но не разрушает яремную ямку и не распространяется в инфралабиринтное пространство
В1	Опухоль частично разрушает нижнюю стенку барабанной полости, но не доходит до яремной луковицы
В2	Опухоль распространяется в сосцевидный отросток
Тип С	Опухоль с поражением инфралабиринтного пространства и распространением в верхушку пирамиды
С1	Опухоль распространяется вплоть до сонного отверстия, но не затрагивает сонную артерию
С2	Опухоль вовлекает вертикальную порцию сонного канала
С3	Опухоль вовлекает и вертикальную, и горизонтальную порции сонного канала, но не доходит до рваного отверстия
С4	Опухоль распространяется вплоть до кавернозного синуса
Тип D	Опухоль с интракраниальным распространением
De1	Опухоли с распространением в полость черепа до 2 см (эпидурально)
De2	Опухоли с распространением в полость черепа более 2 см (эпидурально)
Di1	Опухоли с распространением в полость черепа до 2 см (интрадурально)
Di2	Опухоли с распространением в полость черепа более 2 см (интрадурально)

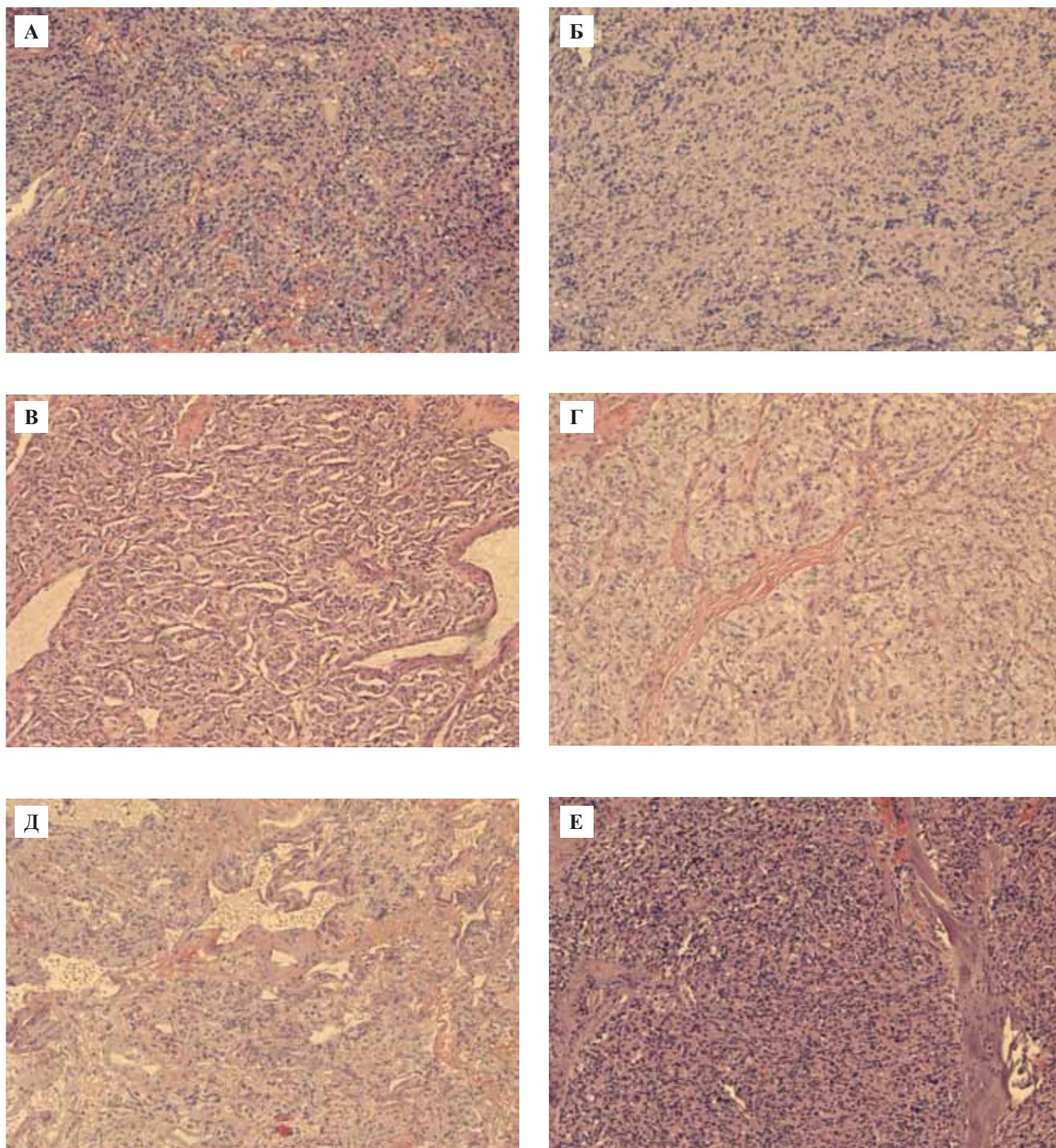


Рис. 1. Типы и варианты югулотимпанальных параганглиом.

А, Б, Е – смешанный тип, В – альвеолярный тип, Г – аденомоподобный вариант, Д – ангиомоподобный вариант.
Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 1. Types and variations of the jugulotympanic paragangliomas.

А, Б, Е – mixed type, В – alveolar type, Г – adenoma-like variation, Д – angioma-like variation.
H&E stain, $\times 100$

Таблица 2 / Table 2

Разделение групп пациентов по классификации
U. Fisch (1988)
The distribution of patient groups according to the
U. Fisch classification (1988)

Число пациентов	Группа I (тип А)	Группа II (тип В)	Группа III (тип С)
33	6	21	6

Параганглиома типа А была выявлена у шести пациентов (18,2%), которые составили группу I. В группу II вошел 21 пациент (63,6%) с опухолями типа В. Группу III составили шесть пациентов (18,2%), у которых была диагностирована параганглиома типа С. Пациентам с параганглиомой типа А опухоль была удалена через ретроаурикулярно-трансмастальный доступ, удаление опухоли типа В проводилось с помощью трансмастоидального доступа, хирургическое вмешательство пациентам с опухолью типа С выполнено с применением инфратемпорального доступа.

Морфологическое изучение операционного материала (33 опухоли) позволило в зависимости от количества и расположения гломусных клеток, сосудов, нервных стволиков и фиброзных прослоек разделить опухоли согласно классификации [8] на следующие типы: альвеолярный, аденоматозный, ангиоматозный, компактный и смешанный (табл. 3, рис. 1).

Таким образом, для типа А (шесть пациентов), где опухоль ограничена промонториумом, по результатам

МСКТ головы, МРТ головы и шеи и интраоперационных находок, характерен аденоматозный или компактный тип строения опухоли (рис. 1 Г). Данный тип опухоли характеризовался медленным ростом, пациенты чаще всего предъявляли жалобы на пульсирующий шум в ухе и снижение слуха.

Для группы II (тип опухоли В, 21 пациент) наиболее характерны аденоматозная, ангиоматозная и смешанная опухоли (рис. 1 Г, Д, Е). При этом по результатам МСКТ, МРТ и интраоперационных находок, опухоль распространялась в гипотимпанум, но не разрушала яремную ямку и не распространялась в инфралабиринтное пространство. Данный тип опухоли характеризовался помимо медленного роста жалобами на пульсирующий шум в ухе, снижением слуха, наличием жалоб на онемение лица и даже его асимметрией со стороны поражения.

При типе С (шесть пациентов) преобладал смешанный тип опухоли (рис. 1 А, Б, Е), который характеризовался, по данным МСКТ головы, МРТ головы и шеи и интраоперационных находок, поражением инфралабиринтного пространства и распространением в верхушку пирамиды. У пациентов отмечалось наличие жалоб на пульсирующий шум в ухе, отсутствие слуха, онемение лица, парез лицевого нерва вследствие поражения опухолью процессом лицевого нерва, что соответствовало 5-й степени по шкале Хауса–Брэкмана. В позднем послеоперационном периоде функция нерва восстанавливалась до 2–3-й степени по шкале Хауса–Брэкмана.

Таблица 3 / Table 3

Типы югулотимпанальных параганглиом
Types of the jugulotympanic paragangliomas

Морфологический тип опухолей	Клинический тип			Всего
	тип А (группа I)	тип В (группа II)	тип С (группа III)	
Альвеолярный	0	1	1	2 (6,0%)
Аденоматозный	3	6	1	10 (30,3%)
Ангиоматозный	0	5	0	5 (15,2%)
Компактный	2	3	0	5 (15,2%)
Смешанный	1	6	4	11 (33,3%)
Всего	6 (18,2%)	21 (63,6%)	6 (18,2%)	33

Выводы

В зависимости от места локализации и распространения процесса определенному типу новообразования соответствовал определенный гистологический тип строения опухолей: для типа А (18,2%), где опухоль ограничена промонториумом, характерен аденоматозный или компактный тип строения опухоли, для опухолей типа В (63,6%) характерны аденоматоз-

ный, ангиоматозный и смешанный тип, а у пациентов с опухолью типа С (18,2%) преобладал смешанный тип.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Х.М. Диаб, В.П. Быкова.
Сбор и обработка материала – П.У. Умаров, А.А. Бахтин, Д.А. Загорская.

Статистическая обработка данных – А.А. Бахтин, Д.А. Загорская, С.Г. Рычкова.

Написание текста – А.А. Бахтин, Д.А. Загорская.

Редактирование – Х.М. Диаб, В.П. Быкова, Х.Ш. Давудов.

Author contributions

Conceived the study – Kh.M. Diab, V.P. Bykova.

Designed the experiment – P.U. Umarov, A.A. Bakhtin, D.A. Zagorskaya.

Collected the data and performed the analysis – A.A. Bakhtin,

D.A. Zagorskaya, S.G. Rychkova.

Wrote the paper – A.A. Bakhtin, D.A. Zagorskaya.

Edited the manuscript – Kh.M. Diab, V.P. Bykova, H.Sh. Davudov.

Литература/References

1. *Sanna M, Piazza P, Shin S, Flanagan S, Mancini F.* Glomusjugulare tumors: Microsurgery of skull base paragangliomas. Thieme. 2013.
2. *Gerosa M, Visca A, Rizzo P, Foroni R, Nicolato A, Bricolo A.* Glomusjugulare tumors: The option of gamma knife radiosurgery. *Neurosurgery.* 2006;59:561–9. doi: 10.1227/01.NEU.0000228682.92552.CA.
3. *Oldring D, Fisch U.* Glomus tumors of the temporal region: Surgical therapy. *Am J Otol.* 1979;(1):7–18.
4. *Stacey E, Mills MD, Edward B, Stelo MB.* Tumors of the Upper Aerodigestive Tract and Ear. AFIP Atlas of Tumor Pathology, Fourth Series, Band 17. 2012;544–6.
5. *Пальцев М.А., Аничков Н.М.* Атлас патологии опухолей человека. Москва: Медицина, 2005. С. 128–132. *Pal'tsev MA, Anichkov NM.* Atlas of human tumor pathology. Moscow: Medicina, 2005. P. 128–132 (In Russ.).
6. *Sanna M, Jain Y, De Donato G, Rohit, Lauda L, Taibah A.* Management of jugular paragangliomas: the Gruppo Otologico experience. *Otol Neurotol.* 2004;25:797–804.
7. *Tekautz TM, Pratt CB, Jenkins JJ, Spunt SL.* Pediatric extraadrenal paraganglioma. *Pediatr Surg.* 2003;(9):1317–21.
8. *Уранова Е.В.* Морфологическая характеристика параганглиом, гломусных опухолей и карциноидов. Министерство здравоохранения СССР. Центральный институт усовершенствования врачей. 1970. С. 41–50. *Uranova EV.* Morphological characteristics of paraganglioma, glomus tumors and carcinoid. Ministry of Health of the USSR. Central institute of advanced training of the doctors 1970. P. 41–50 (In Russ.).

Информация об авторах

Хассан Мохамад Али Диаб – доктор медицинских наук, профессор, руководитель научно-клинического отдела заболеваний уха НКЦО, профессор кафедры оториноларингологии факультета дополнительного профессионального образования РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Валентина Павловна Быкова – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник патологоанатомического отделения ЛОР органов НКЦО.

Хасан Шахманович Давудов – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора НКЦО.

Парвиз Уктамович Умаров – кандидат медицинских наук, врач-оториноларинголог, заведующий операционным блоком НКЦО.

Артур Александрович Бахтин – кандидат медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением ЛОР органов НКЦО.

Дарья Алексеевна Загорская – врач-оториноларинголог второго (детского) отделения НКЦО.

Светлана Геннадьевна Рычкова – лаборант НКЦО.

Author information

Khassan M.A. Diab – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Scientific and Clinical Department of Ear Disorders of the RCCO, Professor, Department of Otorhinolaryngology, Faculty of Postgraduate education, Pirogov Russian National Reserch Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2790-7900>.

Valentina P. Bykova – Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Researcher, ENT Pathology Department, RCCO.

Khasan Sh. Davudov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy Director of the RCCO. <https://orcid.org/0000-0002-2887-0652>.

Parviz U. Umarov – Candidate of Medical Sciences, otorhinolaryngologist, Head of OR, RCCO. <https://orcid.org/0000-0002-2887-0652>.

Artur A. Bakhtin – Candidate of Medical Sciences, Head of the ENT Pathology Department, RCCO. <https://orcid.org/0000-0003-023-0545>

Daria A. Zagorskaya – otorhinolaryngologist, Department of Pediatric Otorhinolaryngology, RCCO. <https://orcid.org/0000-0002-0335-4774>.

Svetlana G. Rychkova – Laboratory Technician, RCCO. <https://orcid.org/0000-0001-5190-8797>.

Морфологические изменения щитовидной железы крыс после введения хлорида магния

Р.В. Янко, Е.Г. Чака, М.И. Левашов

Институт физиологии им. А.А. Богомольца Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

Введение. Магний принимает непосредственное участие в функционировании щитовидной железы. Тем не менее данные о гистоморфологических изменениях железы после введения ионов магния неоднозначны. Это может быть связано с применением различных источников магния в экспериментах, разной дозировкой магниесодержащих препаратов, использованием в опытах животных неодинакового возраста, сезонностью и продолжительностью проведения экспериментов. Цель – исследование морфологических изменений щитовидной железы молодых крыс после введения хлорида магния.

Материал и методы. Эксперименты были выполнены на 24 крысах – самцах линии Вистар 3-месячного возраста. Подопытные животные в дополнение к стандартному рациону питания ежедневно в течение 21 суток получали хлорид магния в дозе 50 мг/кг массы тела. Из ткани щитовидной железы изготавливали гистологические препараты по стандартной методике. Морфометрию железы осуществляли на цифровых изображениях с помощью компьютерной программы Image J. В сыворотке крови и суспензии эритроцитов определяли содержание катионов магния.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о том, что 21-суточное введение хлорида магния крысам приводит к снижению площади поперечного сечения фолликулов и коллоида, росту фолликулярно-коллоидного индекса, количества тиреоцитов в фолликуле, резорбционных вакуолей в коллоиде, увеличению численности интерфолликулярных островков, снижению индекса накопления коллоида, уменьшению относительной площади стромы в железе. У подопытных крыс выявлено умеренное повышение содержания магния в суспензии эритроцитов.

Заключение. Введение хлорида магния сопровождается появлением морфологических признаков активации синтетической активности щитовидной железы.

Ключевые слова: магний, щитовидная железа, морфометрические показатели

Для корреспонденции: Роман Васильевич Янко. E-mail: biolag@ukr.net

Для цитирования: Р.В. Янко, Е.Г. Чака, М.И. Левашов. Морфологические изменения щитовидной железы крыс после введения хлорида магния. Клини. эксп. морфология. 2019;8(3):41-47. DOI: 10.31088/СЕМ2019.8.3.41-47

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины (№ 0116U004472).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 07.08.2019. Получена после рецензирования 27.08.2019. Принята в печать 18.09.2019.

Morphological changes in the thyroid gland of rats after magnesium chloride ingestion

R.V. Yanko, E.G. Chaka, M.I. Levashov

Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Introduction. Magnesium is directly involved in the thyroid gland function. However, the data about the thyroid gland histomorphological changes after magnesium ions influence are often ambiguous. This may be due to the use of the various magnesium sources of in experiments, differences in the magnesium-containing compounds dosage of, animals ages, seasonality and duration of the experiments. The aim of the study was to investigate the morphological changes in the thyroid of young rats after the magnesium chloride ingestion.

Materials and methods. The experiments were performed on 24 Wistar male rats of 3 months of age. Animals of the experimental group, in addition to the standard diet, received magnesium chloride daily for 21 days at a dose of 50 mg/kg of body weight. Histological slides were made from the thyroid tissue according to the standard method. The gland morphometry was performed on digital images using the computer program Image J. The magnesium cations level in the serum and suspension of red blood cells was determined.

Results. The data indicate that the 21 daily magnesium chloride ingestion in rats leads to a decrease in cross-sectional area of thyroid follicles and colloid, to the increase of follicular-colloidal index, the number of thyro-

cytes in the follicle and resorption vacuoles in the colloid. Also, the growth of the interfollicular islets number, the reduction of the colloid accumulation index, the decrease of the relative gland stromal area were observed. The rats of the experimental group revealed a moderate growth in the magnesium content in the erythrocyte suspension.

Conclusions. Thus, the magnesium chloride ingestion is succeeded by the appearance histomorphological features of the synthetic activity in the thyroid gland.

Key words: magnesium, thyroid, morphometric indicators

Corresponding author: Roman V. Yanko, E-mail: biolag@ukr.net

For citation: R.V. Yanko, E.G. Chaka, M.I. Levashov. Histomorphological changes in the thyroid gland of rats after magnesium chloride ingestion. *Clin. exp. morphology.* 2019;8(3):41-47. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.41-47

Funding. The work is done in the framework of the state assignment of Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine (No 0116U004472).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 07.08.2019. Received in revised forms 27.08.2019. Accepted 18.09.2019.

Заболевания щитовидной железы (ЩЖ) широко распространены среди жителей многих стран. Около 8% взрослого населения земного шара имеет данную патологию, и число больных ежегодно увеличивается [1]. Особое место среди различных патологических процессов ЩЖ занимает дисбаланс макро- и микроэлементов в организме. Дефицит или избыток таких элементов как йод, селен, магний, литий, кальций, кобальт, медь, железо и т.д. влияют на ЩЖ, нарушая синтез тиреоидных гормонов.

Магний – один из 12 структурных элементов, составляющих 99% элементного состава организма человека. Он является основным внутриклеточным ионом, который участвует в углеводном, белковом и жировом обмене, регулирует аккумуляцию и высвобождение энергии в АТФ. Магний участвует в контроле важнейших функций многих органов и систем – нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой, костно-мышечной, пищеварительного тракта и т.д. [2].

В последнее время дисбаланс магния в организме (преимущественно его дефицит) стал распространенным явлением, присущим населению практически всего современного мира. Сказываются низкое содержание магния в пище, широкое использование рафинированных продуктов, препятствующих усвоению магния, внедрение системы питания фаст фуд, употребление алкоголя и напитков, содержащих кофеин, увеличивающих потерю магния через почки. Даже если пищевой рацион не обеднен магнием, но богат жирами и белками, с которыми магний образует сложные комплексы, не утилизирующиеся в желудочно-кишечном тракте, может развиваться магнидефицитное состояние [3]. К сожалению, диагностика содержания магния в организме проводится нечасто.

Магний принимает непосредственное участие в функционировании ЩЖ. Он повышает ее активность, увеличивает синтез тироксина, а также участвует в преобразовании тироксина в трийодтиронин. Наряду с этим магний принимает участие в усвоении йода ЩЖ [4].

Заболевания ЩЖ и метаболизм магния взаимосвязаны. При токсическом зобе почти в 100% случаев развивается скрытая или явная недостаточность магния в организме. При гипотиреозе тоже возникает дефицит магния, только причины его иные, чем при тиреотоксикозе. При дефиците тиреоидных гормонов магний не вступает в ферментативные реакции. В свою очередь, дефицит магния приводит к снижению функции ЩЖ за счет синергетической функции паразитовидной железы, которая регулирует абсорбцию магния [5, 6].

В связи с применением в экспериментах различных источников магния, разной дозировкой магниесодержащих препаратов, использованием в опытах животных неодинакового возраста, сезонностью и различной продолжительностью проведения экспериментов данные литературы о гистоморфологических изменениях ЩЖ после введения ионов магния часто неоднозначны [7–9].

Цель работы – исследовать гистоморфологические изменения щитовидной железы молодых крыс после введения хлорида магния.

Материалы и методы

Исследование проведено в весенний период года на 24 крысах – самцах линии Вистар в возрасте 3 месяцев. В качестве естественного источника ионов магния использовали хлорид магния, который встречается в природе в виде минерала бишофита и входит в состав некоторых минеральных вод. Хлорид магния широко применяется в медицинской практике в профилактических и лечебных целях.

Крысы были разделены на две группы по 12 животных в каждой: группа I – контрольные животные, группа II – крысы, которые ежедневно (в 10 часов утра) получали перорально хлорид магния ($MgCl_2 \times 6 H_2O$) в дозе 50 мг/кг в течение 21 суток. С учетом того, что биодоступность хлорида магния не превышает 50%, такая доза может рассматриваться как профилактическая, так как не приводит к существенному повышению

его содержания в крови, но является достаточной для коррекции возможного дефицита магния в организме до значений физиологической нормы. Животные обеих групп находились в унифицированных условиях со стандартным рационом питания. По завершении эксперимента крыс декапитировали под эфирным наркозом. Исследования проводили в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), а также комитета по биомедицинской этике Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины.

После выделения ЩЖ из ее центральных участков брали образцы ткани, из которых изготавливали гистологические препараты по стандартной методике: фиксировали в жидкости Буэна, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм изготавливали на санном микротоме, окрашивали гематоксилином Беймера и эозином. Для визуализации элементов соединительной ткани применяли методы двух- и трехцветной окраски по ван Гизону и Массону [10]. Микропрепараты фотографировали на микроскопе Nikon (Япония) с использованием цифровой камеры. Морфометрию осуществляли с помощью компьютерной программы Image J.

На гистологических срезах щитовидной железы измеряли площадь поперечного сечения фолликулов, коллоида и фолликулярного эпителия; внешний и внутренний диаметры фолликулов; высоту фолликулярного эпителия. Подсчитывали среднее количество тиреоцитов в фолликулах. Определяли фолликулярно-коллоидный индекс и индекс накопления коллоида. С использованием метода наложения точечных морфометрических сеток вычисляли относительную площадь соединительной ткани, паренхимы железы и определяли стромально-паренхиматозный индекс. Измеряли ширину прослоек междольевой, междольковой и межфолликулярной соединительной ткани [11, 12].

Содержание катионов магния (ммоль/л) в суспензии эритроцитов и сыворотке крови определяли фотометрическим методом с использованием стандартных наборов реактивов фирмы Diagnosticum (Венгрия). Принцип метода заключался в измерении интенсивности окраски комплекса красного цвета, образовавшегося при взаимодействии магния с титановым желтым в присутствии гидросиламина, который стабилизирует окраску [13].

Статистическую обработку осуществляли методами вариационной статистики с помощью компьютерной программы Statistica 6.0. Нормальность распределения цифровых массивов проверяли, используя критерий Пирсона. При нормальности распределения для оценки коэффициента различий достоверности разницы между контрольной и подопытной группой использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты исследования

Существенных различий в содержании магния в сыворотке крови между контрольной и подопытной группой крыс не обнаружено. В суспензии эритроцитов животных, получавших хлорид магния, содержание магния было на 17% ($p < 0,05$) выше, чем у контрольных животных (табл. 1).

Выявлено, что ЩЖ крыс, получавших хлорид магния, содержит фолликулы овальной и удлиненной формы разной величины. Фолликулы мелкого и среднего размера локализуются в центральной части железы, а большого размера – по периферии. В ЩЖ интактных животных группы I коллоид умеренной или плотной консистенции с резорбционными вакуолями (рис. 1 А). Коллоид фолликулов крыс группы II умеренной плотности, реже пенистый с многочисленными вакуолями, что свидетельствует о высвобождении гормонов (рис. 1 Б).

В ЩЖ животных, получавших хлорид магния, площадь поперечного сечения фолликулов и коллоида была достоверно меньше – на 11% и 18%, соответственно, по сравнению с контролем (табл. 2). Внешний и внутренний диаметры фолликулов в ЩЖ подопытных крыс имели тенденцию к снижению на 6% и 11%, соответственно, по сравнению с контрольной группой. Среднее количество тиреоцитов в фолликуле подопытных крыс было достоверно больше – на 17% (табл. 2). При этом тиреоциты имели кубическую форму, реже призматическую.

Фолликулярно-коллоидный индекс (отношение площади поперечного сечения фолликулярного эпителия к площади коллоида) у крыс после введения хлорида магния был достоверно больше – на 13% по сравнению с контрольным показателем, тогда как индекс накопления коллоида (отношение внутреннего диаметра фолликула к двойной высоте фолликуляр-

Таблица 1 / Table 1

Содержание катионов магния (ммоль/л) в суспензии эритроцитов и сыворотке крови (n=12, M±m)
The content of magnesium cations (mmol/l) in the suspension of red blood cells and blood serum (n=12, M±m)

Показатели Indicators	Контроль Control	Опыт Experience
Содержание магния в сыворотке крови / Serum magnesium	1,84±0,08	1,82±0,04
Содержание магния в эритроцитах / Red blood cell magnesium	1,78±0,07	2,09±0,08*

Здесь и в таблице 2 * $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем.
Here and in table 2 * $p < 0,05$ – significance of differences compared with control group.

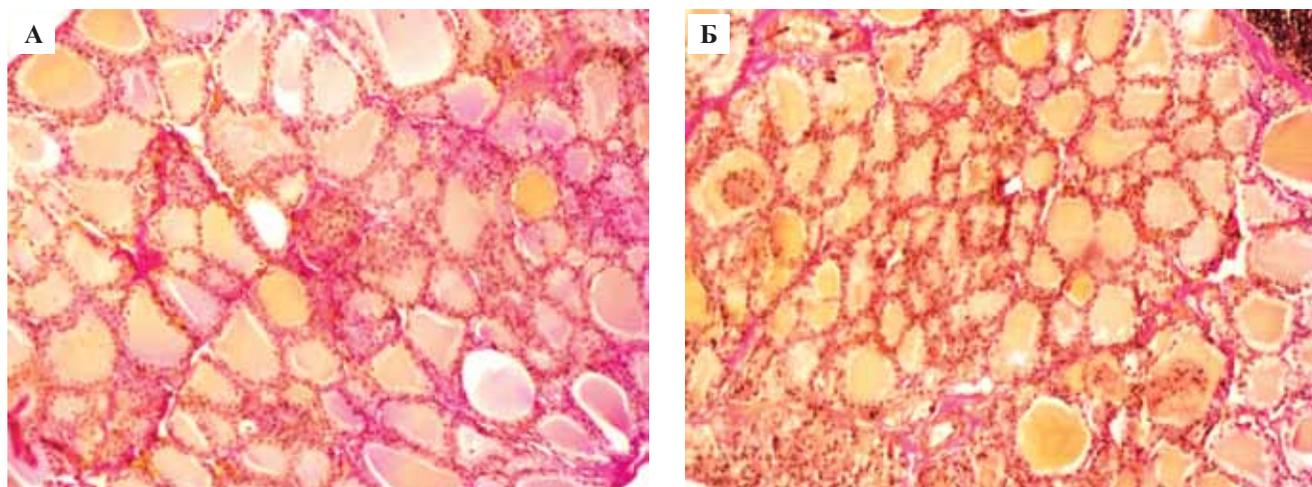


Рис. 1. Микрофотография щитовидной железы I – контрольной (А) и II – подопытной (Б) крысы.
Окраска по ван Гизону. $\times 200$

Fig 1. A micrograph of the thyroid gland of the I – control group (A) and II – experimental group (B) of rats.
van Gieson stain. $\times 200$

ного эпителия), наоборот, снизился на 13% ($p < 0,05$) (табл. 2). У подопытных крыс наблюдали тенденцию к увеличению количества интерфолликулярных островков, что можно считать признаком активации процессов регенерации ЩЖ.

В состав соединительнотканного остова железы входят капсула и строма. В последний различают междольковую, междольковую, межфолликулярную и паравазальную соединительную ткань [14]. Выявлено, что у животных после введения им хлорида магния относительная площадь стромы в ЩЖ была меньше на 13% по сравнению с контролем. Это привело к снижению стромально-паренхиматозного индекса на 16%. Также в ЩЖ подопытных крыс наблюдали достоверное уменьшение ширины прослоек междольковой и межфолликулярной соединительной ткани на 11% и 19%, соответственно, по сравнению с контрольными показателями (табл. 2).

Обсуждение

Впервые показано, что 21-суточное введение хлорида магния (в дозе 50 мг/кг) приводит к изменениям в структуре ЩЖ молодых крыс. В ЩЖ крыс, получавших хлорид магния, достоверно уменьшились размеры фолликулов и их коллоида. Это может указывать на повышение активности железы, в первую очередь связанную с высвобождением гормонов в кровеносное русло. В малоактивном состоянии железа представлена фолликулами преимущественно большого размера из-за депонирования гормонов в середине фолликула, увеличения объема коллоида [11]. Коллоид в фолликулах подопытных крыс был умеренной плотности, иногда пенный, с многочисленными резорбционными вакуолями. Тиреоциты имели кубическую или призматическую форму. Форма

тиреоцитов зависит от функционального состояния железы. При нормальной функции им свойственна кубическая форма, при гипофункции клетки становятся плоскими, а при гиперфункции приобретают призматическую форму [15].

У крыс, получавших хлорид магния, наблюдали возрастание фолликулярно-коллоидного индекса, в то же время индекс накопления коллоида, наоборот, снижался. Изменение этих показателей свидетельствует об усилении секреции тиреоидных гормонов в кровеносное русло [11].

После введения хлорида магния в ЩЖ наблюдали тенденцию к увеличению количества интерфолликулярных островков, что можно рассматривать как активацию фолликулогенеза. Интерфолликулярные островки содержат малодифференцированные клетки, которые могут быть источником для формирования новых фолликулов [16].

У подопытных животных также отмечено уменьшение относительной площади стромы, стромально-паренхиматозного индекса, снижение ширины прослоек междольковой и межфолликулярной соединительной ткани. Это свидетельствует об относительном уменьшении массы соединительной ткани в железе, что, в свою очередь, улучшает межфолликулярный обмен веществ и проникновение гормонов через гистогематический барьер в кровь [14].

Основная часть магния в организме находится в клетках и костных тканях. Только 1% его общей концентрации локализуется во внеклеточных жидкостях, и около 0,3% общего магния присутствует в сыворотке [17]. Тем не менее определение его концентрации в сыворотке крови и эритроцитах наиболее часто используется в лабораторной практике. Нами показано, что после введения хлорида магния его концентрация

Таблица 2 / Table 2

**Морфометрические показатели щитовидной железы (n=12, M±m)
Morphometric parameters of the thyroid gland (n=12, M±m)**

Показатели Indicators	Контроль Control	Опыт Experience
Относительная площадь паренхимы,% / The relative area of the parenchyma, %	80,3±1,9	82,8±2,4
Площадь, мкм ² / Area, μm ² :		
фолликула / follicle	4538±109	4021±117*
коллоида / colloid	1940±105	1594±107*
фолликулярного эпителия / follicular epithelium	2598±92	2427±102
Диаметр фолликула, мкм / Follicle diameter, microns		
внешний / external	71,5±2,4	67,2±2,2
внутренний / interior	43,1±2,8	38,4±1,8
Высота тироцитов, мкм / The height of thyrocytes, microns	14,2±0,9	14,4±0,3
Фолликулярно-коллоидный индекс / Follicular colloid index	1,34±0,06	1,52±0,03*
Индекс накопления коллоида / Colloid accumulation index	1,52±0,04	1,33±0,05
Количество тироцитов в фолликуле, шт / The number of thyrocytes in the follicle, pcs	20,5±0,3	23,9±0,5*
Соединительная ткань / Connective tissue		
Относительная площадь стромы,% / The relative area of the stroma, %	19,7±1,7	17,2±1,1
Стромально-паренхиматозный индекс / Stromal-parenchymal index	0,25±0,03	0,21±0,04
Ширина прослоек соединительной ткани, мкм / The width of the interlayers of the connective tissue, microns		
междолевой / interlobar	23,9±1,8	23,9±1,5
междольковой / interlobular	12,2±0,2	10,9±0,3*
межацинусной / interacinous	1,80±0,10	1,45±0,06*

в сыворотке крови крыс не изменялась. Это можно объяснить тем, что молодым животным при сбалансированном рационе питания магния вполне достаточно, поэтому излишек его выводится из организма и он не накапливается в сыворотке крови. Содержание же магния в суспензии эритроцитов подопытных крыс умеренно повышалось.

В то же время нами был проведен эксперимент по изучению влияния хлорида магния на структуру ЩЖ зрелых крыс (15-месячных). У этих крыс также были выявлены морфологические признаки повышения активности железы под воздействием ионов магния [18].

Изучение влияния магнийсодержащих соединений на состояние ЩЖ проводили и другие исследователи. Выявлено, что введение сульфата магния в различных дозах (0,5, 1 и 1,5 г/кг) крысам линии Вистар в течение 60 суток стимулировало щитовидную пероксидазу и Na⁺/K⁺-АТФазу, изменяло актив-

ность йодтиронин-дейодиназы 1-го типа, повышало в сыворотке крови содержание тироксина, приводило к гипертрофии фолликулярного эпителия, то есть вызвало гипертиреоз [7]. Другими авторами выявлено, что низкое содержание магния в сыворотке крови тесно взаимосвязано с повышенным риском появления положительных антител против тиреоглобулина и возникновения гипотиреоза [19]. Stachura J.A. et al. исследовали дефицит и избыток магния на С-клетки ЩЖ. Показано, что дефицит магния приводил к гипертрофии и гиперплазии С-клеток, гиперплазии рибосом и эндоплазматической сети в них. Все это сопровождалось пониженной активностью холинэстеразы, увеличением синтеза и секреции кальцитонина. При избытке магния С-клетки ЩЖ в размерах не увеличивались, однако активность холинэстеразы, синтез и хранение дофамина повышались [8]. Доказана лечебно-терапевтическая роль магния при повреждении ЩЖ. Так, выявлено, что пероральное введение магния способно

вызывать частичное восстановление функции ЩЖ у экспериментальных крыс с диабетом 2-го типа [20].

Заключение

21-суточное введение в стандартный пищевой рацион молодых крыс дополнительного количества хлорида магния (в дозе 50 мг/кг) приводило к гистоморфологическим изменениям в их щитовидной железе. Характер и степень выраженности изменений основных гистоморфометрических показателей щитовидной железы крыс указывали на наличие морфологических признаков повышения ее активности. Об этом свидетельствовали уменьшение размеров фолликулов, рост фолликулярно-коллоидного индекса, количества тиреоцитов в фолликуле, наличие резорбционных вакуолей в коллоиде фолликулов, рост численности интерфолликулярных островков, уменьшение относительной площади стромы в железе. Введение дополнительного количества магния особенно целесообразно использовать при комплексном лечении гипотиреоза.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – М.И. Левашов.
Сбор и обработка материала – Р.В. Янко.
Написание текста – Р.В. Янко.
Редактирование – М.И. Левашов, Е.Г. Чака.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – M.I. Levashov.
Collected the data and performed the analysis – R.V. Yanko.
Wrote the paper – R.V. Yanko.
Edited the manuscript – M.I. Levashov, E.G. Chaka.

Литература/References

1. *Vanderpump MP*. The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull*. 2011;99:39–51. doi: 10.1093/bmb/ldr030.
2. *Sigel A, Sigel H, Roland KO*. Interrelations between essential metal ions and human diseases. Dordrecht: Springer, 2013. doi:10.1007/978-94-007-7500-83.
3. *Терещенко И.В.* Дефицит магния в практике эндокринолога. *Клиническая медицина*. 2008;7:47–51.
Tereshhenko IV. Magnesium deficiency in the practice of an endocrinologist. *Klinicheskaja medicina*. 2008;7:47–51 (In Russ.).
4. *Corradino RA, Parker HE*. Magnesium and thyroid function in the rat. *The Journal of Nutrition*. 1962;77(4):455–58.
5. *Jones JE, Desper PC, Shane SR, Flink EB*. Magnesium metabolism in hyperthyroidism and hypothyroidism. *J Clin Invest*. 1966;45(6):891–900. doi: 10.1172/JCI105404.
6. *Moncayo R, Moncayo H*. The WOMED model of benign thyroid disease: Acquired magnesium deficiency due to physical and psychological stressors relates to dysfunction of oxidative phosphorylation. *BBA Clin*. 2015;3:44–64. doi: 10.1016/j.bbacli.2014.11.002.
7. *Chandra AK, Goswami H, Sengupta P*. Effects of magnesium on cytomorphology and enzyme activities in thyroid of rats. *Indian J Exp Biol*. 2014;52(8):787–92.
8. *Stachura JA, Pearse AG*. Thyroid C cells in experimental hyper and hypomagnesaemia. *Virchows Arch B*. 1970;5:173.
9. *Tosson R, Brandt G*. Magnesium, zinc and copper concentrations in the normal and diseased thyroid gland. *Mag.-Bull*. 1988; 10:87–90.
10. *Данилов П.К.* Руководство по гистологии. Том II. СПб.: СпецЛит, 2011.
Danilov RK. Guide to histology. Volume II. St. SPb.: SpecLith, 2011 (In Russ.).
11. *Никишин Д.В.* Морфология и методы исследования щитовидной железы: Методические рекомендации. Пенза: Инф.-изд. центр ПГУ, 2008.
Nikishin DV. Morphology and research methods of the thyroid gland: Methodological recommendations. Penza: Inf.-izd. tsentr PGU, 2008 (In Russ.).
12. *Никоненко А.Г.* Введение в количественную гистологию. Киев: Книга-Плюс, 2013.
Nikonenko AG. Introduction to Quantitative Histology. Kiev: Kniga-Plus, 2013 (In Russ.).
13. *Громова О., Калачева А.Г., Торшин И.Ю., Грустливая У.Е., Прозорова Н.В., Егорова Е.Ю. и др.* О диагностике дефицита магния. Часть 1. Архив внутренней медицины. 2014;16(2):5–10.
Gromova O, Kalacheva A, Torshin IJu, Grustlivaja UE, Prozorova NV, Egorova EJu et al. About the diagnosis of magnesium deficiency. Part 1. *Arhiv vnutrennej mediciny*. 2014;16(2):5–10 (In Russ.).
14. *Ludwig KS*. Structure of the thyroid gland; I. Structure of connective tissue. *Acta Anat (Basel)*. 1952;15(3):300–8.
15. *Veerahanumaiah S, Dakshayani KR, Menasinkai SB*. Morphological variations of the thyroid gland. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2015;3(1):53–7.
16. *Aleshin BV, Brindak OI, Mamina VV*. Correlations between the functional activity and proliferation of the thyroid parenchyma. The proliferative forms of the parenchyma of the thyroid. *Probl Endokrinol (Mosk)*. 1987;33(6):67–72.
17. *Gröber U, Schmidt J, Kisters K*. Magnesium in prevention and therapy. *Nutrients*. 2015;7:8199–8226. doi: 10.3390/nu7095388.
18. *Yanko RV*. Investigation of the influence of magnesium ions on the morphofunctional state of the thyroid gland of adult rats. *Endokrynologia*. 2018;23(3):230–34.
19. *Wang K, Wei H, Zhang W, Li Z, Ding L, Yu T et al*. Severely low serum magnesium is associated with increased risks of positive anti-thyroglobulin antibody and hypothyroidism: A cross-sectional study. *Sci Rep*. 2018;8(1):9904. Published 2018 Jul 2. doi:10.1038/s41598-018-28362-5.
20. *Ige AO, Chidi RN, Egbeluya EE, Jubreel RO, Adele BO, Adewoye EO*. Amelioration of thyroid dysfunction by magnesium in experimental diabetes may also prevent diabetes-induced renal impairment. *Heliyon*. 2019; 5(5): e01660. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01660>.

Информация об авторах

Роман Васильевич Янко – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела клинической физиологии соединительной ткани Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины.

Елена Георгиевна Чака – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела клинической физиологии соединительной ткани Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины.

Михаил Иванович Левашов – доктор медицинских наук, заведующий отделом клинической физиологии соединительной ткани Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины.

Authors Information

Roman V. Yanko – Cand. Sci. (Bio.), Senior researcher, Department of Clinical Physiology of Connective Tissue, A.A. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine.
<http://orcid.org/0000-0002-0397-7517>.

Elena G. Chaka – Cand. Sci. (Bio.), Senior researcher, Department of Clinical Physiology of Connective Tissue, A.A. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine.
<http://orcid.org/0000-0001-7425-2751>.

Mikhail I. Levashov – Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher; Head of the Department of Clinical Physiology of Connective Tissue, A.A. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine.
<http://orcid.org/0000-0003-1354-2047>.

Характеристика сперматогенного эпителия семенников половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа при действии иммобилизационного стресса

Г.В. Брюхин, С.Д. Антонов

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

Введение. Экстрагенитальные заболевания матери, среди которых особое место занимает сахарный диабет 1-го типа, вызывают у потомства комплекс разнообразных морфологических, нейрохимических, эндокринных, метаболических изменений. Особенности морфофункционального становления мужской репродуктивной системы у потомства матерей с сахарным диабетом 1-го типа изучены недостаточно.

Цель исследования – анализ морфофункционального состояния сперматогенного эпителия семенников половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа, подвергнутого иммобилизационному стрессу.

Материалы и методы. Диабет матери моделировали с помощью стрептозотоцина. Оценку морфологических особенностей сперматогенного эпителия проводили на серийных гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, далее определяли толщину сперматогенного эпителия, оценку суммарного содержания сперматогенных клеток и их субпопуляционного состава, а также количества суспендоцитов. Для выявления более тонких нарушений сперматогенного цикла экспериментальных животных вычисляли ряд общепринятых индексов, в том числе сперматогенеза, релаксации сперматогенеза и герминативного индекса. Для оценки резистентных свойств развивающихся половых клеток подопытных животных подвергали воздействию иммобилизационного стресса.

Результаты. Установлено, что клетки сперматогенного эпителия потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом обладают сниженной резистентностью, о чем свидетельствует более выраженное, чем в контроле, уменьшение под влиянием стрессового фактора концентрации сперматозоидов, а также снижение содержания сперматогенных клеток и изменение их субпопуляционного состава.

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что сахарный диабет 1-го типа матери вызывает снижение стрессрезистентности сперматогенных клеток потомства.

Ключевые слова: сахарный диабет, эксперимент, крыса, семенник, стресс

Для корреспонденции. Сергей Дмитриевич Антонов. E-mail: S.d.antonov@mail.ru

Для цитирования. Г.В. Брюхин, С.Д. Антонов. Характеристика сперматогенного эпителия семенников половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа при действии иммобилизационного стресса. Клини. эксп. морфология. 2019;8(3):48-54. DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.48-54

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 09.08.2019. Получена в исправленном виде 29.08.2019. Принята в печать 18.09.2019.

Characteristic of seminiferous epithelium of mature offspring of female rats with experimental type 1 diabetes under the influence of immobilization stress

G.V. Bryukhin, S.D. Antonov

South Ural State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

Introduction. Type 1 diabetes is of particular importance among extragenital diseases in pregnancy, which cause a variety of morphological, neurochemical, endocrine, metabolic changes in the offspring. The features of the morphofunctional formation of the male reproductive system in the offspring of mothers suffering from type 1 diabetes mellitus are insufficiently studied.

The aim of the study was to analyze the morphological and functional characteristics of the seminiferous epithelium of the testes in the mature offspring of female rats with experimental type 1 diabetes exposed to immobilization stress.

Materials and methods. Diabetes in mother rats was induced with streptozotocin. The morphological features of seminiferous epithelium were assessed on serial histological slides stained with hematoxylin and eosin. The thickness of the seminiferous epithelium of laboratory animals in the intact and experimental groups was recorded. The total content of spermatogenic cells and their subpopulation composition, as well as the number of sustentocytes were estimated. To evaluate more subtle violations of the spermatogenic cycle in experimental animals, a number of generally accepted indices were determined, including the spermatogenesis index, spermatogenesis relaxation index, and germinative index. To assess the resistance properties of developing germ cells in experimental animals, they were subjected to immobilization stress.

Results. The decreased concentration of spermatozoa under the influence of the stress factor that was more pronounced than in the controls as well as the diminished number of spermatogenic cells and changes in their subpopulation composition indicate reduced stress resistance of seminiferous epithelial cells in the offspring of female rats with experimental diabetes.

Conclusion. The results allow us to conclude that type 1 diabetes of mother rats causes reduced stress resistance of spermatogenic cells in their offspring.

Key words: diabetes, experiment, rat, testis, stress

Corresponding author: Sergei D. Antonov. E-mail: S.d.antonov@mail.ru

For citation: G.V. Bryukhin, S.D. Antonov. Characteristic of seminiferous epithelium of mature offspring of female rats with experimental type 1 diabetes under the influence of immobilization stress. Clin. exp. morphology 2019;8(3):48-54. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.48-54

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 09.08.2019. **Received in revised form** 29.08.2019. **Accepted** 18.09.2019.

Введение

Многочисленными экспериментальными исследованиями и клиническими наблюдениями установлена высокая вероятность наследования разнообразных изменений от матери, страдающей экстрагенитальными заболеваниями [1]. Так, известно, что патология матери обуславливает у потомства комплекс разнообразных микро- и ультраструктурных морфологических, нейрохимических, эндокринных, метаболических изменений, которые закрепляются в постнатальной жизни (явление внутриутробного программирования болезней) [2]. Среди экстрагенитальных заболеваний матери особое место занимает сахарный диабет 1-го типа, рост заболеваемости которого отмечается повсеместно, в том числе у женщин фертильного возраста [3]. При этом диабет вызывает долговременные нарушения у потомства, прежде всего в системе нейроэндокринной регуляции репродукции и гормональной адаптации [4].

Несмотря на многочисленные клинические наблюдения, остается практически не изученной роль сахарного диабета 1-го типа матери в нарушении морфофункционального становления мужской репродуктивной системы потомства.

Исходя из изложенного выше, целью настоящего исследования явился анализ морфофункционального состояния сперматогенного эпителия у половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа, подвергшегося иммобилизационному стрессу.

Материалы и методы

Работа выполнена на белых лабораторных крысах породы Вистар. Чтобы достигнуть поставленной цели, у половозрелых крыс (самок) до беременности моде-

лировали сахарный диабет 1-го типа по общепринятой методике с использованием стрептозотоцина [5] (Streptozotocin; MP Biomedicals, LLC; США), который вводили животным внутрибрюшинно трижды с интервалом 7 дней (по 2,5 мг на 100 г массы в первую и третью неделю и 2 мг на 100 г массы во вторую неделю). Всего за весь курс 10 животных с массой от 230 до 256 граммов получали по 17 мг стрептозотоцина, под влиянием которого у них развивался сахарный диабет, о чем свидетельствовало постоянное повышенное содержание сахара в крови ($32,56 \pm 2,44$ ммоль/л), которое сохранялось на протяжении как минимум трех месяцев. Подсадку к интактным самцам для спаривания проводили через 1 неделю после последнего введения стрептозотоцина. В результате рождались подопытные крысята, в эту группу вошли 19 крысят из 10 пометов, 10 крысят из которых представили группу «опыт», а оставшиеся 9 животных были подвергнуты действию иммобилизационного стресса и составили группу «опыт-стресс». В контрольную группу включили 18 крысят из 14 пометов, из которых 10 крысят вошли в интактную группу, 8 крысят – в группу «контроль-стресс».

Работа с лабораторными животными осуществлялась в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, от 18.03.1986. Все экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария ЮУГМУ. Выведение животных из эксперимента проводили методом декапитации под эфирным наркозом.

Объектом исследования явилось половозрелое потомство (70-дневное) самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа.

На серийных гистологических препаратах семенников, окрашенных гематоксилином и эозином, с помощью морфометрической установки (Motic BA400, Германия) проводили определение толщины сперматогенного эпителия. Оценку суммарного содержания сперматогенных клеток и их субпопуляционного состава, а также количества суспендоцитов из расчета на один извитой семенной каналец проводили по общепринятой методике [6]. Цитологический анализ клеток сперматогенного эпителия проводили при $\times 400$.

Кроме того, для оценки более тонких нарушений сперматогенного цикла экспериментальных животных определяли ряд общепринятых индексов, в том числе индекс сперматогенеза (отношение числа слоев сперматогенного эпителия к числу подсчитанных канальцев), индекс релаксации сперматогенеза (индекс напряженности сперматогенеза – отношение суммарного содержания зародышевых клеток различных типов, в том числе сперматогониев, сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов, к числу суспендоцитов) и герминативный индекс (отношение числа сперматогониев к числу суспендоцитов) [6].

Зрелые сперматозоиды получали из придатка семенника, разрезая его вдоль в среде дозированного количества 5% раствора глюкозы (в объеме 1 мл), предварительно подогретой до 37°C . Затем в камере Горяева определяли общее число сперматозоидов в 1 мл [7].

С целью изучения особенностей антистрессорной резистентности половых клеток семенников у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом нами моделировался стресс, который вызывали путем иммобилизации животных на спине в камере Когана. Первоначально иммобилизация продолжалась с 10.00 до 15.00. Затем после 2 часов отдыха животных вновь помещали в камеру на ночь. На следующее утро иммобилизацию прекращали до вечера. В 17.00 того же дня животных вновь подвергали иммобилизации до 10.00 утра [8].

Полученные результаты были статистически обработаны на компьютере с использованием программы IBM SPSS Statistics 19 и представлены в виде медианы и квартилей. Учитывая небольшую выборку животных, достоверность полученных результатов определяли при помощи непараметрического метода – критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми изменения считали при $p < 0,05$. В тех случаях, когда $p < 0,001$, в тексте и в таблице 1 приводится соответствующее примечание.

Результаты исследования

Прежде всего, нами установлено, что содержание сперматозоидов в 1 мл эпидидимальной взвеси у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом снижено по сравнению с группой контроля. Так, если у интактных животных исследуемый показатель составил 139 млн (121,75; 151,5), то у крысят из группы «опыт» он составил всего 94,5 млн (81,5; 113,75)

($p=0,001$). Известно, что сперматогенез является одним из наиболее чувствительных процессов к действию неблагоприятных факторов как экзогенного, так и эндогенного характера. В частности, многочисленными экспериментальными исследованиями и клиническими наблюдениями установлено, что сперматогенный эпителий характеризуется высокой чувствительностью к действию стрессорных факторов [9, 10]. Наши результаты также свидетельствуют о снижении у экспериментальных животных контрольной и опытной групп при действии иммобилизационного стресса общего числа сперматозоидов в 1 мл эпидидимальной взвеси. Так, установлено, что действие стрессового фактора вызывает уменьшение на 15,5% концентрации сперматозоидов у животных группы «контроль-стресс» – $117,5 \times 10^6$ (105,75; 126,25) относительно интактной группы и на 24,9% в группе «опыт-стресс» – 71×10^6 (63,75; 68,25), $p < 0,001$ по сравнению с группой «опыт».

Известно, что одним из критериев функционального состояния генеративной функции семенников является морфологическая характеристика семенных извитых канальцев. В связи с этим в следующей серии исследований нами был проведен морфологический анализ семенных извитых канальцев, в том числе сперматогенного эпителия.

Прежде всего, установлено, что стресс вызывает уменьшение толщины сперматогенного эпителия как у животных группы «контроль-стресс» (на 3,3%), так и у группы «опыт-стресс» (на 2,2%) (рис. 1, 2). Обращает на себя внимание, что толщина сперматогенного эпителия у подопытных крысят из группы «опыт-стресс» остается существенно меньше, чем в контроле (табл. 1).

Наибольший интерес представляют данные, отражающие состояние субпопуляционного состава сперматогенного эпителия. Установлено, что иммобилизационный стресс обуславливает уменьшение суммарного

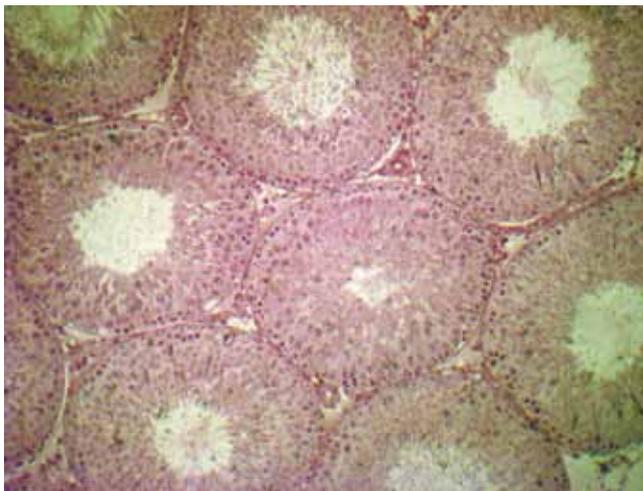


Рис. 1. Яичко 70-дневного крысенка группы «контроль-стресс». Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 1. Testicle of a 70-day-old rat «control-stress» group. H&E, $\times 100$

Таблица 1 / Table 1

Характеристика сперматогенного эпителия потомства самок крыс с экспериментальным диабетом, подвергнутого иммобилизационному стрессу (из расчета на один извитой семенной канал) Me (Q1; Q3)
Seminiferous epithelium characteristics of offspring of female rats with experimental type 1 diabetes under the influence of immobilization stress (per one convoluted seminiferous tubule) Me (Q1; Q3)

Параметры (Parameters)	«Контроль» (Control)	«Опыт» (Experiment)	«Контроль-стресс» (Control-stress)	«Опыт-стресс» (Experiment-stress)
Толщина сперматогенного эпителия (Seminiferous epithelium thickness)	94,4 (83,8; 105,1)	74,3 (72,1; 77,8) p<0,001	91,3 (87,6; 94,2)	72,7 (65,8; 73,8)** p=0,033
Сперматогенные клетки (Spermatogenic cells)	493,5 (480,3; 521,8)	338 (322; 350,8)* p<0,001	423,5 (372,4; 438,5)	216,3 (204,2; 231,3)** p<0,001
Сперматогонии (общ.) (Spermatogonia (total))	56,8 (52,7; 57,5)	50,5 (47,6; 52,5)* p=0,001	54,1 (51,9; 56,8)	36,1 (34,1; 40,0)** p<0,001
Сперматогонии А (Spermatogonia A)	12,0 (10,4; 13,3)	14,4 (11,8; 15,1) p=0,123	12,3 (10,9; 13,0)	15,6 (13,1; 18,3) p=0,101
Сперматогонии П (Spermatogonia P)	4,25 (3,82; 5,28)	3,63 (3,28; 3,8)* p=0,002	5,2 (4,8; 6,5)	3,64 (2,56; 4,23) p=0,932
Сперматогонии В (Spermatogonia B)	40,1 (37,5; 42,2)	33,4 (32; 35,3)* p<0,001	36,4 (34,6; 39,2)	17,8 (14,7; 19,7)** p<0,001
Сперматоциты (Spermatocytes)	94,1 (91,7; 96,3)	73,9 (66,8; 80,7)* p<0,001	69,5 (64,1; 79,1)	36,3 (33,3; 41,2)** (p<0,001)
Сперматиды (общ.) (Spermatids (total))	198,7 (178,3; 219,7)	113,5 (105,3; 136,4)* p<0,001	141,9 (132,5; 192,3)	73,5 (64,8; 95,9)** p<0,001
Ранние сперматиды (Early spermatids)	132,7 (128,2; 147,1)	82,6 (72,9; 96,9)* p<0,001	100,9 (92,0; 130,1)	48,1 (37,6; 59,4)** p<0,001
Поздние сперматиды (Late spermatids)	61,7 (49,2; 68,7)	34,5 (28,1; 41,5)* p<0,001	41,5 (36,0; 61,9)	28,7 (23,1; 35,1) p=0,101
Сперматозоиды (Spermatozoa)	155,7 (144,3; 160,0)	90,5 (73,3; 106,9)* p<0,001	131,2 (112,5; 150,3)	63,7 (54,9; 70,5)** p<0,001
Индекс сперматогенеза (Spermatogenesis index)	3,87 (3,82; 3,92)	3,6 (3,53; 3,68)* p<0,001	3,78 (3,7; 3,81)	3,43 (3,35; 3,46)** p=0,001
Герминативный индекс (Germinative index)	2,55 (2,39; 2,72)	2,28 (2,1; 2,4)* p=0,007	2,6 (2,4; 2,72)	1,73 (1,6; 1,83)** p<0,001
Индекс релаксации сперматогенеза (Spermatogenesis Relaxation Index)	22,8 (21,5; 24,2)	15,2 (13,9; 15,8)* p < 0,001	20,5 (17,7; 20,8)	10,1 (9,4; 10,9)** p<0,001

* – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем (p<0,05) / the results are statistically significant compared with the control group (p<0,05)

** – результаты статистически достоверны по сравнению с группой «контроль-стресс» (p<0,05) / the results are statistically significant compared with the control-stress group (p<0,05)

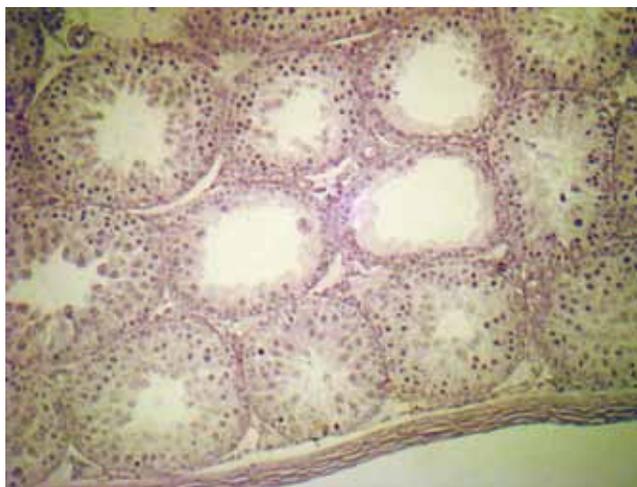


Рис. 2. Яичко 70-дневного крысенка группы «опыт-стресс». Уменьшены толщина сперматогенного эпителия и общее число половых клеток. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 2. Testicle of a 70-day-old rat of the «experiment-stress» group. The thickness of the seminiferous epithelium and the total number of germ cells have been reduced. N&E, $\times 100$

содержания сперматогенных клеток у экспериментальных животных. Так, в группе «контроль-стресс» данный показатель снизился на 14,2% по сравнению с интактной группой, в то время как у животных группы «опыт-стресс» содержание сперматогенных клеток на 36% ниже, чем в группе «опыт» (табл. 1). Уменьшение числа сперматогенных клеток обусловило у подопытных крысят снижение индекса сперматогенеза, представляющего собой отношение числа слоев сперматогенного эпителия к числу подсчитанных канальцев. Как видно из таблицы 1, в группе «контроль-стресс» исследуемый показатель снизился на 2,2%, в то же время у крысят группы «опыт-стресс» он стал меньше на 4,4%.

Согласно данным литературы, в составе сперматогенного пласта наибольшую чувствительность к действию экзогенных и эндогенных неблагоприятных факторов проявляют сперматогонии [9]. Нами установлено, что под влиянием стрессового воздействия в группе «опыт-стресс» происходит уменьшение фракции сперматогониев на 28,5% (по сравнению с группой «опыт»), в то время как у животных группы «контроль-стресс» исследуемый показатель относительно контроля снизился всего на 4,8%. При этом, как видно из таблицы 1, произошло изменение и субпопуляционного состава сперматогониев. В частности, уменьшилось содержание активных сперматогониев (сперматогонии В). Тем не менее обращает на себя внимание, что если у подопытных животных группы «опыт-стресс» содержание данной популяции клеток снизилось на 46,7% относительно группы «опыт», то в группе «контроль-стресс» всего на 9,2% по сравнению с интактными животными. Снижение суммарного содержания сперматогониев обусловило у экспериментальных животных обеих групп

изменение численного состава сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов в составе семенных извитых канальцев. При этом более выраженное изменение численности сперматогенных клеток наблюдается у потомства самок крыс с сахарным диабетом.

Общепризнанно, что наиболее чувствительным индикатором состояния генеративной функции семенников являются индекс релаксации сперматогенеза и герминативный индекс сперматогенеза [6]. Анализ полученных нами результатов позволяет констатировать, что иммобилизационный стресс обуславливает более выраженное снижение герминативного индекса, представляющего собой отношение суммарного содержания сперматогониев к числу sustentоцитов, у подопытных животных (на 24,1%), в то время как в группе сравнения данный показатель практически не изменился.

Еще одним показателем, отражающим состояние сперматогенеза, является индекс релаксации (индекс напряженности сперматогенеза – отношение суммарного содержания зародышевых клеток различных типов, в том числе сперматогониев, сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов, к числу sustentоцитов). Как видно из таблицы 1, под влиянием стрессового воздействия у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом происходит более выраженное снижение индекса релаксации сперматогенеза (на 33,6%) по сравнению с группой контроля (на 10,1%). Таким образом, выявленное более выраженное снижение индекса релаксации у подопытных животных свидетельствует об уменьшении доли сперматогенных клеток относительно стабильной и достаточно резистентной к воздействиям популяции sustentоцитов.

Обсуждение

Установлено, что сахарный диабет сопровождается развитием в организме гипергликемии и гиперкетонемии. Можно предположить, что в силу повышения проницаемости плаценты [11] глюкоза и кетоновые тела в избытке проникают в кровь плода. Избыточная концентрация сахара в крови обуславливает транзиторную гиперплазию бета-клеток островков Лангерганса плода. Развивающийся гиперинсулинизм плода в конечном счете приводит к развитию гипогликемии, являющейся одним из наиболее серьезных осложнений антенатального периода. Логично предположить, что именно гипогликемия и гиперкетонемия могут быть основными причинными факторами нарушения процессов пролиферации и дифференцировки сперматогенного эпителия семенников, в том числе зачаткового эпителия у подопытных крысят.

Одним из важнейших компонентов сперматогенного пласта являются sustentоциты, которые, согласно современным представлениям, вырабатывая многочисленные биологически активные соединения (ингибин, активин, инсулиноподобный фактор роста-1, трансформирующие факторы роста альфа

и бета и др.), прямо или опосредованно регулируют активность тестостеронпродуцирующих эндокриноцитов и, как следствие, активность стероидогенеза [12]. Ранее в специальной серии исследования нами установлено, что у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом имеет место снижение числа клеток Лейдига семенников, в частности их активной фракции. В то же время известно, что клетки Лейдига являются основными структурными элементами, продуцирующими тестостерон, который диффундирует через базальную мембрану в суспензии, где превращается в более активный дигидротестостерон, который затем поступает в просвет семенных извитых канальцев и участвует в регуляции сперматогенеза и спермиогенеза [13, 14]. Вместе с тем известно, что тестостеронпродуцирующая активность клеток Лейдига семенников угнетается под действием кортикостероидов. Можно предположить, что при иммобилизационном стрессе создается высокий уровень концентрации кортикостероидов, что еще в большей степени угнетает секреторную активность клеток Лейдига. В конечном счете это приводит к нарушению процесса сперматогенеза, наиболее выраженному у подопытных животных и проявляющемуся в снижении концентрации сперматозоидов, уменьшении суммарного содержания сперматогенных клеток и изменении их субпопуляционного состава.

Заключение

В целом полученные результаты позволяют сделать вывод, что у половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом происходит снижение стрессрезистентности сперматогенных клеток, о чем свидетельствует более выраженное, чем в контроле, уменьшение общего числа сперматозоидов, а также уменьшение суммарного содержания сперматогенных клеток и изменение их субпопуляционного состава.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.В. Брюхин.
Сбор и обработка материала – Г.В. Брюхин, С.Д. Антонов.
Статистическая обработка данных – Г.В. Брюхин, С.Д. Антонов.
Написание текста – Г.В. Брюхин, С.Д. Антонов.
Редактирование – Г.В. Брюхин, С.Д. Антонов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – G.V. Bryukhin.
Collected the data – G.V. Bryukhin, S.D. Antonov.
Performed the analysis – G.V. Bryukhin, S.D. Antonov.
Wrote the paper – G.V. Bryukhin, S.D. Antonov.
Edited the manuscript – G.V. Bryukhin, S.D. Antonov.

Литература/References

1. *Кожевникова С.А., Будневский А.В., Овсянников Е.С., Малыш Е.Ю., Белов В.Н.* Хроническая обструктивная болезнь легких и сахарный диабет: взгляд на эпидемиологию, патогенетические механизмы, лечение. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016;4:122–127.
2. *Кроненберг Г.М., Мелмед Ш., Полонски К.С., Ларсен П.П.* Сахарный диабет и нарушения углеводного обмена. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 448 с.
Kronenberg GM, Melmed Sh, Polonski KS, Larsen PR. Diabetes and carbohydrate metabolism. Moscow: GEOTAR-Media, 2010, 448 p. (In Russ.).
3. Дедов И.И., Шестакова М.В. (ред.). Сахарный диабет: острые и хронические осложнения. Москва: Медицинское информационное агентство, 2011. 480 с.
Dedov II, Shestakova MV, eds. Diabetes mellitus: acute and chronic complications. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2011. 480 p. (In Russ.).
4. *Питер-Хармел Э., Матур Р.* Сахарный диабет: диагностика и лечение. Москва: Практика, 2008, 496 с.
Piter-Kharmel E, Matur R. Diabetes mellitus: diagnosis and treatment. Moscow: Praktika, 2008. 496 p. (In Russ.).
5. *Закирьянов А.Р., Плахотный М.А., Онищенко Н.А., Володина А.В., Клименко Е.Д., Кобозева Л.П. и др.* Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2007;(4):21–25.
Zakirianov AR, Plakhotny MA, Onischenko NA, Volodina AV, Klimenko ED, Kobozeva LP et al. Diabetic complications in rats in long-term modeling of type I diabetes mellitus. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2007;(4):21–25 (In Russ.).
6. *Иванов Ю.В.* Цитологические критерии состояния сперматогенеза в токсиколого-гигиенических исследованиях. Гигиена и санитария. 1986;(4):52–55.
Ivanov YuV. Cytological criterions for spermatogenesis in toxicological and hygienic studies. Gigiena i sanitariya. 1986;(4):52–55 (In Russ.).
7. *Тиктинский О.Л., Михайличенко В.В.* Андрология. Санкт-Петербург: Медиа Пресс, 1999. 464 с.
Tiktinskiy OL, Mikhailichenko VV. Andrology. Saint-Petersburg: Media Press, 1999. 464 p. (In Russ.).
8. *Лобанова Н.Н., Панушева Н.И., Белова Т.И.* Изменения содержания катехоламинов в структурах мозга крыс, перенесших иммобилизационный стресс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1986;(11):526–527.
Lobanova NN, Panusheva NI, Belova TI. Changes in the content of catecholamines in the brain structures of rats undergoing immobilization stress. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 1986;(11):526–527 (In Russ.).
9. *Золотарева Т.А., Настуллин Б.А., Ярошенко Н.А.* Современное представление о механизмах стрессобусловленных изменений активности сперматогенеза. Світ медицини та біології. 2011;(4):134–137.
Zolotareva TA, Nasibullin BA, Yaroshenko NA, Zmievskiy AV. Modern concepts of stress-induced changes of spermatogenesis' activity. The world of medicine and biology. 2011;(4):134–137 (In Russ.).

10. Fenster L, Katz DF, Wyrobek AJ, Pieper C, Rempel DM, Oman D et al. Effects of psychological stress on human semen quality. *J Androl.* 1997;18(2):194–202. DOI: 10.1002/j.1939-4640.1997.tb01900.x.
11. Капустин П.В., Оноприйчук А.Р., Аржанова О.Н. Патофизиология плаценты и плода при сахарном диабете. Журнал акушерства и женских болезней. 2018;67(6):79–92. Капустин РВ, Оноприйчук АР, Аржанова ОН. Pathophysiology of the placenta and fetus in diabetes mellitus. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2018;67(6):79–92 (In Russ.). DOI: 10.17816/jowd67679-92.
12. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. Клетки Лейдига семенников позвоночных (онтогенез, ультраструктура, цитофизиология, факторы и механизмы регуляции). Оренбург: Издательство ОрГМА, 2010. Shevlyuk NN, Stadnikov AA. Leydig cells of the testicles of vertebrates (ontogenesis, ultrastructure, cytophysiology, factors and mechanisms of regulation). Orenburg: Izdatel'stvo OrGMA, 2010 (In Russ.).
13. Alves MG, Martins AD, Cavaco JE, Socorro S, Oliveira PF. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. *Tissue Barriers.* 2013;1(2):e23992. DOI: 10.4161/tisb.23992.
14. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Restoration of Spermatogenesis in Infertile Mice by Sertoli Cell Transplantation. *Biol Reprod.* 2003; 68(3):1064–71. DOI: 10.1095/biolreprod.102.009977.

Информация об авторах

Геннадий Васильевич Брюхин – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Сергей Дмитриевич Антонов – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Author information

Gennady V. Bryukhin – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Histology, embryology and cytology, South Ural State Medical University <https://orcid.org/0000-0002-3898-766X>.

Sergei D. Antonov – Post-graduate student, Department of Histology, embryology and cytology, South Ural State Medical University <https://orcid.org/0000-0002-3166-5270>

Сравнительная характеристика методов выделения клеток сперматогенного эпителия

Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, А.М. Косырева, М.В. Кондашевская, М.А. Диатроптова, И.С. Цветков, А.А. Степанов, Л.П. Михайлова, К.А. Артемьева

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

Введение. Для изучения биохимических и молекулярно-биологических механизмов процессов сперматогенеза в норме и при его нарушениях необходимо получить изолированные клетки сперматогенного эпителия разных стадий дифференцировки. Клетки сперматогенного эпителия соединены между собой плотными контактами и цитоплазматическими мостиками, разрушение которых позволяет получить суспензию клеток. Для разделения клеток используют ряд методов, включая механический и ферментативные. Состав, концентрация ферментов и время воздействия, применяющиеся разными авторами, широко варьируют. Тем не менее работы по сравнительной оценке эффективности методов выделения клеток сперматогенного эпителия в литературе отсутствуют.

Цель исследования: проведение сравнительного анализа эффективности механического и ферментативных методов выделения клеток сперматогенного эпителия у мышей и определение оптимального способа.

Материалы и методы. В работе использованы самцы половозрелых мышей линии С57BL/6. Клетки выделяли в соответствии с протоколами ферментативных методов по M.L. Meistrich (n=10 – число семенников), Н.Н. Мушкамбарову (n=8) – с использованием ферментов коллагеназы, трипсина, ДНКазы в разных концентрациях, Т.Г. Pretlow (n=12) – с использованием фермента проназы, Y. Wang (n=8) – с применением фермента гиалуронидазы и механического метода по D. Lam (n=8). Оценивали количество полученных клеток на 1 мг ткани семенника, их жизнеспособность и наличие симпластов (реагрегатов).

Результаты. При использовании разных ферментов, включая проназу, после выделения клеток сперматогенного эпителия и через сутки хранения суспензии клеток в культуральной среде при температуре +4°C получено большое количество клеток сперматогенного эпителия, и их жизнеспособность составила 87–91%. При механическом методе выделения клеток сперматогенного эпителия количество полученных клеток было большим, но наблюдали их низкую жизнеспособность и прогрессирующую гибель в течение суток.

Заключение. По результатам сравнительного анализа оптимальным для выделения клеток сперматогенного эпителия является метод с проназой E. Он позволяет получить достаточное количество жизнеспособных клеток с небольшим числом симпластов.

Ключевые слова: сперматогенный эпителий, сперматоциты, сперматиды, методы выделения

Для корреспонденции: Елена Алексеевна Пономаренко. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

Для цитирования: Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, А.М. Косырева, М.В. Кондашевская, М.А. Диатроптова, И.С. Цветков, А.А. Степанов, Л.П. Михайлова, К.А. Артемьева. Сравнительная характеристика методов выделения клеток сперматогенного эпителия. Клини. эксп. морфология. 2019;8(3):55-63. DOI: 10.31088/СЕМ2019.8.3.55-63

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 26.06.2019. Получена после рецензирования 20.08.2019. Принята в печать 18.09.2019.

Comparative characteristics of spermatogenic cells isolation methods

E.A. Ponomarenko, O.V. Makarova, A.M. Kosyeva, M.V. Kondashevskaya, M.A. Diatroptova, I.S. Tsvetkov, A.A. Stepanov, L.P. Mikhailova, K.A. Artem'eva

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. To study the biochemical and molecular-biological mechanisms of spermatogenesis in the normal condition and after its violations, it is necessary to obtain isolated spermatogenic cells of different stages of differentiation. Spermatogenic cells are interconnected by tight contacts and cytoplasmic bridges, the destruction of which allows to obtain a suspension of cells. A number of methods are used to separate cells, including

mechanic and enzymatic ones. The composition, concentration of enzymes, and exposure times used by various authors vary widely. However, there are no works about a comparative assessment of the effectiveness of methods for isolated spermatogenic cells in the literature. The aim is conduction of a comparative analysis of the effectiveness of mechanic and enzymatic methods of spermatogenic cells isolation in mice and determine the optimal method.

Materials and methods. We used male adult C57Bl/6 mice. Cells were isolated in accordance with the protocols of enzymatic methods: according to M.L. Meistrich (the number of testes is 10 (n=10), N.N. Mushkambarov (n=8) – with using collagenase, trypsin, DNase in different concentrations, T.G. Pretlow (n=12) – with using pronase, Y.Wang (n=8) – with using the enzyme hyaluronidase; and the mechanic method according to D.Lam (n=8). The number of cells obtained per 1 mg of testis tissue, their viability and the presence of symplasts (reaggregates) were evaluated.

Results. A large number of spermatogenic cells were obtained and their viability was 87–91% by using various enzymes after isolation of spermatogenic cells, including pronase, and following 24 hours of storage of cell suspension in a culture medium at 4°C. Using of the mechanic isolation method, the number of obtained epithelial cells was big, but their viability was low and progressive death were observed during the day.

Conclusion. According to the results of the comparative analysis, the optimal method for isolation of spermatogenic cells is the enzymatic method with pronase E. It allows to get a high quantity of viable cells with a small number of symplasts.

Key words: seminiferous epithelium, spermatocytes, spermatids, isolation methods

Corresponding author: Elena A. Ponomarenko. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

For citation: E.A. Ponomarenko, O.V. Makarova, A.M. Kosyreva, M.V. Kondashevskaya, M.A. Diatroptova, I.S. Tsvetkov, A.A. Stepanov, L.P. Mikhailova, K.A. Artem'eva. Comparative characteristics of spermatogenic cells isolation techniques. Clin. exp. morphology. 2019;8(3):55-63. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.55-63

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 26.06.2019. **Received in revised forms** 20.08.2019. **Accepted** 18.09.2019.

Введение

Клетки сперматогенного эпителия разных стадий дифференцировки имеют характерные цитологические признаки. Они отличаются по диаметру, площади поперечного сечения, плотности, что позволяет проводить их выделение [1]. Получение клеток сперматогенного эпителия разных стадий дифференцировки необходимо для изучения биохимических и молекулярно-биологических механизмов процессов сперматогенеза в норме и при его нарушениях [1–3]. Клетки сперматогенного эпителия разделяют путем центрифугирования в градиенте плотности фикола, перкола, ренографина, глицерина, в STU-PUT системе при 1g (седиментация под действием гравитации) и с помощью сортера клеток [2–5].

Важным подготовительным этапом к разделению клеток является их выделение из семенников. Клетки сперматогенного эпителия дифференцируются в составе клонов, где они связаны между собой и с клетками Сертоли с помощью цитоплазматических мостиков. Между клетками сперматогенного эпителия также наблюдают плотные контакты, щелевые и десмосомные межклеточные соединения [6, 7]. Вследствие указанных особенностей строения сперматогенного эпителия выделение клеток из семенников имеет ряд трудностей. Так, при получении суспензии клеток не только нарушаются межклеточные соединения, но и происходит повреждение клеток со снижением их жизнеспособности. Нарушение цитоплазматических мостиков может приводить к последующему слиянию (реагрегации) клеток в суспензии с образованием симпластов, кото-

рые осаждаются быстрее и препятствуют эффективному разделению клеток [1]. Все эти проблемы привели к появлению разных методов выделения клеток сперматогенного эпителия, включая механический и ферментативные. Состав, концентрация ферментов и время воздействия, использующиеся разными авторами, варьируют [1, 2, 4–6, 8–10].

Тем не менее сравнительный анализ методов выделения клеток сперматогенного эпителия, предложенных разными авторами, включая механическое [3] и ферментативные [4, 6, 8, 9], не проводили.

Цель работы – проведение сравнительного анализа эффективности механического и ферментативных методов выделения клеток сперматогенного эпителия у мышей и определение оптимального способа.

Материалы и методы

При исследовании использовали самцов мышей линии C57BL/6 массой тела 24–28 граммов (питомник «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России). В работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года). Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Проводили забор семенников для дальнейшего выделения клеток сперматогенного эпителия.

Для получения суспензии клеток сперматогенеза нами были выбраны метод механического разделения

клеток по D. Lam [3] (количество семенников в группе: $n=8$) и методы ферментативной обработки: с применением ферментов коллагеназы, трипсина, ДНКазы по M.L. Meistrich [4] ($n=10$), по Н.Н. Мушкамбарову с соавт. [6] ($n=8$), гиалуронидазы по Y. Wang [9] ($n=8$), проназы E по T.G. Pretlow [8] ($n=12$).

Сравнительную оценку методов выделения клеток осуществляли в соответствии с рекомендациями Н.Н. Мушкамбаров (1982) и M.L. Meistrich (1977) по количеству клеток, полученных из 1 мг ткани семенника мыши, жизнеспособности клеток и выраженности агрегации [6, 11].

Механическое выделение клеток

Выделение клеток из семенников проводили по D. Lam и Р.Я. Фрешни [3, 12]. Семенные каналцы рассекали на фрагменты 3–5 мм и последовательно пропускали их через клеточное сито с диаметром пор 100 мкм, а затем 70 мкм. Клетки хранили в культуральной среде DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия) с 10% FCS (Fetal Calf Serum, PAA laboratories GmbH, Австрия) в течение суток при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Ферментативное выделение клеток

Метод M.L. Meistrich [4] заключался в рассечении каналцев семенников на фрагменты около 0,2 мм. С учетом того, что это трудоемкий процесс, мы модифицировали методику M.L. Meistrich [4] и сделали ее более щадящей. Семенники освобождали от белочной оболочки, затем одним блоком семенные каналцы переносили в раствор коллагеназы IV типа (Worthington Biochemical Corporation, США) – 0,16 мг/мл, в течение 20 минут инкубировали при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе. Далее каналцы переносили в DPBS (раствор Дюльбекко) и ресуспендировали. После трехкратного отмывания в DPBS фрагменты семенных каналцев осаждали в течение 2 минут. Надосадек удаляли, проводили дополнительное рассечение тканевых фрагментов и добавляли 5 мл предварительно подогретого до 37°C 0,25% трипсина («Панэко», Россия) и 40 мкг/мл ДНКазы (AppliChem, Германия), инкубировали в CO_2 -инкубаторе 8 минут. Суспензию клеток и остатки семенных каналцев пропускали через клеточное сито (диаметр пор 100 мкм) и добавляли 10 мл DPBS с 0,1% глюкозой и 5 mM DNA (2-naphthol-6,8-disulfonic acid, dipotassium salt, TCI, Япония)). По данным M.L. Meistrich [11], при использовании DNA жизнеспособность клеток повышалась на 35%, и в итоге она составила 98%. Тем не менее после применения DNA автор отмечал разрушение акросом, потерю цитоплазмы, жгутиков и мембран в продолговатых сперматидях. Полученную суспензию клеток мы центрифугировали при 320 g в течение 10 минут. Супернатант удаляли и к осадку добавляли среду DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия) с 10% FCS (PAA laboratories GmbH, Австрия), клетки ресуспен-

дировали и хранили при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение суток.

При выделении клеток семенников по Y. Wang [9] нами были изменены состав ферментов и их концентрация. На первом этапе выделения использовалась коллагеназа IV типа (Worthington Biochemical Corporation, США) в концентрации 0,16 мг/мл, а на втором – 1 mM раствор EDTA для связывания ионов кальция и гиалуронидаза (Sigma, США) – 0,02 мг/мл – для разрушения межклеточных соединений.

Метод выделения по Н.Н. Мушкамбарову [6], применяемый нами, не отличался от авторского. Были использованы растворы ферментов: 0,16 мг/мл коллагеназа типа IV (Worthington Biochemical Corporation, США), (20 минут, 33°C), 2,5 мг/мл трипсин («Панэко», Россия) и 0,002 мг/мл ДНКазы (AppliChem, Германия) (8 минут, 33°C).

При ферментативном выделении клеток сперматогенного эпителия по T.G. Pretlow [8] вместо трипсина использовали фермент проназу E. Выполняли забор семенников, помещали их в культуральную среду 199 («Панэко», Россия) при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Делали небольшой надрез белочной оболочки семенника и извлекали извитые семенные каналцы одним блоком.

Семенные каналцы помещали в раствор DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия), 0,16 мг/мл коллагеназы типа IV (Worthington Biochemical Corporation, США), 5% фетальной сыворотки – FCS (PAA laboratories GmbH, Австрия) и инкубировали 20 минут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе. Раствор коллагеназы позволяет разобщить каналцы и удалить интерстициальные клетки [13]. После инкубации с раствором коллагеназы семенные каналцы единым блоком переносили в раствор DPBS, без Ca^{2+} , Mg^{2+} («Панэко», Россия), 0,5% FCS и бережно пипетировали, используя наконечник с широким просветом. После оседания семенных каналцев супернатант, содержащий интерстициальные клетки и клетки каналцев, удаляли. Процедуру повторяли 2–3 раза.

Затем семенные каналцы переносили в инкубационную среду следующего состава: DMEM с 25 mM HEPES, 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия), 0,05% проназы E (Sigma, США,), 20 мкг ДНКазы (AppliChem, Германия). Семенные каналцы инкубировали в течение 10 минут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, затем осторожно пипетировали.

Следует отметить, что проназа E активируется в присутствии ионов магния и кальция (DMEM содержит ионы магния) и инактивируется хелатными соединениями (EDTA) или при отмывании клеток растворами, не содержащими Ca^{2+} , Mg^{2+} (DPBS).

Суспензию клеток и остатки семенных каналцев пропускали через клеточное сито с диаметром пор 100 мкм с помощью поршня шприца с резиновым покрытием. Суспензию клеток переносили в пробирку и добавляли 10 мл DPBS с 0,1% глюкозы, 5 mM DNA (2-naphthol-6,8-disulfonic acid, dipotassium salt,

ТС1, Япония), 0,5% FCS. Центрифугировали при 320 g 10 минут при 4°C. Клетки помещали в среду DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы с 10% FCS, 20 мкг/мл гентамицина и 2 mM глутамина («Панэко», Россия).

После выделения клеток сперматогенного эпителия и через сутки после хранения суспензии определяли абсолютное количество половых клеток на 1 мг ткани семенника, их жизнеспособность и выраженность реагрегации.

Оценку жизнеспособности выделенных половых клеток проводили по методу Шрека [14]. К 200 мкл трипанового синего (0,1% раствор на дистиллированной воде) («Биохиммак», Россия) и 200 мкл эозина (0,1% раствор на 2xPBS) («Биохиммак», Россия) добавляли суспензию клеток в объеме 100 мкл. При выделении клеток сперматогенного эпителия по T.G. Pretlow [8] оценку жизнеспособности проводили не только по методу Шрека, но и с использованием эозина и пропидий йодида.

Оценку жизнеспособности клеток с помощью только эозина выполняли по методике, предложенной в руководстве ВОЗ [15]. Готовили 0,5% раствор эозина на 0,9% растворе NaCl. Затем на предметное стекло наносили 5 мкл суспензии клеток семенника мыши и 5 мкл раствора эозина, каплю покрывали покровным стеклом 20×22 мм и считали окрашенные (погибшие) клетки под фазово-контрастным микроскопом в расчете на 200 клеток.

Жизнеспособность клеток также определяли при окраске пропидий йодидом с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Раствор пропидия йодида (Propidium iodide, Sigma, США) готовили из расчета 0,1 мг/мл раствора (0,3 M NaCl, 0,03M цитрат натрия, pH 7,0). К 1 мл клеточной суспензии в PBS добавляли 20 мкл раствора пропидия йодида и инкубировали 30 минут при температуре +37°C [16]. Долю жизнеспособных клеток определяли с помощью проточного цитофлуориметра (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, США).

В суспензии клеток, выделенных из семенника мыши, под микроскопом (×400) оценивали наличие симпластов и их размер.

Важной характеристикой метода выделения клеток из семенников является наличие клеток сперматогенного эпителия всех стадий дифференцировки. В связи с этим в мазках проводили дифференцированный подсчет клеток сперматогенного эпителия, выделенных из семенника. Мазок высушивали и фиксировали в жидкости Шабадша, проводили ШИК-реакцию и окрашивали гематоксилином («Биохиммак», Россия) [17]. Затем проводили докрасивание цитоплазмы эозином в течение 1–2 секунд.

Статистический анализ проводили при помощи программы Statistical10 (StatSoft, США). Непрерывные количественные данные описывали медианой и квартилями (Q25% и Q75%). Дисперсионный анализ про-

водили критерием Краскела–Уоллиса. При наличии статистической разницы применяли попарное сравнение групп методом Манна–Уитни. При множественном сравнении групп использовали поправку Бонферрони. Нулевая гипотеза отвергалась при ошибке первого рода менее 5% с учетом эффекта множественного сравнения. Статистические различия зависимых выборок – жизнеспособность клеток сперматогенного эпителия после выделения и через сутки – оценивали критерием Вилкоксона.

Результаты исследования

При сравнительном анализе методов выделения клеток из семенников получены статистически значимые различия по количеству клеток на 1 мг ткани семенника. Сравнение методов выделения позволило выявить, что при механическом методе наблюдается максимальное количество клеток на 1 мг семенника мыши $4,3(3,6; 4,5) \times 10^5$ по сравнению с методами M.L. Meistrich ($p=0,0002$), Y. Wang ($p=0,006$), Н.Н. Мушкамбарова ($p=0,001$) и T.G. Pretlow ($p=0,000009$) (табл. 1). Ферментативные методы по Y. Wang с гиалуронидазой и по Н.Н. Мушкамбарову с низкой концентрацией коллагеназы и трипсином дают сопоставимое число клеток ($p=0,3$), так же, как и ферментативные методы по M.L. Meistrich и по T.G. Pretlow (с проназой E) ($p=0,5$). Метод Y. Wang дает большее число клеток по сравнению с методами M.L. Meistrich ($p=0,0003$) и T.G. Pretlow ($p=0,0003$). Так же, как и метод Н.Н. Мушкамбарова дает большее число клеток по сравнению с методами M.L. Meistrich ($p=0,009$) и T.G. Pretlow (с проназой) ($p=0,002$).

Количество полученных жизнеспособных клеток (в процентах) статистически значимо различалось между группами. Наименьший процент жизнеспособных клеток получен при механическом выделении клеток по сравнению с ферментативным методом по M.L. Meistrich ($p=0,0002$), выделением клеток по Н.Н. Мушкамбарову ($p=0,0007$) и при использовании фермента проназы E ($p=0,00009$). Показатели жизнеспособности клеток сперматогенного эпителия при механическом выделении сопоставимы с таковыми при использовании метода Y. Wang (с гиалуронидазой) ($p=0,13$). При выделении клеток ферментативными методами по M.L. Meistrich, по Н.Н. Мушкамбарову и по T.G. Pretlow (с проназой E) показатели содержания жизнеспособных клеток в сравниваемых группах статистически значимо не различались ($p=0,3$). Таким образом, несмотря на высокий выход клеток, при механическом способе выделения жизнеспособность была выше при применении всех ферментативных методов, кроме метода с использованием гиалуронидазы.

Большое количество работ по выделению клеток, а затем их разделению в градиенте плотности предполагает проведение двух этапов: первый этап – выделение клеток (1-е сутки), второй этап – разделение в STU-PUT системе (2-е сутки), поэтому была проведена оценка

Таблица 1 / Table 1

Сравнительный анализ методов выделения клеток семенника мыши по показателям абсолютного числа клеток и их жизнеспособности сразу и через сутки после выделения Me (Q25%; Q75%)
Comparative analysis of methods for isolating mouse spermatogenic cells by the absolute number of cells and their viability immediately and one day after the isolation Me (Q25%; Q75%)

Показатели	Методы					p*
	механический [3] (n=8)	ферментативный				
		1. по M.L. Meistrich [4] (n=10)	2. по Y. Wang [9] (n=8)	3. по Н.Н. Мушкамбарову [6] (n=8)	4. по T.G. Pretlow [8] (n=12)	
Количество клеток на 1 мг семенника $\times 10^5$	4,3 (3,6;4,5)	1,2 (0,9;1,8)	2,6 (2,2;3,1)	2,5 (1,6;2,8)	1,3 (0,8;1,4)	0,0001
Жизнеспособность после выделения, метод Шрека	57 (50;64)	91 (87;94)	64 (58;71)	87 (82;92)	91 (88;94)	0,0001
Жизнеспособность через сутки после выделения, метод Шрека	42 (36;48)	69 (53;78)	51(45;53)	73 (69;85)	80 (75;87)	–

p* – тест Краскела–Уоллиса. Сравнительный анализ между группами проводили только при получении суспензии клеток по показателям количества клеток на 1 мг семенника мыши и их жизнеспособности после выделения

p* – Kruskal–Wallis test. A comparative analysis between the groups was carried out only after obtaining a suspension of cells in terms of the cell number per 1 mg of mouse testis and their viability after isolation

их жизнеспособности через сутки после выделения. Показано, что при механическом способе медиана их жизнеспособности снижалась с 57% до 42% ($p=0,037$), что свидетельствует о прогрессирующей гибели клеток в течение суток.

При ферментативных методах выделения клеток в течение суток также наблюдалась их гибель. Так, при выделении клеток по M.L. Meistrich медиана их жизнеспособности снижалась с 91 до 69% ($p=0,005$). Схожую динамику уменьшения количества жизнеспособных клеток через сутки наблюдали при использовании протоколов по Н.Н. Мушкамбарову – с 87 до 73% ($p=0,01$) и по Y. Wang (с гиалуронидазой) – с 64 до 51% ($p=0,005$).

При использовании протокола по T.G. Pretlow (с проназой E) жизнеспособность клеток сперматогенного эпителия сохранялась на высоком уровне и составила 80% через сутки после выделения ($p=0,006$).

Важным показателем качества выделенных из семенника клеток является их способность образовывать реакрегагаты – симпласты. Из всех методов наименьшее количество симпластов через сутки наблюдали при использовании фермента проназы E.

Для оценки жизнеспособности клеток, полученных при всех методах выделения, использовали способ Шрека. Поскольку существуют и другие методы

оценки жизнеспособности, мы провели сравнительный анализ результатов на примере оптимального протокола T.G. Pretlow (табл. 2).

При сравнении результатов всех трех использованных методов оценки жизнеспособности клеток сперматогенного эпителия статистически значимые различия показателей не выявлены ($p=0,12$), в то время как через сутки при использовании оценки жизнеспособности клеток с пропидием йодидом показатель был достоверно выше в сравнении с методами Шрека ($p=0,006$) и эозином ($p=0,006$) (табл. 2). Сравнение двух методов оценки жизнеспособности клеток только с эозином и по методу Шрека различия не выявило ($p=0,5$). Возможно, выявленные различия связаны с тем, что окраска эозином является цитоплазматической, трипановый синий/эозин – ядерной и цитоплазматической, а пропидием йодидом – только ядерной. Очевидно, нарушение плазматической мембраны клеток предшествует повреждению ядерной [18].

При оценке качественного состава полученной суспензии клеток сперматогенного эпителия (табл. 3) морфологию клеток определяли по признакам, описанным нами ранее [19]. При использовании метода выделения клеток с проназой E в мазках отсутствовали клетки на стадиях I и II мейотического деления, что может быть связано с небольшой продолжительностью этого пе-

Таблица 2 / Table 2

Различные методы определения показателей жизнеспособности клеток семенника мыши при выделении клеток сперматогенеза с использованием фермента проназы Е (n=12), Me (Q25%; Q75%)
 Different methods for determining the viability of mouse spermatogenic cells using pronase E (n=12), Me (Q25%; Q75%)

Сроки	Метод оценки жизнеспособности			p*
	метод Шрека (трипановый синий/эозин)	метод с пропидий йодидом	метод с эозином	
Жизнеспособность сразу после выделения клеток (%)	89 (88;94)	93 (90;94)	90 (88;93)	0,12
Жизнеспособность через сутки после выделения клеток (%)	80 (75;87)	89 (86;91)	84 (81;86)	0,005

p* – тест Краскела–Уоллиса

p* – Kruskal–Wallis test

Таблица 3 / Table 3

Состав суспензии клеток (%), полученной при их выделении с ферментом проназа Е
 (через сутки после выделения), n=10

The composition of the cell suspension (%) obtained by isolation with pronase E enzyme (one day after isolation), n=10

Тип клеток: сперматогонии	Me Q25%;Q75%	Деление: профаза I мейоза	Me Q25%;Q75%	Спермиогенез, сперматиды:	Me Q25%;Q75%
Тип A0	11,5 (5;16)	Прелептотена	8 (5;16)	Стадия I	14 (13;22)
Тип A1	7,5 (5;11)	Лептотена ранняя	3 (0;3)	Стадия II	14 (12;20)
Тип A2	3 (0;12)	Лептотена поздняя	51 (46;62)	Стадия III	10 (6;20)
Тип A3	8 (3;14)	Зиготена	21 (16;35)	Стадия IV	11 (6;22)
Тип A4	18,5 (11;23)	Пахитена	115 (106;130)	Стадия V	29,5 (19;32)
Тип Пр.	13 (7;17)	Диплотена	12,5 (8;20)	Стадия VI	31,5 (19;44)
Тип B	21,5 (13;29)	Диакинез	6,5 (3;7)	Стадия VII	37 (30;42)
		Метафаза I мейоза	0	Стадия VIII	61,5 (36;72)
		Анафаза I мейоза	0	Стадия IX	32,5 (22;41)
		Телофаза I мейоза	15,5 (7;20)	Стадия X	45,5 (39;49)
		Метафаза II мейоза	0	Стадия XI	66,5 (57;91)
Клетки Сертоли	20,5(7;32)	Анафаза II мейоза	0	Стадия XII (этапы 12–16)	252 (187;266)
Клетки Лейдига	3(0;10)	Телофаза II мейоза	0		

риода и тем, что клетки в процессе деления наиболее подвержены разрушению ферментами.

Обсуждение

При использовании методов выделения клеток сперматогенеза, предложенных в работах M.L. Meistrich [4], Н.Н. Мушкамбарова с соавт. [6], Y.Wang с гиалуронидазой [9], T.G. Pretlow с ферментом проназа Е [8] и D. Lam [3] при механическом разделении клеток, нами был проведен сравнительный анализ количественных показателей клеток сперматогенного эпителия на 1 мг семенника после выделения, а также их жизнеспособности сразу и через сутки после выделения.

Механический метод, предложенный D. Lam (1970), позволяет получить довольно высокий выход клеток.

Жизнеспособность их в полученной суспензии составляла около 57% и снижалась до 42% в течение суток. Необходимо отметить: неудовлетворительные результаты при механическом выделении клеток семенников отмечали и другие исследователи, что инициировало разработку ферментативных методов выделения [1, 4, 8, 13].

Ферментативный метод включает обработку коллагеназой IV типа, затем трипсином и ДНКазой. Теоретическое и практическое обоснование двухэтапного ферментативного выделения клеток исследователи связывают с тем, что при «мягкой» обработке коллагеназой удастся удалить интерстициальные клетки, затем под действием трипсина и ДНКазы разрушить непосредственно семенные каналы и выделить клетки

сперматогенного эпителия [13]. Большинство авторов – A.R. Bellve [1], T. Vuchou [10], J.M. Bryant [5], T. Garcia [13] – предлагают использовать коллагеназу IV типа в концентрации 1 мг/мл. Следует отметить, что при применении нами данной концентрации коллагеназы было сложно контролировать время обработки. Так, воздействие более 1 минуты вызывало полное разрушение семенных канальцев, частичное разрушение клеток и образование их массивных агрегатов, возможно, связанное с выходом ДНК из поврежденных клеток [1]. Недостаточная временная экспозиция с ферментом коллагеназой приводит к тому, что семенные канальцы не фрагментируются на отдельные участки. Последующее промывание DPBS останавливает разрушающее воздействие коллагеназы на семенные канальцы, но дальнейшее применение трипсина было неэффективным: удавалось экстрагировать только часть клеток канальцев за более продолжительный отрезок времени. В связи с этим оптимальным оказалось применение на первом этапе коллагеназы IV типа в низкой концентрации 0,16 мг/мл, как предложено Н.Н. Мушкамбаровым [6]. Результаты, полученные нами при использовании методов выделения клеток сперматогенного эпителия по Н.Н. Мушкамбарову [6] и M.L. Meistrich [11], оказались сопоставимыми. Отличие метода M.L. Meistrich [11] от метода выделения половых клеток по Н.Н. Мушкамбарову [6] состояло в измельчении канальцев и применении DNA(2-naphthol-6,8-disulfonic acid, dipotassium salt). При выделении клеток сперматогенного эпителия по Н.Н. Мушкамбарову [6] применяли только ферменты. Оба метода позволяют получить достаточное количество клеток с высокой жизнеспособностью. Следует отметить, что в суспензии клеток определяли большое количество симпластов. Это является препятствием для разделения клеток в градиенте плотности, поэтому был рассмотрен метод по Y. Wang (с гиалуронидазой) [9]. По этому методу среда для выделения клеток содержала высокую концентрацию коллагеназы 0,625 мг/мл на первом этапе обработки и ряд ферментов: трипсин, коллагеназу, гиалуронидазу, ДНКазу на втором. Учитывая предыдущий опыт применения коллагеназы, концентрацию фермента мы не увеличивали, оставив 0,16 мг/мл. Для разрушения плотных контактов и других межклеточных соединений сперматогенного эпителия канальцев на втором этапе использовали только EDTA и гиалуронидазу. При сравнительном анализе выделения клеток по методу Y. Wang (с гиалуронидазой) и других методов были выявлены низкая жизнеспособность полученных клеток и в течение суток ее прогрессирующее снижение. Эти результаты сопоставимы с данными, полученными при механическом способе выделения клеток. В связи с тем, что образовывались симпласты, был применен метод с использованием фермента проназы E в концентрации 0,05%, рекомендованной для выделения клеток из других тканей. По результатам сравнительного анализа при использовании этого метода количество

клеток в суспензии сохраняется в течение суток, и их жизнеспособность остается на высоком уровне (при выделении – 86–99%, через сутки – 74–92%). Симпласты клеток были единичными. Таким образом, метод выделения суспензии клеток сперматогенного эпителия T.G. Pretlow (с проназой E) является оптимальным.

Заключение

Протоколы ферментативного выделения половых клеток семенных канальцев многочисленны, но они не стандартизованы, и жизнеспособность полученных клеток сперматогенного эпителия в суспензии различается. Сравнительный анализ методов, приведенных в литературе, и предложенные нами изменения некоторых их этапов позволили разработать оптимальную схему получения большого количества жизнеспособных клеток из семенника мыши, основанную на использовании ферментов, включая проназу E.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова.

Сбор и обработка материала – Е.А. Пономаренко, А.М. Косырева, М.В. Кондашевская, М.А. Диатроптова, И.С. Цветков, А.А. Степанов, К.А. Артемьева.

Статистическая обработка данных – Е.А. Пономаренко.

Написание текста – Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, М.А. Диатроптова.

Редактирование – О.В. Макарова, А.М. Косырева, Л.П. Михайлова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Е.А. Ponomarenko, O.V. Makarova.

Collected and processed the data – Е.А. Ponomarenko, A.M. Kosyрева, M.V. Kondashevskaya, M.A. Diatroptova, I.S. Tsvetkov, A.A. Stepanov, K.A. Artem'eva.

Statistical analysis – Е.А. Ponomarenko.

Wrote the paper – Е.А. Ponomarenko, O.V. Makarova, M.A. Diatroptova.

Edited the manuscript – O.V. Makarova, A.M. Kosyрева, I.S. Tsvetkov, L.P. Mikhailova.

Литература/References

1. Bellve AR. Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. In: Wassarman P.M., DePamphilis M.L., editors. *Guida to techniques in mouse development. Methods Enzymol*, volum 225. New York: Academic Press; 1993. P. 84–113.
2. Глазков М.В. Фракционирование сперматогонических клеток крысы в нелинейном градиенте фиколла. *Онтогенез*. 1980;11(5):555–8.
Glazkov MV. Fractionation of the rat spermatogonial cells in the non-linear ficoll gradient. *Ontogenesis*. 1980;11(5):555–8. (In Russ.).
3. Lam DM, Furrer R, Bruce WR. The separation, physical characterization, and differentiation kinetics of spermatogonial cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1970;65(1):192–9.

4. *Meistrich ML*. Separation of mouse spermatogenic cells by velocity sedimentation. *J. Cell Physiol.* 1972;80(2):299–312.
5. *Bryant JM, Meyer-Ficca ML, Dang VM et al.* Separation of spermatogenic cell types using STA-PUT velocity sedimentation. *J. Vis. Exp.* 2013;80: <http://www.jove.com/video/50648>.
6. *Мушкхамбаров Н.Н., Волкова Н.П., Николаев А.Я.* Стабильность и жизнеспособность сперматогенных клеток после их выделения и фракционирования. *Цитология.* 1982;24(6): 719–23.
Mushkhambarov NN, Volkova NP, Nikolaev AY. Stability and viability of mouse spermatogenic cells after their isolation and separation. *Cytology.* 1982;24(6):719–23 (In Russ.)
7. *Бурнашева С.А., Габаева Н.С., Данилова Л.В., Князева Е.Ф., Костомарова А.А., Райцина С.С.* Современные проблемы сперматогенеза. Москва: Наука, 1982.
Burnasheva SA, Gabaeva NS, Danilova LV, Knyazeva EF, Kostomarov AA, Raitsina SS. Actual problems of spermatogenesis. Moscow: Nauka, 1982. (In Russ.)
8. *Pretlow TG, Scalise MM, Weir EE.* Separation of hamster testicular cells in successive stages of differentiation by velocity sedimentation in an isokinetic gradient of Ficoll in tissue culture medium. *Am. J. Pathol.* 1974;74(1):83–94.
9. *Wang Y, Culty M.* Preparation of enriched mouse syncytia-free pachytene spermatocyte cell suspensions. In: Chan WY., Blomberg LA., editors. *Germline Development. Methods Mol. Biol.*, volum 825. New York: Humana Press; 2012. P. 67–74.
10. *Buchou T, Tan M, Barral S et al.* Purification and analysis of male germ cells from adult mouse testis. In: Krämer OH, editor. *HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development. Methods Mol. Biol.*, volum 1510. New York: Humana Press; 2017. P. 159–168.
11. *Meistrich ML.* Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. In: Prescott DM (ed). *Methods Cell Biol.*, volum XV. New York: Academic Press; 1977. P. 15–54.
12. *Фреини Р.Я.* Культура животных клеток: Практическое руководство. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010.
Freshney RJ. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Moscow: BINOM. Laboratory of knowledge, 2010. (In Russ.)
13. *Garcia T, Hofmann MC.* Isolation of undifferentiated and early differentiating type A spermatogonia from Pou5f1-GFP reporter mice. In: Chan WY, Blomberg LA (eds). *Germline Development. Methods Mol. Biol.*, volum 825. New York: Humana Press; 2012. P. 31–44.
14. *Schrek R.* A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Ann. J. Cancer.* 1936;28:389–92.
15. Курило Л.Ф. (ред.) Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Москва: Капитал принт, 2012.
Kurilo LF. (ed.) WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Moscow: Capital print, 2012. (In Russ.)
16. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain [editorial], <http://www.thermofisher.com>. 2006.
17. *Пономаренко Е.А., Кузикянц С.А., Мхитаров В.А.* Модифицированный метод окраски акросом сперматид у мышей. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2017;2:72–5.
Ponomarenko EA, Kuzikyants SA, Mkhitarov VA. Modified acrosome staining for murine spermatids. *Clin. Exp. Morphology.* 2017;2:72–5 (In Russ.)
18. *Плосконос М.В.* Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека. *Клиническая и лабораторная диагностика.* 2014;11:22–5.
Ploskonos MV. The application of eosin and propidium iodide in evolution of vitality of human spermatozoa. *Russian clinical laboratory diagnostics.* 2014;11:22–5. (In Russ.)
19. *Пономаренко Е.А., Мхитаров В.А., Кузикянц С.А., Золотова Н.А., Хочанский Д.Н., Цветков И.С. и др.* Цитологическая характеристика клеток сперматогенного эпителия у мышей C57BL/6. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2018;3:42–51.
Ponomarenko EA, Mkhitarov VA, Kuzikyants SA, Zolotova NA, Khochansky DN, Tsvetkov IS et al. Cytological characteristic of spermatogenic epithelium cells in C57BL/6 mice. *Clin. Exp. Morphology.* 2018;3:42–51 (In Russ.)

Информация об авторах

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

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

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

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

Марина Анатольевна Диатроптова – младший научный сотрудник, центральная патологоанатомическая лаборатория НИИ морфологии человека.

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

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

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

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Author information

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-9672-7145>.

Olga V. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology
[/https://orcid.org/0000-0001-8581-107X](https://orcid.org/0000-0001-8581-107X).

Anna M. Kosyreva – Dr. Sci.(Biol), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-6182-1799>.

Marina V. Kondashevskaya – Dr. Sci.(Biol), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-1302-8446>.

Marina A. Diatroptova – Junior Researcher, Central Pathology Laboratory, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-0858-8369>.

Ivan S. Tsvetkov – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0003-0946-1105>.

Alexander A. Stepanov – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-5036-1387>.

Lilia P. Mikhailova – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-0479-8684>.

Ksenia A. Artem'eva – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory for Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-1014-752X>.

Оптимизация фиксации и транспортировки биопсийно-операционного материала щитовидной железы

Е.В. Бондаренко

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

Введение. Имеющиеся стандарты хранения и транспортировки биопсийного материала, получаемого после операции на щитовидной железе, не всегда обеспечивают высокое качество изготавливаемых гистологических срезов.

Цель данного исследования – изучить влияние использования прибора – термостата при фиксации и транспортировке биопсийно-операционного материала щитовидной железы на качество получаемых микропрепаратов.

Материалы и методы. Проанализированы результаты применения прибора при хранении и транспортировке операционного материала щитовидной железы от 354 пациентов. Материал от 10 пациентов с многоузловым зобом был разделен на две равные части (правая и левая доли) и обработан рутинным методом с фиксацией при комнатной температуре и с использованием прибора – термостата.

Результаты. Представлена характеристика оригинального портативного автономного легко переносимого термостата для хранения при постоянной температуре биопсийного и операционного материала для морфологического исследования. Благодаря имеющемуся автономному электроснабжению транспортировка возможна на любые расстояния. Получаемые с использованием термостата гистологические срезы органа характеризовались высоким качеством и четкостью, что позволяло проводить морфологическое исследование в оптимальных условиях и в более короткие сроки.

Заключение. Полученные результаты доказывают высокую эффективность данного прибора в практике патологоанатомического исследования – оптимизацию фиксации и транспортировки биопсийно-операционного материала щитовидной железы, позволяют получить гистологические срезы высокого качества и в полной мере оценить основные морфологические изменения в ткани щитовидной железы.

Ключевые слова: щитовидная железа, гистология, фиксация, срезы, термостат

Для корреспонденции: Бондаренко Екатерина Владимировна. E-mail: ekaterinabondarenko@inbox.ru

Для цитирования: Е.В. Бондаренко Оптимизация фиксации и транспортировки биопсийно-операционного материала щитовидной железы. Клини. эксп. морфология. 2019;8(3):64-68. DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.64-68

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 22.07.2019. Получена после рецензирования 07.08.2019. Принята в печать 18.09.2019.

Optimization of fixation method and transportation of surgical thyroid biopsies

E. V. Bondarenko

MF Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), Moscow, Russia

Introduction. The existing standards for storage and transportation of biopsy material obtained after surgery on the thyroid gland do not always ensure the high quality of the obtained histological sections. The purpose of this study is to study the effect of using a thermostat device during fixation and transportation of surgical thyroid biopsies on the quality of obtained microscopic preparations.

Materials and methods. The results of the use of the device during storage and transportation of thyroid gland surgical specimens from 354 patients were analyzed. Specimens from 10 patients with multinodular goiter were divided into two equal parts (right and left lobes) and processed by a routine method with fixation at room temperature and by using a thermostat.

Results. We present characteristics of the original portable, autonomous, handy carry thermostat designed to store at a constant temperature biopsies and surgical specimens for morphological assays. Due to the available autonomous power supply, transportation is possible at any distance. The histological sections obtained using a

thermostat device were characterized by high quality and clarity, which allowed the morphological examination to be carried out under optimal conditions and for shorter periods.

Conclusion. The results prove the high efficiency of this device in the practice of anatomy pathology research. Optimization of fixation and transportation of surgical thyroid biopsies provide high-quality histological sections and complete assessment of major morphological changes of the thyroid gland tissue.

Key words: thyroid gland, histology, fixation, sections, thermostat

Corresponding author: Ekaterina V. Bondarenko, E-mail: ekaterinabondarenko@inbox.ru

For citation: E. V. Bondarenko. Optimization of fixation method and transportation of surgical thyroid biopsies. Clin. exp. morphology. 2019;8(3):64-68. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.64-68

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Received 22.07.2019. **Received in revised forms** 07.08.2019. **Accepted** 18.09.2019.

Введение

В последние десять лет в Российской Федерации отмечается рост выявления пациентов с раком щитовидной железы в 1,5 раза [1]. Данная тенденция приводит к увеличению числа проведенных операций, являющихся основным методом лечения [2].

При этом хирургическому лечению подвергаются не только карциномы щитовидной железы, но и зубные изменения при наличии подтвержденного синдрома компрессии, аденомы и иные неопластические процессы [3, 4]. В связи с этим значительно увеличивается объем послеоперационного материала, направляемого в патологоанатомические отделения.

Хранение биопсийно-операционных материалов для прижизненного патологоанатомического исследования включает стандартные меры: материалы подлежат фиксации в 10% растворе нейтрального формалина и маркировке [5] без четкого указания необходимого для фиксации времени и определенной температуры. Известно, что отложенная и несвоевременная фиксация сопровождается изменениями структурных элементов органа. Дегенеративные изменения компонентов ткани начинаются сразу после прекращения тканевого кровоснабжения [6].

В большинстве случаев фиксация послеоперационного материала проводится в 10% растворе нейтрального формалина при комнатной температуре в течение 24 часов. Между тем некоторые ткани, в частности иссеченная ткань щитовидной железы, подвергаются частичной деструкции даже после немедленной фиксации в растворе формалина без соблюдения температурного режима, особенно при колебаниях температуры.

Особенности структуры, такие как малая толщина клеточной мембраны, коллоидное содержимое клеток и рыхлые межклеточные связи, приводят к быстрому развитию аутолиза в зафиксированном препарате. Происходящая при этом десквамация эпителия в просвет фолликулов может давать ложную картину прижизненных некротических изменений и вводить в заблуждение морфолога, проводящего исследование. Особенно значимой проблема качества микропрепаратов для патологоанатомического исследования стала после внесения в классификацию опухолей щитовидной железы группы образований с неопределенным зло-

качественным потенциалом, в диагностике которых важное место занимают выявление частичной инвазии собственной капсулы и очаговая ядерная атипия [7]. При морфологическом исследовании многоузловых зобов также могут выявляться участки со вторичными дегенеративно-дистрофическими изменениями, приводящие к визуализации очаги гиперплазии. Данные области могут сопровождаться ядерным полиморфизмом, что зачастую приводит к неправильной трактовке злокачественного потенциала.

На базе патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского был проведен поиск оптимального способа фиксации ткани щитовидной железы. Известны способы хранения операционно-биопсионного материала, сводящиеся в основном к помещению кусочков тканей в фиксирующие растворы (10% нейтральной раствор формалина спирт, ацетон и другие фиксирующие жидкости) и проведению процедуры фиксации при температуре +20°C, +60°C [8]. Тем не менее данные температурные режимы неблагоприятны для фиксации ткани щитовидной железы. Температура +20°C приближена к комнатной, что не позволяет получить равномерную фиксацию, а фиксация при +60°C может приводить к эффекту «варки».

Термостаты, используемые для фиксации материала, имеют большие габариты, что усложняет их установку в операционном блоке и лишает возможности транспортировать материал при необходимой постоянной температуре.

Цель данного исследования – изучить возможности использования прибора – термостата при фиксации и транспортировке биопсийно-операционного материала щитовидной железы для улучшения качества микропрепаратов.

Материалы и методы

В исследовании представлены результаты послеоперационной диагностики 354 пациентов с различной хирургической патологией щитовидной железы, находившихся на лечении в МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского с 2016 по 2018 год. Всем пациентам проведена операция в объеме тиреоидэктомии.

Послеоперационный материал сразу после удаления погружали в специализированный контейнер с 10%

нейтральным раствором формалина, нагретым до температуры $+36,4-36,6^{\circ}\text{C}$, и устанавливали в термостат с поддержанием постоянной заданной температуры на срок от 8 до 24 часов. Для фиксации материала использовали прибор – термостат, разработанный на базе патологоанатомического отделения МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, отличающийся от существующих аналогов (патент № 2686848). Прибор выполнен из термоизолирующего материала и включает в себя корпус с герметичной крышкой, разделенный перегородкой на два отсека. Первый отсек содержит терморегулятор с дискретностью установки заданной температуры $0,2^{\circ}\text{C}$ и рабочим интервалом нагревания $+36,4-36,6^{\circ}\text{C}$, блок питания, представленный стабилизатором напряжения, литиевым портативным аккумулятором (длительность поддержания постоянного тока 3 года) и тумблером, соединенным шнуром электропитания с вилкой. Второй отсек снабжен отдельной герметичной крышкой из термоизолирующего материала и фиксирующими элементами для емкостей с биопсийно-операционным материалом щитовидной железы, содержит термодатчик и термозлемент, представленный цоколем, лампой накаливания мощностью



Рис. 1. Открытый прибор – термостат с двумя отсеками и емкостями для материала

Fig. 1. Open device – thermostat with two compartments and containers for specimens



Рис. 2. Внешний вид термостата с крышкой

Fig. 2. Appearance of the thermostat with a lid

24 Вт и защитной решеткой (рис. 1). Терморегулятор обеспечивает возможность соединения с нагревательным элементом и термодатчиком. Стабилизатор напряжения и аккумулятор соединены с терморегулятором через тумблер переключения между стабилизатором и аккумулятором. Габариты термостата: длина 35 см, ширина 20 см, высота 30 см. Он снабжен широким ремнем для переноски на плече. Вес термостата без контейнеров с материалом 6,3 кг (рис. 2).

Гистологическая проводка осуществлена в вакуумном аппарате стандартным методом с использованием изопропила/этанола. Материал заливали в блоки гомогенизированного парафина толщиной 5 мм. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм готовили непосредственно перед исследованием и монтировали на положительно заряженные стекла с высушиванием в соответствии с рекомендациями производителя (Menzel Glazer, Германия). Полученные срезы депарафинировали и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Результаты

Для морфологического исследования был представлен материал 354 оперированных пациентов с различными заболеваниями щитовидной железы. Материал от 10 пациентов с многоузловым зобом был разделен на две равные части (правая и левая доли) и обработан рутинным методом с фиксацией при комнатной температуре или с использованием прибора – термостата.

В случае фиксации материала при различных температурах (от $+14$ до $+25^{\circ}\text{C}$) вне прибора при макроскопическом исследовании во время вырезки было затруднено прохождение лезвия, что не позволяло изготовить тонкие срезы. При этом капсула органа в некоторых местах отслаивалась, из-за обилия бурого содержимого контуры узлов и других структур были нечеткими (рис. 3). Данные изменения в ряде случаев приводили к необходимости дополнительной фиксации уже выбранных для дальнейшего исследования участков щитовидной железы. При микроскопическом исследова-



Рис. 3. Узловой зоб на разрезе. Отмечаются нечеткость структур, обилие содержимого бурого цвета

Fig. 3. Nodular goiter section: the structures are ill defined, abundance of contents of brown color is observed

нии отмечались неравномерная толщина среза, участки наложения структур друг на друга. Окраска гематоксилином и эозином имела различную интенсивность на разных участках, в центре среза наблюдали очаги аутолиза (рис. 4, 5). Данные изменения могут приводить к диагностическим неточностям, необходимости изготовления дополнительных срезов и увеличению продолжительности морфологического исследования.

Сравнительный анализ показал значительную разницу между тканями, фиксированными стандартным и модифицированным способами. В случае использова-

ния прибора с поддержанием постоянной температуры макроскопически отмечались равномерное фиксирование ткани, сохранение архитектоники железы. Элементы крови практически отсутствовали (рис. 6). При вырезке получались ровные тонкие срезы с сохранением взаимоотношений всех элементов. Микроскопически была отмечена одинаковая толщина изготовленных срезов без заворотов ткани. Фолликулярные структуры были четкими, с ровным коллоидом, без артефактов. Окраска гематоксилином и эозином была одинаково интенсивной на всех участках срезов (рис. 7, 8).

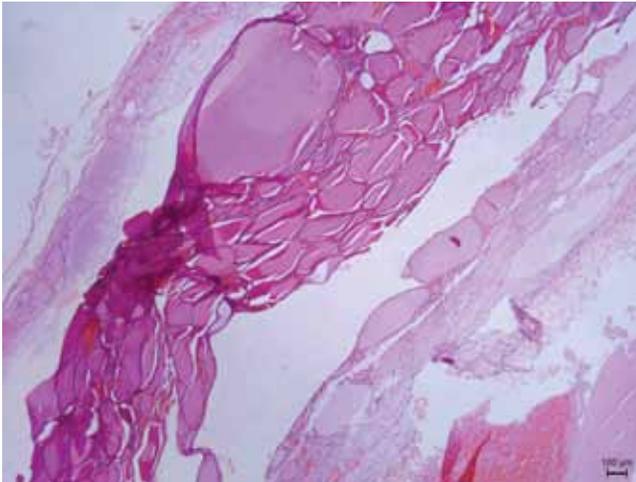


Рис. 4. Узловой зоб микроскопически при стандартной фиксации. Отмечаются неровность структур, искусственное наложение друг на друга. Окраска гематоксилином и эозином, масштабная шкала 100 мкм

Fig. 4. Microscopical slide of nodular goiter with standard fixation. The irregularity of the structures, the artificial layering on each other. H&E stain, scale bar 100 μ m

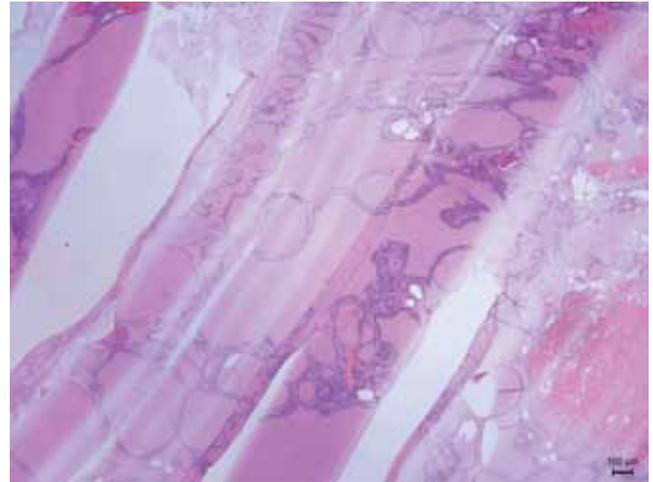


Рис. 5. Узловой зоб микроскопически при стандартной фиксации. Неравномерное окрашивание гистологического препарата. Окраска гематоксилином и эозином, масштабная шкала 100 мкм

Fig. 5. Microscopical slide of nodular goiter with standard fixation. Uneven staining of the histological slide. H&E stain, scale bar 100 μ m



Рис. 6. Узловой зоб на разрезе при фиксации в термостате. Четкое узловое строение, отсутствие жидкостных компонентов

Fig. 6. Nodular goiter section with fixation in the thermostat. Clear nodular structure, no liquid components

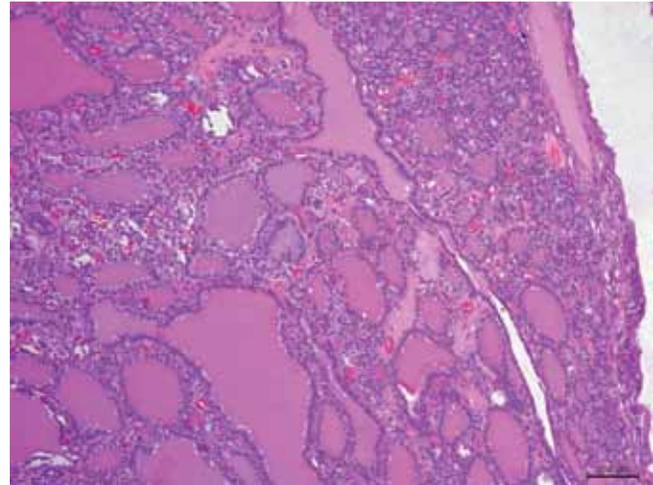


Рис. 7. Узловой зоб после фиксации в термостате. Равномерное окрашивание, однородность среза. Окраска гематоксилином и эозином, масштабная шкала 100 мкм

Fig. 7. Nodular goiter after fixation in the thermostat. Uniform staining, uniformity of the cut. H&E stain, scale bar 100 μ m

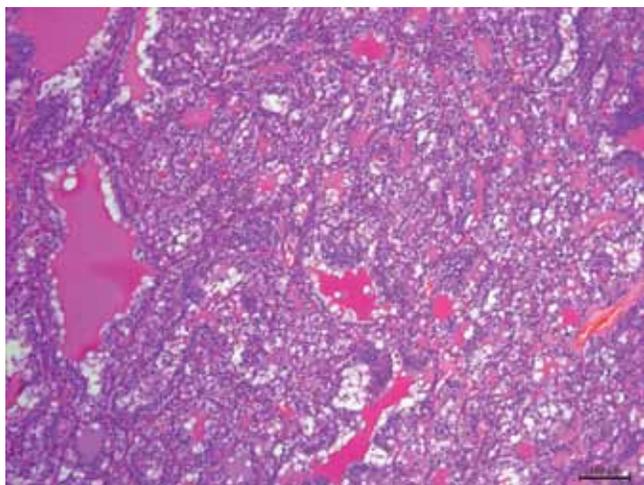


Рис. 8. Узловой зоб после фиксации в термостате. Четкая визуализация фолликулярных структур с морфологическими признаками повышенной функциональной активности тиреоидного эпителия. Окраска гематоксилином и эозином, масштабная шкала 100 мкм

Fig. 8. Nodular goiter after fixation in the thermostat. Clear visualization of the follicular structures with morphological features of increased functional activity of the thyroid epithelium. H&E stain, scale bar 100 μm

Закключение

Проведенное исследование свидетельствует об эффективности применения термостата в патолого-анатомической практике для оптимизации фиксации и транспортировки биопсийно-операционного материала щитовидной железы. Гистологические срезы более высокого качества, чем получаемые с использованием рутинных методов, позволяют в полной мере оценить основные морфологические изменения в ткани щитовидной железы. Малые габариты, возможность эксплуатации как при подключении к электросети, так и автономно позволяют использовать данный прибор в любых помещениях. Малый вес и приемлемые габариты термостата обеспечивают транспортировку материала для гистологического исследования на любые расстояния при постоянной температуре.

Информация об авторе

Бондаренко Екатерина Владимировна – научный сотрудник отделения морфологической диагностики отдела онкологии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Author information

Ekaterina V. Bondarenko – Researcher, Department of Morphological Diagnostics, Oncology Department, MF Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute. <https://orcid.org/0000-0003-2122-2297>

Литература/References

1. Каприн А.Д., Старицкий В.В., Петрова Г.В. (ред.). Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2019. 236 с.
Kaprin AD, Staritsky VV, Petrova GV (eds.). The status of cancer care for the population of Russia in 2018. Moscow: P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center – FSBI National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russia. 2019. 236 p. (In Russ.).
2. Бельцевич Д.Г., Ванушко В.Э., Румянцев П.О., Мельниченко Г.А., Кузнецов Н.С., Абросимов А.Ю. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению высокодифференцированного рака щитовидной железы у взрослых, 2017 год. Эндокринная хирургия. 2017;11(1):6–27. doi: 10.14341/serg201716-27
Beltsevich DG., Vanushko VE, Rumyantsev PO, Melnichenko GA, Kuznetsov NS, Abrosimov AY. et al. Russian clinical guidelines for the diagnosis and treatment of high-grade thyroid cancer in adults, 2017. Endocrine surgery. 2017;11(1):6–27 (In Russ.).
3. Chen AY, Bernet VJ, Carty SE, Davies TF, Ganly I, Inabnet WB, Shaha AR. American Thyroid Association statement on optimal surgical management of goiter. *Thyroid.* 2014;24:181–9.
4. Shin JJ, Caragacianu D, Randolph GW. Impact of thyroid nodule size on prevalence and post-test probability of malignancy: a systematic review. *Laryngoscope.* 2015;125:263–72.
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 24.03.2016 № 179н «О Правилах проведения патологоанатомических исследований».
Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 03.24.2016 № 179n «On the Rules for the conduct of autopsy studies» (In Russ.).
6. Пальцев М.А., Мальков П.Г., Франк Г.А. Стандартные технологические процедуры при морфологическом исследовании биопсийного и операционного материала: Руководство. Архив патологии. 2011;73. Приложение. 114 с.
Paltsev MA, Malkov PG, Frank GA. Standard technological procedures for morphological examination of biopsy and surgical material: Manual. Arkhiv patologii. 2011;73. Prilozheniye. 114 s. (In Russ.).
7. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J (eds). WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs (4th edition). IARC Press: Lyon 2017.
8. Саркисов Д.С., Перов Д.С. Микроскопическая техника: Руководство. Москва: Медицина, 1996. 544 с.
Sarkisov DS, Perov DS. Microscopic technique: Manual. Moscow: Medicine. 1996. 544 p. (In Russ.).

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)

Общие правила

Статья должна быть напечатана шрифтом Times New Roman, 14 пунктов через 1,5 интервала с полями 2,5 см с каждой стороны. Выравнивание по ширине без переносов; абзацный отступ – 1,25 см.

Рукопись статьи должна сопровождаться скан-копиями заявления, подписанного руководителем и заверенного печатью учреждения, и контрольного листа (формы представлены на сайте журнала cem-journal.ru).

Рукописи, а также сопроводительные документы могут быть направлены в редакцию по электронной почте на адрес журнала cem.journal@mail.ru или через сайт cem-journal.ru (текст статьи подается в формате Microsoft Word, сопроводительные документы с оригинальными подписями прикрепляются к письму в формате PDF).

Статья регистрируется в редакции только при наличии полного комплекта документов.

Структура рукописи

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

Формат заглавия: название работы – с прописной, далее строчными буквами; инициалы, фамилия авторов – курсивом, полное название организации с ведомственной принадлежностью, город, страна – Times New Roman, 14 пунктов через 1,5 интервала строчными буквами. Максимальная длина заглавия **10–12 слов**. Оно должно быть информативным, содержать основные ключевые слова, характеризующие тему (предмет) исследования и цель работы.

Аффилиация содержит названия организации, город и страну. Если в названии организации есть название города (Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского, в адресных данных город также необходимо указывать. При указании названия организации на русском и английском

языках следует использовать название, представленное на официальном сайте организации. Русскоязычная аффилиация – с аббревиатурой, определяющей статус организации (ФГБНУ, ФГБУ, ФГАОУ ВО, НПО ООО, ГБУЗ), и ведомственной принадлежностью организации (Минздрав России, Департамент здравоохранения города Москвы). В англоязычной аффилиации определение статуса организации (Federal State Budgetary Institution of Science) или аббревиатуры (FSBI, FSBEI of HE) не указываются. Личные имена, входящие в название организации, на английском языке пишутся **перед** основным названием, инициалы можно не указывать, оборот «named after» не использовать. На русском языке следует указывать полностью «имени академика», «имени почетного академика».

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.

Аннотация/Abstract (реферат, авторское резюме) должна отражать основное содержание работы, включать характеристику основной темы, проблемы объекта, цели исследования, основные методы, результаты исследования и главные выводы. Для оригинальных исследований аннотация должна быть структурированной в соответствии с текстом статьи и включать разделы **Введение/Introduction** (в конце раздела указывается Цель исследования/ The aim of the study), **Материалы и методы/Materials and Methods**, **Результаты/Results**, **Заключение/Conclusion**. Аннотация обзоров литературы должна содержать **Введение** (с обоснованием цели обзора) и **Заключение**. Объем аннотаций для оригинальных исследований **200–250 слов**, обзора литературы не менее **100–150 слов**. Сокращения и условные обозначения, кроме общеупотребительных, применяются в исключительных случаях, им дают расшифровку и определения при первом упоминании в аннотации. Не допускается включение ссылок на источники из полного текста.

Ключевые слова (Keywords) должны быть максимально конкретными и отражать тему, цель и объект исследования. В качестве ключевых слов могут использоваться как одиночные слова, так и словосочетания. Рекомендуемое количество ключевых слов – 5–7, количество слов внутри ключевой фразы – не более трех.

После ключевых слов следуют разделы:

Для корреспонденции. Указываются полностью имя, отчество фамилия, автора, ответственного за связь с редакцией, E-mail.

Для цитирования. Инициалы, фамилии авторов. Название статьи. Клинический эксперимент. морфология.

Финансирование. *Варианты:*

Исследование выполнено в рамках государственного задания, далее – наименование учреждения с ведомственной принадлежностью, номер государственного учета НИР.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта (наименование фонда, номер гранта).

Конфликт интересов.

Corresponding author.

For citation. Authors. Title. Clin. Exp. Morphology **Funding.**

The work (the research) was performed within the framework of the state assignment of ... (Institution) (No. ...).

This work was supported by the (Institution: e.g. Russian Science Foundation (RSF) / Russian Basic Research Foundation (RFBR)) grant (No. ...).

Conflict of interest.

Информация о прохождении статей (даты ставит редакция).

Статья поступила Поступила после рецензирования Принята в печать...

Received Received in revised forms Accepted.

Титульный лист должен быть представлен на русском и английском языках.

Образец титульной страницы

УДК: 619:616-001.4

Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих

Т.В. Шмакова¹, Е.Ю. Кананыхина^{1,2}, Г.Б. Большакова¹

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

Текст резюме, ключевые слова

Для корреспонденции: Татьяна Владимировна Шмакова. E-mail: tanesta12@gmail.com

Для цитирования: Шмакова Т.В., Кананыхина Е.Ю., Большакова Г.Б.. Клеточные механизмы безрубцового заживления кожи млекопитающих. Клинический эксперимент. морфология.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека (№ ААА-А17-117013050044-8).

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила Поступила после рецензирования Принята в печать

Cellular mechanisms of scarless wound healing in mammals

T.V. Shmakova¹, E.Yu. Kananykhina^{1,2}, G.B. Bolshakova¹

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² VI Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Abstract text, keywords

Corresponding author: Tatyana V. Shmakova, E-mail: tanesta12@gmail.com

For citation: Shmakova T.V., Kananykhina E.Yu., Bolshakova G.B.. Cellular mechanisms of scarless wound healing in mammals. Clin. Exp. Morphology. (In Russ.).

Funding: The work is done in the framework of the state assignment of Research Institute of Human Morphology (No ААА-А17-117013050044-8).

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Received Received in revised forms Accepted

Текст. Обзорные статьи объемом **4000–6000** слов должны быть структурированы на **Введение** с обоснованием цели обзора; **Тематические рубрики** – разделы/подразделы; **Заключение.** Обзоры могут включать до 5 рисунков (схем).

Оригинальная научная статья – объем **3000–5000 слов** (12–18 страниц машинописного текста через 1,5 интервала), 5–8 рисунков.

Объем клинических наблюдений – до 2500 слов, 3–5 рисунков.

Большой объем статей 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: **Введение** (включает Цель исследования); **Материалы и методы**; **Результаты**; **Обсуждение** (возможно объединение разделов – **Результаты и Обсуждение**); **Выводы** (или **Заключение**); **Вклад авторов/ Author contributions**; **Литература/References**; **Информация об авторах/ Author information.**

В разделе Вклад авторов/Author contributions (в конце текста статьи) следует указывать инициалы и фамилии авторов.

Образец

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.П. Милованов, А.Н. Шувалов, Т.В. Фокина.

Сбор и обработка материала – Т.В. Фокина, А.П. Милованов, В.А. Мхитаров

Написание текста – А.П. Милованов.

Редактирование – А.П. Милованов, Т.В. Фокина, А.Н. Шувалов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.P. Milovanov, A.N. Shuvalov, T.V. Fokina.

Collected the data and performed the analysis – T.V. Fokina, A.P. Milovanov, V.A. Mkhitarov.

Wrote the paper – A.P. Milovanov.

Edited the manuscript – A.P. Milovanov, T.V. Fokina, A.N. Shuvalov.

Каждый тип статьи должен содержать раздел **Информация об авторах/Author information**, располагающийся после списка литературы. На русском языке указываются **полностью** имена, отчества, фамилии авторов, ученые степени, ученые звания, должности, структурные подразделения, учреждения (сокращенные наименования с официального сайта). На английском языке указываются **полностью** имена, первые буквы отчества, фамилии авторов, **сокращенно** – ученые степени Cand. Sci. (Med.); Cand. Sci. (Biol.); Dr.

Sci. (Med.); Dr. Sci. (Biol.), ученые звания, должности, структурные подразделения, учреждения (сокращенные наименования с официального сайта), ORCID.

Образец

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

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

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

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

Author information

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-9672-7145>.

Olga V. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology

<https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>.

Anna M. Kosyreva – Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

Ivan S. Tsvetkov – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

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 (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. **Подписуемые подписи даются отдельно с указанием номера рисунка и объяснением условных обозначений на русском и английском языках.** В подписях к микрофотографиям нужно указывать метод окрашивания (визуализации), степень увеличения или размер масштабной линейки.

Каждый рисунок следует представлять отдельным файлом в формате TIF, JPG 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. **Заголовки таблиц и сноски должны быть оформлены на русском и английском языках, желателен перевод информации в строках и столбцах.**

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 пять 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. Обзорные статьи должны цитировать 50–80 источников, оригинальные статьи – 25–40, клинические наблюдения – до 8 источников.

Ссылки на публикации авторов статьи (самоцитирование) не должны составлять более 15 процентов от

общего списка. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

Журнал использует Ванкуверский стиль цитирования источников: <https://rasedp.ru/images/materials/vancouver.pdf>

Библиографические источники должны быть расположены в порядке цитирования в тексте 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; с указанием DOI (при наличии). Фамилии иностранных авторов даются в оригинальной транскрипции.

В отечественных и зарубежных публикациях при авторском коллективе книги или статьи до шести человек включительно упоминаются все, при больших авторских коллективах — шесть первых авторов и др. или *et al.*

С учетом требований международных систем цитирования после каждого русскоязычного источника на следующей строке помещается его латинизированная библиографическая ссылка, имеющая следующую структуру: авторы и название книги или статьи (английский язык), название источника (официальное англоязычное или транслитерация в стандарте BSI), выходные данные в цифровом формате, с указанием DOI (при наличии). В конце англоязычной части библиографического описания в круглых скобках указывается язык публикации (In Russ.).

Образцы оформления литературы

Статья в журнале

Прошина А.Е. Пластичность эндокринной части поджелудочной железы человека. Клиническая и экспериментальная морфология. 2017;2:4–11

Proshchina AE. Plasticity of the endocrine part of human pancreas. Clin. exp. morphology. 2017;2: 4–11 (In Russ.).

Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.Д., Боcharов Е.В. и др. Экспериментальное моделирование функциональной недостаточности nigrostriатной дофаминергической системы у мышей. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2010;96(3):270–282.

Kozina EA, Khaindrava VG, Kudrin VS, Kucheryanu VG, Klodt PD, Bocharov EV, et al. Experimental modeling of functional deficiency of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova. 2010;96(3):270–282 (In Russ.).

Gerosa M, Visca A, Rizzo P, Foroni R, Nicolato A, Bri-colo A. Glomusjugulare tumors: The option of gamma knife radiosurgery. Neurosurgery. 2006;59:561–9.

Petrie KJ, Muller JT, Schirmbeck F, Donkin L, Broadbent E, Ellis CJ, et al. Effect of providing information about normal test results on patients' reassurance: randomised controlled trial. *British Medical Journal*. 2007;334(7589):352–4. DOI:10.1136/bmj.39093.464190.55.

Книга печатная

Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы: Руководство. Санкт-Петербург: Сотис, 2002, 288 с.

Khmelnitsky OK. Cytological and histological diagnosis of thyroid diseases: A guide. Saint Petersburg: Sotis, 2002, 288 p. (In Russ.).

Воробьев А.П. (ред.). Руководство по гематологии. 3-е изд. Москва: Ньюдиамед, 2005, 632 с.

Vorobyov AP, ed. Manual on hematology. 3rd ed. Moscow: Nyudiamed, 2005, 632 p. (In Russ.).

An YH, Kylie LM. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2003, 590 p.

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

Книга электронная (доступна онлайн)

Греч Е.Д. Азбука интервенционной кардиологии. 2-е изд. Чичестер: Уайли Блэквелл; 2011. Доступно по адресу: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/imperial/detail.action?docID=822522> (Получено 6 июля 2017).

Grech ED. ABC of interventional cardiology. 2nd ed. Chichester: Wiley blackwell; 2011. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/imperial/detail.action?docID=822522> (Accessed 6th July 2017).

Глава в книге, статья в сборнике

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

Silver RM, Peltier MR, Branch DW. The immunology of pregnancy. In: Creasey RK, Resnik R (eds.) Maternal-fetal medicine: Principles and practices. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2004, p. 89–109.

Иванова А.Е. Тенденции и причины смерти населения России. В кн.: В.Г. Осипов, Л.Л. Рыбаковский (ред.). Демографическое развитие России в XXI веке. М.: Экон-Информ, 2009, с. 110–131.

Ivanova AE. Trends and causes of death of the population of Russia. In: Osipov VG, Rybakovsky LL (eds.). Demographic development of Russia in the XXI century. Moscow: Ekon-Inform, 2009, p. 110–131 (In Russ.).

Материалы научных конференций

Берченко Г.Н. Костные трансплантаты в травматологии и ортопедии. В сб.: Применение искусственного имплантата Коллапан в травматологии и ортопедии. Москва, 2008, с. 3–8.

Berchenko GN. Bone grafts in trauma and Orthopaedics. V sb.: Primeneniye iskusstvennogo implantata Kollapan v travmatologii i ortopedii. Moscow, 2008, p. 3–8 (In Russ.).

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

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. Полные тексты статей, размещаются в открытом доступе на сайте **cem-journal.ru**. Печатный вариант журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» можно получить только по подписке.

АВТОМАТЫ ОКРАСКИ ЭМКОСТЕЙНЕР

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ,
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

- Высококачественная однотипная окраска препаратов
- Открытая система (любые реагенты и методики)
- Высокая производительность
- Реализация сложных методик (окраска по Папаниколау, гистология)
- Безопасные условия труда
- Низкая себестоимость окраски
- Шесть приборов, 6-8-13-16 станций:
АФОМК-6, АФОМК8-Г-01, АФОМК8-В-01, АФОМК-13-ПАП,
АФОМК-16, АФОМК-16-25

129301, г. Москва, ул. Касаткина, д. 11, стр.1;
тел. / факс: +7 (495) 287-81-00, 287-84-00;
www.emco.ru, www.stainer.ru, emco@bk.ru



ГРУППА КОМПАНИЙ ЭМКО

