

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА МОРФОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА РАМН

ISSN 2226-5988

№ 3/2012

«Клиническая и экспериментальная морфология»

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Учредитель

ФГБУ «Научно-исследовательский
институт морфологии человека»
РАМН

117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

Адрес редакции

117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3

Телефоны редакции:

+7 (499) 120-80-65

+7 (499) 129-51-33

e-mail: morfolhum@mail.ru

Издается с 2012 года

Тираж 500 экземпляров

Подписной индекс в каталоге Агентства «Роспечать» – 70045 (на полугодие)

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

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

© ФГБУ «Научно-исследовательский
институт морфологии человека» РАМН

Главный редактор

член-корреспондент РАМН, профессор Л.В. Кактурский

Заместители главного редактора

профессор О.В. Зайратьянц

профессор О.В. Макарова

Ответственные секретари

д.б.н., профессор М.Н. Болтовская

к.м.н. М.В. Мнихович

Редакционная коллегия

Член-корр. РАМН *Н.М. Аничков*

Член-корр. РАМН *В.В. Банин*

Профессор *М.Н. Болтовская*

Д.б.н. *Г.Б. Большакова*

Д.м.н. *С.В. Буравков*

Акад. РАМН

Ю.И. Денисов-Никольский

Д.б.н. *М.В. Кондашевская*

Профессор *И.А. Казанцева*

Профессор *И.И. Марков*

Профессор *А.П. Милованов*

Д.м.н. *Л.П. Михайлова*

К.м.н. *В.А. Мхитаров*

Профессор *Н.П. Омельяненко*

Профессор *Ю.Г. Пархоменко*

Профессор *С.В. Савельев*

Академик РАМН *М.Р. Сапин*

Академик РАМН *Ю.Н. Соловьев*

Профессор *А.Б. Шехтер*

Профессор *А.Л. Черняев*

Профессор *В.В. Яглов*

Д.м.н. *Н.В. Яглова*

Редакционный совет

Н. Булаева (Хьюстон, США)

И.Н. Волощук (Москва)

Ю.И. Гуминский (Винница,
Украина)

А.Е. Доросевич (Смоленск)

Л.М. Ерофеева (Москва)

В.В. Климачев (Барнаул)

А.В. Кононов (Омск)

М. Кочуков (Хьюстон, США)

А.Э. Мационис (Ростов-на-Дону)

О.Д. Мишнев (Москва)

Л.М. Михалева (Москва)

Л.М. Непомнящих (Новосибирск)

Е.В. Новичков (Киров)

В.В. Новочадов (Волгоград)

А.Н. Романюк (Сумы, Украина)

М.Г. Рыбакова (Санкт-Петербург)

И.В. Твердохлеб (Днепропетровск,
Украина)

В.А. Туманский (Запорожье,
Украина)

М.Г. Узбеков (Москва)

Ю.И. Ухов (Рязань)

Л.В. Фомина (Винница, Украина)

Н.М. Хмельницкая
(Санкт-Петербург)

В.П. Черников (Москва)

В.Ф. Чехун (Киев, Украина)

И. Шварц (Тель-Авив, Израиль)

А.Н. Яцковский (Москва)

ПЕРЕДОВЫЕ СТАТЬИ, ЛЕКЦИИ EDITORIALS, LECTURES

- В.В. Яглов, Н.В. Яглова*
Итоги и перспективы изучения диффузной
эндокринной эпителиальной системы
- 4
- V.V. Yaglov, N.V. Yaglova*
Results and prospects for studying diffuse endocrine
epithelial system

КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ CLINICAL MORPHOLOGY

- Н.А. Семенцова, Ю.Н. Пономарева,
Т.Г. Барсанова, О.В. Зайратьянц*
Нарушения процессов ангиогенеза, апоптоза
и пролиферации в тканях плодного яйца
и эндометрии при неразвивающейся
беременности в I триместре
- 11
- N.A. Sementsova, Ju.N. Ponomareva,
T.G. Barsanova, O.V. Zayratyants*
Disorders of angiogenesis, apoptosis and proliferation
in the tissue of the gestational sac and endometrium
in non-developing pregnancy of the first trimester
- А.Е. Прощина, В.М. Барабанов,
Ю.С. Кривова, С.В. Савельев*
Количественное и иммуногистохимическое
изучение поджелудочной железы
при длительно текущем сахарном диабете
1-го типа у взрослых
- 17
- A.E. Proshchina, V.M. Barabanov,
Yu.S. Krivova, S.V. Saveliev*
Quantitative and immunohistochemical study
of the pancreas of adult patients with long-termed
diabetes mellitus type 1
- А.В. Павлов, С.В. Савельев*
Онтогенетические трансформации цито-
и ангиоархитектоники сосцевидных тел
головного мозга человека
- 22
- Pavlov A. V., Saveliev S. V.*
Ontogenetic transformations in cyto-
and angioarchitectonics of mammillary bodies
of human brain

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

- А.В. Аверьянов, А.Л. Черняев, А.Г. Коноплянников,
В.Н. Петров, О.А. Коноплянникова, Е.В. Агеева,
О.П. Кузовлев, Н.С. Кулагина, А.Е. Трусов,
К.С. Войтковская*
Влияние аллогенных мезенхимальных стволовых
клеток на ткань легких в экспериментальной
модели эмфиземы у крыс
- 27
- A. V. Averyanov, A. L. Chernyaev, A. G. Konoplyannikov,
V. N. Petrov, O. A. Konoplyannikova, E. V. Ageeva,
O. P. Kuzovlev, N. S. Kulagina, A. E. Trusov,
K. S. Voytkovskaya*
Effects of allogeneic mesenchymal stem cells
on lung tissue in rat experimental model of pulmonary
emphysema
- И.М. Богданова, Е.А. Пономаренко*
Стимуляция опухолеспецифического иммунного
ответа цитостатическими химиопрепаратами
в популяции клеток селезенки мышей *in vitro*
- 33
- I. M. Bogdanova, E. A. Ponomarenko*
Stimulation of tumor-specific immune response
by cytostatic chemotherapeutic drugs in mouse spleen
cell populations *in vitro*

С.О. Абдулаева, С.О. Кирюхин, Т.А. Белоусова, Т.И. Хомякова, В.П. Черников, О.В. Макарова
Морфологическая характеристика острого язвенного колита, индуцированного декстрансульфатом натрия, у мышей линии Balb/C

38

S.O. Abdulaeva, S.O. Kirukhin, T.A. Belousova, T.I. Khomyakova, V.P. Chernikov, O.V. Makarova
Morphological characteristics of dextran sulfate sodium induced acute ulcerative colitis in mice Balb/C

И.В. Арутюнян, А.В. Макаров, Т.Х. Фатхудинов, В.В. Глинкина, Д.В. Гольдштейн, Г.Б. Большакова
Верификация хронической ишемии нижних конечностей при моделировании на лабораторных животных

47

I.V. Arutyunyan, A.V. Makarov, T.H. Fathudinov, V.V. Glinkina, D.V. Goldstein, G.B. Bolshakova
Verification of chronic hind limb ischemia in experimental models

С.С. Обернихин, Ж.Б. Понежева, Н.В. Яглова
Морфологическая характеристика печени мышей с конканавалин А-индуцированным гепатитом при профилактическом введении глимуриды

53

S.S. Obernikhin, Zh.B. Ponezheva, N.V. Yaglova
Morphological changes in murine liver with concanavalin A-induced hepatitis after preventive administration of glymuride

НОВЫЕ МЕТОДЫ NEW METHODS

И.В. Арутюнян, А.В. Макаров, Т.Х. Фатхудинов, А.В. Ельчанинов, Д.В. Гольдштейн, Г.Б. Большакова
Выделение культуры мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика крысы методом эксплантов

57

I.V. Arutyunyan, A.V. Makarov, T.H. Fathudinov, A.V. Elchaninov, D.V. Goldstein, G.B. Bolshakova
Isolation of multipotent stromal cells from rat umbilical cord using an explants method

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

С.В. Вернигородский
Проблема метаплазии эпителия слизистой оболочки желудка в историческом аспекте: от взглядов Купфера и Вирхова до современности

62

S.V. Vernigorodskiy
Metaplasia of gastric mucosa in the historical aspect: from Kupffer and Virchow to the present

С.О. Кирюхин, Т.И. Хомякова, М.Т. Добрынина, О.В. Макарова
Интерстициальные клетки Кахаля желудочно-кишечного тракта животных и человека

68

S.O. Kiryukhin, T.I. Khomyakova, M.T. Dobrynina, O.V. Makarova
Interstitial cells of Cajal in animal and human gastrointestinal tract

ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ PROBLEMS OF MANAGEMENT OF ANATOMIC PATHOLOGY SERVICE

А.П. Милованов, И.М. Расстригина, Е.А. Помазанова
Роль пандемии гриппа А (H1N1) 2009 года в глобальном увеличении материнской смертности

75

A.P. Milovanov, I.M. Rasstrigina, E.A. Pomazanova
Role of pandemic influenza A (H1N1) 2009 in the global increase in maternal mortality

ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ ДИФфуЗНОЙ ЭНДОКРИННОЙ ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

В.В. Яглов, Н.В. Яглова

ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва

Диффузная эндокринная эпителиальная система (ДЭЭС) – эволюционно древнее и крупнейшее звено эндокринной системы животных и человека. В статье обобщены многолетние результаты исследования биологии ДЭЭС, включая историю создания концепции ДЭЭС, филогенетические и онтогенетические аспекты формирования ДЭЭС, структурно-функциональную организацию, секрецию ее клеток, и намечены пути ее дальнейшего исследования.

Ключевые слова: диффузная эндокринная эпителиальная система, филогенез, онтогенез, структурная организация, секреция

В 2013 г. исполнится 75 лет с момента формирования концепции диффузной эндокринной эпителиальной системы. ДЭЭС – эволюционно древнее и крупнейшее звено эндокринной системы животных и человека. Она образована комплексом одиночно расположенных рецепторно-эндокринных клеток, которые находятся в эпителиальных тканях слизистых оболочек органов пищеварительной, дыхательной, мочеполовой систем и кожи. Клетки ДЭЭС получают информацию из внешней и внутренней среды организма. В ответ на нее они реагируют выделением биогенных аминов и пептидных гормонов, благодаря чему реализуют широкий диапазон биологических защитных реакций. Это дает основание рассматривать ДЭЭС как эволюционно древний диффузно организованный орган чувств.

История создания концепции ДЭЭС. Морфологические предпосылки открытия ДЭЭС создал немецкий физиолог и гистолог Р. Гейденгайн. В 1870 г. он обнаружил в слизистой оболочке желудка ранее никем не описанные клетки, избирательно окрашивающиеся солями хрома [26]. Позже их выявляли другие исследователи и описывали под разными названиями (светлые, желтые, базальнозернистые, энтерохромоаффинные, аргентаффинные, аргирофильные) или по фамилии описавших их авторов (клетки Кульчицкого, Нуссбаума, Фейртера, Николаса). Функции этих клеток на протяжении многих лет оставались невыясненными. В 1938 г. F. Feurter [23] изложил свои концептуальные взгляды на эту систему клеток. По его мнению, они выделяют гормоны, которые оказывают местные, то есть паракринные, эффекты и, поступая в кровь, дистантно влияют на клетки организма, однако эта концепция не привлекла к себе должного внимания исследователей. Причиной стало отсутствие доказательств эндокрин-

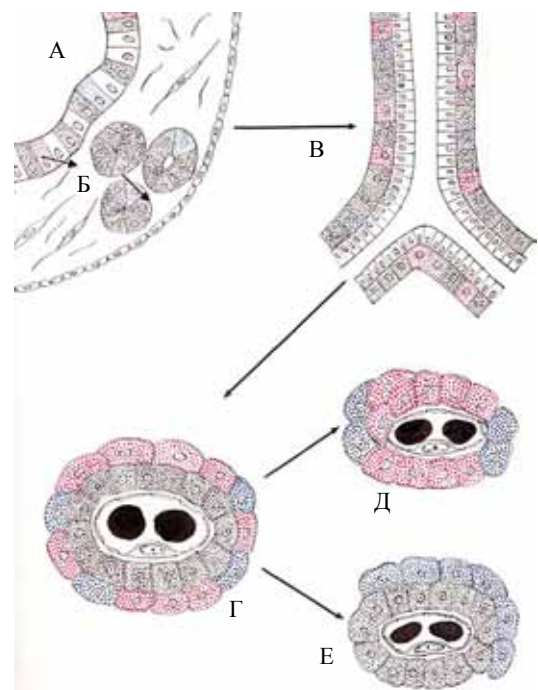
ной природы этих клеток. В 1968–1969 гг. А. Pearse опубликовал свои результаты, касающиеся функции этих загадочных клеток. Он установил, что они являются эндокринными и выделяют биогенные амины и пептидные гормоны. Кроме того, им были описаны и гистохимические проявления (маркеры) продукции биогенных аминов и пептидных гормонов. Эти клетки назвали APUD-серией [30, 31]. Так ДЭЭС устами Пирса обрела свое другое название. Ее клетки стали называть апудоцитами, а опухоли, развивающиеся из них, – апудомами. Ценный вклад в ее дальнейшее изучение внес Т. Fujita [24]. Он установил, что клетки APUD-серии наряду с эндокринной функцией выполняют рецепторную и внешне напоминают нейроны. Т. Fujita ввел для них новое название – паранейроны. Дальнейшие исследования клеток APUD-серии показали, что их свойствами обладают не только клетки ДЭЭС, но и пептидергические нейроны, тучные клетки соединительной ткани, секреторные кардиомиоциты и т.д. Было также установлено, что пептидергические нейроны выделяют тот же набор пептидных гормонов, что и клетки ДЭЭС, – соматостатин, вазоактивный интестинальный пептид (ВИП), эндорфины, бомбезин, субстанцию P, нейротензин, холецистокинин (ХЦК), инсулин, глюкагон. Наблюдаемое сходство клеток ДЭЭС и пептидергических нейронов навело Пирса на мысль, что все клетки APUD-серии являются производными нейроэктодермы, а эмбриональным зачатком их развития он считал нервный гребень [29]. Так, APUD-серия клеток переросла границы ДЭЭС и стала называться нейроэндокринной системой. Вследствие этого она утратила свою концептуальную суть ДЭЭС, осуществляющей гормональный контроль за элементарным свойством эпителиев, – внешнего обмена.

Кроме того, признание APUD-серии клеток единой гистогенетической системой потребовало пересмотра классических положений современной эмбриологии и гистологии об энтеродермальном происхождении эпителия слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы, мезенхимного происхождения тучных клеток, мезодермального – кардиомиоцитов. Дальнейшее изучение ДЭЭС и ее роли в регуляции функций организма было возможным, зная фило- и онтогенетические закономерности ее развития, общие принципы структурно-функциональной организации и становление механизмов секреции ее клеток.

Филогенетические аспекты формирования ДЭЭС. Изучение сравнительной морфологии ДЭЭС показало, что в ходе эволюции позвоночных животных и их предков она прошла ряд морфологических этапов становления. У современных представителей класса ланцетников, близких по структурно-функциональной организации к древним предкам позвоночных, она представлена кишечной (энтериновой) эндокринной эпителиальной системой (рис. 1 А). У первых представителей позвоночных (класс круглоротые) начался процесс структурного преобразования кишечной (энтериновой) системы в гастроэнтеропанкреатическую эндокринную систему. Из эпителия кишки происходило выселение В-клеток, секретирующих инсулин, за ее пределы, тогда как остальные эндокринные клетки оставались еще в эпителии кишки. Выселившиеся В-клетки формировали полимерные скопления клеток, которые в дальнейшем превращались в фолликулы Лангерганса (рис. 1 Б). У древних представителей позвоночных – хрящевых и кистеперых рыб – завершилось формирование поджелудочной железы. Изменилась и форма структурной организации эндокринной части. Ее клетки располагались по ходу средних и мелких выводных протоков (рис. 1 В), вследствие чего данную форму называли внешним эпителием. У представителей хрящевых и кистеперых рыб продолжалось выселение части клеток из внешнего эпителия и формирование в паренхиме экзокринной части немногочисленных смешанных панкреатических островков, состоящих в основном из А-, В- и D-клеток. В ходе дальнейшей эволюции панкреатические островки стали основной формой структурной организации эндокринной части поджелудочной железы всех остальных классов позвоночных (рис. 1 Г). Так кишечная (энтериновая) система в ходе эволюции превратилась в гастроэнтеропанкреатическую эндокринную систему. У двоякодышащих рыб часть ее клеток сформировала респираторный отдел ДЭЭС. У амфибий клетки ДЭЭС дополнительно появились и в коже. У птиц наблюдалось частичное разделение инсулярного и контринсулярного аппарата и формирование трех типов панкреатических островков: типичных смешанных, состоящих, как и у всех позвоночных, из А-, В-, D- и PP-клеток, и эволюционно новых, так называемых темных и светлых островков.

Первые образованы многочисленными А- и единичными D-клетками, а вторые – многочисленными В- и единичными D-клетками (рис. 1 Д, Е).

Таким образом, основным принципом эволюционного развития ДЭЭС являлись процессы миграции ее клеток из эпителия слизистой оболочки кишки, в результате чего она сформировала свои представительства и в других органах пищеварительной системы (гастроэнтеропанкреатическая эндокринная система), дыхательной, мочеполовой систем и кожи. В ходе эволюции эндокринной части поджелудочной железы имел модус фиксации промежуточных фаз, объясняющий наличие наряду с панкреатическими островками остатков внешнего эпителия в составе выводных протоков поджелудочной железы некоторых классов позвоночных [1, 12]. Особый интерес представляют данные о сравнительной чувствительности В-клеток, секретирующих инсулин, к диабетогенным факторам. Установлено, что В-клетки амфибий [9] и рептилий [10] проявляют сравнительно высокую резистентность к аллоксану, тогда как у млекопитающих [12] он вызывает их гибель. Таким образом, проведенный анализ структур-



А – энтериновая гормональная система ланцетник
 Б – фолликулы Лангерганса круглоротые
 В – внешний эпителий поджелудочной железы хрящевые и кистеперые рыбы
 Г – смешанный панкреатический островок костистые рыбы, амфибии, рептилии, птицы, млекопитающие
 Д – темный островок птиц
 Е – светлый островок птиц

Рис. 1. Схема этапов эволюции структурной организации эндокринной части поджелудочной железы позвоночных (по В.В. Яглову, 1978)

турного формирования ДЭЭС в ряду позвоночных дает основания считать, что ее развитие было направлено на интенсификацию функций организма (ароморфоза) путем миграции ее клеток из кишки в эпителии других органов и систем с целью создания адекватных условий гормонального контроля всех этапов внешнего обмена.

Онтогенетические аспекты формирования ДЭЭС. В этом плане заслуживает внимания рассмотрение двух проблем – выяснение эмбриональных источников развития ДЭЭС и закономерностей становления и дифференцировки ее клеток в пре- и постнатальном периодах онтогенеза.

В то время, когда формировалась концепция APUD-серии, основное внимание исследователей было обращено на сходство ее клеток с пептидергическими нейронами. В конечном счете все клетки APUD-серии стали считать нейроэндокринными, то есть производными нейроэктодермы. Такое представление хорошо объясняло, почему так называемые нейропептиды (соматостатин, ВИП, бомбесин, нейротензин, субстанция P, эндорфины и т.д.) содержатся как в нейронах, так и в тучных клетках, секреторных кардиомиоцитах и клетках ДЭЭС. Однако признание их производными нейроэктодермы противоречило элементарным представлениям об энтеродермальном происхождении паренхимы экзокринной и эндокринной частей поджелудочной железы, мезенхимном – тучных клеток и мезодермальном – секреторных кардиомиоцитов.

Начались проверочные работы. Было использовано два методических подхода: изучение ацинозостровковых клеток, сочетающих в себе черты структурно-функциональной организации экзокринных и эндокринных клеток поджелудочной железы, и удаление нервного гребня (предполагаемого источника развития клеток APUD-серии) до начала его диссоциации и миграции клеток в ткани. Ультраструктурный анализ поджелудочной железы костистых рыб [11], амфибий [5], рептилий [6], птиц [7] и млекопитающих [8] показал наличие в ней ацинозостровковых клеток. Было установлено, что они являются истинными клетками, а не артефактами. На основании этого сделан вывод о едином источнике их развития из кишечной энтодермы [4, 12, 15, 16, 17]. Второй подход дал те же результаты [19, 34]. Таким образом, нейроэктодермальная концепция происхождения клеток ДЭЭС не получила научно обоснованного подтверждения. Стало очевидно, что клетки ДЭЭС развиваются из стволовых клеток гистогенетически различных типов эпителиальных тканей. В частности, клетки самого крупного звена ДЭЭС – гастроэнтеропанкреатической системы развиваются из стволовой энтеродермальной клетки [22, 35]. Дифференцировка стволовых клеток крипт кишечника осуществляется по пяти направлениям, формирующим пулы бокаловидных, энтероэндокринных клеток, апикальнозернистых клеток Панета, каемчатых энтероцитов и малоизученных пулов клеток, таких как М-клетки, щеточные клетки и т.д. [28, 33]. Первые три

вида клеток формируют так называемую секреторную линию дифференцировки. Основными путями дифференцировки стволовых клеток кишечного эпителия являются Wnt и Notch (рис. 2). Активация Notch приводит к транскрипции генов класса Hes (Hairy/Enhancer of Split), которые репрессируют транскрипцию генов фактора Math1 – ключевого транскрипционного фактора, коммитирующего дифференцировку клеток по секреторному пути. Утрата Math1 приводит к утрате секреторных клеток. Запуск каскада Notch–Hes–Math1 необходим для активации группы транскрипционных факторов нейрогенин-3 (Ngn3), отвечающих непосредственно за дифференцировку прогениторных клеток секреторного пути в энтероэндокринные [20]. Одновременно каскад Wnt активирует синтез Dll – лигандов пути Notch. Dll соединяется с рецептором, расположенном на мембране соседней клетки, и активирует в ней экспрессию рецепторов Notch. Это приводит к транскрипции генов Hes1, что препятствует экспрессии нейрогенина-3, и клетка не дифференцируется по секреторному направлению. Экспрессия нейрогенина-3 нужна для дифференцировки различных энтероэндокринных клеток, в частности I-клеток (ХЦК), S-клеток (секретин), G-клеток (гастрин), К-клеток (гастроингибирующий пептид), L-клеток (энтероглюкагон), YY-клеток (YY-полипептид), Ес-клеток (серотонин, субстанция P) и D-клеток (соматостатин).

Утверждение, что клетки ДЭЭС развиваются из различных эмбриональных зачатков, не дает ответа на ряд вопросов. В частности, как объяснить, что гистогенетически разные клетки – нейроны (производные нейроэктодермы), клетки гастроэнтеропанкреатической эндокринной системы (производные

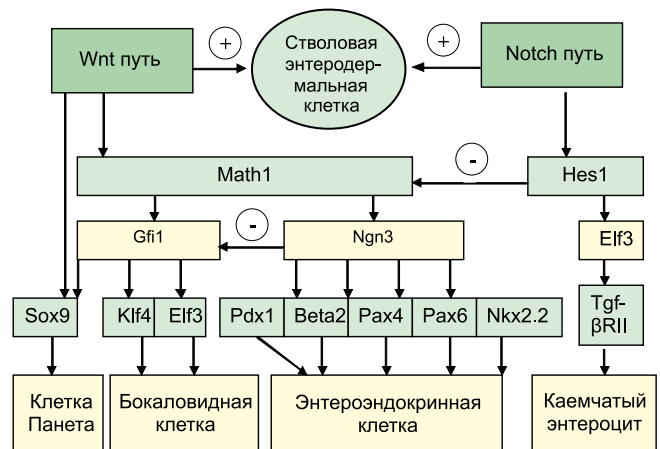


Рис. 2. Схема дифференцировки эпителиальных клеток кишечника (по van der Flier L. с соавт., 2009, с изменениями и дополнениями).

Math1 – mouse atonal homolog 1, Hes1 – hairy/Enhancer of Split, Gli1 – , Ngn3 – neurogenin3, Elf3 – E47-like factor 3, Sox9 – , Klf4 – kruppel-like factor 4, Pdx1 – pancreatic and duodenal homeobox 1, Beta2 – , Pax4, 6 – paired box 4, 6, Tgf-βRII – transforming growth factor β type II receptor

эпителия энтеродермального типа), тучные клетки (производные мезенхимы), секреторные кардиомиоциты (производные миоэпикардальной пластинки мезодермы) – секреторируют одни и те же биогенные амины (гистамин, серотонин, катехоламины) и пептидные гормоны (инсулин, глюкагон, ВИП, соматостатин, ХЦК, субстанция Р и т.д.)? Анализируя эту проблему, следует признать, что химическая структура биологически активных веществ принципиально не менялась в ходе эволюции животных, то есть отражала экспрессию элементарного блока генотипа клеток животных различного уровня эволюционного развития. Как известно, в основу современного функционализма положена концепция функциональных блоков [3]. Так, образование молочной кислоты и в бактериях, и в мышцах человека требует участия одних и тех же ферментов. Другими словами, каждый элементарный функциональный блок продукции биологически активного вещества может экспрессироваться различными цитогенетическими типами клеток. Это в равной мере относится и к экспрессии маркеров их дифференцировки. Хромогранин А может выявляться в нейроэктодермальных клетках (хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечника), энтеродермальных клетках ДЭЭС и мезодермальных glanduloцитах бульбоуретральных желез. Все сказанное требует научно обоснованного подхода к созданию гистогенетической классификации опухолей ДЭЭС.

Анализ второго аспекта онтогенетического развития ДЭЭС – закономерностей закладки и дифференцировки ее клеток – позволил выделить ряд закономерностей этого процесса. Одной из них является ранняя дифференцировка клеток ДЭЭС в органах и тканях до появления специфических клеток-мишеней, то есть в тот период, когда гормоны еще не могут оказывать свое специфическое действие. С другой стороны, эти данные дают основание полагать, что раннее развитие эндокринных клеток в составе тех или иных тканей обусловлено участием их гормонов в регуляции механизмов эмбрионального гистогенеза. Второй закономерностью становления клеток ДЭЭС в пренатальном онтогенезе является интенсивное развитие эндокриноцитов в период наиболее выраженного роста и дифференцировки тканей. Третья закономерность пренатальной закладки ДЭЭС – появление ее клеток в органах и тканях, где у взрослых особей они не встречаются, но в условиях патологии появляются, например образование гастринсекретирующих клеток в составе панкреатических островков при синдроме Золлингера–Эллисона или В-клеток, продуцирующих инсулин, в процессе метаплазии эпителия бронхов у пациентов, страдающих пылевым бронхитом [13, 15]. Итак, анализ разных аспектов онтогенетического становления ДЭЭС свидетельствует о том, как важно их дальнейшее изучение для понимания механизмов гормональной регуляции нормально и патологически протекающего гистогенеза тканей.

Структурно-функциональная организация ДЭЭС. ДЭЭС является эндотелиальной железой мозаично-клеточного типа [17,18]. Для ее клеток характерны умеренно развитый набор органелл, наличие светлого матрикса цитоплазмы и секреторных гранул, которые в каждой клетке различаются формой, размерами и электронной плотностью содержимого [13, 14, 15, 18]. В структурно-функциональном отношении клетки ДЭЭС подразделяют на открытый и закрытый типы [25]. Клетки открытого типа своим апикальным концом достигают полости желудка, кишки или бронха. На нем имеются микроворсинки, содержащие рецепторные белки, то есть клетки открытого типа являются хеморецепторами содержимого полых органов, сообщающихся с внешней средой. Клетки закрытого типа не достигают полости органа и получают информацию о состоянии внутренней среды организма.

Последняя классификация клеток ДЭЭС включает следующие виды клеток: А, В, D, D1, Ес, Ес1, G, I, К, L, Мо, N, Р, РР, S, X, YУ [27]. А-клетки (клетки закрытого типа) содержатся в эндокринной части поджелудочной железы и слизистой оболочке желудка, выделяют глюкагон, эндорфины, гастроингибирующий пептид (ГИП) и ХЦК. В-клетки (клетки закрытого типа) располагаются в эндокринной части поджелудочной железы и выделяют инсулин. D-клетки (клетки закрытого типа) находятся в панкреатических островках, слизистой оболочке желудка, тонкой и толстой кишки. Они секреторируют соматостатин. D1-клетки содержатся в поджелудочной железе, желудке, тонкой и толстой кишке. Они выделяют ВИП. Ес-клетки (клетки открытого типа) – самый многочисленный вид. Они встречаются в поджелудочной железе, слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, воздухоносных путях и легких. Эти клетки секреторируют серотонин и субстанцию Р. Ес1-клетки (клетки закрытого типа) располагаются в слизистой оболочке тела желудка. Они выделяют гистамин. G-клетки содержатся в эпителии слизистой оболочки пилорического отдела желудка, двенадцатиперстной и тощей кишки, выделяют гастрин. I-клетки находятся в тонкой кишке. Они секреторируют ХЦК. К-клетки содержатся только в тонкой кишке, секреторируют гастроингибирующий пептид (ГИП). L-клетки – вторая по численности популяция клеток – находятся в слизистой оболочке подвздошной и толстой кишки. Они продуцируют энтероглюкагоны: глицентин, или глюкагоноподобный пептид-1 (ГПП-1), и оксинтомодулин (ГПП-2). Мо-клетки содержатся в эпителии слизистой оболочки тонкой кишки. Они продуцируют серотонин и мотилин. N-клетки располагаются в нижнем отделе тонкой кишки и выделяют нейротензин. Р-клетки локализируются в желудке, тощей, подвздошной кишке, поджелудочной железе и легких. Выделяют бомбезин. РР-клетки содержатся в поджелудочной железе, слизистой оболочке пилорического отдела желудка, тонкой и толстой кишки. Они выделяют панкреатический полипептид. S-клетки (от-

крытого типа) находятся в двенадцатиперстной кишке. Выделяют секретин. Х-клетки выявлены в слизистой оболочке желудка. Их гормональный профиль не выяснен. YY-клетки выделяют пептид YY.

Клеточный состав других звеньев ДЭЭС исследован менее полно. В последние годы в составе ДЭЭС открыты клетки, секретирующие грелин и обестатин. Наличие в составе ДЭЭС хеморецепторных клеток открытого и закрытого типа послужило основанием считать ее эволюционно древним диффузно организованным органом чувств [15], осуществляющим гормональный контроль за внешним обменом эпителиев слизистых оболочек полых органов, сообщающихся с внешней средой (рис. 3). Анализ топографии клеток ДЭЭС показал, что D, D1, Ec, P и PP-клетки содержатся во всех отделах желудочно-кишечного тракта, тогда как остальные клетки имеют ограниченную органную локализацию. В чем физиологический смысл такой топографии клеток ДЭЭС? По мнению В.В. Яглова [15], D-, D1-, Ec-, P- и PP-клетки и их гормоны (соматостатин, ВИП, серотонин, субстанция P, бомбезин и панкреатический полипептид) в экстремальных ситуациях включают защитные стандартные механизмы усиления барьерной функции эпителиальных тканей. В пищеварительной системе они в конечном счете завершаются рвотой или диареей, в воздухоносных путях – бронхоспазмом. Что касается ограниченной локализации клеток ДЭЭС, они в большей мере осуществляют регуляцию периодической функциональной

деятельности органов желудочно-кишечного тракта – выделение желудочного, панкреатического, кишечного сока, перистальтику, всасывание пищевых мономеров и передачу информации об их химическом составе. Из этого следует, что ДЭЭС как орган чувств полых органов, сообщающихся с внешней средой, имеет различные по структурно-функциональной организации паракринно-эндокринные регионы [15]. Основу каждого из них составляют D-, D1-, Ec-, P- и PP-клетки – регуляторы барьерной функции эпителиальных тканей. Наличие в них других гормонопродуцирующих клеток обеспечивает регуляцию их специфической деятельности. Однако роль паракринно-эндокринных регионов не ограничивается этими функциями. Появились данные о роли гастрина, ХЦК, бомбезина, нейротензина, пептида YY, энтероглюкагона и соматостатина в регуляции пролиферации клеток и трофике тканей [32]. Это открывает новые перспективы в изучении структурно-функциональной деятельности паракринно-эндокринных регионов ДЭЭС, так как выделяемые в их пределах гормоны отличаются степенью выраженности пролиферативных, трофических и анти-трофических эффектов.

Секреция клеток ДЭЭС. Данный процесс прошел два этапа эволюционного становления: спонтанный, или агранулярный, и циклический, или гранулярный [2]. При спонтанном типе секреции образовавшиеся молекулы прогормонов сразу выделялись за пределы клетки, а при циклическом оформлялись в секреторные гранулы, накапливались в клетке и при действии триггера выделялись за ее пределы, поэтому в гранулярном секреторном цикле клетки ДЭЭС различают последовательно текущие фазы: поступление исходных продуктов, синтез из них секрета, его оформление в секреторные гранулы, их накопление в цитоплазме и выделение секрета [12, 15]. При этом было отмечено, что после стимулированной секреции вслед за фазой накопления секрета клетки вступают не в фазу выделения секрета, а в фазу его максимального накопления в результате включения механизма эктрузионного блока [8, 11]. После него клетка все-таки вступает в фазу выделения, но не экзоцитозом, а микроапокринным или голокринным способом с частичным либо полным нарушением ее целостности. Важно подчеркнуть, что у высокоорганизованных животных и человека в секреторной деятельности функционирует преимущественно циклический тип секреции – выделение биологически активного гормона (например, инсулина) и спонтанный – выделение биологически неактивной формы – прогормона (проинсулина). В норме у человека в крови содержится (95% инсулина и 5% проинсулина). Доказано, что В-клетки инсулиномы, продуцирующие инсулин, адаптивно меняют соотношение спонтанного и циклического типа секреции, выделяют 50% инсулина и 50% проинсулина [21] и тем самым предотвращают развитие гипогликемии и ее последствий. Эти показатели можно расценивать как

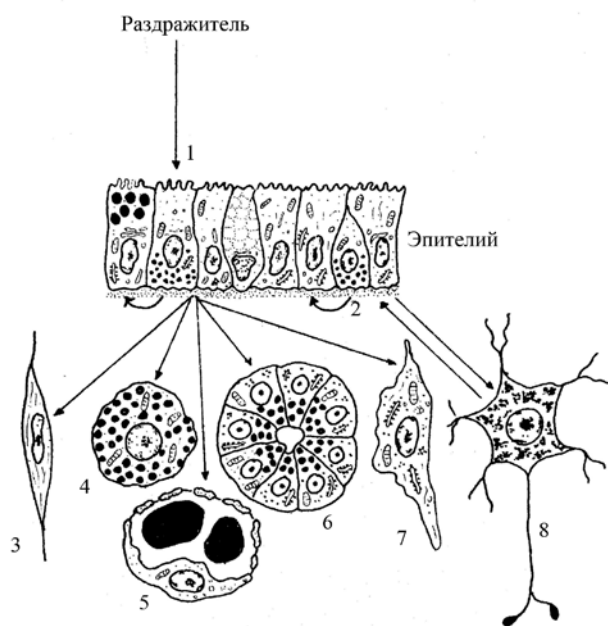


Рис. 3. Схема строения диффузной эндокринной эпителиальной системы (по В.В. Яглову, 1989).

- 1 – эндокринная клетка открытого типа;
- 2 – эндокринная клетка закрытого типа; 3 – гладкий миоцит;
- 4 – тучная клетка; 5 – кровеносный капилляр;
- 6 – концевой отдел экзокринной железы; 7 – фибробласт;
- 8 – нейрон

диагностические признаки присутствия в организме гормонально активных опухолей ДЭЭС.

Функциональная деятельность ДЭЭС неразрывно связана с деятельностью других желез внутренней секреции, нервной и иммунной систем, играя роль звена первичного реагирования, оповещения и защиты организма [15].

К фундаментальным проблемам изучения ДЭЭС необходимо отнести следующие: выявление связей ДЭЭС с другими железами внутренней секреции; выяснение ее роли в реализации механизмов специфического динамического действия пищи; дальнейшее изучение трофических и антитрофических свойств гормонов ДЭЭС в различных паракринно-эндокринных регионах; исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе резистентности и чувствительности В-клеток эндокринной части поджелудочной железы к диабетогенным факторам; дальнейшее изучение секреторных механизмов клеток ДЭЭС в норме и патологии и научно обоснованный пересмотр гистогенетической классификации опухолей ДЭЭС.

Литература

1. Елецкий Ю.К. Эволюция структурной организации эндокринной части поджелудочной железы позвоночных / Ю.К. Елецкий, В.В. Яглов. М.: Наука, 1978. 168 с.
2. Трэк Н.С. Эволюция механизмов секреции инсулина / Н.С. Трэк // Эволюционная эндокринология поджелудочной железы. Л.: Наука, 1977. С. 192–203.
3. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Элементы современного функционализма / А.М. Уголев. Л.: Наука, 1985. 544 с.
4. Яглов В.В. Морфология и классификация ацино-островковых клеток поджелудочной железы / В.В. Яглов, Ю.К. Елецкий // Архив анат. 1975. Т. 69. Вып. 12. С. 20–23.
5. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы амфибий / В.В. Яглов // Архив анат. 1976. Т. LXX. Вып. 3. С. 73–78.
6. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы рептилий / В.В. Яглов // Архив анат. 1976. Т. LXX. Вып. 11. С. 89–93.
7. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы птиц / В.В. Яглов // Архив анат. 1977. Т. LXXII. Вып. 1. С. 24–27.
8. Яглов В.В. К сравнительной морфологии эндокринной части поджелудочной железы млекопитающих / В.В. Яглов // Архив анат. 1977. Т. LXXII. Вып. 4. С. 83–88.
9. Яглов В.В. Ультраструктурный анализ влияния аллоксана на инсулярный аппарат поджелудочной железы амфибий / В.В. Яглов // Проблемы эндокринологии. 1977. Т. 23. № 3. С. 87–89.
10. Яглов В.В. Ультраструктурный анализ влияния аллоксана на клеточные элементы поджелудочной железы рептилий / В.В. Яглов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1977. № 8. С. 248–250.
11. Яглов В.В. Морфология эндокринной части поджелудочной железы костистых рыб / В.В. Яглов // Архив анат. 1978. Т. LXXIV. Вып. 1. С. 111–115.
12. Яглов В.В. Сравнительная морфология, гистофизиология и экспериментальная патология эндокринной части поджелудочной железы позвоночных: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук / В.В. Яглов. М., 1978. 32 с.
13. Яглов В.В. Диффузная эндокринная система. Перспективы изучения для профессиональной патологии и токсикологии (обзор литературы) / В.В. Яглов // Гигиена труда. 1983. № 11. С. 32–36.
14. Яглов В.В. Диффузная эндокринная система. Итоги и перспективы исследования / В.В. Яглов, Г.А. Ломоносова // Успехи современной биологии. 1985. Т. 99. Вып. 2. С. 264–276.
15. Яглов В.В. Актуальные проблемы биологии диффузной эндокринной системы / В.В. Яглов // Архив анат. 1989. Т. 96. Вып. 1. С. 14–29.
16. Яглов В.В. Актуальные проблемы биологии ацино-островковых клеток поджелудочной железы / В.В. Яглов, Н.В. Яглова // Вестник РАМН. 2010. № 7. С. 28–35.
17. Яглов В.В. Нерешенные проблемы нормальной и патологической морфологии диффузной эндокринной системы / В.В. Яглов, Н.В. Яглова // Архив патол. 2011. Т. 73. № 5. С. 58–62.
18. Яглов В.В. Основы частной гистологии / В.В. Яглов, Н.В. Яглова. М.: КолосС, 2011. 432 с.
19. Andrew A. The embryonic origin of connective tissue mast cells / A. Andrew, B. Rawdon // J. Anat. 1987. V.150. P. 219–27.
20. Basic helix-loop-helix transcription factors and enteroendocrine cell differentiation / H. Li et al. // Diabetes Obesity & Metabolism. 2011. V. 13. Suppl. 1. P. 5–12.
21. Biochemical and morphological investigation of 30 human insulinomas. Correlation between the tumor content of insulin and proinsulin-like components and histological and ultrastructural appearance / W. Creutzfeld et al. // Diabetologia. 1973. V. 9. N. 3. P. 217–31.
22. Development and differentiation of gut endocrine cells. Minireview / S. Schonhoff et al. // Endocrinology. 2004. V. 145. N. 6. P. 2639–44.
23. Feyrter F. Uber diffuse endokrine epitheliale Organe / F. Feyrter // Leipzig: J.A. Barth., 1938.
24. Fujita T. Concept of paraneurons / T. Fujita // Arch. Histol. Jap. 1977. V. 40 (Suppl.). P. 187–233.
25. Fujita T. The cells and hormone of the GEP endocrine system – the current of studies / T. Fujita, S. Kobayashi // Gastroentero-pancreatic endocrine system. A-cell-biological approach / T. Fujita (ed.). Tokyo: Igaku Shoin, 1973. P. 1–16.
26. Heidenhain R. Untersuchungen über den Bau der Labdrüsen / R. Heidenhain // Arch. mikr. Anat. 187. Bd. 6. S. 368–406.
27. Human gastroenteropancreatic endocrine-paracrine cells: Santa Monica, 1980. Classification / E. Solcia et al. // In: Cellular basis of chemical messengers in the digestive system. London, Toronto, Sidney, San Francisco: Acad. Press, 1981. P. 159–165.
28. Intestinal M-cells: the fallible sentinels? / H. Miller et al. // World J. Gastroenterol. 2007. V. 13. P. 1477–86.

29. *Pearse A.* Cell migration and alimentary system: endocrine contributions of the neural crest to the gut its derivatives / A. Pearse // *Digestion*. 1973. V. 8. P. 372–85.
30. *Pearse A.* Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cell producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial cells and calcitonin / A. Pearse // *Proc. Roy. Soc.* 1968. ser. B. V. 170. N. 1018. P. 71–80.
31. *Pearse A.* The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and embryologic, physiologic and pathologic implication of the concept / A. Pearse // *J. Histochem. Cytochem.* 1969. V. 17. P. 303–13.
32. Role of gastrointestinal hormones in proliferation of normal and neoplastic tissues / R. Thomas et al. // *Endocrine Reviews*. 2003. V. 24. N. 5. P. 571–99.
33. *Sbarbati A.* A new fate for old cells: brush cells and related elements / A. Sbarbati, F. Osculati // *J. Anat.* 2005. V. 206. P. 349–58.
34. The neural crest and the origin of the insulin-producing and other gastrointestinal hormone-producing cells / R. Pictet et al. // *Science*. 1976. V. 191. P. 191–2.
35. *van der Flier L.* Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium / L. van der Flier, H. Clevers // *Annu. Rev. Physiol.* 2009. V. 71. P. 241–60.

RESULTS AND PROSPECTS FOR STUDYING DIFFUSE ENDOCRINE EPITHELIAL SYSTEM

V.V. Yaglov, N.V. Yaglova

Diffuse endocrine epithelial system (DEES) is evolutionarily ancient and largest component of animal and human endocrine system. The paper summarizes the long-term results from the study on DEES including the history of the concept of DEES; phylogenetic and ontogenetic aspects of DEES development; structure and function of diffuse endocrine epithelial cells. Outlines for further research of DEES are suggested.

Key words: diffuse endocrine epithelial system, phylogenesis, development, structure, hormone secretion

Информация об авторах

Яглов В.В. – докт. мед. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 128-6683. E-mail: vyaglov@mail.ru

Яглова Н.В. – докт. мед. наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека РАМН.

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

Материал поступил в редакцию 8 июня 2012 года.

НАРУШЕНИЯ ПРОЦЕССОВ АНГИОГЕНЕЗА, АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ В ТКАНЯХ ПЛОДНОГО ЯЙЦА И ЭНДОМЕТРИИ ПРИ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ В I ТРИМЕСТРЕ

Н.А. Семенцова¹, Ю.Н. Пономарева¹, Т.Г. Барсанова², О.В. Зайратьянц^{1,2}

¹ ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздравсоцразвития России, Москва

² ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Проведено иммуноморфологическое исследование тканей плодного яйца и соскобов эндометрия у 96 пациенток с неразвивающейся беременностью в сроке 4–12 недель. Контролем служили 40 соскобов эндометрия при артифициальных абортах. Показано, что в патогенезе неразвивающейся беременности в I триместре определенное значение могут иметь нарушения экспрессии сосудисто-эндотелиального фактора роста, трансформирующего фактора роста- β_1 , Вах, Vcl-2 и Ki-67 в тканях плодного яйца и эндометрия.

Ключевые слова: неразвивающаяся беременность, факторы роста, апоптоз, пролиферация

Неразвивающаяся беременность (НБ) является одной из актуальных медико-социальных проблем в акушерстве и гинекологии. Ее частота, по данным разных авторов, варьирует от 45 до 88,6% среди всех случаев самопроизвольного прерывания беременности в I триместре, а в структуре репродуктивных потерь она составляет 10–20%. Исследования последних лет свидетельствуют о многофакторности патогенеза НБ. Недостаточно изучены его молекулярно-биологические механизмы, в частности нарушения продукции факторов роста, ангиогенеза, процессов апоптоза и пролиферации клеток тканей трофобласта и эндометрия. Формирование сосудистой системы хориона, необходимой для имплантации, связано с оптимальной экспрессией сосудисто-эндотелиального фактора роста (СЭФР) [5]. Значительным пролиферативным и митогенным потенциалом, необходимым для роста, созревания клеток и неоангиогенеза, обладает трансформирующий фактор роста бета (ТФР- β_1), повышенная продукция которого, напротив, инициирует процессы склероза тканей [2, 5]. Физиологическая готовность к имплантации бластоцисты и инвазии трофобласта во многом обусловлена оптимальным соотношением процессов апоптоза и пролиферации клеток эндометрия [8]. В регуляции апоптоза большое значение имеют несколько групп белков, среди которых основные – системы Vcl-2 и Вах, относящиеся, соответственно, к его ингибиторам

и индукторам [3]. Активность процессов пролиферации принято оценивать по уровню экспрессии негистонового ядерного белка Ki-67, который позволяет выделить пролиферирующие клетки, находящиеся во всех фазах клеточного цикла, кроме фазы G0 [6].

С целью изучения некоторых молекулярно-биологических механизмов формирования НБ в I триместре проведено комплексное клиничко-морфологическое исследование 96 пациенток в возрасте от 17 до 38 лет (средний возраст 25,3±8,1 года), госпитализированных с диагнозом угрожающего, начавшегося или несостоявшегося аборта в сроке беременности 4–12 недель. Всем пациенткам проводилось комплексное обследование в соответствии с принятыми стандартами: общеклиническое обследование, лабораторные исследования, трансвагинальная эхография с доплерометрией [4]. При проведении УЗИ диагностировали отсутствие сердцебиения эмбриона (плода), по параметрам плодного яйца и предполагаемым срокам беременности устанавливали время гибели эмбриона (плода) с последующей постановкой диагноза «неразвивающаяся беременность».

Объектом морфологического исследования являлись удаленные из полости матки ткани плодного яйца и соскобы эндометрия. В качестве контроля при проведении иммуноморфологических исследований использовали 40 образцов abortного материала, по-

лученного при проведении искусственных абортов на сроке 4–12 недель у женщин, сопоставимых по возрасту и данным анамнеза.

Гистологические исследования проводили по стандартной методике, для иммуноморфологического исследования использовали иммунопероксидазный метод. Гистологические срезы, изготовленные из парафиновых блоков, помещали на покрытые адгезивом APES-ацетон предметные стекла. Эндогенную пероксидазу в депарафинированных срезах блокировали 3% перекисью водорода. Демаскировку антигенов проводили в микроволновой печи в течение 20 минут при 600 Вт в 0,1 М растворе цитратного буфера (рН 6,0). Использовали 5 моноклональных антител (производства DAKO, UK, Germany и Lab Vision, USA) к СЭФР (клон G153-694), ТФР-β₁, Bcl-2, Вах и Ki-67. После инкубации гистологических срезов с первичными антителами (рабочее разведение антисывороток – 1:50–100, время инкубации – 45–60 минут при температуре +37°C) их обрабатывали вторичными биотилированными антикроличьими иммуноглобулинами. Для последующей визуализации результата реакции использовали систему детекции Ultra Vision LP Value HRP Polymer (Lab Vision, USA). Проводили общепринятые отрицательные и положительные контрольные процедуры на используемые реагенты и ткани при обработке параллельных срезов. Отрицательный контроль заключался в проведении реакции с исключением первичных специфических

антител (путем их замены неиммунным реактивом – бычьей сывороткой) или специфических антигенов. Положительный контроль – с использованием гистологических препаратов рака молочной железы.

Результаты иммуногистохимических реакций оценивали с помощью полуколичественного морфометрического метода [9] отдельно в децидуальных клетках, клетках стромы и эпителии желез эндометрия, клетках эпителия и стромы ворсин (в последующем для сравнительной оценки тканевых показателей вычисляли средние значения для децидуальной ткани, ткани эндометрия и ворсин хориона). Определяли процент клеток, ядра которых экспрессируют белок Ki-67 в 10 полях зрения при увеличении микроскопа x 400. Для оценки экспрессии СЭФР, ТФР-β₁, Вах и Bcl-2 применяли балльную систему. Визуально оценивали интенсивность окраски клеток в баллах от 0 до 3 (отрицательная, слабая, умеренная и выраженная) и подсчитывали процент позитивно окрашенных клеток при каждом значении интенсивности окраски (в 10 полях зрения при увеличении микроскопа x 400). Коэффициент экспрессии рассчитывали для каждого наблюдения по формуле [9]: $K = \frac{\sum(B \times \Pi)}{100}$, где B — интенсивность окраски в баллах (от 0 до 3), Π – процент окрашенных клеток (от 0 до 100%) для каждого значения B.

Статистическую обработку данных проводили в соответствии с правилами вариационной статистики [1].

Таблица

Тканевые показатели экспрессии факторов роста, регуляторов апоптоза и уровня пролиферации в изученных наблюдениях

Показатель	Группы наблюдений и ткани*:								
	1 – децидуальные ткань – децидуальные клетки; 2 – ткань эндометрия – средний показатель для стромальных клеток и эпителия желез эндометрия; 3 – ткань ворсин – средний показатель для стромальных клеток и эпителия ворсин хориона								
	Контроль, n=40			I группа, n=54			II группа, n=42		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
СЭФР	1,05±0,11	1,88±0,10	0,72±0,10	0,77±0,09 p=0,05	0,93±0,34 p=0,02	0,35±0,13 p=0,47	1,11±0,11 p ₁ =0,02	1,63±0,24	0,82±0,11 p ₁ =0,01
ТФРβ ₁	0,18±0,03	0,41±0,02	0,13±0,03	1,24±0,19 p<0,001	0,91±0,15 p=0,01	0,47±0,13 p=0,03	0,25±0,02 p ₁ <0,001	0,57±0,04 p ₁ =0,05	0,18±0,01 p ₁ =0,05
Вах	0,11±0,01	0,21±0,02	0,10±0,01	0,58±0,11 p<0,001	0,46±0,10 p=0,04	0,30±0,08 p=0,04	0,24±0,10 p ₁ =0,03	0,36±0,13	0,11±0,03 p ₁ =0,05
Bcl-2	2,24±0,45	2,79±0,78	2,85±0,78	2,10±0,59	2,55±0,71	2,76±0,71	2,13±0,49	2,61±0,41	2,97±0,98
Bcl-2/Bax	20,4±2,45	13,3±1,44	28,5±4,60	3,6±0,07 p<0,001	5,5±0,15 p<0,001	9,2±2,10 p<0,001	8,9±3,22 p=0,01	7,3±3,22	26,4±2,50
Ki-67	9,9±1,10	12,6±1,10	38,0±3,88	6,2±1,41 p=0,05	9,2±1,10 p=0,04	29,0±2,10 p=0,03	7,5±0,86	14,0±2,09 p ₁ =0,03	33,2±2,84

* Особенности экспрессии отдельных типов клеток изученных тканей – см. в тексте статьи; p – статистическая значимость различий с контрольной группой; p₁ – статистическая значимость различий с I группой.

Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка среднего. Для оценки статистически значимых различий использовали критерий Стьюдента (t), критический уровень значимости (p) принимался меньшим или равным 0,05.

Результаты исследования 40 наблюдений контрольной группы выявили высокие значения экспрессии СЭФР и Vcl-2 в клетках стромы и части эпителиальных клеток желез гравидарного эндометрия, децидуальных клетках, стромальных и эпителиальных клетках ворсин хориона, а также Ki-67 ядрами тех же типов клеток. Минимальная экспрессия отмечена для ТФР- β_1 и Вах (табл.). Выявленные изменения позволяют предположить, что при нормальном развитии беременности на ранних сроках высокая концентрация СЭФР связана с модуляцией процессов эмбриотрофической активности, тогда как минимальные концентрации ТФР- β_1 , инициирующего реакции локальной иммуносупрессии в гравидарном эндометрии, обеспечивают реакции

физиологической инвазии трофобласта. Соотношение ингибиторов и индукторов апоптоза (Vcl-2/Vax), баланс которых обеспечивает постоянство клеточного состава, повышалось, что указывало на подавление механизмов запуска программированной клеточной гибели, необходимой для нормального развития и инвазии трофобласта.

Из 96 наблюдений НБ в 54 случаях (I группа, 56,3%) гистологически выявлялись изменения эндометрия, не позволяющие исключить возможность ранее существовавшего хронического эндометрита: диффузная, преимущественно периваскулярная лимфомакрофагальная инфильтрация с примесью плазмоцитов, формирование лимфоидных фолликулов со светлыми центрами, перигландулярный и периваскулярный склероз (рис. 1, А–Г). В 42 наблюдениях НБ (II группа, 43,7%) гистологически были выявлены только разной величины очаги некроза и острое гнойное воспаление тканей трофобласта и эндометрия (рис. 2, А, Б).

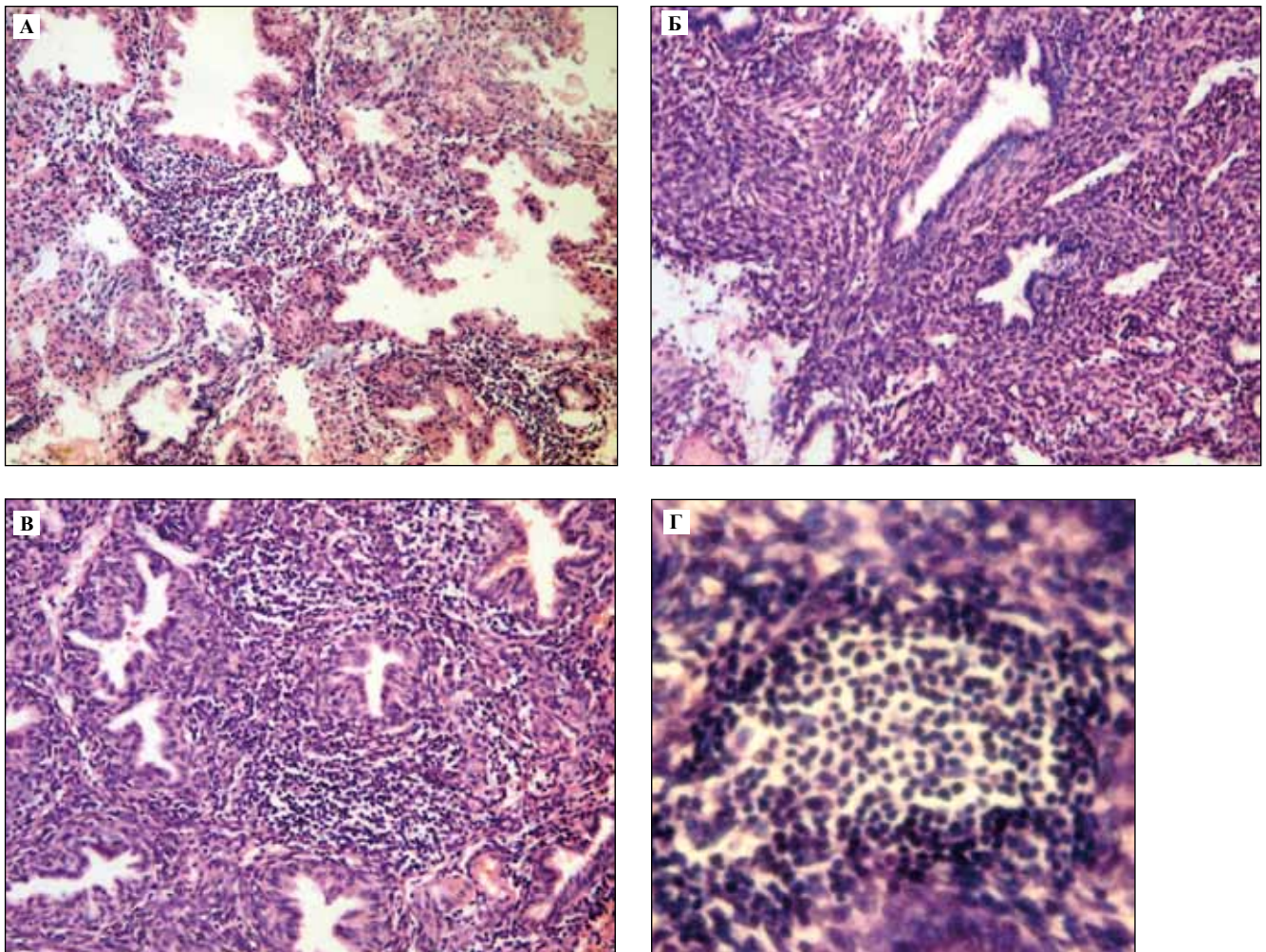


Рис. 1. А–Г. I группа наблюдений. Лимфомакрофагальная инфильтрация с примесью плазмоцитов (А–В), перигландулярный и периваскулярный склероз (Б, В) и формирование лимфоидных фолликулов со светлыми центрами (Г) в эндометрии. Окраска гематоксилином и эозином, А – $\times 100$, Б, В – $\times 140$, Г – $\times 400$

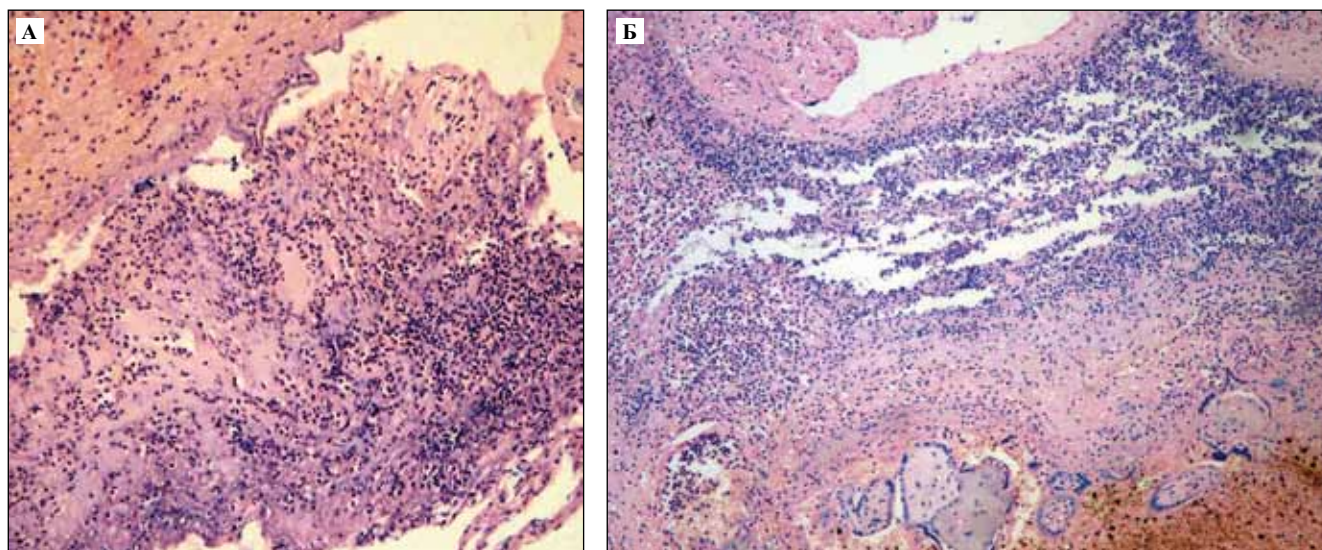


Рис. 2, А, Б. II группа наблюдений. Обширные очаги некроза и острого гнойного воспаления тканей плодного яйца и эндометрия. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 120$

В I группе наблюдений отмечались снижение экспрессии СЭФР и значительное повышение ТФР- β_1 в строме и эпителии желез эндометрия, децидуальных клетках, стромальных и эпителиальных клетках ворсин хориона по сравнению с показателями контрольной группы (табл.). Очевидно, что снижение СЭФР предопределяет неполноценную инвазию трофобласта, приводя к его повреждению, отслоению и в конечном счете прекращению развития беременности. Другой составляющей этого механизма потери беременности является гиперпродукция ТФР- β_1 (рис. 3, А), опосредующего усиление иммунного ответа на трофобластические антигены и активацию продукции компонентов межклеточного матрикса [2], препятствуя, таким образом, изначально сниженной инвазии трофобласта за счет дефицита СЭФР. Каскад изменений ростовых факторов, локальная гипоксия на фоне нарушений развития сосудистого компонента могут приводить к активации механизмов клеточной гибели, в частности посредством активной экспрессии индуктора апоптоза Вах, а также снижению пролиферативной активности клеток, что и было установлено.

Во II группе наблюдений экспрессия СЭФР как в клетках стромы и эпителии желез гравидарного эндометрия, так и в децидуальных клетках, а также в стромальных клетках ворсин была достаточно выражена, не отличаясь от показателей контрольной группы, и оказалась выше, чем в I группе (рис. 3, Б). Нельзя исключить, что высокие значения экспрессии СЭФР обусловлены не только физиологическими механизмами развития беременности, но и прямой стимуляцией его продукции провоспалительными цитокинами I типа (интерфероны, ИЛ-1, ФНО α) при остром воспалении. Последние наряду с активацией апоптоза клеток (умеренная экспрессия в децидуальных клетках Вах со снижением соотношения Vcl-2/Вах) (рис. 3, В, Г) оказывают

прямое эмбриотоксическое действие и способствуют активации протромбиназы, предопределяя тромбозы, инфаркты трофобласта, его отслойку и гибель [6, 7]. Низкая экспрессия ТФР β_1 при остром воспалении также, возможно, связана с активацией цитотоксической активности макрофагов [2].

Таким образом, проведенное исследование выявило при НБ в I триместре различные нарушения экспрессии факторов роста, процессов апоптоза и пролиферации в тканях плодного яйца и эндометрия. Дальнейшее изучение молекулярно-биологических механизмов патогенеза НБ позволит с новых позиций рассматривать проблему невынашивания беременности и откроет перспективы поиска диагностических критериев, путей своевременной профилактики и патогенетического лечения данной патологии.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
2. Зубова С.Г., Окулов В.Б. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухолей- α и трансформирующего фактора роста- β в процессе ответа макрофага на активацию // Иммунология. 2001. № 5. С. 18–21.
3. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М.: Медицина, 2001. 192 с.
4. Отраслевые стандарты объемов обследования и лечения в акушерстве, гинекологии и неонатологии / Под ред. В.И. Кулакова, В.Н. Серова, Ю.И. Барашнева. М.: Триада-Х, 1999. С. 97–216.
5. Пальцев М.А. Цитокины и их роль в межклеточных взаимодействиях // Архив патологии. 1996. Вып. 6. С. 3–7.
6. Сидельникова В.М. Привычная потеря беременности. М.: Триада-Х, 2002. 304 с.
7. Цитокины и преждевременные роды / Н.Н. Володин и соавт. // Педиатрия. 2001. № 4. С. 72–77.

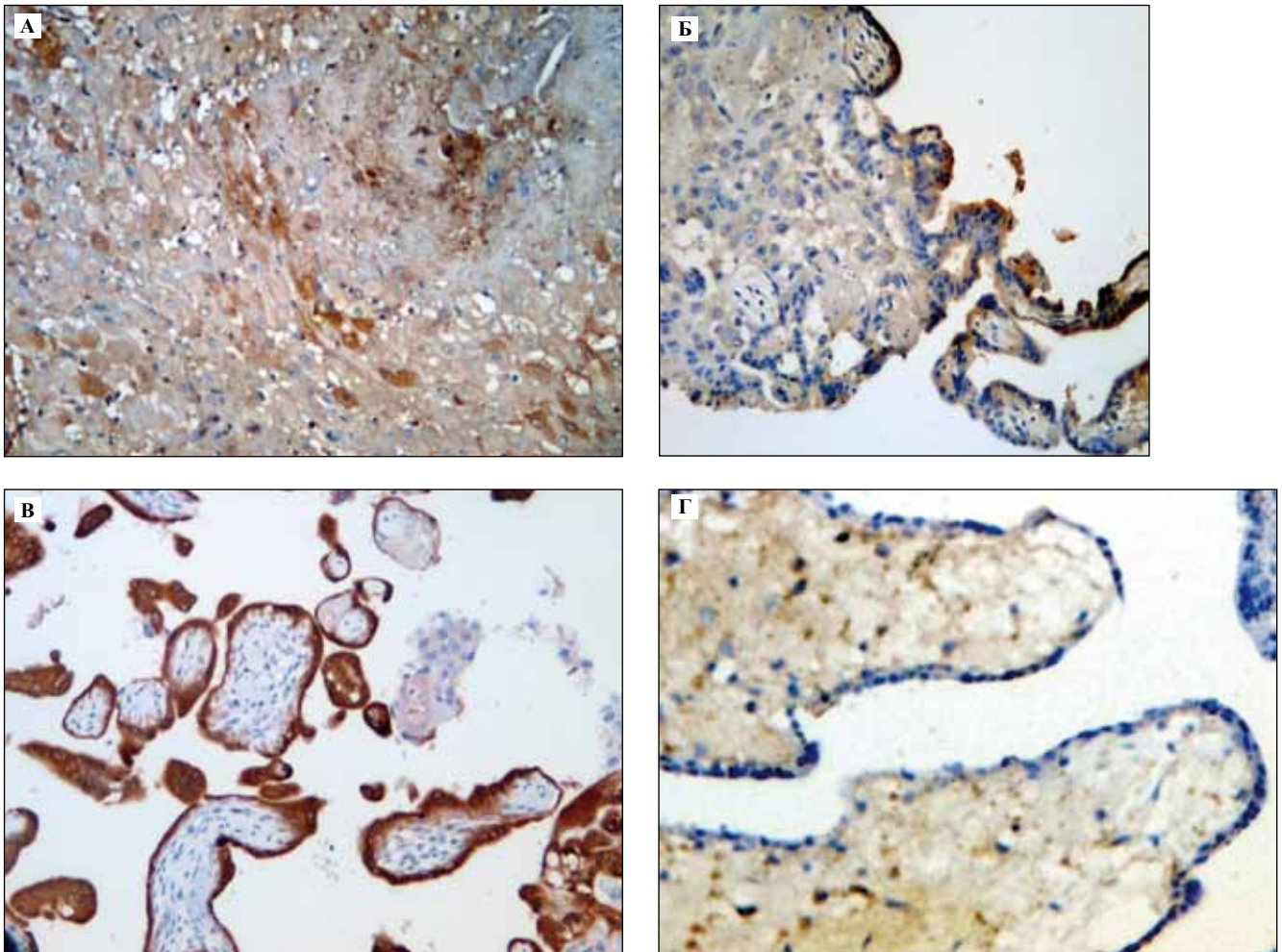


Рис. 3. А–Г. Результаты иммуноморфологического исследования I группы (А) и II группы (Б–Г) наблюдений; А – выраженная экспрессия ТФР- β_1 в децидуальных клетках; Б – выраженная экспрессия СЭФР преимущественно в эпителии и части клеток стромы ворсин и умеренная в децидуальных клетках; В – выраженная экспрессия Bcl-2 в клетках хориального эпителия ворсин; Г – умеренная экспрессия Bax в клетках стромы ворсин хориона и крайне слабая в клетках хориального эпителия. Непрямой иммунопероксидазный метод с антителами к ТФР- β_1 (А), СЭФР (Б), Bcl-2 (В), Bax (Г); А, Г – $\times 200$, В, Б – $\times 120$

8. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: an approach using multiparameter flow cytometry / Morsi H.M. et al. // Gynecol. Oncol. 2000. V. 77. P. 11–17.
9. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods / L.B. Kinsel et al. // Cancer Res. 1989. V. 49. P. 1052–1056.

DISORDERS OF ANGIOGENESIS, APOPTOSIS AND PROLIFERATION IN THE TISSUE OF THE GESTATIONAL SAC AND ENDOMETRIUM IN NON-DEVELOPING PREGNANCY OF THE FIRST TRIMESTER

N.A. Sementsova, Ju.N. Ponomareva, T.G. Barsanova, O.V. Zayratyants

Tissue of the gestational sac and endometrial scrapings of 96 women with non-developing pregnancy (weeks 4 to 12) was studied immunomorphologically. Forty endometrial scrapings obtained from artificial abortions served as controls. Impaired expression of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor- β_1 , Bax, Bcl-2 and Ki-67 in the tissue of the gestational sac and endometrium are shown to be involved in the pathogenesis of non-developing pregnancy of the first trimester.

Key words: non-developing pregnancy, growth factors, apoptosis, proliferation

Информация об авторах

Семенцова Наталья Александровна – аспирант кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета.

Пономарева Юлия Николаевна – профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета Московского государственного медико-стоматологического университета.

Барсанова Татьяна Георгиевна – врач-лаборант кафедры патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета.

Зайратьянц Олег Владимирович – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Московского государственного медико-стоматологического университета.

Адрес: Москва, ул. Делегатская, д. 20. Телефон 8 903184-9217. E-mail: ovzair@mail.ru

Материал поступил в редакцию 15 июня 2012 года.

© Коллектив авторов, 2012

УДК: 611.611:616.379-08.64.42]-08

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНО ТЕКУЩЕМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-го ТИПА У ВЗРОСЛЫХ

А.Е. Прощина, В.М. Барабанов, Ю.С. Кривова, С.В. Савельев

ФГБУ «НИИ морфологии человека РАМН», Москва

В работе исследованы аутопсии поджелудочной железы (ПЖ), полученные от 5 лиц, страдавших длительное время сахарным диабетом 1-го типа (СД1), и 9 лиц, не страдавших нарушениями углеводного обмена и заболеваниями ПЖ. При гистологическом исследовании выявлена воспалительная реакция в экзокринной части ПЖ 3 пациентов с СД1. Наибольший вклад в эту реакцию вносили CD16+ и CD25+ клетки. Кроме того, при СД1 были выявлены достоверное увеличение относительного количества больших островков ПЖ (диаметр >100 мкм) и занимаемой ими площади на фоне уменьшения количества островков в целом. Предполагается, что в результате СД1 не происходит полноценного обновления популяции В-клеток, секретирующих инсулин, и образования новых островков.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, островки поджелудочной железы, инсулин

Сахарный диабет – группа эндокринных заболеваний, развивающихся вследствие абсолютной или относительной недостаточности гормона инсулина. Тяжелая недостаточность инсулина при отсутствии его заместительного введения приводит к гипергликемии и кетоацидозу – биохимическим признакам сахарного диабета 1-го типа. К середине 80-х годов прошлого столетия в диабетологии сложилась концепция аутоиммунного патогенеза СД1, основное положение которой сводится к тому, что причиной гибели В-клеток, содержащих инсулин, является аутоиммунная агрессия против них [1, 11]. У пациентов с недавно выявленным СД1 аутоиммунные процессы проявляются в форме инсулита – хронической воспалительной инфильтрации моноклеарными клетками остаточных В-клеток в островках поджелудочной железы [3]. Хотя инсулит и считается характерным для начальных стадий СД1, гистологически и иммуногистохимически он был описан только примерно в 150 случаях за 100 лет изучения [14].

Несмотря на заметные успехи в лечении диабета, СД1 по-прежнему остается одной из ведущих причин развития финальных стадий почечной болезни, слепоты и ампутаций [11]. В настоящее время активно разрабатываются новые методы трансплантации для восстановления углеводного обмена у больных диабетом. При этом вопрос о механизмах и последовательности

формирования зрелых мозаичных островков у человека до сих пор остается открытым [6].

Целью нашей работы было выявить количественные и иммуногистохимические изменения в ПЖ человека при длительно текущем СД1 по сравнению с контролем.

Материалы и методы

В работе использовали аутопсийный материал, собранный в 2007–2011 годы в больницах Москвы, и из коллекции лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека РАМН. Нами были исследованы образцы ПЖ 5 лиц, страдавших, по данным клинического диагноза, СД1, и 9 лиц без нарушений углеводного обмена и заболеваний ПЖ в качестве контроля (табл.).

Материал был зафиксирован в 10% кислотом формалине, нейтральном формалине (4% параформальдегид на 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,5) или жидкости Буэна. Кусочки из хвостовой части ПЖ обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и диоксане и заливали в парафин. Для всех образцов готовили серийные срезы толщиной 5 или 10 мкм. Впоследствии срезы депарафинировали, гидратировали, проводили гистологическую окраску по Маллори и гематоксилин-эозином.

Для иммуногистохимического исследования ПЖ срезы инкубировали при комнатной температуре в те-

Половозрастная характеристика доноров ткани ПЖ
(с – лица с СД1, н – контроль)

№	1с	2с	3с	4с	5с	1н	2н	3н	4н	5н	6н	7н	8н	9н
Возраст	27	41	41	41	66	24	27	31	35	51	55	60	62	70
Пол	м	м	м	м	м	м	м	м	м	м	м	м	м	м

чение 45 минут с антителами к инсулину (мышинные моноклональные антитела, Sigma, 1:1000–1:2000) и глюкагону (мышинные моноклональные антитела, Sigma, 1:2000–1:16000). В работе также использовались антитела к маркерам иммунологического ряда (Lab Vision Corp, NeoMarkers, RTU). Демаскирование антигена (кипячение срезов в 0,01 М цитратном буфере в течение 10 минут) было проведено для реакции с антителами к CD8, CD16, CD25 и CD71. С антителами к CD8 (кроличьи, эпитопспецифичные) срезы инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут, к CD20, CD25 (мышинные, моноклональные) – в течение 1 часа и, наконец, с антителами к CD16 и CD71 (мышинные моноклональные) – в течение 2 часов. Для выявления этих антигенов использовали Ultra Vision Detection System Anti-polyvalent (Lab Vision Corp). Для всей серии антител проведен как негативный, так и позитивный контроль.

На срезах также проведено двойное иммуногистохимическое окрашивание в реакциях инсулин (мышинные моноклональные антитела, ThermoScientific, 1:400) плюс глюкагон (кроличьи поликлональные антитела,

Таблица

ThermoScientific, 1:100). Для выявления указанных антигенов использована система детекции MultiVision Polymer Detection System: MultiVision anti-rabbit/HRP + anti-mouse/AP polymers (ThermoScientific).

Все полученные препараты оценивали визуально с помощью микроскопа Leica DMLS. Видеозахват осуществлялся с помощью камеры Sony SSC-DC50P. Оценку количественных параметров проводили полуавтоматическим методом при помощи программы NIH ImageJ 1.43u. Сначала измеряли общую площадь среза при увеличении объектива x 1,6. Затем вычислялось количество островков диаметром от 40 до 100 мкм и отдельно островков диаметром больше 100 мкм, а также занимаемая ими площадь в срезе. Вычислялось процентное соотношение количества крупных и средних островков и процентное соотношение занимаемой ими площади. Статистические расчеты проводили по критерию Манна–Уитни при помощи программы Statistica 6.

Результаты и обсуждение

Уже на гистологическом уровне нами были выявлены заметные отличия в образцах ПЖ, полученных от пациентов с СД1, от контрольных образцов. В наблюдении 5с выявлена заметная атрофия ПЖ, в наблюдении 4с обнаружено жировое перерождение в экзокринной части и отложение бесструктурного матрикса вдоль капилляров в ряде островков. В наблюдениях 1с, 2с и 3с была выражена воспалительная реакция (рис. 1А). При этом не наблюдалось классической картины перинсулита и инсулита. В очагах воспаления при помощи

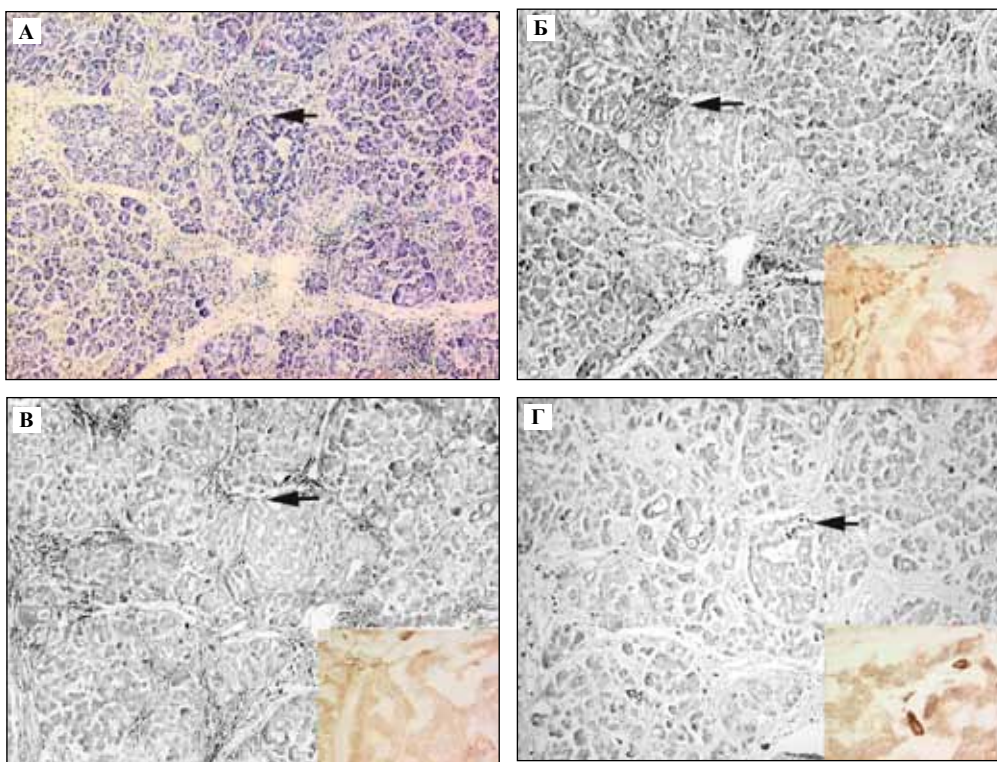


Рис. 1. Серийные срезы ткани ПЖ пациента 2с: А – окраска гематоксилин-эозином, × 100; Б – иммуногистохимическая реакция на CD 16, × 100; В – иммуногистохимическая реакция на CD 25, × 100; Г – иммуногистохимическая реакция на CD 71, × 100, стрелками отмечен крупный островок; на врезках фрагменты того же островка, × 1000

иммуногистохимических методов нами были идентифицированы CD16 и CD25 положительные клетки (рис. 1 Б, В). При этом реакция на CD8 оказалась незначительной. Кроме того, в аутопсиях, полученных от больных диабетом, и тех, в которых наблюдалась воспалительная реакция, увеличивалось число клеток, положительных на антитела к рецептору трансферрина (CD71). В некоторых островках эти клетки обнаруживались и внутри капилляров (рис. 1 Г). Количество клеток, положительных на антитела к CD20, во всех исследованных образцах было незначительным. Эти клетки встречались только в достаточно крупных кровеносных сосудах. В контроле реакция на все эти антитела наблюдалась лишь в небольшом числе клеток внутри крупных сосудов.

В контроле нами выявлены различные типы организации эндокринной части ПЖ: от единичных инсулинсодержащих клеток до крупных панкреатических островков. При окрашивании на глюкагон во всех случаях СД1 были выявлены как единичные глюкагонсодержащие клетки, так и островки. Только в одном

случае (наблюдение 2с) полностью отсутствовала иммуноположительная реакция на инсулин (рис. 2 А). В наблюдении 1с выявлялись лишь единичные инсулинположительные клетки, рассеянные в ацинарной и протоковой ткани (рис. 2 Б). В трех случаях (наблюдения 3с, 4с и 5с) нами выявлены инсулинположительные клетки и в островках ПЖ (рис. 2 В, Г).

Количество островков диаметром больше 100 мкм относительно общего числа островков при СД1 возрастало ($p < 0,05$). Соответственно, возрастала и занимаемая этими островками относительная площадь ($p < 0,01$) (рис. 3 А, Б).

Обнаруженные нами гистологические изменения в ПЖ при СД1, такие как выраженная воспалительная реакция и атрофия экзокринной части ПЖ, являются характерными и неоднократно описаны [7, 9, 12]. Хотя изменения в наблюдении 4с более характерны для сахарного диабета 2-го типа [2], они также были описаны для СД1 [5, 9].

Феномен инсулита, как лимфоидная инфильтрация островковых клеток, обнаруженная при аутопсиях под-

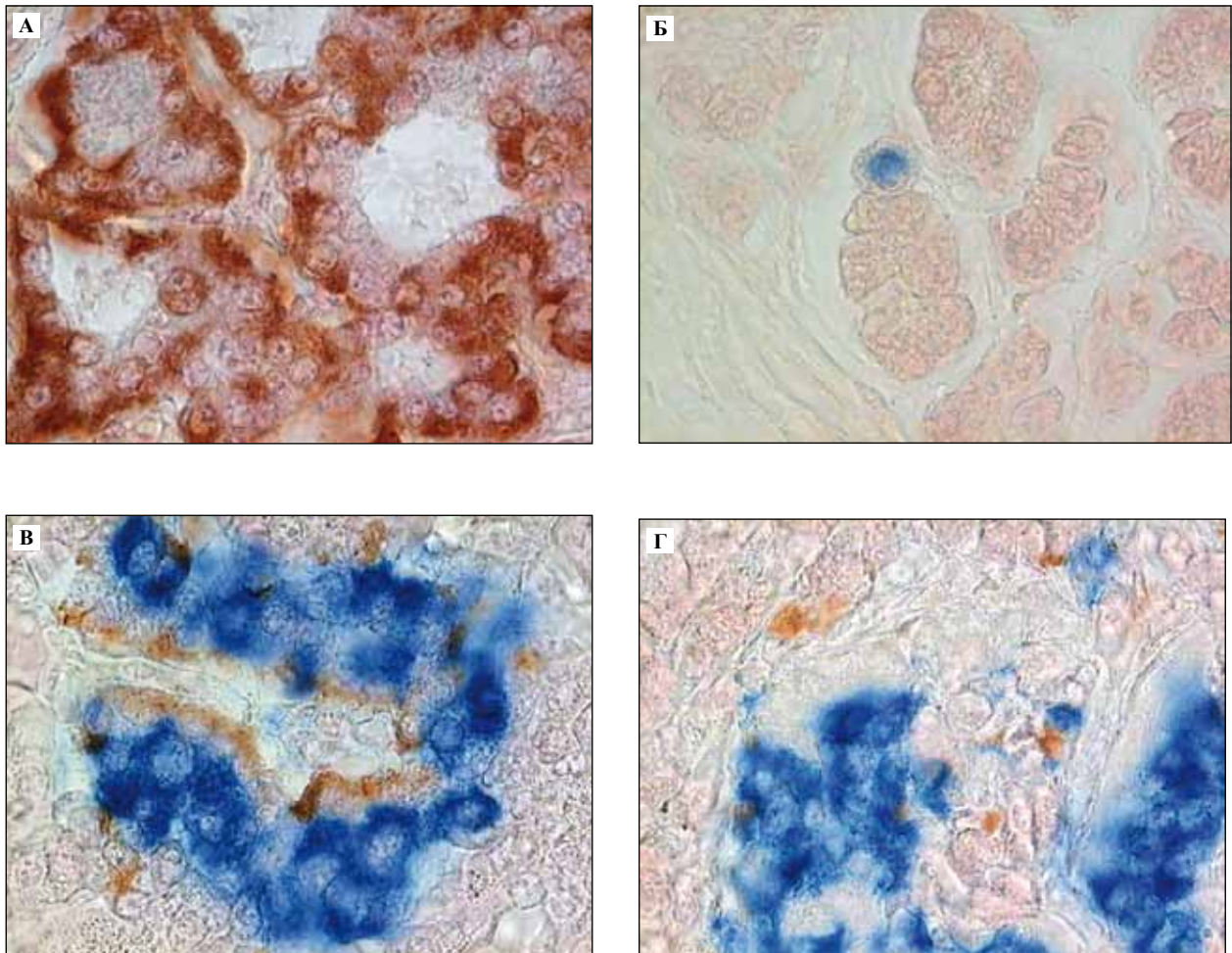


Рис. 2. Двойная иммуногистохимическая окраска на инсулин (синий) и глюкагон (красный), $\times 1000$:
 А – полное отсутствие реакции на инсулин у пациента 2с; Б – остаточная секреция инсулина у пациента 1с;
 В, Г – примеры сохранения В-клеток в островках ПЖ у пациентов 3с и 4с

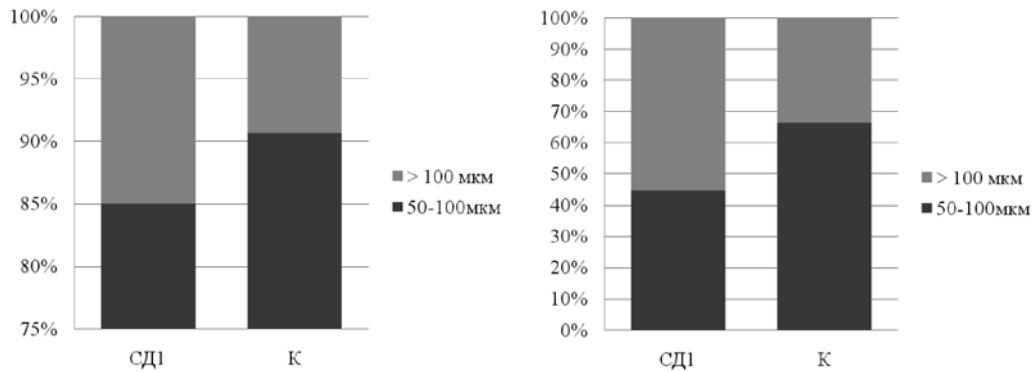


Рис. 3. Процентное соотношение А) числа островков диаметром больше 100 мкм и островков диаметром 40–100 мкм при СД1 и в контроле, Б) площади, занимаемой островками разного диаметра в срезе

желудочной железы больных с недавно выявленным СД 1-го типа, описан в 1965 г. [8] и был подтвержден в дальнейших работах на животных. Мононуклеарные клетки включают преимущественно активированные Т-лимфоциты (CD4+, CD8+), то есть имеющие экспрессию рецептора интерлейкина-2, а также макрофаги. Присутствуют и В-лимфоциты [1]. При инсулите наблюдается селективная гибель В-клеток ПЖ, в то время как другие эндокринные клетки остаются интактными. Инсулит характерен для островков, в которых сохранилась значительная часть В-клеток. В основном считается, что инсулит характерен для детей и подростков с впервые выявленным СД1 [8, 14]. У взрослых лиц с продолжительным течением диабета он выявляется редко [9, 13, 14], однако описаны случаи инсулита и после 8 лет длительности СД1 [4].

К сожалению, мы не располагаем информацией о точной продолжительности течения СД1 у исследованных нами пациентов, но, судя по гистологическому и иммуногистохимическому состоянию ПЖ этих больных, СД1 развивался у них в течение длительного времени. В нашем исследовании ни в одном из образцов не была выявлена картина инсулита, однако в трех случаях из пяти нами обнаружена выраженная воспалительная реакция в экзокринной части, причем в двух случаях (наблюдения 1с и 2с) В-клетки в эндокринной части практически не выявлялись. Следовательно, эту реакцию сложно считать направленной только против инсулинсодержащих клеток. Воспалительная реакция в экзокринной части ПЖ больных с разной длительностью СД1 была выявлена и другими авторами, например при проведении национального исследования СД1 в Японии [9]. Это позволило авторам даже высказать предположение о принципиальном отличии протекания СД1 у японцев по отношению к представителям белой расы.

Наибольший вклад в развитие обнаруженной нами реакции вносили CD16+ и CD25+ клетки. CD16 является антигеном NK-клеток и клеток миеломоноцитарного происхождения. Кроме того, CD16 также служит рецептором при антителозависимой клеточной цитотоксичности и клеток, экспрессирующих интерлейкин-2.

CD25 – маркер лимфоцитарной активации и рецептор фактора роста Т-клеток. Он экспрессируется в активированных Т- и В-лимфоцитах, а по некоторым источникам, в NK-клетках и макрофагах. Повышенная экспрессия в этих образцах CD71 свидетельствует о том, что в воспалительной реакции участвуют клетки, прошедшие недавно пролиферацию. В формировании наблюдавшейся нами реакции Т(CD8+)- и В-лимфоциты (CD20) принимали незначительное участие. Таким образом, в обнаруженной реакции ведущую роль, по всей видимости, играют активированные цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки, что соответствует данным литературы [10, 11].

Несмотря на большие индивидуальные различия, нами была выявлена общая закономерность – увеличение числа крупных островков по сравнению с небольшими и, соответственно, значительное увеличение площади, занимаемой большими островками на срезе. Ранее нами [2] было описано общее сокращение числа островков при СД1 за счет инсулинположительных и глюкагонположительных клеток. Схожие данные были получены и другими исследователями [9]. В половине случаев СД1 из 47 изученных они не смогли обнаружить инсулинсодержащие клетки, а в пяти случаях – глюкагонсодержащие. Возможно, эти данные можно интерпретировать следующим образом: при СД1 по неизвестной нам причине, предположительно из-за аутоиммунной атаки, не образуются новые островки и постепенно с течением болезни их становится все меньше.

Заключение

Таким образом, основным становится вопрос, не почему при СД1 гибнут В-клетки, а почему их популяция не восстанавливается. Его решение может открыть новые перспективы в лечении данного заболевания.

Исследование поддержано специализированным фондом управления целевым капиталом для выполнения научно-исследовательских работ в области биологии и медицины «Фундаментальный».

Литература

1. *Один В.И.* Аутоиммунный сахарный диабет / Один В.И. СПб.: ВМедА, 2003. 267 с.
2. Структурные и иммуногистохимические изменения поджелудочной железы человека, возникающие при старении и в результате сахарного диабета / Прошина А.Е. и др. // Морфологические ведомости. 2011. № 2. С. 56–61.
3. *Уильямз Г.* Руководство по диабету / Уильямз Г., Пикап Д. М.: МЕДпресс-информ, 2003. 248 с.
4. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients / Coppieters K.T. et al. // J. Exp. Med. V. 2009. № 1. P. 51–60.
5. *Doniach I.* Diabetes Mellitus / Doniach I. // Pathology of the Pancreas Proc. roy, Soc. Med. 1975. V. 68. P. 255–6.
6. Endocrine cell clustering during human pancreas development / Jeon J. et al. // J. Histochem. Cytochem. 2009. V. 57. № 9. P. 811–24.
7. *Foulis A.K.* The pancreas in recent onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islet, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue / Foulis A.K., Stewart J.A. // Diabetologia. 1984. V. 26. P. 456–61.
8. *Gepts W.* Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus / Gepts W. // Diabetes. 1965. V. 14. № 10. P. 619–33.
9. Histopathologic Study of the Pancreas Shows a Characteristic Lymphocytic Infiltration in Japanese Patients with IDDM / Waguri M. et al. // Endocrine Journal. 1997. V. 44. № 1. P. 23–33.
10. *Mellanby R.J.* Role of regulatory T-cells in autoimmunity / Mellanby R.J., Thomas D.C., Lamb J. // Clinical Science. 2009. V. 116. P. 639–49.
11. *Moberg L.* Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood / Moberg L., Korsgren O., Nilsson B. // Clinical and Experimental Immunology. 2005. V. 142. P. 125–31.
12. Noninvasive imaging of pancreatic islet inflammation in type 1A diabetes patients / Jason L. et al. // The Journal of Clinical Investigation. 2011. V. 12. № 1. P. 442–5.
13. Screening for Insulinitis in Adult Autoantibody-Positive Organ Donors / Peter In't Veld et al. // Diabetes. 2007. V. 56. № 9. P. 2400–4.
14. Insulinitis in human type 1 diabetes The quest for an elusive lesion / Veld P. In't // Islets. 2011. № 3:4. P. 131–8.

QUANTITATIVE AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF THE PANCREAS OF ADULT PATIENTS WITH LONG-TERMED DIABETES MELLITUS TYPE 1

A.E. Proshchina, V.M. Barabanov, Yu.S. Krivova, S.V. Saveliev

We studied pancreatic autopsy samples in 5 adult patients with long-termed diabetes mellitus type 1 and of 9 adults not suffering from metabolic disorders of carbohydrate and diseases of the pancreas using histological, immunohistochemical and quantitative methods. We have identified the inflammatory response in the acinar pancreatic tissue of three patients with diabetes. CD16+ and CD25+ cells were the major contributors to this reaction. Insulinitis was not detected in any of the cases examined. In addition, the significant increase was revealed in the relative number and area of large islets with a diameter of more than 100 microns against the background of decreased total number of islets. Diabetes mellitus type 1 is supposed to inhibit the renewal of the population of B-cells secreting insulin and the formation of islets.

Key words: diabetes mellitus type 1, pancreatic islets, insulinitis

Информация об авторах

Прошина Александра Евгеньевна – канд. биол. наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: proshchina@yandex.ru.

Материал поступил в редакцию 19 июня 2012 года.

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ ЦИТО- И АНГИОАРХИТЕКТониКИ СОСЦЕВИДНЫХ ТЕЛ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

А.В. Павлов^{1,2}, *С.В. Савельев*²

¹ ГОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России, Рязань

² ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование архитектоники ядер сосцевидных тел обеих гендерных групп показало наличие возрастной инволютивной трансформации их нейронного, глиального и сосудистого компонентов. Выявлена гендерная специфичность изменений средних значений основных параметров нейро-глио-сосудистых ансамблей сосцевидных тел в процессе позднего постнатального онтогенеза лиц разного пола и возраста. Выявлены закономерности сроков появления и интенсивности инволютивных изменений цито- и ангиоархитектоники ядер сосцевидных тел у представителей разных полов.

Ключевые слова: головной мозг, гипоталамус, сосцевидные тела, возраст

Изучение преобразований, происходящих в органах и тканях организма в течение жизни, остается актуальной задачей современной биологии и медицины. В настоящее время изучение сосцевидного комплекса представляется важным уже с позиций их анатомического размещения и топографии. Как правило, сосцевидному комплексу отводят роль исключительно коммуникативной структуры ввиду того, что большая ее часть занята миелинизированными волокнами, формирующими ряд крупных проводящих путей и связывающими ключевые структуры головного мозга. По современным представлениям характерной особенностью коммуникативных структур является отсутствие возрастных изменений или гендерной специфичности, проявляющихся в процессе жизни. Яркий пример образований, основной функцией которых служит передача информации от одной анатомической структуры к другой, – латеральный и медиальный пучки мозга. При этом ни одно исследование не подтверждает наличие в них возрастных изменений в зависимости от гендерных признаков.

Результаты клинических исследований подтверждают также актуальность изучения половых различий в человеческом мозге. Так, было показано, что некоторые неврологические и психические заболевания чаще наблюдаются у представителей одного пола: аутизм, эпилепсия, шизофрения (Зенков Л.Р., 2002; Swaab D.F., 2004; Goldstein Jill M., 2007). Вместе с тем данные литературы, касающиеся изучения полового диморфиз-

ма мозга человека в целом и гипоталамуса в частности, весьма немногочисленны и часто противоречивы. Еще меньше работ посвящено описанию морфологии сосцевидных тел гипоталамуса. Тем не менее исследование полового диморфизма гипоталамических структур человека может не только раскрыть механизм репродуктивного поведения и половой ориентации, но и представить весьма важные клинические данные о половых различиях, затрагивающих риск и течение некоторых заболеваний.

Целью исследования было изучение онтогенетических особенностей нейро-глио-сосудистых ансамблей сосцевидных тел головного мозга человека с учетом половой принадлежности.

Материалы и методы

Исследование проводили на аутопсийном материале головного мозга людей обоего пола, смерть которых не была напрямую связана с заболеваниями нервной системы. Материал фиксировали в 10% кислом или нейтральном забуференном формалине (4% параформальдегид на 0,1M фосфатном буфере, рН 7,5), жидкости Буэна, жидкости Карнуа или спирт-формалином по методу Леннера (1 часть 40% формалина и 2 части 80% спирта) и заливали в парафин. Выполняли серии срезов, которые окрашивали по стандартным гистологическим и иммуногистохимическим методикам. В работе использовали нейромаркеры (к нейронспецифическому бета 3-тубулину,

нейронспецифической эналазе, основному белку миелина, глиальному фибриллярному кислому белку). Работа с антителами проводилась согласно рекомендуемому производителем протоколу. Весь материал распределили на группы по гендерно-возрастным признакам. Ввиду морфофизиологических особенностей второго периода зрелого возраста для более детальной оценки изменений, происходящих в сосцевидных телах в это время, данный период подразделяли на четыре субпериода: 36–40, 41–45, 46–50, 51–55 лет. В каждой группе выполняли морфометрический анализ следующих параметров: количество глиальных клеток, количество нейронов, количество сосудов, площадь нейронов. Рассчитывали степень васкуляризации и глио-сосудистый индекс.

Статистическую обработку данных проводили с применением пакета анализа Microsoft Excel и Statistica 6.0, NCSS 2004. Оценку значимости различия средних значений и частоты проявления признаков в различных исследованных группах осуществляли с помощью параметрических и непараметрических методов оценки гипотез.

Результаты и обсуждение

При анализе полученных в ходе исследования данных было установлено, что с первого периода зрелого возраста морфометрические характеристики ядер сосцевидных тел показывают выраженную гендерную

специфичность, которая не проявлялась в более ранних возрастных группах.

У мужчин средние значения количества глиальных клеток с возрастом изменяются: с $372,29 \pm 11$ клеток в юношеском периоде они возрастают до $631,17 \pm 26$ клеток в пожилом возрасте, соответственно увеличиваясь на 41%. При этом наиболее выраженное статистически достоверное увеличение числа глиальных клеток у мужчин определяется во втором периоде зрелого возраста, когда разница значений между первым и вторым периодом по данному параметру достигает 35,4% ($p < 0,001$).

В женской группе увеличение числа глиальных клеток происходит с 319 ± 19 в первом периоде до значений $629,40 \pm 25,58$ во втором. Средние значения отличаются более чем на 49%. При этом последующий рост данного показателя относительно возраста происходит плавно: прирост его составляет 6,3% с 46 до 55 лет, и 7,3% с 55 до 74 лет.

В мужской группе средние значения количества нейронов в сосцевидных телах с возрастом имеют тенденцию к снижению на 39%, уменьшаясь к пожилому возрасту с $105,23 \pm 8$ клеток до $64,16 \pm 4$ клеток в пяти полях зрения.

Число нейронов в сосцевидных телах женщин с возрастом статистически достоверно уменьшается на 30,4%. При этом отмечается резкое снижение средних значений количества нервных клеток ко второму периоду

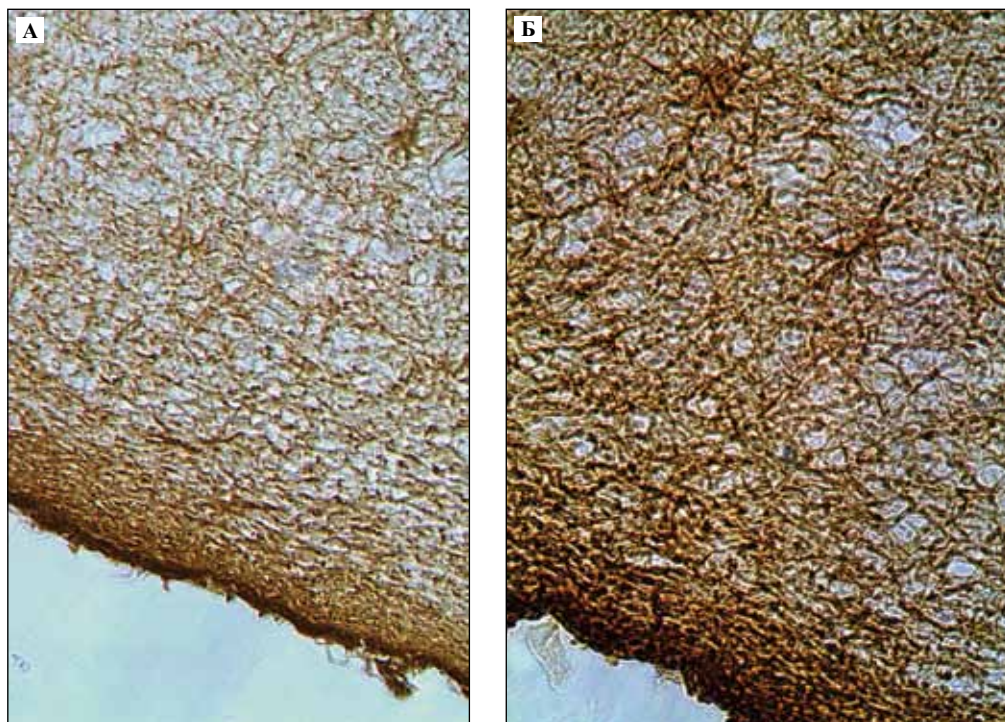


Рис. 1. Участок сосцевидных тел мужчины 34 лет. GFAP-иммунопозитивные клетки и волокнистые структуры пограничной глиальной мембраны и подлежащего слоя.
А – $\times 200$, Б – $\times 400$

ду зрелого возраста. Разница значений определяется как 40%. В пожилом возрасте наступает своеобразная стабилизация падения средних значений этого показателя и даже отмечается некоторый рост.

Значения глиального индекса также имеют статистически достоверные изменения во всех возрастных группах. Разница значений средних показателей между юношеским и пожилым периодом у мужчин составляет 73,4% ($p < 0,001$). Наиболее выраженные изменения показателя глиального индекса определяются ко второму периоду зрелого возраста, когда средние значения увеличиваются на 59,7% по сравнению с первым зрелым периодом.

В связи с резким изменением числа глиальных клеток у женщин отмечается сильная корреляционная связь глиального индекса с возрастом. Коэффициент корреляции по данному показателю равен 0,77, $p < 0,001$.

Возрастные изменения нейро-глио-сосудистых ансамблей сосцевидных тел головного мозга сопровождаются появлением нервных клеток, в цитоплазме которых определяются гранулы липофусцина. У мужчин статистически значимые и достоверные изменения показателя средних значений числа таких клеток определяются, начиная с первого периода зрелого возраста, и достигают своих максимальных значений в пожилом возрасте, увеличиваясь с $4,60 \pm 1$ клетка до $34,96 \pm 2$ клетки, соответственно. Разница средних

значений между этими периодами составляет 86,8%. При этом наиболее выраженный рост числа клеток с липофусцином отмечается во втором периоде зрелого возраста. Достоверные различия средних значений этого параметра у мужчин ко второму периоду зрелого возраста достигают 79,3% ($p < 0,001$).

При оценке возрастных изменений средних значений количества нейронов с липофусцином в цитоплазме следует отметить, что в отличие от мужской группы у женщин наличие данного параметра можно оценивать только со второго периода зрелого возраста. Разница значений между вторым зрелым и пожилым периодами у женщин по данному показателю составляет 24,8%. С возрастом у мужчин отмечается уменьшение средних показателей числа микрососудов на 58,2%. Особенно резко значения этого показателя уменьшаются в пожилом возрасте. Между вторым периодом зрелого возраста и пожилым определяется статистически достоверное отличие показателя количества микрососудов на 48% ($p < 0,001$). Соответственно этому падает степень васкуляризации сосцевидных тел к пожилому возрасту. Коэффициент корреляции этого параметра у мужчин с возрастом имеет значение $-0,58$.

Возрастное снижение количества сосудов у женщин также более выражено. Среднее значение этого показателя к пожилому возрасту снижается на 57,5%. При этом наиболее выраженное изменение данного показателя наблюдается во втором периоде зрелого

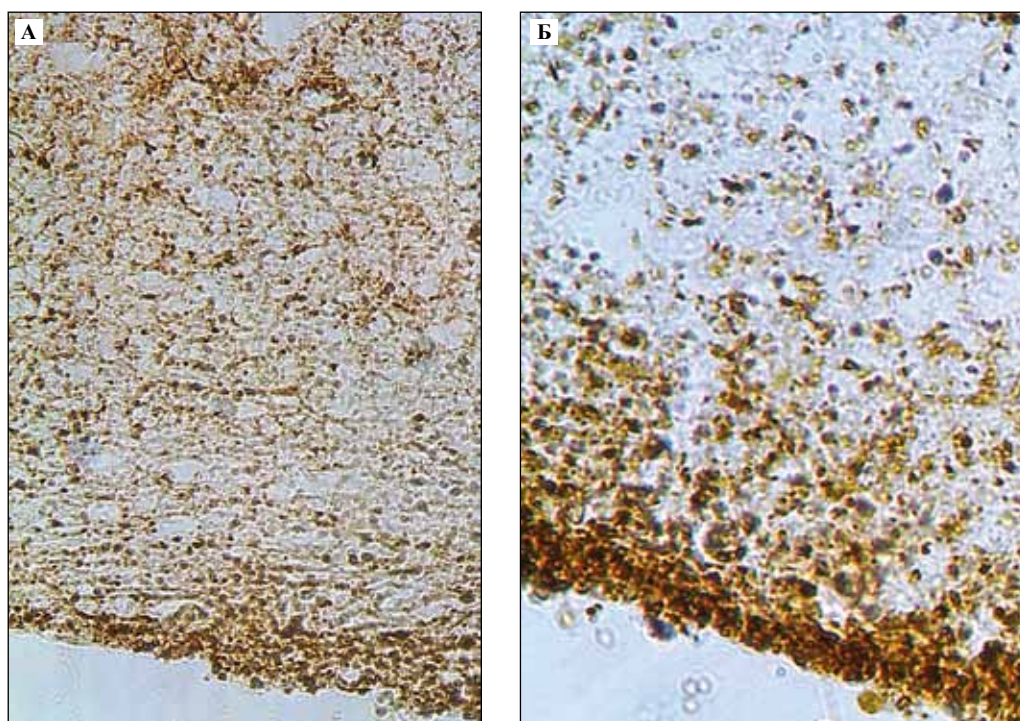


Рис. 2. Участок сосцевидных тел женщины 72 лет.
GFAP-иммунопозитивные клетки и волокнистые структуры пограничной
глиальной мембраны и подлежащего слоя.
А – $\times 200$, Б – $\times 400$

возраста с 46 лет. Соответственно этому изменяется и степень васкуляризации сосцевидных тел, снижаясь со значения $14,82 \pm 1,05$ в юношеском возрасте до $6,27 \pm 0,54$ в пожилом.

Средние показатели площади нейронов сосцевидных телах мужской группы с возрастом имеют тенденцию к увеличению. Статистически достоверные отличия между юношами и мужчинами пожилого возраста по данному показателю составляют 18,6%. Наиболее интенсивное увеличение средних значений площади нейронов в сосцевидных телах у мужчин происходит к концу первого периода зрелого возраста, разница значений с юношеским возрастом составляет 14,8%. Последующее увеличение показателей площади нейронов протекает постепенно, возрастал в среднем на 2,5% за каждый возрастной период.

Средние значения площади нейронов у женщин, как и в мужской группе, увеличиваются, достигая статистически достоверных различий в пожилом возрасте (39,4%).

Оценивая результаты микроморфометрического исследования нейро-глио-сосудистых ансамблей сосцевидных тел головного мозга мужчин, можно отметить следующее. С возрастом происходят статистически достоверные изменения средних значений всех выбранных параметров. Сила корреляционной связи этих изменений относительно возраста может быть охарактеризована, в среднем, как умеренная. Отмечается рост средних значений таких параметров как количество глиальных клеток, глиальный индекс, количество нейронов с включениями липофусцина и площадь нейронов. С возрастом достоверно уменьшаются значения показателей числа нейронов, капилляров.

В целом динамику средних значений параметров нейро-глио-сосудистых ансамблей в женской группе можно охарактеризовать следующим образом. С возрастом происходит увеличение средних значений количества глии, нейронов с липофусцином, площади нейронов. Наблюдается уменьшение средних значений количества нейронов, капилляров и площади ядра нейрона.

При анализе корреляционной связи ряда средних значений морфометрических параметров нейро-глио-сосудистых ансамблей мужчин и женщин в возрасте от 16 до 74 лет определяются статистически значимые значения коэффициента корреляции при $p < 0,05$. Наиболее выраженная связь отмечается между половыми группами по показателям глиального индекса, что может быть объяснено с тех позиций, что показатели среднего количества глиальных и нервных клеток также имеют достоверную корреляцию.

При анализе возрастных изменений исследуемых параметров сосцевидных тел можно отметить их схожую динамику в обеих гендерных группах. При этом время наступления и выраженность изменения их средних значений зависят от пола. Следует отметить, что сила корреляционной связи исследуемых параметров с возрастом в разных половых группах отличается. В целом можно сказать, что изменения, протекающие в соотношениях нейрон–глия–капилляр сосцевидных тел мужчин, отличаются от схожих процессов в женской группе меньшей силой корреляционной связи с возрастом. Несмотря на то, что наиболее выраженные изменения средних значений морфометрических параметров происходят в обеих половых группах во втором периоде зрелого возраста, в женской группе они проявляются на 5 лет раньше и отличаются интенсивностью.

Выводы

Применение разнообразных методик позволило дать морфологическую характеристику нейро-глиальных отношений, а также динамику числа микрососудов в ядрах сосцевидных тел лиц в различных возрастных и половых группах. Выявлена четкая гендерная специфичность онтогенетических изменений выбранных параметров, поэтому сосцевидные тела головного мозга человека не могут рассматриваться в качестве коммуникативного центра.

Литература

- Байбаков С.Е. Сравнительная характеристика морфометрических параметров головного мозга у взрослого человека в период зрелого возраста (по данным магнитно-резонансной томографии) / Байбаков С.Е., Гайворонский И.В., Гайворонский А.В. // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2009. С. 111–117.
- Alpeeva E.V. Perinatal development of the mammillothalamic tract and innervation of the anterior thalamic nuclei. *Brain Res*-2009; 1248:1–13.
- Begega A., Cuesta M., Santin L.J., Rubio S., Astudillo A., Arias J.L. Unbiased estimation of the total number of nervous cells and volumen of medial mammillary nucleus in humans. *Experimental Gerontology*, 1999; 34:771–82.
- Berger J.R. Memory and the mammillothalamic tract: editorial. *AJNR Am J Neuroradiol* 2004;25:906–7.
- Brown J.E., Yates B.J. & Taube J.S. Does the vestibular system contribute to head direction cell activity in the rat? *Phys. Behav.* 2002;77, 743–8.
- Ishumina, T.A., Swaab, D.F., Fischer, D.F.,. Estrogen receptor-alpha splice variants in the medial mamillary nucleus of Alzheimer's disease patients: identification of a novel MB1 isoform. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90: 3757–65.

ONTOGENETIC TRANSFORMATIONS IN CYTO- AND ANGIOARCHITECTONICS OF MAMMILLARY BODIES OF HUMAN BRAIN

Pavlov A.V., Saveliev S.V.

Histological and immunohistochemical architectonics of mammillary bodies investigation both gender groups showed the presence of age-involutive transformation of neuronal, glial and vascular components. Identified gender specificity changes in average values of the main parameters of the neuro-glio-vascular ensembles mammillary bodies during late postnatal ontogeny of humans in different age and gender. The performed investigation demonstrated patterns and timing of the involutive changes of cyto- and angioarchitectonics in mammillary bodies of human brain in different sexes.

Key words: brain, hypothalamus, mammillary bodies, age

Информация об авторах:

Савельев Сергей Вячеславович – доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120-0050

Материал поступил в редакцию 12 июля 2012 года

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ТКАНЬ ЛЕГКИХ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЭМФИЗЕМЫ У КРЫС

А.В. Аверьянов¹, А.Л. Черняев³, А.Г. Коноплянников², В.Н. Петров², О.А. Конопляникова², Е.В. Агеева², О.П. Кузовлев¹, Н.С. Кулагина¹, А.Е. Трусов³, К.С. Войтковская³

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, Москва

² ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздравсоцразвития России, Москва

³ ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Москва

В эксперименте в разные сроки после внутривенной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток изучены изменения в легких у крыс с эмфиземой, индуцированной интратрахеальным введением панкреатической эластазы. Выявлено регенеративные и системные воспалительные эффекты трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Учитывая низкую иммуногенность мезенхимальных стволовых клеток, можно ожидать подобного эффекта и при введении ксеногенных мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: эксперимент, эмфизема легких, мезенхимальные стволовые клетки

Эмфизема легких (ЭЛ) – один из наиболее частых клинико-морфологических синдромов в патологии органов дыхания. По данным метаанализа R.J. Halbert et al. [8], у взрослого населения ЭЛ встречается с частотой 0,5–5,7%. Большой проблемой является не только высокая заболеваемость ЭЛ, но и фактическое отсутствие лечебных средств, влияющих на прогрессирование патологического процесса в легких. Согласно общепринятому определению, эмфизема легких – это необратимое увеличение воздушного пространства дистальнее терминальных бронхиол, сопровождающееся деструкцией стенок ацинуса без их сопутствующего фиброза [20]. Однако устойчивое представление о необратимости эмфизематозных изменений ткани легких было подвергнуто сомнению после ряда экспериментов, доказывающих возможность регенерации поврежденных структур экстрацеллюлярного матрикса легочной паренхимы под влиянием ретиноевой кислоты [10, 18]. Также было показано, что в сохранившихся клеточных элементах тканей легких идет активный синтез эластина и коллагена [26]. В нашем исследовании у больных, оперированных по поводу тяжелой эмфиземы, обнаружена гиперэкспрессия фактора роста эндотелия (VEGF) в паренхиме легких, что свидетельствует в пользу процессов активного ангиогенеза [1]. Одна из гипотез патогенеза ЭЛ предполагает, что в его основе лежит нарушение баланса между повреждением и регенерацией альвеолярных структур.

Естественный интерес к проблеме регенерации в легких вызывают активно развивающиеся технологии трансплантации стволовых клеток (СК). Тем не менее, до последнего времени опубликованы результаты единичных исследований, оценивающих возможные эффекты различных видов СК на патологический процесс в экспериментальных моделях ЭЛ. В 2008 г. G. Zhen et al. [28] показали, что введение крысам с папаниндуцированной эмфиземой легких мезенхимальных стволовых клеток (МСК) приводит к миграции их в легкие с последующей дифференцировкой в альвеолоциты II типа, ингибирует процессы апоптоза и предотвращает развитие ЭЛ. Schweitzer et al. [23] показали снижение активности воспаления в дыхательных путях и уменьшение числа погибших альвеолоцитов и эндотелиоцитов после трансплантации МСК жировой ткани мышам с эмфиземой, вызванной хронической экспозицией табачного дыма или блокадой рецепторов VEGF. Однако H. Kubo [14] не подтверждает регенеративный эффект экзогенных МСК костного мозга в экспериментальной модели ЭЛ у мышей. Исходя из противоречивости данных об эффектах лечения МСК в ранее проведенных исследованиях, нами была воспроизведена острая модель эмфиземы легких у крыс с последующей трансплантацией МСК и морфометрической оценкой респираторного отдела легких.

Целью исследования стало изучение влияния у крыс с эмфиземой, индуцированной интратрахеальным

введением панкреатической эластазы, внутривенной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в разные сроки на ткань легких.

Материалы и методы

В эксперименте было использовано 40 самок крыс линии Вистар в возрасте 3 месяцев массой 180–200 г. Животным 1-й группы (10 крыс) одномоментно интратрахеально вводили 0,4 мл 0,9% раствора NaCl. Остальным 30 крысам однократно эндотрахеально вводили 20 ЕД свиной панкреатической эластазы (Sigma, США) в 0,4 мл 0,9% NaCl. После инстиляции крыс поворачивали в разные стороны в течение 1 минуты для равномерного распределения жидкости в дыхательных путях. Для обездвиживания животных во время интратрахеальных инъекций предварительно внутрибрюшинно вводили раствор нембутала в дозе 40 мг/кг массы тела.

Из 30 животных с экспериментальной эмфиземой легких 10 были использованы в качестве группы сравнения (2-я группа). Третьей группе крыс через 1 сутки после начала эксперимента в хвостовую вену вводили по 2×10^6 суспензии аллогенных МСК, содержащихся в 0,5 мл физиологического раствора (3-я группа). Животные 4-й группы получили ту же дозу МСК через 7 суток после введения эластазы.

Культура МСК (пассаж 5) была выращена из костного мозга самок крыс Вистар по модифицированной методике [6]. У крыс-доноров клетки костного мозга для посева в культуру получали из бедренной кости после введения им летальной дозы нембутала (70 мг/кг). Полученные в строго стерильных условиях примерно 10^7 костномозговых клеток помещали в пробирки с гепарином (100 ЕД/мл пунктата). После отстаивания эритроцитов в течение 1–2 часов при комнатной температуре супернатант отсасывали пастеровской пипеткой, выделенные клетки отмывали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут, осадок ресуспендировали в ростовой среде. В качестве ростовой брали среду RPMI-1640 (Sigma, США), содержащую пенициллин (100 ЕД/мл), амфотерицин (100 нг/мл), L-глутамин 2 мМ, 20% эмбриональной телячьей сыворотки. Культивирование проводилось в пластиковых флаконах Карреля (Sigma, США) с площадью дна 25 см^2 , в которые вносили 5×10^6 – 10^7 клеток костного мозга в 8 мл ростовой среды. Флаконы продували газовой смесью, содержащей 5% углекислого газа и 95% воздуха, и помещали их в термостат 37°C . Продувание флаконов такой газовой смесью проводили каждый раз, когда меняли среду или пересевали клетки в новые культуральные флаконы. При достижении сливного (конфлюэнтного) монослоя клетки пересевали с использованием 0,25% раствора трипсина (Sigma, США) в новые флаконы сначала с той же площадью дна (25 см^2), а впоследствии, при нарастании клеточной массы, – в большие культуральные флаконы с площадью дна

175 см^2 . Такой метод позволял к концу 5–6-й недели добиться получения популяции МСК в числе $(1\text{--}2) \times 10^8$ клеток, достаточных для трансплантации в организм крыс-реципиентов.

Крыс выводили из эксперимента на 21-й день внутрибрюшинным введением нембутала в дозе 70 мг/кг массы. При достижении наркотизации проводили перитонеальный лаваж, промывая брюшную полость 5 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР, рН 7,4). Модифицирующие эффекты МСК на уровень зимозаниндуцируемой продукции активных форм кислорода (АФК) перитонеальными макрофагами (ПМ) оценивали в тесте люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) [4]. Пул ПМ выделяли на градиенте Histopaque 1077/1119 (Sigma, США). Для определения продукции АФК в кюветы люцинометра LKB-Wallac 1251 вносили по 10^6 выделенных ПМ в 600 мкл ЗФР, содержащей 10^{-4} М люминола (Serva). Затем в термостатируемую при $+37^\circ\text{C}$ кювету в кюветодержателе люцинометра автоматически по специальной программе LKB-Wallac 1254-124 Phagocytosis Program добавляли суспензию опсонизированного зимозана (Serva) до конечной концентрации 1,25 мг/мл. Регистрация зимозаниндуцированной хемилюминесцентной (ХЛ) активности в милливольтгах/ 10^6 клеток продолжалась в течение 30 минут через каждые 2–3 минуты. Данные представляли как средние величины показаний пика ХЛ-активности макрофагов от 12 параллельных измерений.

После забора материала для определения ХЛ-активности макрофагов для фиксации легких интратрахеально через катетер вводили жидкость Боуэна под давлением 12 см вод. ст. до полного расправления легких, заполнявших всю плевральную полость. После этого перевязывали трахею, извлекали из плевральной полости комплекс легкое–сердце и помещали его в жидкость Боуэна, в 5-кратном размере превышающую объем легких, на 3 суток. Затем из каждого легкого вырезали пластины толщиной 0,4 см перпендикулярно к воротам легкого через все его отделы. Полученные срезы обезжизивали в возрастающих по концентрации спиртах, заливали в парафин и приготавливали срезы толщиной 0,4–0,5 мкм. Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону. С помощью объект-микрометра измеряли ширину альвеолярных ходов между замыкательными пластинками входа в альвеолы, ширину и глубину альвеол, открывающихся в альвеолярные ходы. Все измерения проводили строго перпендикулярно к продольной оси альвеолярных ходов. Вычисляли также соотношение ширины к глубине альвеол (альвеолярный индекс), характеризующее степень выраженности ЭЛ [5].

Статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica for Windows StatSoft Inc (версия 6.0). Данные таблиц представлены как выборочное среднее \pm стандартное отклонение. Достоверность различий оцениваемых по-

казателей между исследуемыми группами вычислялась методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Результаты морфометрического анализа ткани легких в разных группах животных представлены в таблице 1.

Таблица 1

Морфометрические характеристики ткани легких в контрольной и экспериментальных группах (n – число измеренных альвеолярных ходов и альвеол)

Группы	Ширина альвеолярного хода (мкм)	Альвеолярный индекс (отношение ширины к глубине альвеол)
1-я (контроль)	(n=65) 43,2±2,0	(n=59) 0,78±0,04
2-я	(n=76) 100,0±2,0	(n=73) 1,16±0,04
3-я	(n=60) 66,5±3,8	(n=57) 0,71±0,04
4-я	(n=38) 60,8±4,3	(n=41) 0,49±0,06
Ширина альвеолярного хода		Альвеолярный индекс
1-я – 2-я, 3-я, 4-я $p < 0,001$		1-я – 2-я, 4-я $p < 0,001$
2-я – 3-я, 4-я $p < 0,001$		2-я – 3-я, 4-я $p < 0,001$
3-я – 4-я $p > 0,05$		3-я – 4-я $p < 0,001$
		1-я – 3-я $p > 0,05$

Как видно из таблицы 1, во 2-й группе экспериментальной эмфиземы ширина альвеолярных ходов увеличивалась на 231% по отношению к контрольной группе (рис. 1 А, Б), что свидетельствовало об успешном моделировании острой ЭЛ. При введении МСК через сутки после создания модели острой эмфиземы легких ширина альвеолярных ходов уменьшалась в среднем на 50,3% по сравнению с группой животных, которым МСК не вводили (рис. 1 В). У животных, которым МСК вводили на 7-е сутки развития эмфиземы легких, этот показатель снижался в большей степени – на 64,5%, но был выше на 40,7% по сравнению с контрольной группой (рис. 1 Г). Другой количественный показатель выраженности ЭЛ – альвеолярный индекс – достоверно возрастал на 149% во 2-й группе по отношению к контролю. При введении МСК на 1-е и 7-е сутки после введения эластазы альвеолярный индекс достоверно уменьшался, соответственно, на 163,4% и 237% по отношению к значению данного показателя в группе контрольной ЭЛ (табл. 1).

Исследуя показатели хемилюминесцентной активности перитонеальных макрофагов, мы получили данные, в целом отражающие морфологические изменения в экспериментальных группах (табл. 2). Высший пик ХЛ-активности ПМ пришелся на животных 2-й группы (57,3±1,3 мВ/10⁶ клеток), что практически в 2 раза выше, чем в 1-й группе. В группах лечения МСК показатель ХЛ-активности ПМ снижался в среднем на 60% (3-я группа) и 79,6% (4-я группа), но не достигал уровня у крыс без эмфиземы легких.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о положительных морфологических и иммунологических эффектах трансплантации МСК в острой

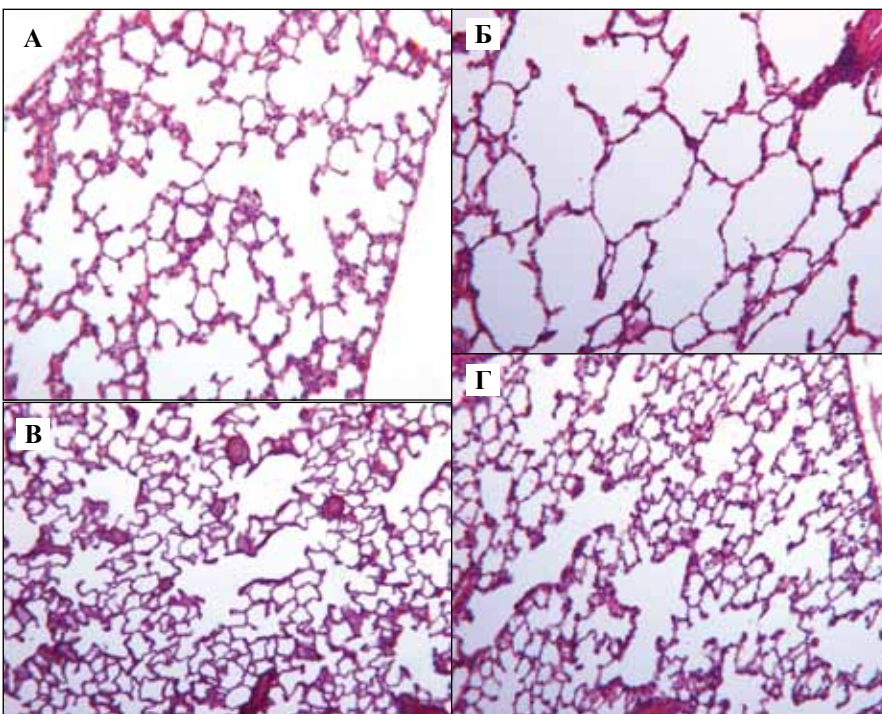


Рис. 1. Ткань легких. Окраска гематоксилином и эозином, × 100
 А – альвеолярные ходы и альвеолы в контрольной группе; Б – расширение альвеолярных ходов при острой эмфиземе легких на 21-е сутки эксперимента;
 В – альвеолярные ходы и альвеолы после введения МСК со 2-х суток эксперимента; Г – альвеолярные ходы и альвеолы после введения МСК на 7-е сутки после создания экспериментальной эмфиземы

Таблица 2

Пиковые значения хемилюминесцентной активности перитонеальных макрофагов в контрольной и экспериментальных группах

Группы	Средние величины показаний пика ХЛ-активности макрофагов (мВ/10 ⁶ клеток)
1-я группа	28,8±1,1*
2-я группа	57,3±1,3
3-я группа	35,8±1,6*
4-я группа	31,9±1,9*

* – $p < 0,001$ в сравнении со 2-й группой

эластазной модели ЭЛ. По-видимому, МСК оказали сдерживающее влияние на развитие ЭЛ после эластазного повреждения. Несмотря на то, что биохимические процессы деградации экстрацеллюлярного матрикса паренхимы легких фиксируются уже в первые часы после эндотрахеального введения эластазы, значимые морфологические изменения находят обычно к концу 2-й недели эксперимента [15]. При этом гибель альвеолоцитов и эндотелиоцитов, снижение содержания эластина, коллагена и ламинина в альвеолярных стенках наблюдаются с первого дня эластазного повреждения [15, 22].

В нашем исследовании более выраженный регенеративный эффект наблюдался в группе, получившей МСК на 7-й день эксперимента (4-я группа). Возможно, это связано с тем, что в ближайший период от момента повреждения легких часть МСК «отвлекалась» на нейтрализацию острого воспалительного ответа, развивающегося после введения эластазы [17]. Доказательством противовоспалительной активности МСК могут служить результаты оценки индуцированной хемилюминесценции перитонеальных макрофагов [2]. Массированный выброс активных радикалов кислорода (синглетный кислород, перекись водорода, гипохлорит, супероксидный анион-, гидроксильный и гидропероксидный радикалы, оксид азота) в результате «метаболического взрыва» является одним из основных и начальных звеньев цитостатической и цитотоксической активации фагоцитов, естественных киллеров в отношении микробных, опухолевых и переживающих клеток [3, 24]. При использовании ХЛ-теста было обнаружено, что введение эластазы и развитие эмфиземы легких усиливают способность эффекторных клеток генерировать активные формы кислорода, что свидетельствует о системном воспалительном ответе. С другой стороны, в группах, получивших клеточную терапию, пик ХЛ-активности перитонеальных макрофагов достоверно уменьшался, приближаясь к уровню у контрольных животных без эмфиземы легких.

Таким образом, мы предполагаем, что часть МСК оказывала противовоспалительный эффект и поэтому меньшее число МСК участвовало в последующем процессе восстановления клеточных и каркасных структур, что объясняет больший регенерационный эффект в группе, получившей МСК не на следующий, а на 7-й день после эластазной травмы.

Механизмы восстановления паренхимы легких в результате введения МСК до настоящего времени окончательно не установлены, хотя в ряде исследований показаны миграция МСК в легкие и превращение экзогенных МСК в альвеолярный эпителий и эндотелий [11, 13, 27]. В более поздних работах установлено, что трансформация МСК в альвеолоциты происходит не более чем у 1% от введенного пула МСК [12, 16], однако эти данные были получены не на модели эмфиземы, а при экспериментальном муковисцидозе и блеомициновом фиброзе. Вероятно, больший вклад в регенерацию ткани легких при эмфиземе вносят паракринные эффекты клеточной терапии. G. Zhen et al. [29] продемонстрировали положительное влияние МСК на тканевую экспрессию фактора роста эндотелия (VEGF) и подавление апоптоза эпителия у крыс с ЭЛ, вызванной инстилляцией папаина в дыхательные пути. В исследовании E.P. Ingenito et al. [9] на модели ЭЛ у овец показана продукция МСК интегринов, компонентов экстрацеллюлярного матрикса (коллагена IV, ламинина и фибриллина), рецепторов фактора роста тромбоцитов и трансформирующего фактора роста $\beta 2$. В этой же работе установлено, что часть МСК встраивается в альвеолярные стенки и перибронхиальный интерстиций при эндобронхиальном введении, а часть подвергается апоптозу.

Вероятны также активирующие эффекты экзогенных МСК на резидентные СК легких. Как и в других органах, в легких имеются собственные МСК, среди которых выделяют клетки протоков желез подслизистого слоя трахеи, базальные клетки эпителия межхрящевых зон нижней части трахеи, клетки Клара терминальных и респиаторных бронхиол, альвеолярных ходов и альвеолоциты II типа [21]. Одним из путей активации стационарных СК легких может быть экспрессия экзогенными СК ростовых факторов, в частности фактора роста кератиноцитов [7]. По-видимому, суммация разных эффектов трансплантированных МСК как основного компонента физиологической и «аварийной» регенерации разных органов и тканей взрослого организма [19] определяет как торможение развития ЭЛ, так и восстановление поврежденных структур ткани легких при острой эластазной модели.

Заключение

В проведенном исследовании была показана принципиальная возможность сдерживающего, регенеративного и системного противовоспалительного эффекта при внутривенном введении аллогенных МСК в экспериментальной эластазной модели эмфиземы лег-

ких у крыс. Учитывая низкую иммуногенность МСК, можно ожидать подобного эффекта и при введении ксеногенных МСК, что наблюдалось в экспериментальных моделях при других заболеваниях [25].

Литература

1. *Аверьянов А.В., Самсонова М.В., Черняев А.Л.* и др. Аспекты патогенеза эмфиземы легких у больных ХОБЛ // Пульмонология. 2008. № 3. С. 35–41.
2. *Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П.* Хемилюминесценция клеток животных / В кн.: Итоги науки и техники. Биофизика. ВИНТИ. М., 1989. Т. 24. 176 с.
3. *Маянский А.Н., Маянский Д.Н.* Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, 1989. 344 с.
4. *Петров В.Н., Конопляников А.Г., Саяпина Е.В.* и др. In vitro модифицирующее воздействие мезенхимальных стволовых клеток на продукцию макрофагами активных форм кислорода в аллогенной и ксеногенной системах совместных культур / В кн.: Аутологичные стволовые клетки. Экспериментальные исследования и перспективы клинического применения / Под ред. В.А.Ткачука. М.: Литтерра, 2009. С. 429–448.
5. *Таков Р.Г.* Патологическая анатомия и патогенез хронической обструктивной эмфиземы легких: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1966. 25 с.
6. *Цыб А.Ф., Конопляников А.Г., Колесникова А.И., Павлов В.В.* Получение и использование в медицине клеточных культур из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека // Вестник РАМН. 2004. Т. 59. № 9. С. 71–76.
7. *Gomperts B.N., Belperio J.A., Fishbein M.C.* et al. Keratinocyte growth factor improves repair in the injured tracheal epithelium // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2007. V. 37. N 1. P. 48–56.
8. *Halbert R.J., Natoli J.L., Gano A.* Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis // Eur. Respir. J. 2006. V. 28. N 3. P. 523–32.
9. *Ingenito E.P., Tsai L., Murthy S.* et al. Autologous lung-derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental emphysema // Cell Transplant. 2011. Feb. 3. P. 1–44.
10. *Kaza A.K., Kron I.L., Kern J.A.* et al. Retinoic acid enhances lung growth after pneumonectomy // Ann. Thorac. Surg. 2001. V. 71. N 5. P. 1645–50.
11. *Kotton D.N., Ma B.Y., Cardoso W.V.* et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium // Development. 2001. V. 128. N 24. P. 5181–8.
12. *Kotton D.N., Fabian A.J., Mulligan R.C.* Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2005. V. 33. N 4. P. 328–34.
13. *Krause D.S., Theise N.D., Collector M.I.* et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell // Cell. 2001. V. 105. N 3. P. 369–77.
14. *Kubo H.* Lung Repair and Regeneration — Animal Models. Cell therapy for lung disease // Imperial College Press. London, 2010. P. 199–235.
15. *Lest C.H.A., Versteeg E.M.M., Veerkamp J.H., Kuppevelt T.H.* Digestion of proteoglycans in porcine pancreatic elastase-induced emphysema in rats // Eur. Respir. J. 1995. V. 8. P. 238–245.
16. *Loi R., Beckett T., Goncz K.K.* et al. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006. V. 173. N 2. P. 171–9.
17. *Mao M., Wang S.N., Lv X.J.* et al. Intravenous delivery of bone marrow-derived endothelial progenitor cells improves survival and attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in rats // Shock. 2010. V. 34. N 2. P. 196–204.
18. *Massaro G.D., Massaro D.* Retinoic acid treatment partially rescues failed septation in rats and in mice // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2000. V. 278. N 5. L955–L960.
19. *Mimeault M., Hauke R., Batra S.K.* Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies // Clin. Pharmacol. Ther. 2007. V. 82. N 3. P. 252–64.
20. National Heart Lung and Blood Institute. The definition of emphysema. Report of a Division of Lung Diseases workshop // Am. Rev. Respir. Dis. 1985. V. 132. N 1. P. 182–5.
21. *Roomans G.M.* Tissue engineering and the use of stem/progenitor cells for airway epithelium // Eur. Cell Mater. 2010. V. 19. P. 284–99.
22. *Rubio M.L., Martin-Mosquero M.C., Ortega M.* et al Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats // Chest. 2004. V. 125. N 4. P. 1500–06.
23. *Schweitzer K.S., Johnstone B.H., Garrison J.* et al. Adipose stem cell treatment in mice attenuates lung and systemic injury induced by cigarette smoking // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011. V. 183. N 2. P. 215–25.
24. *Tauber A.I., Babior B.M.* O₂⁻ and host defense: the production and fate of O₂⁻ in neutrophils // Photochem. Photobiol. 1978. V. 28. N 4–5. P. 701–9.
25. *Tse W.T., Pendleton J.D., Beyer W.M.* et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation // Transplantation. 2003. V. 75. N 3. P. 389–97.
26. *Vlanovich G., Russel M.L., Mercer R.R., Crapo J.D.* Cellular and connective tissue changes in alveolar septal walls in emphysema // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999. V. 160. N 6. P. 2086–92.
27. *Wang G., Bunnell B.A., Painter R.G.* et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. N 1. P. 186–191.
28. *Zhen G., Liu H., Gu N., Zhang H.* Mesenchymal stem cells transplantation protects against rat pulmonary emphysema // Front Biosci. 2008. V. 13. P. 3415–22.
29. *Zhen G., Xue Z., Zhao J.* et al. Mesenchymal stem cell transplantation increases expression of vascular endothelial growth factor in papain-induced emphysematous lungs and inhibits apoptosis of lung cells // Cytotherapy. 2010. V. 12. N 5. P. 605–14.

EFFECTS OF ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS ON LUNG TISSUE IN RAT EXPERIMENTAL MODEL OF PULMONARY EMPHYSEMA

A.V. Averyanov, A.L. Chernyaev, A.G. Konoplyannikov, V.N. Petrov, O.A. Konoplyannikova, E.V. Ageeva, O.P. Kuzovlev, N.S. Kulagina, A.E. Trusov, K.S. Voytkovskaya

We studied the lung tissue in rats with emphysema induced by intratracheal administration of pancreatic elastase at different times after intravenous transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells. We revealed that allogeneic mesenchymal stem cells administered intravenously could have inhibitory, regenerative and systemic anti-inflammatory effects on rat lungs in the experimental elastase model of pulmonary emphysema. Considering the low immunogenicity of mesenchymal stem cells, a similar effect can be expected after administration of xenogeneic mesenchymal stem cells.

Key words: experiment, emphysema, mesenchymal stem cells.

Информация об авторах

Аверьянов А.В. – докт. мед. наук, заместитель генерального директора по научной работе и медицинским технологиям Федерального научно-клинического центра специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России.
Телефон: 8 (495) 395-0511. E-mail: averyanovav@mail.ru

Черняев А.Л. – докт. мед. наук, профессор, заведующий отделом патологии НИИ пульмонологии ФМБА России.
Телефон: 8 (495) 465-5384.

Материал поступил в редакцию 21 июля 2012 года

СТИМУЛЯЦИЯ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУННОГО ОТВЕТА ЦИТОСТАТИЧЕСКИМИ ХИМИОПРЕПАРАТАМИ В ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК СЕЛЕЗЕНКИ МЫШЕЙ *IN VITRO*

И.М. Богданова, Е.А Пономаренко

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Исследовали влияние противоопухолевых химиопрепаратов доксорубицина, цисплатина и топо-текана на клетки опухолевых линий различного генеза *in vitro*. Культивирование опухолевых клеток с клетками селезенки интактных мышей приводит к опухолеспецифической активации иммунитета, регистрируемой по выработке провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли- α и интерферона- γ . При оценке прямого цитотоксического эффекта химиопрепаратов на клетки опухолевых линий выявлены чувствительные и резистентные линии. Предварительная обработка опухолевых клеток цитостатиками с последующей отмывкой приводит к повышению уровня цитокинов в культуральном надосадке 24-часовых культур опухолевых клеток и клеток селезенки. Это, очевидно, связано с усилением экспрессии иммуногенных детерминант на опухолевых клетках, претерпевающих начальную стадию апоптоза. Взаимосвязь между повышением иммуногенного потенциала опухолевых клеток, обработанных цитостатиками, и их чувствительностью к действию химиопрепаратов выявлена только при использовании опухолевых линий одного тканевого происхождения, глиобластом 101.8 и С6. В случае с клетками L929 (фибробластоподобная опухолевая клеточная линия), резистентными к цитотоксическому действию цитостатиков, выявлена обратная зависимость между резистентностью опухоли к цитостатикам и индукцией иммуногенного потенциала. Возможно, экспрессия иммуногенных детерминант на опухолевых клетках и их гибель, индуцированная действием препаратов, значительно разобщены во времени. Для ответа на поставленные вопросы необходимы дополнительные эксперименты.

Ключевые слова: опухолевые клеточные линии, клетки селезенки, иммуногенность, противоопухолевые химиопрепараты

Иммунная система может идентифицировать и разрушать вновь образуемые опухолевые клетки, то есть осуществлять противоопухолевый иммунный надзор. В процессе онкогенеза, в результате многочисленных мутаций, опухолевые клетки начинают экспрессировать измененные антигенные пептиды, которые могут быть распознаны иммунной системой как измененное «свое» [27]. К настоящему времени в многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях получены неоспоримые доказательства участия клеток врожденного и адаптивного иммунитета в противоопухолевом иммунном надзоре [12, 25]. Взаимосвязь между врожденным и приобретенным противоопухолевым иммунитетом при развитии протективного Т-клеточного ответа осуществляется при участии цитокинов, хемокинов и ассоциированных с гибелью клеток молекулярных паттернов (damage-associated molecular pattern, DAMP) [2, 23]. Ответ на опухоль может быть зарегистрирован при *in vitro* со-

культивировании опухолевых клеток и спленоцитов иммунокомпетентных мышей по выработке провоспалительных цитокинов. Эффект опухолеспецифичен и проявляется уже через 4 часа, достигая максимального значения через 24 часа. Цитокины, вырабатываемые в популяции клеток селезенки в ответ на опухоль, включают фактор некроза опухоли (ФНО)- α , интерлейкин (ИЛ)-6, интерферон (ИФ)- γ [1]. В популяции спленоцитов клетки-эффекторы, отвечающие на опухоль в столь ранние сроки, представлены дендритными клетками, плазмацитоидными клетками, естественными киллерными клетками и ИФ-продуцирующими киллерными дендритными клетками [21, 24, 26], а также макрофагами и не рестриктированными по главному комплексу гистосовместимости $\gamma\delta$ Т-клетками [27]. Иммуногенный потенциал опухолевых клеток, то есть способность к индукции противоопухолевого иммунного ответа, определяется набором белков с иммуномодулирующими свойствами, называемыми сигналами опасности,

которые регистрируются клетками иммунной системы через соответствующие рецепторы. Повышение уровня таких сигналов – один из способов индукции эффективного противоопухолевого иммунного ответа.

Результаты многочисленных работ последних лет, посвященных этой проблеме, свидетельствуют о зависимости между типом гибели опухолевых клеток и экспрессией молекулярных детерминант, ассоциированных с иммуногенным потенциалом опухоли [3, 28]. Апоптоз, или физиологическая гибель клеток, – непрерывный неиммуногенный процесс обновления клеточного пула организма, который протекает в отсутствие сигналов опасности, исходящих от погибающих клеток [4], однако апоптотическая гибель опухолевых клеток, индуцированная стрессом (радио- или химиотерапия), может приводить к повышению их иммуногенности [13, 22, 23]. Показано, что цитостатики антрациклинового ряда вместе с прямым действием индуцируют развитие противоопухолевого иммунного ответа в системе врожденного и адаптивного иммунитета [9, 10, 15, 17], необходимого для оптимального терапевтического результата. Приобретение опухолевыми клетками иммуногенного фенотипа зависит от ряда факторов. Наряду с внутренними факторами, которые определяют тип ответа, а также потенциальную иммуногенность опухолевых клеток, важное прогностическое значение имеет функциональное состояние иммунной системы хозяина [29].

Имуногенная клеточная гибель вовлекает изменения состава клеточной поверхности и освобождение растворимых иммуногенных сигналов. Имуногенная клеточная гибель характеризуется ранней экспрессией шаперонов на клеточной поверхности, включая кальретикулин и/или белки теплового шока. Преапоптотическая транслокация внутриклеточного кальретикулина на поверхность плазматической мембраны имеет ключевое значение для распознавания и захвата погибающих опухолевых клеток дендритными клетками (ДК), а также влияет на созревание ДК [7, 8, 14, 20]. Блокада или нокдаун кальретикулина подавляют фагоцитоз обработанных доксорубицином опухолевых клеток и отменяют их иммуногенность у мышей. Другие ДНК-повреждающие агенты, такие как митомицин С и этопозид, не индуцируют иммуногенную гибель клеток [19]. В экспериментальной системе на мышах, несущих стабилизированные канцерогениндуцированные опухоли, удачный исход лечения доксорубицином в большой степени зависит от участия как врожденного, так и адаптивного иммунитета [16]. Нами разработана модельная система для регистрации ранней (до 24 часов) провоспалительной реакции клеток селезенки мышей на клетки опухолевых линий *in vitro*, основанная на определении уровня референс-цитокинов, ФНО- α и ИФ- γ в культуральном надосадке спленоцитов и опухолевых клеток [1].

Цель настоящей работы – исследование способности используемых в клинике химиопрепаратов ин-

дуцировать иммуногенную клеточную гибель в опухолевых клеточных линиях крысы и мыши *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 весом 20–22 г (питомник «Столбовая»). Экспериментальные процедуры на животных проводились в соответствии с приказом МЗ СССР № 755 от 12.8.1977.

В экспериментах использовали культивируемые линии опухолевых клеток – L-929 (фибросаркома мыши), YAC-1 (Т-лимфома мыши), 101.8 и С6 (глиобластомы крысы из коллекции линий глиом НИИ морфологии человека, предоставленные А.С. Халанским и Л.И. Кондаковой). Клетки поддерживались субкультивированием в среде RPMI 1640 с 10% фетальной телячьей сыворотки, 20 мкг/мл гентамицина и 2 мМ глутамин.

В работе использовали цитостатические химиопрепараты: доксорубин (Dox) – антрациклиновый антибиотик, цисплатин (Cis) – препарат на основе платины и топотекан (Торо) – ингибитор топоизомеразы I, предоставленные А.С. Халанским.

Для получения культуральных надосадков клетки селезенки мышей C57BL/6 (5×10^6 /мл) инкубировали с клетками опухолевых линий (5×10^5 /мл) в течение 24 часов при +37°C в CO₂-инкубаторе. По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием, надосадки отбирали и хранили до тестирования при –20°C.

Цитокины в культуральных надосадках определяли иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов ELISA для детекции ИФ- γ мыши и ELISA (mouse Th1/Th2 10plex Kit) от Bender MedSystem GmbH. В последнем случае определение цитокинов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 BeckmanCoulter.

Оценку цитотоксического действия химиопрепаратов проводили с использованием колориметрического метода определения жизнеспособности клеток [18]. Опухолевые клетки инкубировали в 96-луночных плоскодонных панелях (5×10^4 клеток/лунку) в течение 24 часов для получения монослоев. Затем в лунки добавляли серийные разведения цитостатиков от 10 мкг/мл до 0,01 мкг/мл в объеме 50 мкл (в случае с суспензионной культурой YAC-1 1-й этап 24-часовой инкубации клеток исключали) и инкубировали 1 сутки. В контрольных лунках цитостатики отсутствовали. По окончании инкубации в лунки добавляли по 20 мкл МТТ(3-(4,5-диметилтиразол-2-ил)-2,6-дифенилтетразолий бромид) (Sigma) с концентрацией 5 мг/мл и инкубировали 4 часа при +37°C. Панели центрифугировали 5 минут. При 1500 об/мин надосадки удаляли и в каждую лунку добавляли по 100 мкл HCl-изопропанола. После тщательного пипетирования проводили фотометрию на многоканальном планшетном фотометре ANTHOS 2010 (Австрия) при длине волны 495 нм. Процент цитолиза определяли по формуле $D1 - D2/D1 \times 100(\%)$, где D1 – оптическая плотность контрольных, а D2 – опытных образцов.

Для обработки опухолевых линий цитостатиками клетки L929, 101.8 и С6 в концентрации 5×10^5 /мл в объеме 1 мл помещали в лунки 24-луночных панелей и инкубировали при $+37^\circ\text{C}$ с 5% CO_2 в течение 24 часов. К полученным монослойным культурам клеток добавляли цитостатики – Dox, Cis и Торо (10 мкг/мл) и инкубировали 2–4 часа. Затем культуры отмывали 3 раза бессывороточной средой, доводили объем до 1 мл полной культуральной средой и добавляли спленоциты (5×10^6 /мл). Инкубировали 24 часа, надосадки отбирали, центрифугировали и хранили при -20°C [7].

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$). О достоверности различий средних величин судили по критерию t-Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Для оценки прямого действия химиопрепаратов на клетки опухолевых линий различного генеза использовали доксорубицин, цисплатин и топотекан. Нами обнаружены различия по чувствительности к цитостатикам тестируемых опухолевых линий. На рисунке 1 видно, что клетки линий L929 и С6 в значительной степени резистентны, а YAC-1 и 101.8 – чувствительны к цитолитическому действию химиопрепаратов. Несмотря на различную химическую природу используемых препаратов, их эффект на опухолевые клетки практически идентичен. В связи с этим нам представлялось интересным определить зависимость между таким свойством опухолевых клеток как чувствительность к цитотоксическому действию химиопрепаратов и способностью к индукции цитокинов в популяции клеток селезенки интактных мышей. Мы полагаем, что уровень экспрессии иммуногенных детерминант, ассоциированных с начальной стадией гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза, должен быть выше в клетках чувствительных, чем резистентных линий и, соответственно, вызывать более интенсивную продукцию провоспалительных цитокинов. Данные, представленные в таблице 1, полностью подтверждают это предположение. Значительно более высокий уровень выработки ФНО- α и ИФ- γ и небольшое, но достоверное повышение продукции ИЛ-6 и ИЛ-10 зарегистрированы в надосадках сокультур чувствительных опухолевых клеток 101.8 и спленоцитов C57BL/6, чем при использовании в качестве индукторов этих цитокинов резистентной линии С6. Таким образом, чувствительность к химиопрепаратам ассоциирована с повышением иммуногенности опухолевых клеток. Выработка других цитокинов, ИЛ-1 α , ИЛ-2, ИЛ-5, ГМ-КСФ, ИЛ-4, ИЛ-10 не зарегистрирована, что может быть связано с их недетектируемым уровнем в столь ранние сроки активации врожденного иммунитета.

При анализе результатов, полученных с использованием в качестве индуктора цитокинов другой рези-

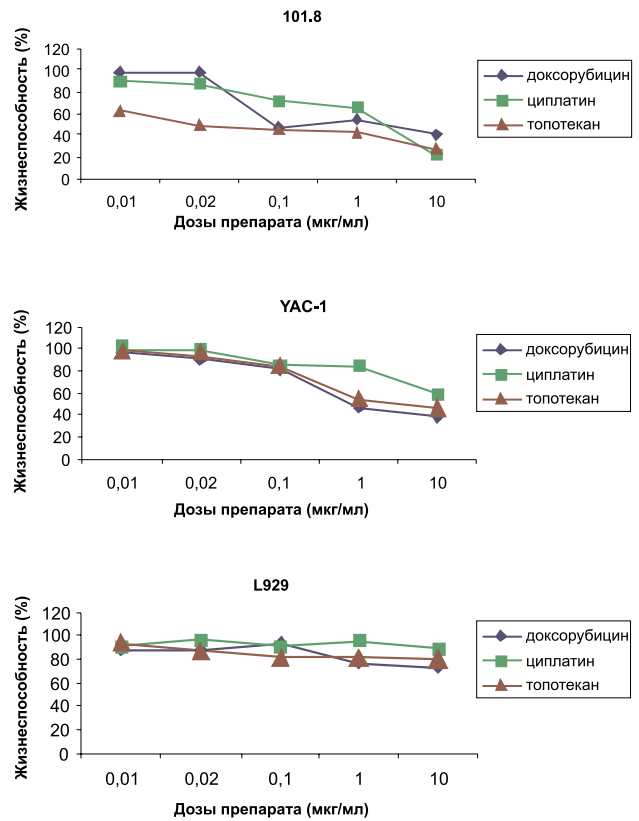


Рис. 1. Влияние химиотерапевтических препаратов на жизнеспособность клеток опухолевых линий

стентной линии, L929, выявлено повышение иммуногенности, индуцируемое химиопрепаратами (табл. 1). В данной экспериментальной системе использованы опухолевые линии различного тканевого происхождения. Мы полагаем, что исход химиотерапии наряду с чувствительностью к препаратам связан с другими многочисленными факторами [29]. Очевидно, в случае с опухолевыми клетками L929 обработка их химиопрепаратами, индуцирующая экспрессию иммуногенных детерминант на клеточной поверхности, и гибель клеток могут быть разобщены по времени. Действительно, удлинение срока экспозиции L929 с химиопрепаратами с 24 до 48 часов значительно повышает процент гибели этих клеток (данные не представлены).

Для продолжения работы необходимо расширение панели опухолевых линий и, возможно, потенциальных индукторов иммуногенности опухолевых мишеней. Также необходимо проведение анализа причин резистентности опухолевых клеток к цитостатическому действию химиопрепаратов. Здесь следует иметь в виду феномен множественной лекарственной резистентности (multidrug resistance, MDR). Р-гликопротеин, Pgp, кодируемый MDR1 геном, – АТФ-зависимый трансмембранный транспортер, который осуществляет активный выброс различных токсинов, включая противоопухолевые препараты, из клетки. Высокий уровень экспрессии этого белка в опухолевых клетках сообщает им рези-

Выработка цитокинов клетками селезенки интактных мышей C57BL/6 при их сокультивировании с клетками опухолевых линий чувствительных и резистентных к цитотоксическому действию противоопухолевых химиопрепаратов

Опухолевая клеточная линия	Препарат	Цитокины									
		ИЛ-1 α	ИЛ-2	ИЛ-5	ИЛ-6	ИЛ-10	ИФ γ	ФНО- α	ГМ-КСФ	ИЛ-4	ИЛ-17
L929	–	0	0	0	2230 \pm 61	137 \pm 24	979 \pm 39	107 \pm 21	0	0	0
	Эксп. № 1 Cis	0	0	0	2151 \pm 48	280 \pm 26*	1451 \pm 45*	145 \pm 28*	0	0	0
	Dox	0	0	0	3930 \pm 53**	208 \pm 24*	1360 \pm 48*	156 \pm 27*	76 \pm 21	0	0
	Topo	0	0	0	5066 \pm 192**	334 \pm 33*	1644 \pm 56*	163 \pm 33*	79 \pm 20	0	0
	Эксп. № 2 –	0	0	0	2909 \pm 101	308 \pm 30	2188 \pm 68*	454 \pm 48	294 \pm 32	0	0
	Cis	0	0	0	5009 \pm 203**	368 \pm 35	16173 \pm 901***	842 \pm 46**	514 \pm 39	0	0
	Эксп. № 3 –	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	312 \pm 31	н/д	н/д	н/д	н/д
Dox	–	–	–	–	–	2322 \pm 58**	–	–	–	–	
101.8	–	0	0	0	358 \pm 34	82 \pm 11	145 \pm 21	76 \pm 18	0	0	0
	Cis	0	0	0	1215 \pm 69**	338 \pm 35**	3632 \pm 57**	187 \pm 23**	0	0	0
С6	–	0	0	0	500 \pm 28	196 \pm 27	1506 \pm 39	375 \pm 44	0	0	0
	Cis	0	0	0	296 \pm 21	124 \pm 18	1478 \pm 40	188 \pm 21	0	0	0
	Dox	0	0	0	260 \pm 23	220 \pm 20	1107 \pm 34	234 \pm 24	0	0	0
	Topo	0	0	0	522 \pm 37	183 \pm 19	1445 \pm 38	346 \pm 28	0	0	0

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с соответствующим контролем. Cis – цисплатин, Dox – доксорубин, Topo – топотекан.

стентность к Pgp-транспортируемым лекарственным препаратам. Важным является оценка экспрессии Pgp на мембране опухолевых клеток, а также подавление его функции сурфактантами или неспецифическими ингибиторами протеинкиназы С [6].

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что тестируемые нами химиопрепараты доксорубин, цисплатин и топотекан наряду с прямым цитотоксическим действием повышают иммуногенность опухолевых клеток и индуцируют более высокий уровень иммунного ответа в популяции клеток селезенки мышей, регистрируемый по выработке основных противоопухолевых цитокинов.

Кроме того, показано наличие взаимосвязи между чувствительностью опухолевых клеток к цитостатикам и индукцией противоопухолевого ответа в системе врожденного иммунитета при использовании опухолевых клеточных линий одного генеза (глиобластомы крысы 101.8 и С6).

Литература

1. Малайцев В.В. Активация клеток иммунной системы при первичной экспозиции с клетками опухолевых линий in vitro / Малайцев В.В., Богданова И.М. // Актуальные во-

просы морфогенеза в норме и патологии: Сборник научных трудов. М.: 2010. С. 135–137.

2. Belardelli F. Cytokines as link between innate and adaptive anti-tumor immunity / Belardelli F., Ferrantini M. // Trends. Immunol. 2002. V. 23. N. 4. P. 201–8.
3. Bruserud O. Anticancer immunotherapy in combination with proapoptotic therapy / Bruserud O. et al. // Curr. Cancer Drug Targets. 2008. V. 8. N. 8. P. 666–75.
4. Casares N. Caspase-dependent immunogenicity doxorubicin-induced tumor cell death / Casares N. et al. // J. Exp. Med. 2005. V. 202. N. 12. P. 1691–1701.
5. Chaput N. Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference / Chaput N. et al. // J. Molec. Med. (Berl). 2007. V. 85. N. 10. P. 1069–76.
6. Chaudhary P.M. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs / Chaudhary P.M., Roninson I.B. // J. Natl. Cancer Inst. 1993. V. 85. N. 8. P. 632–9.
7. Chauhan P. Cisplatin primes murine peritoneal macrophages for enhanced expression of nitric oxide, proinflammatory cytokines, TLRs, transcription factors and activation of MAP kinases upon co-incubation with L929 cells / Chauhan P. et al. // Immunobiology. 2009. N. 214. P. 197–209.
8. Clarke C. Calreticulin exposure increases cancer immunogenicity / Clarke C., Smyth M.J. // Nat. Biotechnol. 2007. V. 25. N. 2. P. 192–3.

9. *Fucikova J.* Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response / Fucikova J. et al. // *Cancer Res.* 2011. V. 71. N. 14. P. 4821–33.
10. *Galluzzi L.* The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs / Galluzzi L. et al. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012. V. 11. N. 3. P. 215–33.
11. *Galluzzi L.* Enlightening the impact of immunogenic cell death in photodynamic cancer therapy / Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. // *EMBO J.* 2012. V. 31. N. 5. P. 1055–7.
12. *Ghiringhelli F.* Links between innate and cognate tumor immunity / Ghiringhelli F. et al. // *Curr. Opin. Immunol.* 2007. V. 19. N. 2. P. 224–31.
13. *Kepp O.* The immunogenicity of tumor cell death / Kepp J. et al. // *Curr. Opin. Oncol.* 2009. V. 21. N. 1. P. 71–6.
14. *Kepp O.* Molecular determinants of immunogenic cell death elicited by anticancer chemotherapy / Kepp O. et al. // *Cancer metastasis Rev.* 2011. V. 30. N. 1. P. 61–9.
15. *Martins I.* Surface-exposed calreticulin in interaction between dying cells and phagocytes / Martins I. et al. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010. N. 1209. P. 77–82.
16. *Mattarollo S.R.* Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors / Mattarollo S.R. et al. // *Cancer Res.* 2011. V. 71. N. 14. P. 4809–20.
17. *Menard C.* Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity / Menard C. et al. // *Immunol. Immunother.* 2008. V. 57. N. 11. P. 1579–87.
18. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. N. 65. P. 22–34.
19. *Obeid M.* Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy / Obeid M. et al. // *Immunol. Rev.* 2007. N. 220. P. 22–34.
20. *Obeid M.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death / Obeid M. et al. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. N. 1. P. 54–61.
21. *Terme M.* The dendritic cell-like functions of IFN-producing killer dendritic cells reside in the CD11b+ subset and are licensed by tumor cells / Terme M. et al. // *Cancer Res.* 2009. V. 69. N. 16. P. 6590–7.
22. *Tensiere A.* Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm / Tensiere A. et al. // *Curr. Opin. Immunol.* 2008. V. 20. N. 5. P. 504–11.
23. *Ullrich E.* Tumor stress, cell death and the ensuing response / Ullrich E. et al. // *Cell death and differentiation.* 2008. N. 15. P. 21–28.
24. *Ullrich E.* Dendritic cells and innate defense against tumor cells / Ullrich E. et al. // *Cytokines Growth Factor Rev.* 2008. V. 19. N. 1. P. 79–92.
25. *Vesely M.D.* Natural innate and adaptive immunity to cancer / Vesely M.D. et al. // *Ann. Rev. Immunol.* 2011. V. 23. N. 29. P. 235–71.
26. *Vremec D.* Production interferons by dendritic cells, natural killer cells and interferon-producing killer dendritic cells / Vremec D. et al. // *Blood.* 2007. V. 109. N. 3. P. 1165–73.
27. *Whiteside L.* Immune response to malignancies / Whiteside L. // *Allergy Clin. Immunol.* 2010. N. 125. P. 272–83.
28. *Zitvogel L.* Immune response against dying tumor cells / Zitvogel L. et al. // *Adv. Immunol.* 2004. N. 84. P. 131–79.
29. *Zitvogel L.* Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens / Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011. V. 18. N. 3. P. 151–60.

STIMULATION OF TUMOR-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE BY CYTOSTATIC CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS IN MOUSE SPLEEN CELL POPULATIONS *IN VITRO*

I.M. Bogdanova, E.A. Ponomarenko

We studied the effects of anticancer chemotherapeutic drugs (doxorubicin, cisplatin, topotecan) on the different tumor cell lines *in vitro*. The cocultivation of spleen cells from intact mice with tumor cells resulted in the activation of tumor-specific immune response detected by the production of proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ . Estimating the direct cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs revealed sensitive and resistant cell lines. Pretreatment of tumor cells by cytostatics and subsequent washing led to increased cytokine levels in the supernatant of 24-hour culture of tumor and splenic cells. That was obviously connected with the enhanced expression of immunogenic determinants in tumor cells undergoing the initial stage of apoptosis. The relationship between increased immunogenic potential of tumor cells and their susceptibility to chemotherapeutic drugs was recorded only in tumor cell lines of the same origin, from glioblastomas 101.8 and C6. L929 cells (fibroblast-like tumor cell line) were resistant to cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs. Inverse relationship between tumor resistance to cytostatics and the induction of immune potential was revealed. Expression of immunogenic determinants on tumor cells and their drug-induced death seem to be significantly separated in time. Additional experiments are clearly needed to answer these questions.

Key words: tumor cell lines, spleen cells, immunogenicity, chemotherapeutic drugs

Информация об авторе

Богданова И.М. – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Материал поступил в редакцию 30 июня 2012 года.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТРОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА, ИНДУЦИРОВАННОГО ДЕКСТРАНСУЛЬФАТОМ НАТРИЯ, У МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C

С.О. Абдулаева¹, С.О. Кириухин¹, Т.А. Белоусова², Т.И. Хомякова²,
В.П. Черников², О.В. Макарова²

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

² ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Морфологические проявления язвенного колита, описанные в литературе, касаются слизистой оболочки. Изменения мышечного слоя ободочной кишки не изучены. Целью работы было изучение гистологических и ультраструктурных изменений стенки ободочной кишки, а также оценка состава просветной микрофлоры у мышей Balb/C при язвенном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия.

Показано, что потребление 5–7% раствора декстрансульфата натрия приводит к быстрому и значительному количественному и качественному изменению микрофлоры толстой кишки и нарушению эпителиального барьера. При морфологическом исследовании ободочной кишки во всех ее отделах выявляется эрозивно-язвенный колит. Методом электронной микроскопии в гладких миоцитах и интерстициальных клетках Кахаля преимущественно циркулярного слоя мышечной оболочки обнаруживаются деструктивные изменения разной степени выраженности, в ряде случаев с переходом в некротические. Выявленные альтеративные изменения клеток мышечной оболочки ободочной кишки приводят к нарушению ее перистальтической активности, снижению скорости продвижения содержимого, что, наряду с нарушением эпителиальной выстилки, способствует транслокации персистирующих в кишке условно патогенных и транзиторных патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: морфология, декстрансульфат натрия, мыши Balb/C, колит, микрофлора

Среди воспалительных заболеваний кишечника у человека наиболее распространены хронический неспецифический язвенный колит и болезнь Крона. Этиология этих заболеваний неясна, а патогенетические механизмы связаны с нарушениями взаимодействия иммунной системы кишечника и его микробиома, обусловленными генетической предрасположенностью организма и рядом внешних и внутренних факторов [6].

Для изучения патогенетических механизмов воспалительных заболеваний кишечника широко используется экспериментальная модель острого язвенного колита, разработанная Okayasu et al. (1990). Воспалительный процесс в толстой кишке развивается при пероральном потреблении мышами вместо питьевой воды раствора низкомолекулярного декстрансульфата натрия (*dextranodium sulphat, DSS ad libitum*).

Известно, что в развитии воспалительного процесса участвуют как гуморальное, так и клеточное звенья иммунитета, при этом особую роль играют хелперные Т-клетки (Th). В настоящее время некоторые авторы предполагают, что острый DSS-индуцированный ко-

лит у мышей обусловлен дисбалансом в системе Th1–Th17. Хронизация воспалительного процесса в толстой кишке связана с переключением иммунного ответа на Th2-тип [11]. Большинство авторов, исследовавших воспалительные заболевания кишечника на модели DSS-колита, использовали животных с генетически обусловленным преимущественно Th1-опосредованным типом иммунного ответа. Применение в этих целях мышей с преимущественно Th2-типом иммунного ответа ограничено несколькими работами, а результаты этих исследований по воспроизводимости модели противоречивы [3, 5, 12]. Морфологические проявления острого язвенного колита, описанные в литературе, касаются только слизистой оболочки. Изменения мышечного слоя ободочной кишки не изучены.

Воспроизведение всех экспериментальных моделей воспалительных заболеваний кишечника, включая использование генетически модифицированных животных и DSS-индуцированный колит, требует наличия в кишке бактерий-комменсалов [2, 9]. В ряде работ показано, что при развитии хронического колита про-

исходит снижение биологического разнообразия бактерий, населяющих кишечник, и значительное уменьшение количества некоторых бактерий-симбионтов, сочетающееся с увеличением количества токсигенных *Escherichia coli* инвазивного фенотипа [1]. Следовательно, необходимо комплексное исследование морфологических и бактериологических проявлений колита.

В связи с изложенным выше целью работы было изучение морфологических изменений стенки ободочной кишки и кишечной микрофлоры у мышей линии Balb/C при экспериментальном остром язвенном колите, индуцированном декстрансульфатом натрия.

Материалы и методы

В работе были использованы 2 группы половозрелых самцов мышей линии Balb/c – по 8 особей в каждой. Мыши опытной группы получали раствор DSS в питьевой воде по следующей схеме: 5% раствор DSS в течение первых 4 суток эксперимента и 7% раствор DSS в течение следующих 3 суток. В эксперименте был использован DSS (молекулярная масса 100 000 Da; Fluka, США). Мыши контрольной группы получали обычную питьевую воду в течение всего эксперимента. Оценка состояния микрофлоры кишечника контрольной и опытной групп оценивали высевом гомогената свежеполученных фекалий в физиологическом растворе (1:9 по весу) на соответствующие питательные среды (HiMedia, Индия). Определяли следующие группы микроорганизмов: количество лактозоположительных и лактозоотрицательных энтеробактерий, энтерококков (*Enterococcus faecalis* et *fecium*), лактобактерий. Подсчет колоний проводили через 18–36 часов роста. Показатели выражали в КОЕ/мг фекалий.

Для исследования микробиологической обсемененности образцы органов стандартных размеров (3 x 3 x 3 мм) гомогенизировали в 0,4 мл физиологического раствора. После инкубирования в течение 1 часа при комнатной температуре 0,05 мл тканевого гомогената его высеивали на сердечно-мозговой агар (HiMedia, Индия). Оценка результатов посева проводили через 18 часов роста при температуре 36°C. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека РАМН. Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. Для гистологического исследования выделяли ободочную кишку, которую разрезали вдоль по линии брыжейки и расправляли на миллиметровом фильтре, фиксировали в растворе Буэна в течение 24 часов, заливали в парафин. Гистологические срезы ободочной кишки окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде на фосфатном буфере (0,1M, pH 7,3) в течение 2 часов. После отмывания в 0,1M фосфатном буфере проводили фиксацию в OsO₄ и заливку в смесь эпона с

аралдитом. Полутонкие срезы исследовали под световым микроскопом, выбирали интересующую область и прицельно затачивали блок. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме 8800 Ultratome III (LKB, Швеция), используя стеклянные ножи. Ультратонкие срезы помещали на сетки для электронной микроскопии, срезы контрастировали в растворе Рейнольдса в течение 7 минут. Исследование образцов проводили на просвечивающем электронном микроскопе TEM Libra120 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

На 5–7-е сутки потребления DSS у мышей опытной группы снижалась двигательная активность, шерстный покров был тусклым, в области анального отверстия определялись следы желто-коричневых, иногда с примесью крови, фекалий. Показатель массы тела у животных опытной группы по сравнению с контрольной статистически значимо не изменялся. При микробиологическом исследовании просветной микрофлоры отмечалось незначительное повышение количества лактозоотрицательных колиформных энтеробактерий и снижение количества лактобактерий. Было обнаружено также достоверное увеличение количества *E. fecalis* при снижении количества *E. fecium*. Полученные данные позволяют утверждать, что употребление DSS мышами линии Balb/C приводит к быстрому и значительному количественному и качественному изменению микрофлоры с формированием патогенного микробного профиля.

При посеве на сердечно-мозговой агар образцов крови и гомогената органов у мышей опытной группы была обнаружена значительная бактериемия (4,4–9,2 x 10²/мл), которая свидетельствует о нарушении проницаемости эпителиального барьера и транслокации бактерий из кишки в кровотоки. Приведенные результаты соответствуют данным, полученным на других линиях животных и экспериментах *in vitro* [7, 10].

При макроскопическом исследовании внутренняя поверхность ободочной кишки мышей контрольной группы была серо-розовая, блестящая, местами складчатая. У мышей, получавших DSS, слизистая оболочка была тусклой, очагово гиперемированной, в ней выявлялись единичные мелкие изъязвления диаметром 0,1–0,2 мм.

При гистологическом исследовании ободочной кишки животных контрольной группы (рис. 1) кровный эпителий был сохранен на всем протяжении, крипты узкие, относительно глубокие, с преобладанием в эпителиальном пласте бокаловидных клеток. В собственной пластинке слизистой оболочки выявляли диффузно рассеянные клеточные элементы, представленные лимфоцитами, гистиоцитами, фиброцитами и фибробластами. Мышечная пластинка слизистой оболочки была образована 2–3 слоями гладкомышечных клеток с эозинофильной цитоплазмой. В соединительной ткани подслизистой основы обнару-

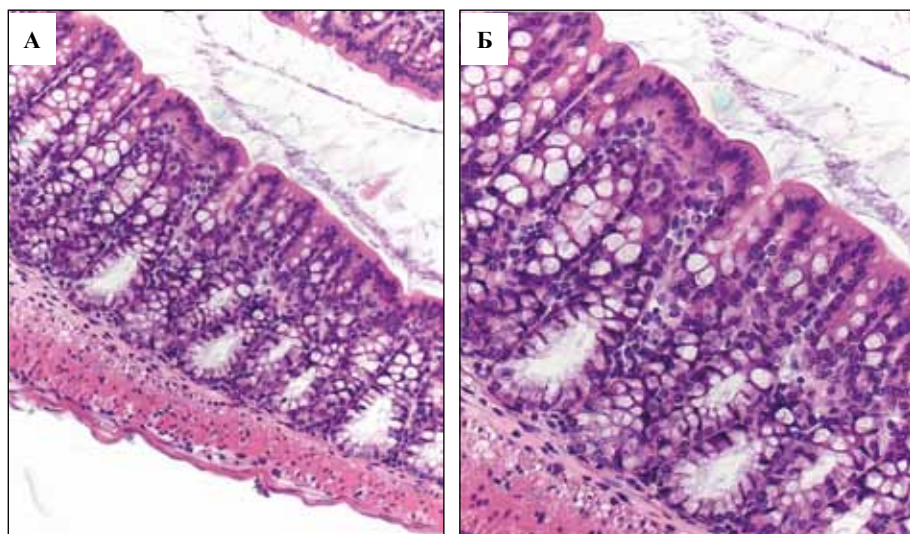


Рис. 1. Ободочная кишка мыши контрольной группы. Эпителий цилиндрический, каемчатый, без дистрофических изменений, много бокаловидных клеток. Крипты щелевидные. В собственной пластинке слизистой оболочки небольшое количество диффузно рассеянных лимфоцитов. Мышечная пластинка состоит из 2–3 слоев гладких миоцитов. Подслизистый слой узкий. Миоциты мышечной оболочки, прилежащие к подслизистой основе, с гомогенной эозинофильной, иногда светлой цитоплазмой. Окраска гематоксилином и эозином. А – $\times 200$, Б – $\times 400$

живались расширенные, неравномерно полнокровные кровеносные сосуды и лимфатические сосуды с узким щелевидным просветом. Мышечная оболочка была образована продольным и циркулярным слоями гладких миоцитов с гомогенной эозинофильной цитоплазмой и округлыми гиперхромными ядрами. В циркулярном слое мышечной оболочки встречались кластеры миоцитов со светлой, слабо эозинофильной цитоплазмой. Серозная оболочка была представлена слоем уплотненных мезотелиальных клеток и соединительнотканью слоем. На границе поперечного и продольного слоев гладких миоцитов выявлялись ганглии межмышечных сплетений.

При гистологическом исследовании ободочной кишки мышей, получавших в течение 7 суток 5–7% раствор DSS, во всех ее отделах (верхний, средний и нижний) выявлен острый эрозивно-язвенный колит, выраженность которого у каждой особи была мозаичной и варьировала от минимальной до максимальной.

В зонах с минимально выраженными патоморфологическими изменениями эпителиальная выстилка была сохранена на всем протяжении. Отмечались увеличение размеров бокаловидных клеток в области крипт, увеличение числа клеточных элементов в собственной пластинке слизистой оболочки. В мышечной пластинке слизистой оболочки изменения по сравнению с контрольной группой не выявлены. В подслизистом слое наблюдались выраженное полнокровие кровеносных сосудов и расширение просвета лимфатических сосудов. Мышечная оболочка стенки кишки животных опытной и контрольной групп различий не имела.

Зоны ободочной кишки с умеренно выраженными патоморфологическими изменениями (рис. 2) характеризовались очаговыми дистрофическими изменениями покровного эпителия с десквамацией единичных клеток. Крипты были сохранены, в них располагались крупные бокаловидные клетки в состоянии резко выраженной гиперсекреции. В собственной пластинке слизистой оболочки были выражены отек и воспалительная инфильтрация лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами. Мышечная пластинка по сравнению с таковой у животных контрольной группы была не изменена. В подслизистой основе отмечались выраженный отек, полнокровие кровеносных сосудов, резкое расширение просвета лимфатических сосудов, а также умеренная диффузно-очаговая воспали-

тельная инфильтрация лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами. В мышечной оболочке различия по сравнению с контролем не выявлены.

Зоны ободочной кишки с максимально выраженными патоморфологическими изменениями (рис. 3) характеризовались дистрофией и десквамацией эпителия с образованием эрозий и язв. Наблюдалась резкая гипертрофия бокаловидных клеток. Глубина крипт была снижена, выражены отек и воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами. В подслизистой основе отмечались резко выраженный отек, полнокровие кровеносных сосудов и значительное расширение просвета лимфатических сосудов, резко выраженная воспалительная инфильтрация. Среди гладких миоцитов циркулярного слоя мышечной оболочки преобладали клетки с зернистой, слабо эозинофильной цитоплазмой. В структуре гладких миоцитов продольного слоя мышечной оболочки изменения по сравнению с контролем не выявлены.

При электронно-микроскопическом исследовании мышечной оболочки стенки ободочной кишки мышей линии Balb/C контрольной группы гладкие миоциты тесно прилежали друг к другу. Каждая мышечная клетка была окружена базальной мембраной, отсутствующей лишь на участках, где плазмолеммы смежных гладких миоцитов формируют щелевые соединения. Их ядра располагались преимущественно в центре клетки. При этом часть хроматина была локализована на периферии ядра, пристеночно, а часть рассеяна в виде глыбок. В околоядерной области и иногда на от-

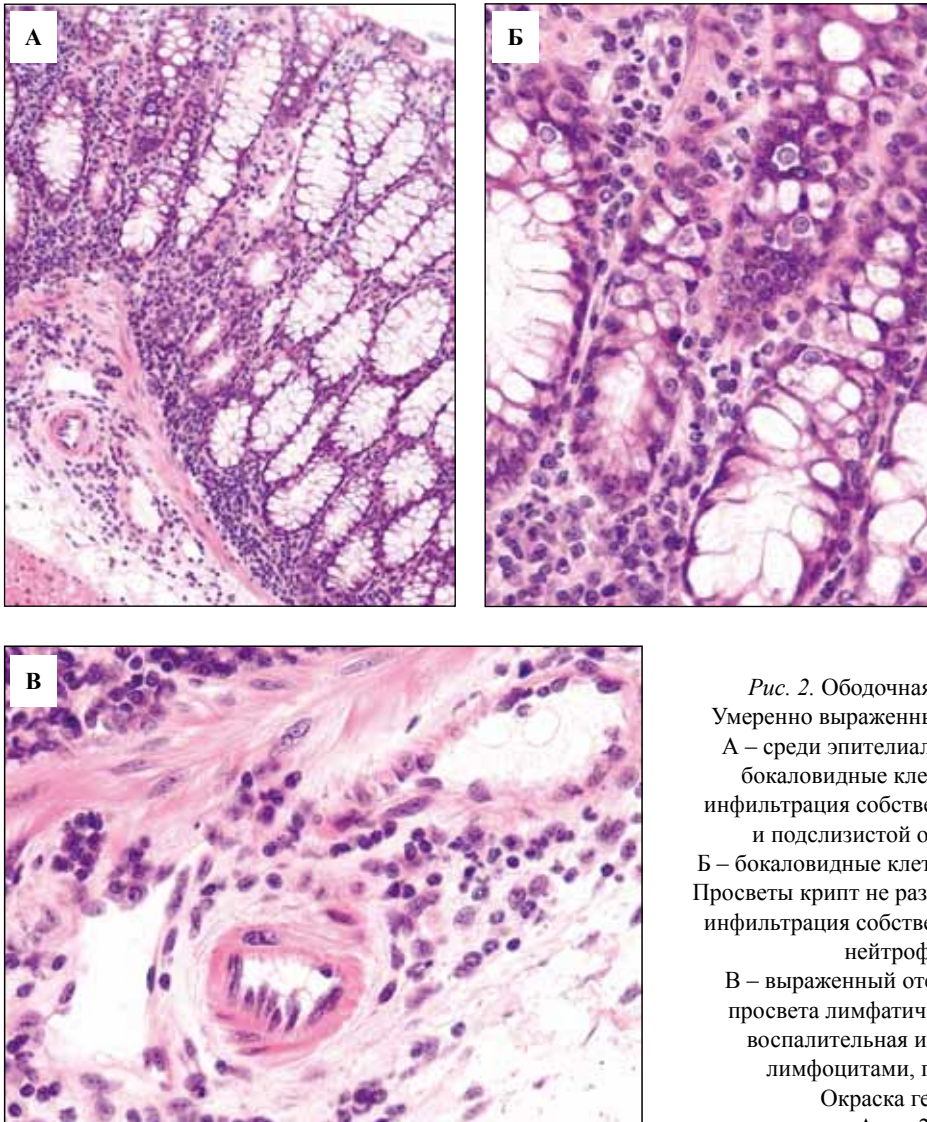


Рис. 2. Ободочная кишка мыши, получавшей DSS. Умеренно выраженные патоморфологические изменения. А – среди эпителиальных клеток преобладают крупные бокаловидные клетки. Выраженная воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки и подслизистой основы, отек подслизистого слоя. Б – бокаловидные клетки крипт в состоянии гиперсекреции. Просветы крипт не различаются. Диффузная воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки нейтрофилами и лимфоцитами. В – выраженный отек подслизистого слоя, расширение просвета лимфатических сосудов. Диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация подслизистого слоя лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами. Окраска гематоксилином и эозином. А – $\times 200$, Б – $\times 400$, В – $\times 400$

даленных от ядра участках располагались немногочисленные митохондрии с электронно плотным матриксом, редкие цистерны гладкого эндоплазматического ретикулума. Преобладающая часть цитоплазмы была представлена толстыми и тонкими миофиламентами, на фоне которых были видны плотные тельца. На периферии гладких миоцитов с плазмолеммой контактировали структуры, аналогичные плотным тельцам, – так называемые плотные пластинки, а в цитоплазме под плазмолеммой располагались немногочисленные окруженные мембраной пузырьки – кавеолы. В узких соединительнотканых пространствах между гладкими миоцитами обнаруживались коллагеновые фибриллы (рис. 4).

Между пластами гладких миоцитов в интерстиции у животных контрольной группы встречались единичные клетки, ультраструктура которых, при сопоставлении с данными литературы, соответствовала интерстициальным клеткам Кахала. Они имели отростчатую форму, электронно плотную цитоплазму, в которой контури-

ровались цистерны развитой гранулярной и гладкой эндоплазматической сети, свободные рибосомы и полисомы, митохондрии, кавеолы. Эти клетки были окружены прерывистой базальной мембраной, тесно контактировали с гладкими миоцитами и нервными окончаниями и располагались в непосредственной близости от нервных волокон (рис. 5). Безмиелиновые нервные волокна были представлены осевыми цилиндрами, цитоплазма которых содержала везикулы и нейрофибриллы, и шванновскими клетками, окруженными базальной мембраной.

Субмикроскопическая организация структурных компонентов мышечной оболочки ободочной кишки мышей с экспериментальным колитом характеризовалась полиморфизмом и мозаичностью. Ультраструктура гладкомышечных клеток субсерозного слоя мышечной оболочки была относительно сохранна и не отличалась от контроля. В гладких миоцитах и других структурных компонентах мышечной оболочки, располагающихся ближе к подслизистой основе и слизистой

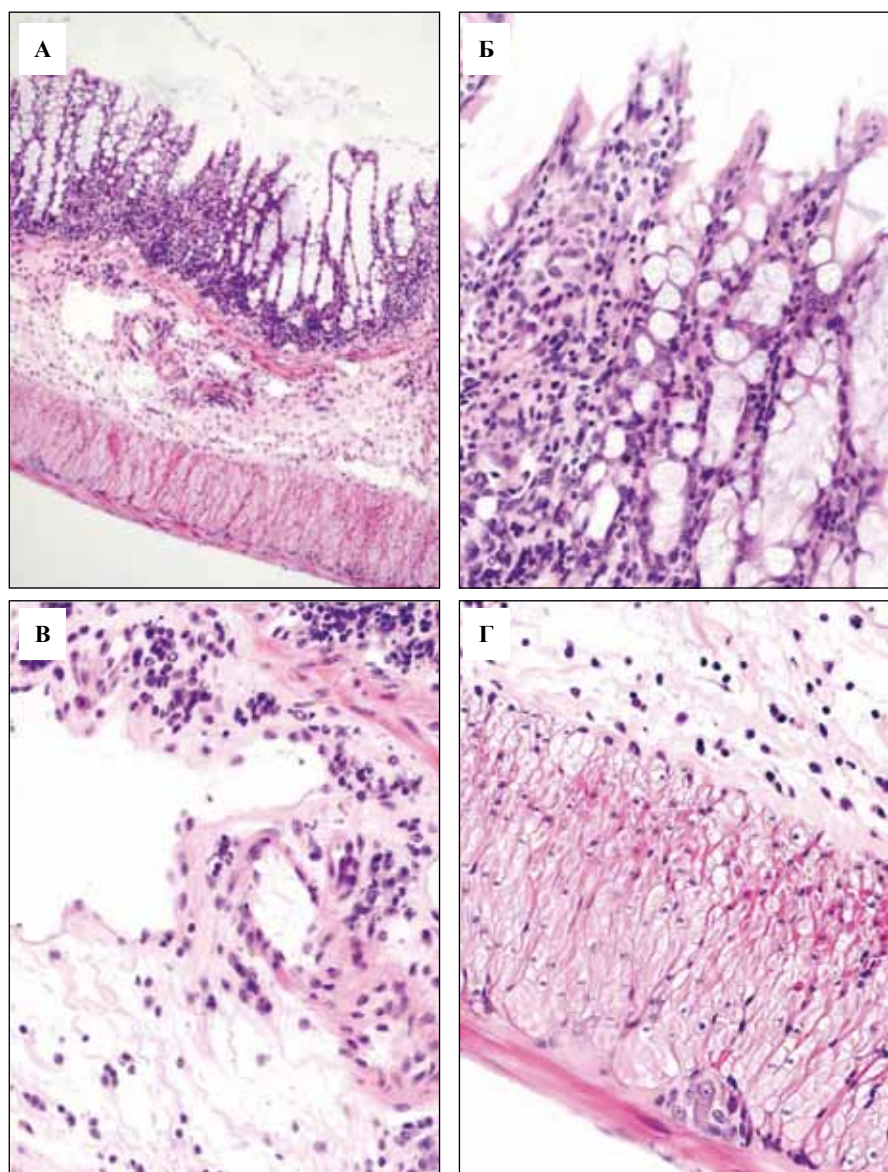


Рис. 3. Ободочная кишка мыши, получавшей DSS. Максимально выраженные патоморфологические изменения.

А – очаговая десквамация эпителия. Бокаловидные клетки в состоянии резко выраженной гиперсекреции.

Диффузная воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки. Резко выраженный отек подслизистого слоя, расширение лимфатических сосудов.

В циркулярном слое мышечной оболочки преобладают миоциты со светлой цитоплазмой.

Б – десквамация покровного эпителия, бокаловидные клетки в состоянии гиперсекреции. Диффузная воспалительная инфильтрация лимфоцитами и нейтрофилами.

В – резко выраженный отек и диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация подслизистого слоя лимфоцитами и нейтрофилами.

Расширение просвета лимфатических сосудов.

Г – в циркулярном слое мышечной оболочки преобладают миоциты со светлой зернистой цитоплазмой.

В продольном слое цитоплазма преимущественно эозинофильная. Окраска гематоксилином и эозином.

А – $\times 100$, Б, В, Г – $\times 400$

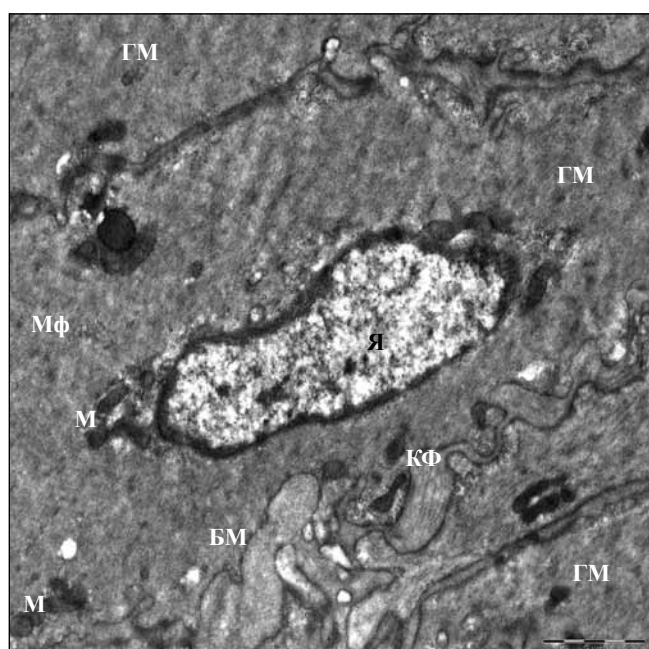


Рис. 4. Фрагмент мышечной оболочки ободочной кишки мыши контрольной группы. ГМ – гладкие миоциты, Я – ядро ГМ, Мф – миофиламенты, М – митохондрии, БМ – базальная мембрана, КФ – коллагеновые фибриллы

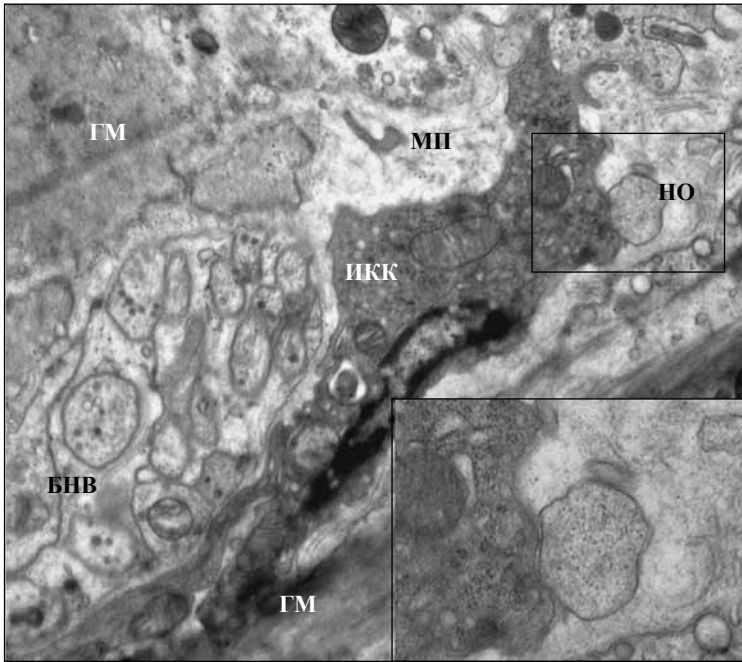


Рис. 5. Фрагмент мышечной оболочки стенки ободочной кишки мышцы контрольной группы. ИКК – интерстициальная клетка Кахаля, БНВ – безмиелиновое нервное волокно, ГМ – гладкие миоциты, МП – межклеточное пространство. х 8000.
На врезе – контакт ИКК и нервного окончания (НО). х 20 000

оболочке стенки кишки, обнаруживались деструктивные изменения разной степени выраженности, в ряде случаев с переходом в некротические (рис. 6, 7). Так, на рисунке 6 в верхнем правом углу виден фрагмент миоцита с умеренно выраженными по сравнению с контролем изменениями цитоплазмы, проявляющимися в основном в утрате четкости и частичной гомогенизации миофибриллярного аппарата при сохранности плотных телец, кавеол, плазмолеммы и базальной мембраны. Гладкий миоцит, расположенный в левом нижнем углу этой микрофотографии, характеризуется некротическими изменениями: отсутствует фибриллярность цитоплазмы, не контурируются мембранные структуры, нарушена четкость контуров плазмолеммы; клеточное содержимое представлено в виде бесструктурной мас-

сы. В центре микрофото видна отростчатая клетка с относительно крупным ядром, которая по ультраструктурной характеристике соответствует интерстициальной клетке Кахаля. Стоит отметить, что в ее цитоплазме также выявляются признаки деструктивных изменений в виде, например, лизиса мембран внутриклеточного вакуолярного компартмента, локальных просветлений кариоплазмы. Гладкий миоцит, представленный на рисунке 7, содержит митохондрии с дисккомплексированными кристами и частично гомогенизированным содержимым, фибриллярная организация его цитоплазмы утрачена. В центре этой микрофотографии располагается фрагмент, по-видимому, интерстициальной клетки Кахаля, ядро которой находится в состоянии развивающегося карюлизиса. Деструктивные процессы были

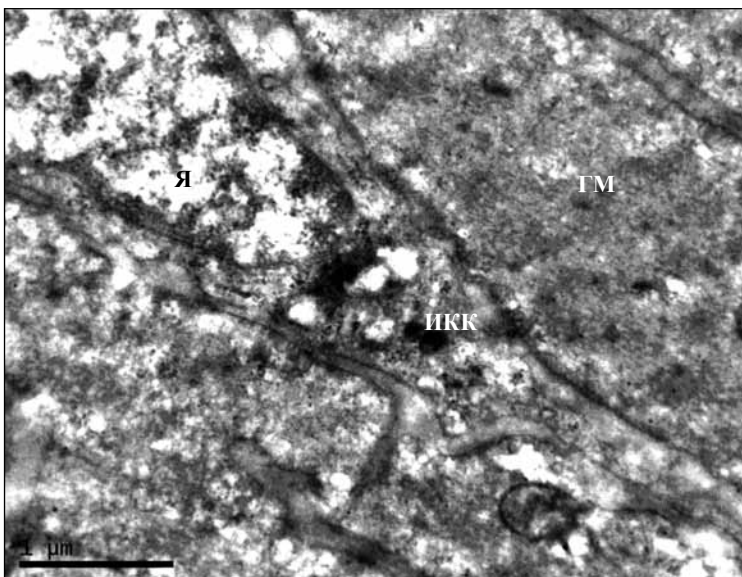


Рис. 6. Фрагмент из прилежащего к подслизистой основе участка мышечной оболочки ободочной кишки мыши, получавшей декстрансульфат в течение 7 суток. ГМ – гладкие миоциты, ИКК – интерстициальная клетка Кахаля, Я – ядро ИКК

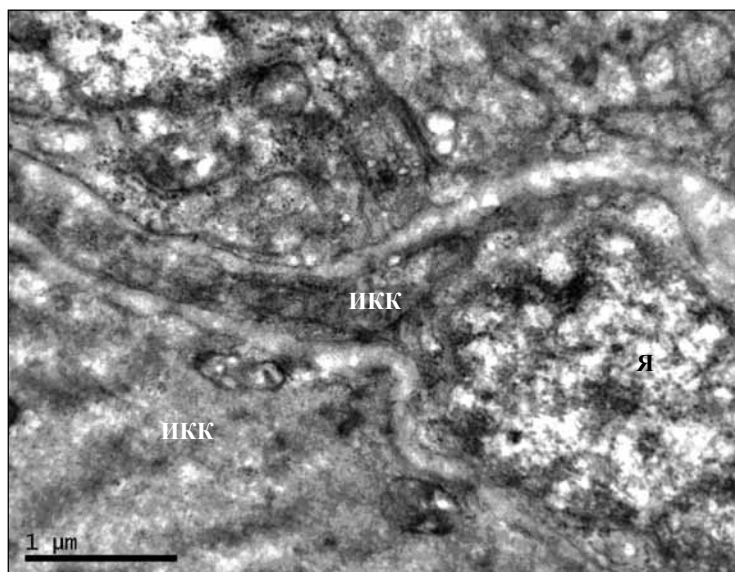


Рис. 7. Фрагмент из прилежащего к подслизистой основе участка мышечной оболочки ободочной кишки мыши, получавшей декстрансульфат в течение 7 суток. ГМ – гладкий миоцит, ИКК – интерстициальная клетка Кахаля, Я – ядро ИКК

выявлены также в безмиелиновых нервных волокнах, осевые цилиндры которых содержали митохондрии с дисконплексированными кристами и частично просветленным матриксом.

Таким образом, модель острого язвенного колита по I. Okayasu et al. (1990) воспроизводится на мышах линии Balb/C с преимущественно Th2-типом иммунного ответа. Выявленные изменения поведенческих реакций, заключающиеся в снижении двигательной активности и уменьшении поедания корма, а также внешние признаки – диарея и примесь крови в фекалиях – соответствуют данным литературы [6]. Отмечались качественные и количественные нарушения микробного спектра толстой кишки у мышей линии Balb/C с острым язвенным колитом, которые приводят к формированию патогенного профиля микробиома.

N.A. Nagalingam (2011) показано, что нарушение целостности эпителиального барьера толстой кишки при воздействии бактериальных антигенов сопровождается мукозальной иммунологической реакцией с развитием хронического воспаления. У мышей линии Balb/C при остром язвенном колите нами выявлены нарушения микробиома и повреждение эпителиального барьера. На макроскопическом уровне обнаружены эрозии и очаговая гиперемия. Патоморфологические изменения в стенке ободочной кишки у мышей с острым язвенным колитом были мозаичными и варьировали от минимальных до выраженных. Полученные в работе результаты по воспроизводимости модели острого язвенного колита на мышах линии Balb/C согласуются с данными литературы [4].

Патоморфологические изменения слизистой оболочки ободочной кишки характеризовались дистрофией каемчатых энтероцитов, десквамацией клеток эпителиального пласта, гиперсекрецией бокаловидных клеток. Также были выявлены очаговые эрозии. В собственной пластинке слизистой оболочки

обнаружены отек и воспалительная инфильтрация лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами. Патоморфологические изменения подслизистого слоя стенки ободочной кишки мышей, получавших DSS, характеризовались отеком, воспалительной инфильтрацией лимфоцитами, гистиоцитами и нейтрофилами разной степени выраженности. Лимфатические сосуды имели расширенный просвет, кровеносные сосуды были полнокровны. Полученные данные соответствуют опубликованным в литературе [1, 4].

Микроскопическое исследование зон с максимальными выраженными патоморфологическими изменениями стенки ободочной кишки выявило изменения циркулярного слоя мышечной оболочки на участках, прилежащих к подслизистой основе; гладкие миоциты в этой области отличались от контроля светлой, зернистой цитоплазмой. При электронно-микроскопическом исследовании, предпринятом для более детальной оценки состояния структурных компонентов мышечной оболочки кишки, было установлено, что употребление DSS вызывает ультраструктурные изменения сократительных, пейсмейкерных (клетки Кахаля) и нервных образований. Эти изменения могут быть охарактеризованы как деструктивные с переходом в отдельных случаях в некробиотические; они отличаются мозаичностью, и их выраженность в определенной степени зависит от близости к слизистой оболочке. Полученные данные позволяют предположить, что при развитии острого язвенного колита на стадии выраженного воспаления и изъязвления слизистого и подслизистого слоев в мышечной оболочке толстой кишки происходят дегенеративные изменения, приводящие к нарушению ее перистальтической активности, снижению скорости продвижения содержимого по ободочной кишке и созданию благоприятных условий для развития и проникновения через нарушенный эпителиальный барьер персистирующих в кишке условно

патогенных и транзиторных патогенных микроорганизмов. Структурные изменения мышечной оболочки могут быть одним из звеньев в хронизации воспалительного процесса в толстой кишке.

Заключение

Таким образом, потребление 5–7% раствора декстрансульфата натрия приводит к качественному и количественному изменению микрофлоры толстой кишки и развитию язвенного колита у мышей Balb/C. При морфологическом исследовании в ободочной кишке выявляются единичные эрозии и язвы, воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки. В подслизистом слое резко выражены отек, диффузная воспалительная инфильтрация, расширение лимфатических и кровеносных сосудов. При электронно-микроскопическом исследовании в гладких миоцитах и интерстициальных клетках Кахала преимущественно циркулярного слоя мышечной оболочки обнаруживаются деструктивные изменения разной степени выраженности, в ряде случаев с переходом в некротические.

Литература

1. Friswell M., Campbell B., Rhodes J. The Role of Bacteria in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease // Gut and Liver. V. 4. N. 3. September 2010. P. 295–306.
2. Ghosh S., van Heel D., Playford R. J. Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? // Gut 2004;53:620–622.
3. Horino J., Fujimoto M., Terabe F., Serada S. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice // International Immunology. 2008. V. 20. N. 6. P. 753–762.
4. Kawada M., Arihiro A., Mizoguchi E. Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease // World J Gastroenterol 2007 November 14; 13(42): 5581–5593.
5. Kverka M., Rossmann P., Tlaskalova-Hogenova H. et al. Safety and efficacy of the immunosuppressive agent 6-thioguanine in murine model of acute and chronic colitis // BMC Gastroenterology 2011, 11:47.
6. Mizoguchi A., Mizoguchi E. Animal models of IBD: linkage to human disease // Curr Opin Pharmacol. 2010 October; 10(5): 578–587.
7. Nagalingam N.A., Kao J.Y., Young V.B. Microbial ecology of the murine gut associated with the development of DSS-colitis // Inflamm Bowel Dis. 2011 April; 17(4): 917–926.
8. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice // Gastroenterology 1990; 98: 694–702.
9. Packey C.D., Sartor R.B. Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases // Curr Opin Infect Dis. 2009 Jun;22(3):292–301.
10. Patwa L.G., Fan T.J., Tchaptchet S., Liu Y. et al. Chronic intestinal inflammation induces stress-response genes in commensal *Escherichia coli* // Gastroenterology. 2011 Nov;141(5):1842–51. e1–10.
11. Tsaprouni L.G., Ito K., Powell J.J., Ian M Adcock, Punchard N. Differential patterns of histone acetylation in inflammatory bowel diseases // J Inflamm 2011, 8:1–13.
12. Zhou F., Chen L., Liu X., Ouyang Ch. et al. *Lactobacillus crispatus* M206119 exacerbates murine DSS colitis by interfering with inflammatory responses // World J Gastroenterol 2012 May 21; 18(19): 2344–2356.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DEXTRAN SULFATE SODIUM INDUCED ACUTE ULCERATIVE COLITIS IN MICE BALB/C

S.O. Abdulaeva, S.O. Kirukhin, T.A. Belousova, T.I. Khomyakova, V.P. Chernikov, O.V. Makarova

Reported morphological manifestations of acute ulcerative colitis in mice mainly touch mucous disturbances; any alterations of a muscular layer of colon are not studied. The aim of the work was the investigation of histological and ultra structural changes of the colon wall as well as the estimation of microbiological state changes in Balb/C mice in acute dextran sulfate sodium induced ulcerative colitis.

It was shown that 5–7% solution of dextran sulfate sodium consumption induced quick quantitative and qualitative changes of gut microbiome, intestinal barrier dysfunction and bacteraemia. The morphological investigation reveal an acute erosive ulcerative colitis in all parts of the colon. Electron microscopy showed alterative changes of smooth myocytes and Kajal cells primarily in the circulatory muscular layer of the colon, with different degrees of manifestation in some cases up to a necrotic damage. The revealed changes in muscular layer of the colon lead to the disturbance of the gut motility, decrease casing content progress. All the above mentioned together with an epithelial linen damage promotes bacterial translocation of opportunistic and transient pathogen microbes.

Key words: morphology, dextran sulfate sodium, Balb/C mice, acute colitis, microbiome

Информация об авторах

Абдулаева С.О. – аспирант МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет.

Адрес: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Телефон 8 965 212-5332. E-mail: sabina347@mail.ru

Кирюхин С.О. – студент МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет.

Адрес: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. Телефон 8 903 762-9039. E-mail: exit__@inbox.ru

Белюсова Т.А. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 (499) 120-0555. E-mail: belousova@retinoids.ru

Хомякова Т.И. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон 8 917 505-4626. E-mail: tatkhom@yandex.ru

Черников В.П. – канд. мед. наук, заведующий лабораторией экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Тел.: 8 916 847-1156. E-mail: 1200555@mail.ru

Макарова О.В. – докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе НИИ морфологии человека РАМН, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления.

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

Материал поступил в редакцию 7 июля 2012 года.

© Коллектив авторов, 2012

УДК: 615.231:615.015.5:615.051.5

ВЕРИФИКАЦИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

*И.В. Арутюнян¹, А.В. Макаров^{1,4}, Т.Х. Фатхудинов^{1,2,4},
В.В. Глинкина², Д.В. Гольдштейн^{1,3,4}, Г.Б. Большакова¹*

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва

² ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

³ ФГБУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

⁴ ООО «Клиника регенеративной медицины РМ-клиник», Москва

В статье представлено подробное описание наиболее распространенных и целесообразных методов верификации хронической ишемии нижних конечностей при моделировании на лабораторных животных, продемонстрирована значимость гистологического исследования для оценки адекватности модели.

Ключевые слова: хроническая ишемия нижних конечностей, экспериментальная модель, методы верификации

Синдром хронической ишемии конечностей может быть проявлением целого ряда заболеваний, среди которых лидируют облитерирующий атеросклероз, диабетическая макроангиопатия, облитерирующий тромбангиит (болезнь Бюргера), болезнь Хортона, постэмболические и травматические окклюзии сосудов и т.д. Хроническое развитие артериальной недостаточности конечностей имеет несколько клинических стадий: асимптомное течение (незначительное изменение региональной гемодинамики), перемежающаяся хромота (стадия субкомпенсации) и критическая ишемия конечности (стадия декомпенсации). В возрастной группе старше 55 лет распространенность заболеваний периферических артерий может достигать 20%, при этом у 1–2% пациентов заболевание выявляют на стадии критической ишемии. К концу первого года после верификации критической ишемии лишь у 45% пациентов есть шанс сохранить конечность, 30% пациентов выполняется успешная ампутация бедра или голени, 25% ожидает летальный исход [1].

Проблема комплексного лечения хронической ишемии нижних конечностей (ХИНК) является одной из приоритетных в современной ангиологии и сосудистой хирургии. Поиск новых методов лечения, в том числе с применением клеточных технологий, невозможен без использования адекватной модели ХИНК на лабораторных животных. Повреждения периферических сосудов удобнее изучать на крупных лабораторных животных (например, собаках), однако подавляющее большин-

ство исследований проводят на грызунах. При моделировании ишемии конечностей на мышах и крысах необходимо учитывать, что у них велика вариабельность сосудистого русла конечностей и значительно сильнее развиты механизмы компенсации повреждения кровотока [2, 7].

В зависимости от задач исследования возможно моделирование ХИНК на разных стадиях развития заболевания – от незначительных сдвигов гемодинамики до развития выраженных повреждений тканей. Описанные в современной литературе методики моделирования ишемии конечности можно разделить на 3 основные группы:

- лигирование или удаление участков питающих сосудов конечности на разных уровнях (брюшинной аорты, поверхностной эпигастральной артерии, общей подвздошной артерии, бедренной артерии и ее ветвей, подкожной артерии, в том числе комбинированное повреждение нескольких сосудов) [5, 6];
- наложение жгута или компрессионной манжеты на конечность без хирургического вмешательства [9, 11];
- ампутация/реплантация конечности животного с последующим наложением артериовенозных шунтов [4, 17].

Воспроизводимость подобных моделей недостаточно высока, так как на результаты могут оказывать влияние особенности кровеносного русла конкретного

животного, техническая сложность выполнения операции, случайное повреждение нервов и другие факторы. В итоге вместо хронической ишемии исследователь может получить картину ишемии без клинических проявлений или острой ишемии конечности с последующим восстановлением кровотока, а также некроза или воспаления. В то же время во многих современных работах не проводится достаточная верификация ХИНК при моделировании на животных, что может поставить под сомнение результаты всего исследования.

В Национальных рекомендациях по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией [1] рекомендуется использовать следующие методы исследования для постановки диагноза: измерение лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ), пальце-плечевого индекса (ППИ), сегментарного давления, запись пульсовой волны, дуплексное сканирование, доплерометрия, нагрузочные тесты. Эти методы могут быть дополнены компьютерно-томографической ангиографией, магнито-резонансной ангиографией и контрастной ангиографией.

Очевидно, что для небольших и мелких лабораторных животных проведение некоторых измерений невозможно (например, определение ЛПИ, ППИ) или сильно затруднено (в частности, при необходимости суперселективного позиционирования катетера, отсутствии соответствующего размеру животного оборудования). По нашему мнению, для верификации ХИНК при моделировании на лабораторных животных целесообразно применять следующие методы.

Неинвазивные методы:

- лазерная доплерометрия;
- нагрузочные тесты.

Инвазивные методы:

- измерение биохимических показателей крови;
- контрастная ангиография;
- сцинтиграфия.

Исследования после эвтаназии животного:

- использование Dye-Track® микросфер;
- исследование макропрепаратов мышц;
- гистологическое и морфометрическое исследование микропрепаратов.

Наиболее распространенным неинвазивным методом при исследовании ХИНК на животных является лазерная доплерометрия. В работах обычно представляют результаты цветного доплеровского картирования – ультразвуковой визуализации кровотока, основанной на регистрации скоростей движения крови, кодировании этих скоростей разными цветами и наложении полученной картины на двухмерное черно-белое изображение исследуемого объекта (рис. 1).

Помимо картирования доплерометрия позволяет определить количественные характеристики кровотока – среднюю скорость кровотока (может быть измерена в покое и при стимуляции папаверином), индекс резистентности, пульсационный индекс, систолическое диастолическое соотношение и т.д. При публикации

данных часто указывают не сами индексы, а их изменение относительно неишемизированной (контрольной) конечности. При моделировании ХИНК на кроликах средняя скорость кровотока уменьшается в 1,6 раза, отношение систолического давления ишемизированной конечности к систолическому давлению нормальной конечности составляет 0,34 [8], по другим данным оно не превышает 0,3 [16]. При этом через 30 дней после операции происходит постепенное восстановление кровотока, и индекс соотношения давления в поврежденной и контрольной конечностях возрастает до 0,64 [8].

Следует учитывать, что количественные измерения проводят в подавляющем большинстве случаев на достаточно крупных объектах (кроликах), а точность доплерометрии зависит от температуры окружающей среды, поэтому животных помещают на подогреваемый столик [18].

Другой неинвазивный метод исследования – тредмил-тест – не столь информативен, однако более удобен, так как не требует дополнительной наркотизации животного. При этом результаты достаточно точно отражают динамику прогрессирования или компенсации хронической ишемии конечностей. Чаще всего используют беговую дорожку (определяют общее время бега). Существует и более точный вариант теста, в котором с помощью прикрепленных к конечностям электродов определяют количество касаний ишемизированной и контрольной конечностей при 5-минутном беге по наклонной движущейся дорожке [5].

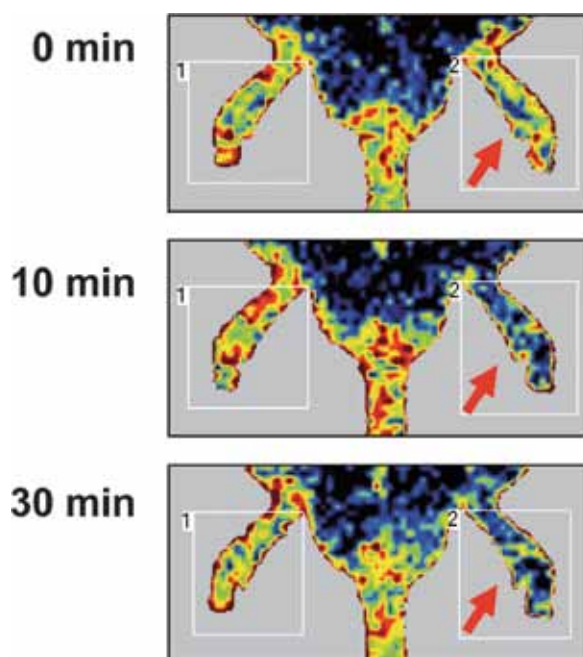


Рис. 1. Цветное доплеровское картирование через 0, 10 и 30 минут после моделирования ишемии конечности 2 (указана стрелкой) у крысы. Конечность 1 контрольная.

Красным цветом кодируется высокая скорость кровотока, синим – низкая. По Iwatsuki Y. et al., Biol. Pharm. Bull. (2007)

К группе инвазивных методов исследования относят измерения биохимических показателей крови животных. Для верификации хронической ишемии наиболее информативна оценка содержания в плазме крови изопростанов группы F_{22} , являющихся индикаторами уровня окислительного стресса. Измерения обычно проводят с использованием готовых наборов для иммуноферментного анализа. Динамику компенсации ишемии оценивают по содержанию в крови стабильных метаболитов оксида азота NO_2^- и NO_3^- , активирующих антиокислительные ферменты. Данное исследование проводят с помощью Greiss-теста [6].

Метод контрастной ангиографии, золотого стандарта для исследования патологии сосудов [1], основан на введении с помощью катетера контрастного материала для рентгенологической визуализации кровеносных сосудов. Высокое разрешение изображения можно получить только при использовании системы автоматизированного введения контрастного вещества, так как общий объем вводимой контрастной среды очень мал (не больше 2 мл на крысу). Как и в случае использования доплерометрии, часто сравнивают наполнение сосудов кровью в покое и при стимуляции папаверином (рис. 2) [15]. Метод контрастной ангиографии позволяет получить данные по притоку и оттоку крови, точно локализовать зону поражения, оценить компенсацию ишемии за счет формирования коллатералей. К существенным недостаткам метода следует отнести невозможность его многократного использования, потому что велика вероятность осложнений в силу токсического действия контраста или повреждения сосудов (атероземболии, расслоения и разрыва стенки сосуда).

Намного реже для исследования ишемии тканей используют сцинтиграфию – метод радионуклидной диагностики, основанный на введении тропного к костной ткани радиофармпрепарата (например, пирофосфата, медроната) и последующей регистрации в гамма-камере его накопления и распределения. В основе метода лежит оценка скорости накопления препарата, которая уменьшается при снижении интенсивности кровотока [3]. Данный метод не получил широкого распространения вследствие сложности работы с изотопами, однако полуколичественных данных достаточно для выбора модели ХИНК (рис. 3) [9].

Исследование местного кровотока в ткани проводят также с использованием Dye-Track® микросфер, специально разработанных для решения данной задачи на экспериментальных животных [12]. Полистироловые микросферы диаметром 15 мкм вводят в брюшную аорту за 30 секунд до эвтаназии животного, затем извлекают образцы тканей, экстрагируют микросферы и определяют их количество с помощью спектрофотометра (результаты нормируют на единицу веса мышцы). Полученные данные обычно представляют в виде процентного отношения оптических плотностей для ишемизированной и контрольной конечностей [13].

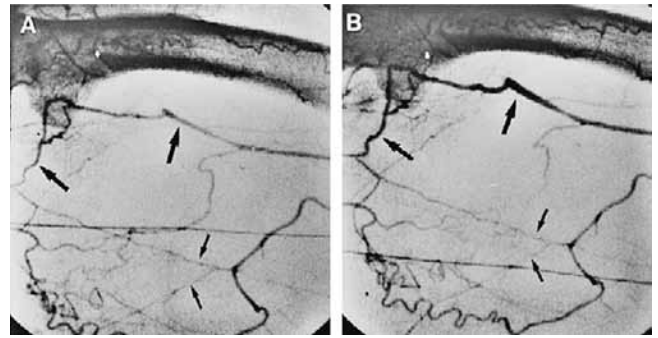


Рис. 2. Микроангиограмма ишемизированной задней конечности крысы (А – в покое, В – при стимуляции кровотока папаверином). Большими стрелками указано усиление кровотока в больших сосудах, маленькими стрелками – отсутствие изменений в сосудах диаметром меньше 100 мкм. По Takeshita S. et al., *Cardiovasc. Res.* (1997)

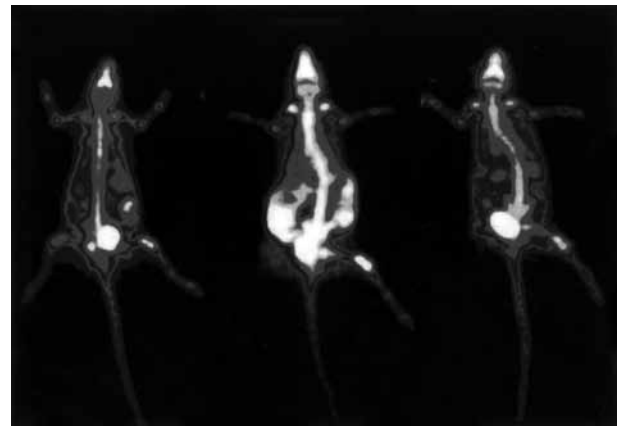


Рис. 3. Сцинтиграфическое изображение крыс через 3 часа после введения MDP. Представлены результаты трех вариантов моделирования хронической ишемии на одной из конечностей, вторая конечность (на сцинтиграмме справа) – контрольная. По Babuccu O. et al., *J. Reconstr. Microsurg.* (2004)

На наш взгляд, несмотря на удобство применения современных технологий, полную информацию о воспроизводимости и адекватности модели ХИНК можно получить только с помощью исследования макро- и микропрепаратов после эвтаназии животного.

Макропрепараты мышц после моделирования ишемии окрашивают синим Эванса – красителем, который прочно связывается с белками плазмы и распространяется по всему кровеносному руслу, не проникая при этом через стенку сосуда. По изменению интенсивности окрашивания синим Эванса можно судить о степени нарушения кровоснабжения ишемизированной мышцы. Кроме того, данный краситель удобно использовать для мониторинга остановки кровотока в процессе моделирования ХИНК с применением жгута. Непосредственно после наложения жгута вводят раствор синего Эванса (25 мг на 1 кг веса животного).

При полном пережатии сосудов индикатор не визуализируется, окрашивание кровеносного русла происходит только после снятия жгута [11].

Для верификации острой ишемии или некроза используют окрашивание макропрепаратов солями тетразолия, которые позволяют гистохимически определить активность дегидрогеназ. Во время инкубации изолированной мышцы с водным раствором 2,3,5-трифенилтетразолия (1 мг/мл) при температуре 37°C в ткани образуются нерастворимые кристаллы формазана красного цвета, за исключением участков с острой ишемией или некрозом, которые остаются неокрашенными (рис. 4) [19]. Использование солей тетразолия является рутинным способом выявления участков некроза. Однако имеются данные, что отсутствие окрашивания не обязательно говорит о некрозе и необратимой ишемии, а может свидетельствовать о наличии острой ишемии [20]. Использование 2,3,5-трифенилтетразолия удобно для быстрой оценки нарушения кровотока в мышце на этапе отработки модели.

Исследование микропрепаратов позволяет получить максимально точную информацию о процессах, происходящих в мышцах при использовании конкретной модели ХИНК, однако результаты гистологического, иммуногистохимического и морфометрического исследований недостаточно полно отражены в работах, посвященных данной тематике. В то же время продемонстрировать степень компенсации хронической ишемии, выявить наличие сопутствующих патологических процессов (кровоизлияние, воспаление, повреждение нервных волокон, гангрена) можно только гистологическими методами.

Для отработки экспериментальной модели нами было проведено пилотное исследование. ХИНК моделировали на половозрелых самцах аутбредных крыс Sprague-Dawley массой 180–200 г (n=18) путем лигирования и иссечения общей бедренной и подколенной артерий. Животных выводили из эксперимента на 7-е сутки после операции.

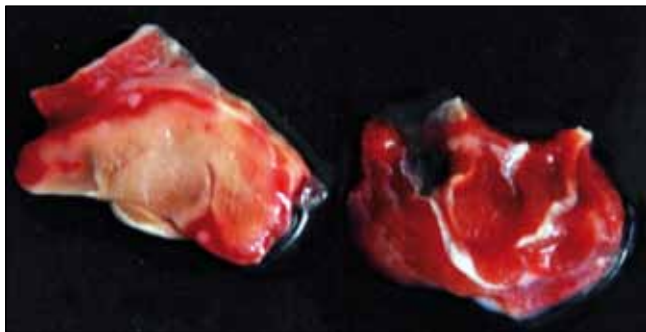


Рис. 4. Макропрепарат. Поперечный срез группы икроножных мышц крысы с моделированной хронической ишемией.

Окрашивание 2,3,5-трифенилтетразолием. На рисунке слева видны неокрашенные поврежденные участки мышцы.

На рисунке справа – контроль, мышечная ткань ярко-красного цвета

На макроскопическом уровне обращали на себя внимание уменьшение общего объема задней группы мышц голени и снижение массы икроножных мышц по сравнению со здоровой конечностью. При этом ни на поверхности, ни на поперечных срезах область повреждения без дополнительно окрашивания не визуализировалась.

Для изучения морфологических изменений, происходящих в мышце в условиях хронической ишемии, получали поперечные серийные срезы на 10 уровнях. Микропрепараты мышц окрашивали гематоксилином и эозином и по Маллори.

Повреждение имело очаговый характер и локализовалось на разных участках икроножных мышц. Выявляли зоны коагуляционного некроза с глыбчатым распадом мышечных волокон и выраженной лимфогистиоцитарной инфильтрацией по периферии (рис. 5). На 7-е сутки после повреждения большая часть некротизированных масс была замещена грануляционной тканью. На отдельных участках на ее месте отмечалось формирование грубого рубца (рис. 6).

В перифокальной области чередовались участки неповрежденной мышечной ткани и участки с атрофированными мышечными волокнами (рис. 7). Поврежденные волокна имели меньший диаметр при сравнении с нормальными миоцитами и располагались на значительном расстоянии друг от друга вследствие отека стромы (рис. 8). Отмечали лизис мышечных ядер и исчезновение поперечной исчерченности. В некоторых мышечных волокнах выявляли контрактуры.

В неповрежденной мышечной ткани диаметр мышечных волокон и толщина перимизия не изменялись, отека стромы не наблюдалось. Миосимпласты содержали большое количество ядер по периферии волокна.

Таким образом, характер морфологических изменений подтвердил соответствие выбранной нами экспе-

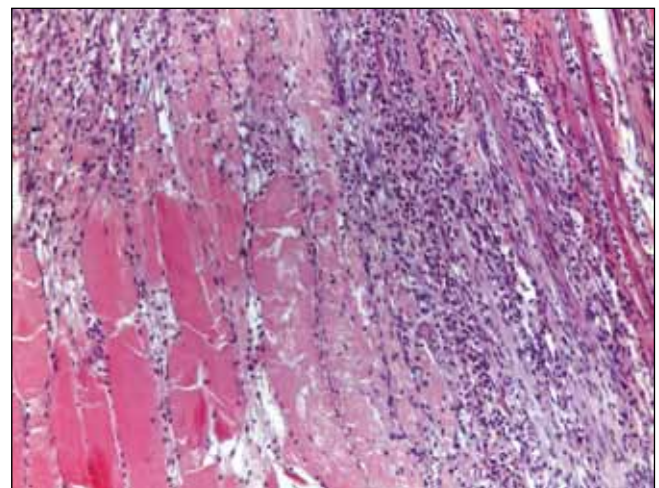


Рис. 5. Очаг повреждения представлен участками некроза, выраженной воспалительной инфильтрацией и грануляционной тканью. Окрашивание гематоксилином и эозином. × 100

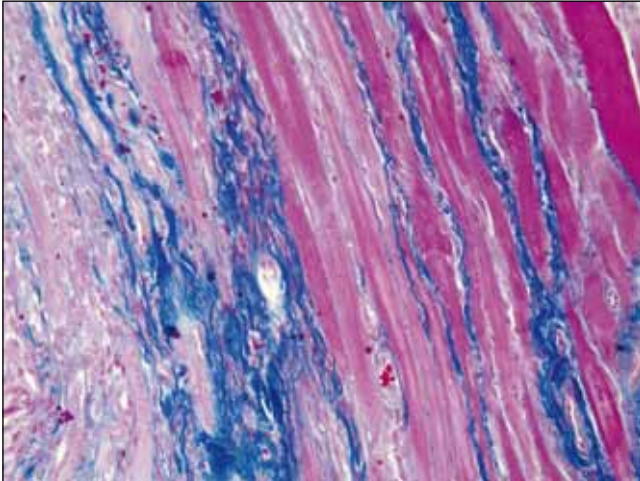


Рис. 6. Грануляционная ткань и коллагеновые волокна соединительнотканного каркаса в области повреждения. Окрашивание по Маллори. $\times 200$

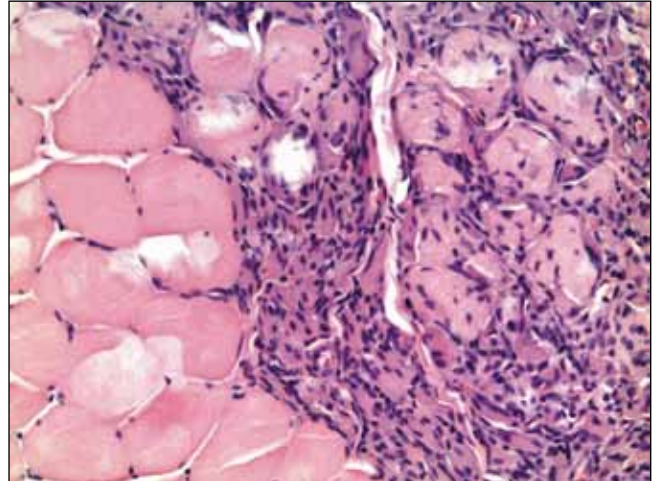


Рис. 7. Замещение некротизированных мышечных волокон грануляционной ткани с выраженной воспалительной инфильтрацией, фагоцитоз некротических масс. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

риментальной модели морфологической картине ишемического повреждения скелетных мышц на стадии декомпенсации (критической ишемии) в соответствии с классификацией по Рутерфорду [1].

Помимо качественной оценки морфологических изменений при ХИНК необходимо проводить морфометрическое исследование, которое позволяет количественно охарактеризовать степень ишемического повреждения ткани. Для максимально информативного гистологического исследования нами предложен следующий комплекс морфометрических показателей. В первую очередь на панорамных микрофотографиях нужно оценить площадь повреждения относительно всей площади поперечного среза икроножных мышц. Площадь некроза, грануляционной ткани и рубца следует соотносить с площадью всего повреждения. Большое значение имеют количественная характеристика воспалительного инфильтрата и подсчет отдельных клеточных типов в области повреждения. Для оценки степени гипо- и атрофии мышц необходимо оценить уменьшение размеров и количества отдельных волокон по сравнению с интактной мышечной тканью.

Важными характеристиками неоангиогенеза являются общее количество сосудов в поле зрения и их объемная плотность. При этом данные показатели целесообразно оценивать отдельно в грануляционной ткани, рубце, перифокальной и интактной областях. Для более точного подсчета может быть использовано дополнительное иммуногистохимическое окрашивание с антителами к маркеру эндотелиальных клеток CD31 [6].

На основе морфометрических данных можно строить предположения о процессах, происходящих в мышце при ишемическом повреждении. Так, было показано, что при моделировании ХИНК у молодых мышечных волокон остается неизменным, но почти вдвое уменьшается их диаметр,

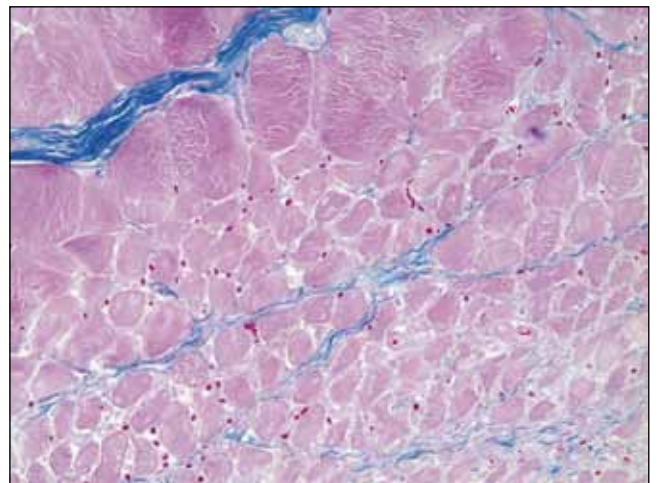


Рис. 8. Гипо- и атрофия мышечных волокон. Окрашивание по Маллори. $\times 200$

что свидетельствует об атрофии мышцы. У старых мышечных волокон, напротив, средний диаметр мышечного волокна остается прежним, однако число волокон снижается вдвое, при этом происходит активное разрастание соединительной ткани. Снижение кровотока, измеряемое с помощью доплерометрии, в ишемизированной конечности по сравнению с контрольной в обеих группах было одинаковым и составило около 80% [14]. Таким образом, гистологическое исследование позволяет обнаружить особенности развития патологических процессов в ишемизированной мышце, не выявляемые при помощи неинвазивных методов.

Подводя итоги, скажем, что многообразие существующих вариантов моделирования ХИНК на лабораторных животных дает исследователям возможность выбрать наиболее удобный для решения конкретной поставленной задачи. Моделируемая хроническая ишемия мышцы должна быть однозначно верифицирована

с использованием как минимум нескольких методов с обязательным проведением гистологического исследования.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по ГК № 16.512.11.2065 от 17 февраля 2011 года.

Литература

1. Национальные рекомендации по ведению пациентов с сосудистой артериальной патологией: Российский согласительный документ. Ч. 1. Периферические артерии. М.: Изд-во НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2010. 176 с.
2. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы (Лабораторные животные) / А.Д. Ноздрачев, Е.Л. Поляков. СПб.: Лань, 2001. 464 с.
3. Паша С.П., Терновой С.К. Радионуклидная диагностика / С.П. Паша, С.К. Терновой. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 208 с.
4. Acute lung injury following reperfusion after ischemia in the hind limbs of rats / Punch J. et al. // J Trauma. 1991. V. 31. N. 6. P. 760–5.
5. Assessment of gait dynamics in rats submitted to limb ischemia / Piccinato C.E. et al. // Acta Cir Bras. 2011. V. 26. N. 6. P. 490–5.
6. Beneficial effects of concurrent autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the mouse hindlimb / Napoli C. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. V. 102. N. 47. P. 17202–6.
7. Comparison of Six Methods for the Assessment of Ischemia-Reperfusion Injury in Skeletal Muscle following Composite Tissue Allotransplantation / Baumeister S.P. et al. // J Reconstr Microsurg. 2004. V. 20. N. 3. P. 253–9.
8. Direct Intramuscular Gene Transfer of Naked DNA Encoding Vascular Endothelial Growth Factor Augments Collateral Development and Tissue Perfusion / Tsurumi Y. et al. // Circulation. 1996. V. 94. P. 3281–90.
9. Evaluation by scintigraphy of hindlimb ischemia in a rat model / Babucco O. et al. // J Reconstr Microsurg. 2004. V. 20 N. 3. P. 405–10.
10. Experimental model of lower limb ischemia in rats and the effect of YM466, an oral direct factor Xa inhibitor / Iwatsuki Y. et al. // Biol Pharm Bull. 2007. V. 30. N. 10. P. 1874–7.
11. Hind limb ischemic preconditioning induces an anti-inflammatory response by remote organs in rats / Souza Filho M.V. et al. // Braz J Med Biol Res. 2009. V. 42. N. 10. P. 921–9.
12. <http://www.physiology.com/dyeuser.htm>
13. Improved angiogenic potency by implantation of ex vivo hypoxia prestimulated bone marrow cells in rats / Li T.S. et al. // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002. V. 283. N. 2. P. 468–73.
14. Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis / Westvik T.S. et al. // J Vasc Surg. 2009. V. 49. N. 2. P. 464–73.
15. Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats / Takeshita S. et al. // Cardiovasc Res. 1997. V. 35. N. 3. P. 547–52.
16. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia / Murohara T. et al. // J Clin Invest. 1998. V. 101. N. 11. P. 2567–78.
17. Sympathetic blockade of isolated rat hindlimbs by intra-arterial guanethidine: the effect on blood flow and arterial-venous shunting / McCarty M.E. et al. // Microsurgery. 1995. V. 16. N. 7. P. 476–81.
18. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease / Taniyama Y. et al. // Gene Ther. 2001. V. 8. N. 3. P. 181–9.
19. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide / Tran T. et al. // Eur J Pharmacol. 2011. V. 650. N. 1. P. 328–34.
20. Unpredictability of triphenyltetrazolium chloride in staining irreversible ischaemia-reperfusion injury in the skeletal muscle of rats / Cheng HT. et al. // Eur J Surg. 1996. V. 162. N. 5. P. 407–12.

VERIFICATION OF CHRONIC HIND LIMB ISCHEMIA IN EXPERIMENTAL MODELS

I.V. Arutyunyan, A.V. Makarov, T.H. Fathudinov, V. V. Glinkina, D.V. Goldstein, G.B. Bolshakova

The article describes in details the most commonly used and feasible verification methods of chronic hind limb ischemia in experimental models. The significance of histological examination is shown to assess the adequacy of the model.

Key words: chronic hind limb ischemia, experimental model, methods of verification

Информация об авторах

Арутюнян И.В. – научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Макаров А.В. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Фатхудинов Т.Х. – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Большакова Г.Б. – докт. биол. наук, заведующая лабораторией роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Материал поступил в редакцию 24 июля 2012 года.

© Коллектив авторов, 2012

УДК: 615.9:615.281:511.112.382-389

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕЧЕНИ МЫШЕЙ С КОНКАНАВАЛИН А-ИНДУЦИРОВАННЫМ ГЕПАТИТОМ ПРИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ ГЛИМУРИДА

С.С. Обернихин¹, Ж.Б. Понежева², Н.В. Яглова¹

¹ ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

² ФГБОУ ВПО «Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова», Нальчик

Изучены морфологические изменения печени мышей при введении различных доз иммуномодулятора глимурида одновременно с конканавалином А, вызывающим развитие гепатита. Установлено, что введение глимурида в дозе 0,2 мг/кг уменьшает выраженность альтеративных изменений в печени, а введение глимурида в дозе 1 мг/кг препятствует развитию некротических и дистрофических изменений при индукции гепатита, оказывая профилактическое действие.

Ключевые слова: гепатит, конканавалин А, глимурид, профилактика

Заболееваемость вирусным гепатитом в разных странах в последние десятилетия имеет тенденцию к росту [6, 9]. Вследствие этого особую значимость приобретает не только повышение эффективности медикаментозной терапии гепатита, но и профилактика у лиц, входящих в группу риска. Фармакологическими агентами, которые могут использоваться как для оптимизации схем лечения вирусных гепатитов, так и для их профилактики, являются иммуномодуляторы. В последние годы все большее распространение в медицинской практике получает иммуномодулятор глимурид – гликозидный дериват мурамилдипептида (β-гептилгликозид-МДП). Он создавался как средство, повышающее сопротивляемость организма к возникновению и развитию злокачественных опухолей. Дальнейшие исследования показали, что глимурид не только усиливает противоопухолевый иммунитет, но и существенно улучшает результаты комплексного лечения многих воспалительных заболеваний [1, 2]. Выявлена способность глимурида *in vivo* регулировать продукцию интерлейкинов – ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИЛ-12 и интерферона-γ [3]. На моделях *in vivo* доказано, что препарат модулирует клеточный и гуморальный иммунитет [4].

При этом если иммунологические аспекты действия глимурида изучены и изучаются до сих пор, морфологические исследования в данной области ограничены трудностью получения биопсийного материала у человека. В связи с этим среди экспериментальных

моделей наиболее часто применяется модель конканавалин А (Кон А)-индуцированного гепатита. Некоторые авторы придерживаются мнения, что вирусное повреждение печени имеет сходную природу с Кон А-индуцированным гепатитом и связано с активацией Т-лимфоцитов и последующим выбросом ими провоспалительных цитокинов [5].

Целью данной работы было изучение динамики морфологических изменений печени мышей линии Balb/c при Кон А-индуцированном гепатите при профилактическом введении глимурида.

Материалы и методы

В опытах были использованы 20 самцов мышей линии Balb/c массой тела 18–20 г (питомник «Столбовая»). Для моделирования гепатита мышам первой опытной группы (n=5) под эфирным наркозом внутривенно вводили Кон А в дозе 10 мг/кг массы тела в 200 мкл физиологического раствора. Мышам первой контрольной группы (n=5) вводили 200 мкл физиологического раствора. Животным второй контрольной группы (n=5) глимурид вводили в дозах 1 мг/кг, 0,2 мг/кг и 0,04 мг/кг. Второй опытной группе животных (n=5) вводили препарат в тех же дозах, что и в контрольной группе, за 2 часа до введения Кон А. Животных выводили из эксперимента на 3-и сутки после введения Кон А под эфирным наркозом методом цервикальной дислокации. Для морфологического исследования печень фиксировали в 10% растворе нейтрального

формалина, после стандартной гистологической обработки срезы окрашивали гематоксилином и эозином, проводили PAS-реакцию.

Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании печень мышей контрольной группы, которым вводили физиологический раствор, имела типичное строение. Гепатоциты – без дистрофических изменений, с высоким содержанием гликогена в цитоплазме. В просветах вен и синусоидных капилляров – небольшое количество эритроцитов.

При морфологическом исследовании в печени мышей, которым вводили Кон А в дозе 200 мкг, на 3-и сутки после введения определялись обширные очаги некроза с демаркационной зоной, в которой выявля-

лись нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты (рис. 1 А). Наблюдались выраженные дистрофические изменения гепатоцитов. Значительно снижалось содержание гликогена в гепатоцитах (рис. 1 Б). Отмечалось увеличение кровенаполнения синусоидных капилляров. В просветах части центральных вен долек, собирательных и междольковых вен выявлялись скопления лимфоцитов и отложения фибрина.

При введении Кон А в сочетании с глимуридом в дозе 0,04 мг/кг существенные изменения морфологических характеристик печени не выявлены. Наблюдались обширные очаги некроза, были выражены дистрофические изменения гепатоцитов. Количество гепатоцитов с PAS-положительными включениями в цитоплазме было значительно снижено.

При введении Кон А в сочетании с глимуридом в дозе 0,2 мг/кг отмечалась меньшая выраженность альтеративных изменений. В гистологических препаратах печени дольковое и балочное строение было сохранено. Выявлялись мелкие очаги некрозов (5–10 гепатоцитов) и выраженные дистрофические изменения гепатоцитов (рис. 2). Количество гепатоцитов с PAS-положительными включениями в цитоплазме оказалось выше, чем в группах мышей, которым вводили глимурид в дозе 0,02 и 0,04 мг/кг.

При введении Кон А в сочетании с глимуридом в дозе 1 мг/кг в печени некрозы не выявлены. Отмечались анизоцитоз гепатоцитов, дистрофические изменения незначительного количества гепатоцитов, увеличивалось число неэпителиальных клеточных элементов. Просветы центральных вен долек были свободны (рис. 3).

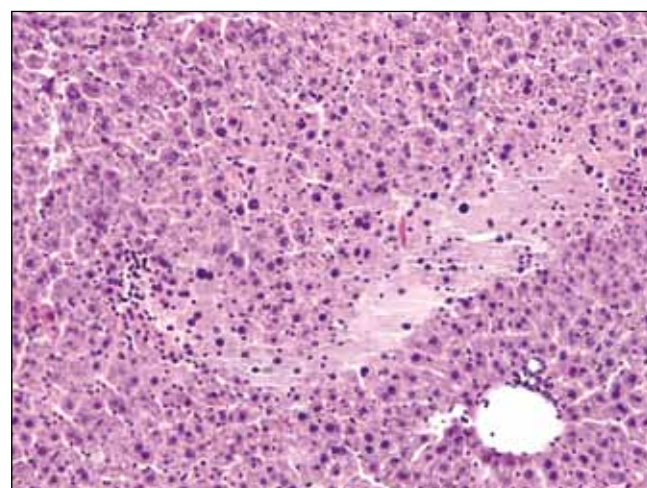
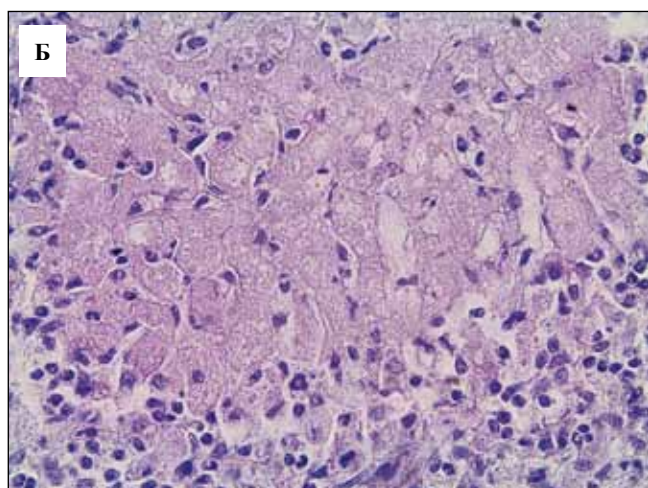
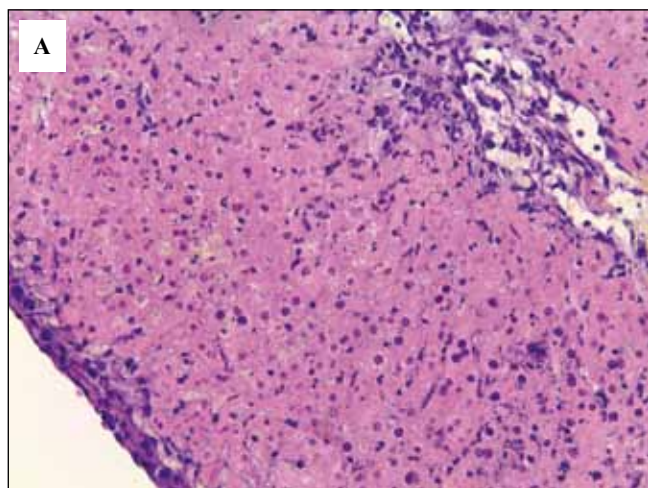


Рис. 1. Морфологические изменения печени мышей при конканавалин А-индуцированном гепатите.

А – обширный очаг некроза, выраженные дистрофические изменения гепатоцитов.

Окраска гематоксилином и эозином. × 100

Б – отсутствие гликогена в гепатоцитах. ШИК-реакция с докраской гематоксилином. × 400

Рис. 2. Морфологические изменения печени мышей при введении конканавалина А и глимуриды в дозе 0,2 мг/кг.

Мелкие очаги некрозов (5–10 гепатоцитов) и выраженные дистрофические изменения гепатоцитов.

Окраска гематоксилином и эозином. × 200

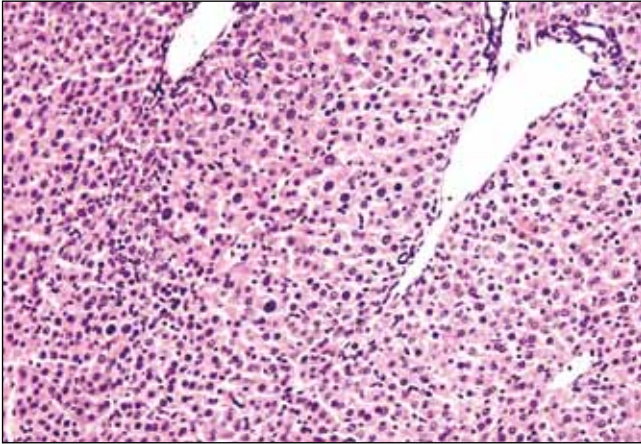


Рис. 3. Морфологические изменения печени мышей при введении конканавалина А и глимурид в дозе 1 мг/кг. Анизоцитоз гепатоцитов, дистрофические изменения незначительного количества гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. х 200

В печени мышей, которым вводили только глимурид, морфологическая картина не отличалась от таковой в контрольной группе животных.

Биологическая активность глимурид обусловлена наличием специфических рецепторов β -гептилгликозид-МДП, локализованных в эндоплазме фагоцитов и Т-лимфоцитов, связывание с которыми стимулирует активность фагоцитов и усиливает пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, что приводит к усилению выработки интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12), фактора некроза опухолей-альфа, интерферона- γ , колониестимулирующих факторов [8]. Механизмы лечебного и профилактического эффекта глимурид тесно связаны с патогенезом развития вирусного гепатита, при котором также наблюдается выброс большого количества цитокинов, что наряду с прямым повреждающим эффектом вируса значительно усугубляет патологический процесс. Показано, что активация CD4⁺ лимфоцитов приводит к альтеративным процессам в печени, в то время как активация субпопуляций CD8⁺ не оказывает существенного влияния [7]. В печени находится большое количество клеток, участвующих в иммунном ответе. Это лимфоциты, эндотелиальные клетки синусов, клетки Купфера и звездчатые клетки, гиперактивация которых приводит к повреждениям паренхимы печени [10]. В связи с этим глимурид может подавлять избыточную клеточную агрессию в отношении гепатоцитов.

По данным гистологического исследования через сутки после введения Кон А у мышей развивалась тяжелая форма гепатита с обширными некрозами гепатоцитов. У мышей, которым одновременно с Кон А вводили глимурид в дозе 0,04 мг/кг, морфологические изменения печени практически не отличались. Вве-

дение глимурид в дозе 0,2 мг/кг с Кон А приводило к снижению альтеративных изменений гепатоцитов. Проведенное морфологическое исследование показало, что при одновременном введении Кон А и глимурид выраженность патологических изменений в печени значительно ниже и имеет прямую зависимость от дозы глимурид. По результатам гистологического исследования печени мышей, которым Кон А вводили с глимуридом в дозе 1 мг/кг, гепатит не развивался.

Выводы

Выраженность альтеративных изменений печени мышей при развитии конканавалин А-индуцированного гепатита снижается при введении глимурид в дозе 0,2 мг/кг, то есть глимурид оказывает лечебное действие.

Глимурид в дозе 1 мг/кг предотвращает развитие некротических и дистрофических изменений при индукции гепатита, оказывая профилактическое действие.

Литература

1. Абидов М.Т. Иммуноterapia острых и хронических воспалительных заболеваний / М.Т. Абидов, О.В. Калюжин, М.В. Нелюбов // Terra Medica. 2001. № 2. С. 3–7.
2. Абидов М.Т. Новый отечественный иммуномодулирующий и противовоспалительный препарат / М.Т. Абидов, О.В. Калюжин, Т.И. Гришина // Военно-медицинский журнал. 1999. № 1. С. 41–45.
3. Влияние глимурид на продукцию цитокинов спленocyтaми мышей C57BL/6 и BALB/c / Л.П. Михайлова и др. // Иммунология. 2004. Т. 25. № 3. С. 152–154.
4. Стимуляция неспецифической резистентности мышей β -гептилгликозид-мурамилдипептидом / О.В. Калюжин и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999. № 5. С. 543–545.
5. A recombinant adenovirus encoding hepatitis C virus core and E1 proteins protects mice against cytokine-induced liver damage / J. Lasarte et al. // Hepatology. 2003. V. 37. N. 2. P. 461–70.
6. Averbhoff F. Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare providers in the United States / F. Averbhoff, N. Glass, D. Holtzman // Clin. Infect. Dis. 2012. V. 55. Suppl. 1. S10–S15.
7. Carambia A. CD4 T cells in hepatic immune tolerance / A. Carambia, J. Herkel // J. Autoimmun. 2010. V. 34. N. 1. P. 23–8.
8. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis / H.-X. Wang et al. // World J. Gastroenterol. 2012. V. 18. N. 2. P. 119–25.
9. Prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta virus in pregnant women and in patients in Mauritania / W. Mansour et al. // J. Med. Virol. 2012. V. 84. N. 8. P. 1186–98.
10. Zheng Z. Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration / Z. Zheng, S. Weng, Y. Yu // World J. Gastroenterol. 2009. V. 15. P. 5776–83.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN MURINE LIVER WITH CONCAVALIN A-INDUCED HEPATITIS AFTER PREVENTIVE ADMINISTRATION OF GLYMURIDE

S.S. Obernikhin, Zh.B. Ponezheva, N.V. Yaglova

Changes in murine liver morphology after administration of different doses of glymuride prior to concanavalin A were studied. Single administration of glymuride 0.2mg/kg bw significantly reduced concanavalin A-induced liver injury. Injection of glymuride 1 mg/kg bw prevented necrosis and dystrophia of hepatocytes. Thus, our data shows that glymuride pretreatment protects mice from concanavalin A-induced hepatitis.

Key words: hepatitis, concanavalin A, glymuride, prevention

Информация об авторах

Обернихин Сергей Станиславович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунопатологии и биотехнологии НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон (499) 129-5301. E-mail: ober@mail.ru

Понежева Жанна Бетовна – докт. мед. наук, доцент кафедры инфекционных болезней Кабардино-Балкарского государственного университета им. Х.М. Бербекова.

Адрес: 360004, Кабардино-Балкарская Республика, Нальчик, ул. Чернышевского, д. 173.

Яглова Наталья Валентиновна – докт. мед. наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3.

Материал поступил в редакцию 20 июля 2012 года.

ВЫДЕЛЕНИЕ КУЛЬТУРЫ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА КРЫСЫ МЕТОДОМ ЭКСПЛАНТОВ

*И.В. Арутюнян¹, А.В. Макаров^{1,4}, Т.Х. Фатхудинов^{1,2,4},
А.В. Ельчанинов^{1,2}, Д.В. Гольдштейн^{1,3,4}, Г.Б. Большакова¹*

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва

² ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

³ ФГБУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

⁴ ООО «Клиника регенеративной медицины РМ-клиник», Москва

В статье описано получения первичной культуры мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика крыс методом эксплантов, показаны преимущества данного метода (простота и высокая эффективность).

Ключевые слова: мультипотентные стромальные клетки пупочного канатика, крыса, метод эксплантов

Пупочный канатик в качестве источника мультипотентных стромальных клеток (МСК) был открыт относительно недавно, однако уже сейчас можно говорить о том, что активное исследование данной клеточной популяции является одним из наиболее перспективных путей развития современной клеточной трансплантологии [2]. В настоящее время продемонстрирована возможность направленной дифференцировки МСК пупочного канатика в клеточные типы трех зародышевых листков в условиях *in vitro* и *in vivo* [2], показана стабильность кариотипа при длительном культивировании, ведутся клинические исследования безопасности и эффективности их трансплантации [1]. В то же время до сих пор не существует общепринятого протокола выделения первичной культуры стромальных клеток из пупочного канатика.

На первом этапе выделения исследователи обычно удаляют поверхностный эпителий, кровеносные сосуды (их число у разных животных варьирует) и периваскулярную строму. Сами МСК выделяют из интерваскулярной стромы – вартонова студня, представленного фибробластоподобными клетками, заключенными в аморфный богатый протеогликанами матрикс. В вартоновом студне отсутствуют капилляры и лимфатические сосуды, он фактически выполняет функцию адвентиции пупочных сосудов [2].

Наиболее распространенным методом изоляции клеток из стромы пупочного канатика является ферментативная обработка. Предварительно измельченную ткань инкубируют при температуре +37°C с раствором ферментов – коллагеназы I или II типа, ги-

луронидазы, трипсина (иногда в сочетании с ЭДТА), ДНКазы, а также их различных комбинаций [2, 3]. Время обработки может колебаться от 30 минут [8] до 6 часов [10], 16 [13] и даже 18 часов [14]. В некоторых работах после инкубации ткань дополнительно обрабатывают с помощью гомогенизатора [8]. На следующем этапе взвесь клеток пропускают через фильтры, постепенно уменьшая диаметр пор от 100 до 70 или 40 мкм [2, 8], отмывают от ферментов, подсчитывают и переносят в культуральную среду. Как видно, данная методика является достаточно трудоемкой и требует значительных временных и материальных затрат. Более того, эффективность выделения первичной культуры ферментативным методом не всегда высока (некоторые исследователи связывают это с возможным повреждением мембран клеток [3]) и может в значительной степени зависеть от выбора концентрации ферментов и продолжительности инкубации [2, 3].

Значительно менее распространен метод эксплантов, который основан на пластик-адгезивных свойствах МСК [4]. При использовании данного метода небольшие фрагменты ткани (экспланты) помещают в культуральную посуду, минуя стадию ферментативной обработки. Через некоторое время из ткани начинают мигрировать клетки, имеющие высокое сродство к подложке. Данный метод был успешно применен для выделения МСК из пупочных канатиков человека [5, 9, 11, 12], свиньи [7, 12], козы [6]. По разным данным, эффективность выделения первичной культуры этим методом колеблется от 25% [8] до 100% [1, 5], а время

прикрепления клеток к культуральному пластику составляет от 5 до 10 суток [5, 9, 11].

Пупочный канатик у крысы значительно меньше, чем у крупных млекопитающих: его длина составляет всего 5–6 см, а толщина не превышает 3 мм. Значительную его часть занимают пупочные сосуды, однако их удаление затруднено низкими ригидными свойствами самого канатика. В итоге при выделении первичной культуры МСК пупочного канатика крыс методом ферментативной обработки исследователи либо обрабатывают пупочный канатик целиком (при этом первичная культура является высокогетерогенной), либо выделяют очень небольшое количество клеток из очищенного материала.

В настоящей работе проведена оценка эффективности метода эксплантов для выделения первичной культуры стромальных клеток пупочного канатика крыс и подтверждено наличие в полученных культурах популяций мультипотентных стромальных клеток.

Материалы и методы

Пупочные канатики ($n=12$) были получены от беременных крыс линии Wistar ($n=4$) путем оперативного вмешательства (кесарева сечения) на поздних сроках гестации. Материал промывали стерильным раствором Хэнкса («ПанЭко») с амикацином («Синтез») (500 мг/л), максимально тщательно удаляли кровеносные сосуды и отмывали от крови. Далее стромальную ткань нарезают на небольшие фрагменты объемом 0,5–2 мм³ и помещали в культуральную посуду (NUNC) с небольшим количеством ростовой среды (DMEM/F12 («ПанЭко»), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА Lab.), 2 mM L-глутамина («ПанЭко»), 1% пенициллина-стрептомицина («ПанЭко»). Посуду с эксплантами помещали в CO₂-инкубатор при стандартных условиях (5% CO₂, 37°C). По мере необходимости добавляли свежую среду. По достижении субконфлюэнтного монослоя клетки снимали стандартным способом трипсином на основе раствора Версена («ПанЭко») и рассаживали в новую культуральную посуду.

Для оценки клоногенных свойств МСК пупочного канатика крыс клетки на 2–3-м пассаже рассаживали на 90-миллиметровые чашки Петри из расчета 3 тысячи клеток на 1 чашку (около 50 клеток на 1 см²). Через 12–14 дней образовавшиеся колонии фиксировали 4% нейтральным формалином и окрашивали гематоксилином и эозином. При подсчете учитывали колонии диаметром не меньше 2 мм. Коэффициент клоногенности вычисляли, нормируя общее количество колоний на начальное количество клеток в чашке Петри, результат выражали в процентах.

Для оценки пластичности полученных культур МСК пупочного канатика крыс использовали клетки 2–4-го пассажа. По достижении клетками конфлюэнтного монослоя ростовую среду заменяли на дифференцировочную. В работе использовали готовые наборы StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit, StemPro® Osteogenesis

Differentiation Kit, StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco) в соответствии с рекомендациями производителя. Для выявления адипогенеза клетки фиксировали спирт-формалином (1:4) не более 3 минут и окрашивали раствором Судана III в течение 10 минут. Для выявления очагов минерализации индуцированные в остеогенном направлении клетки фиксировали 70° спиртом и окрашивали 40 mM ализариновым красным (pH=4,7) в течение 5 минут. Для визуализации хондрогенной дифференцировки клетки фиксировали 4% формалином (не менее 1 часа) и окрашивали скопления мукополисахаридов 1% раствором альцианового синего (pH=2,5) в течение 24 часов.

Результаты и обсуждение

После удаления кровеносных сосудов и периваскулярной ткани из пупочного канатика крысы оставалось совсем небольшое количество ткани (Вартонова студня), достаточное, однако, для получения как минимум 6–8 эксплантов. Активную миграцию клеток из фрагментов ткани наблюдали уже на следующие сутки после прикрепления эксплантов к пластику. Клетки имели форму, характерную для поляризованного фибробласта с ярко выраженным активным (движущимся) краем (рис. 1). Открепление эксплантов от подложки происходило на 5–7-е сутки культивирования. К 8–10-м суткам уже происходило формирование клеточных колоний до 1–2 см в диаметре. Клетки в них имели сходную морфологию: небольшой размер (до 80 мкм), фибробластоподобная форма, центрально расположенное округлое ядро с четко визуализируемыми ядрышками, слабо выраженная зернистость цитоплазмы. Разрастание колоний происходило за счет не только миграции клеток из эксплантов, но и митотического деления прикрепившихся клеток, которое наблюдали уже на 3–4-е сутки культивирования. В сформировавшихся

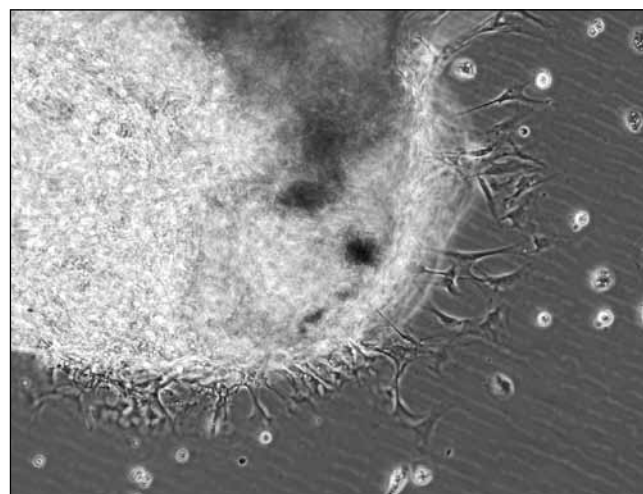


Рис. 1. Миграция клеток из экспланта пупочного канатика крысы через 24 часа после начала культивирования. ФК, $\times 100$

колониях также была отмечена высокая митотическая активность (рис. 2).

Из 12 пупочных канатиков крысы было успешно выделено 12 первичных культур стромальных клеток (коэффициент эффективности 100%). В отличие от других исследователей, работавших с пупочными канатиками человека, козы или свиньи, мы не отмечаем разделения первичной культуры на субпопуляции, отличающиеся по значению ядерно-цитоплазматического индекса, размеру и морфологии, или формирования клеточных скоплений на стадии конфлюентного монослоя [6, 7, 11, 12]. Кроме того, активное прикрепление клеток к пластику мы наблюдали значительно раньше, чем указано для эксплантов пупочных канатиков крупных млекопитающих (1-е сутки по сравнению с 5–10-ми сутками) [5, 9, 11]. Высокую скорость миграции клеток мы связываем в первую очередь со свойствами Вар-

тонова студня крысы, более рыхлого, чем у крупных плацентарных животных.

Оценку эффективности клонирования проводили на двух культурах МСК пупочного канатика на 2-м и 3-м пассажах. Между двумя культурами не было выявлено значимых отличий, из 3 тысяч клеток во всех случаях образовывалось около 200 колоний (рис. 3). Таким образом, эффективность клонообразования составила $6,9 \pm 0,8\%$ на 2-м пассаже и $6,3 \pm 0,9\%$ на 3-м.

Исследование мультипотентных свойств проводили на 2 культурах МСК пупочного канатика крысы. В качестве контроля использовали те же культуры без добавления дифференцировочных сред. Даже при длительном (более 4 недель) культивировании в высокой плотности мы не наблюдали спонтанной дифференцировки клеток (рис. 4А).

Уже через 5–7 суток после замены ростовой среды на адипогенную в культуре МСК пупочного канатика появлялись клетки с характерными фазово-контрастными включениями. На 10–14-е сутки индукции в культуре были отмечены зрелые адипоциты со слившимися вакуолями, сдвигающими ядро к периферии. Характерно, что множественные липидные включения всегда формировались в перинуклеарной области, постепенно увеличивались в размерах, но никогда не образовывали единичных огромных включений (рис. 4Б).

При замене ростовой среды на остеогенную происходили заметные изменения в морфологии МСК: исчезала характерная упорядоченность распределения клеток, которые при этом становились более крупными и отростчатыми. На 10–14-е сутки индукции появлялись участки со специфической трехмерной структурой. На 21-е сутки окрашивание ализариновым красным выявляло в этих структурах очаги минерализации (рис. 4В).

При замене ростовой среды на хондрогенную происходило постепенное формирование плотных

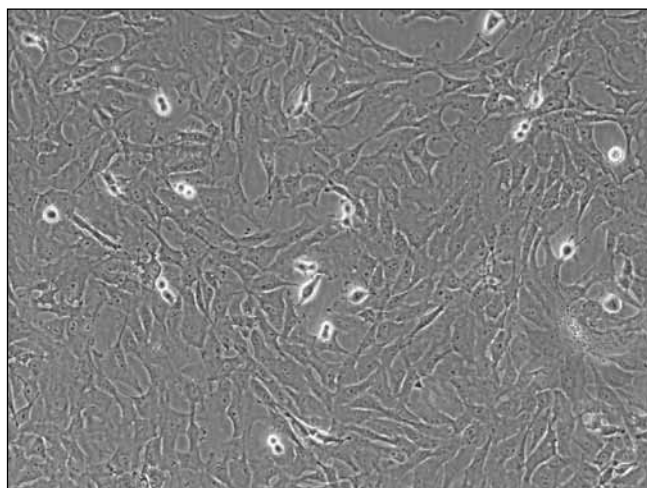


Рис. 2. Культура МСК пупочного канатика крысы на 10-е сутки культивирования. ФК, $\times 100$

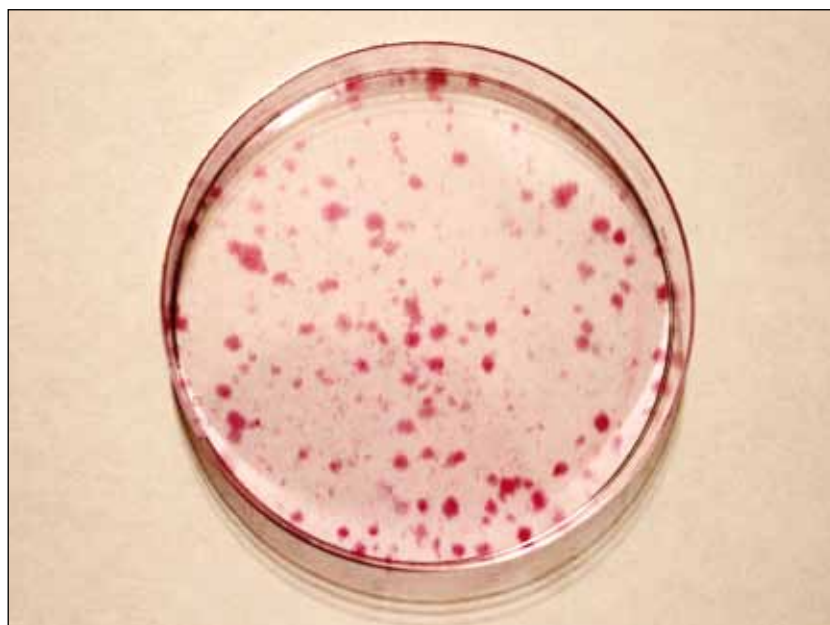


Рис. 3. Образование колоний клетками МСК пупочного канатика крысы на 2-м пассаже из низкой плотности. Окрашивание гематоксилином и эозином. Диаметр чашки Петри 90 мм

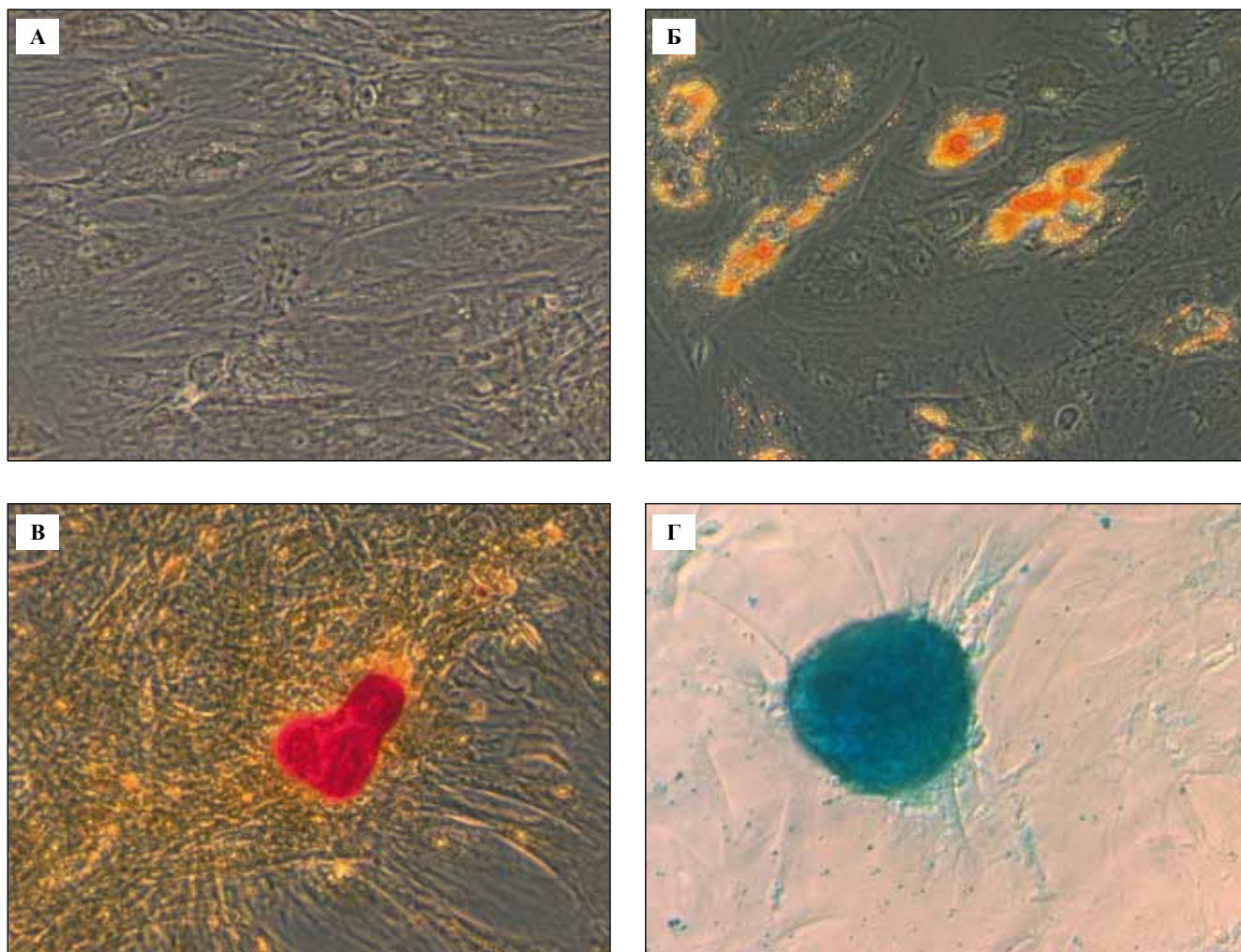


Рис. 4. Направленная дифференцировка МСК пупочного канатика крыс.

А – контроль. Б – адипогенная дифференцировка, 10-е сутки индукции, окрашивание Суданом III.

В – остеогенная дифференцировка, 21-е сутки индукции, окрашивание ализариновым красным (pH=4,7).

Г – хондрогенная дифференцировка, 21-е сутки индукции, окрашивание альциановым синим (pH=2,5). ФК, × 200

групп клеток, округлой или, реже, вытянутой формы. С 16–20-х суток эти группы клеток начинали секретировать во внеклеточный матрикс мукополисахариды, выявляемые окрашиванием альциановым синим (рис. 4Г).

Таким образом, была подтверждена способность полученных культур МСК пупочного канатика крыс отвечать на действие направленной индукции в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.

Заключение

Метод эксплантов является, на наш взгляд, оптимальным для выделения первичной культуры мультипотентных стромальных клеток пупочного канатика крыс и, возможно, других мелких лабораторных животных. Данный метод прост и позволяет получить достаточно однородную культуру клеток в короткие сроки со 100% эффективностью даже из очень небольшого объема исходного материала. Проведенное исследование показало способность выделенных культур образовывать колонии фибробластоподоб-

ных клеток из низкой плотности и возможность направленной дифференцировки клеток в нескольких направлениях.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по ГК № 16.512.11.2065 от 17 февраля 2011 года.

Литература

1. Bieback K. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy / Bieback K, Brinkmann I. // World J Stem Cells. 2010. V. 2. N. 4. P. 81–92.
2. Can A. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. / Can A, Karahuseynoglu S. // Stem Cells. 2007. V. 25. N. 11. P. 2886–95.
3. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly /

- Salehinejad P. et al. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2012. V. 48. N. 2. P. 75–83.
4. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells / Parolini O. et al. // *Stem Cells.* 2008. V. 26. N. 2. P. 300–11.
 5. Effectiveness of protocol for the isolation of Wharton's Jelly stem cells in large-scale applications / Petsa A. et al. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2009. V. 45. N. 10. P. 573–6.
 6. Effects of transplanted mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of caprine umbilical cord on cutaneous wound healing: histopathological evaluation / Azari O. et al. // *Vet Res Commun.* 2011. V. 35. N. 4. P. 211–22.
 7. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells / Carlin R. et al. // *Reprod Biol Endocrinol.* 2006. V. 4. N. 8. doi: 10.1186/1477-7827-4-8.
 8. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method / Tong C.K. et al. // *Cell Biol Int.* 2011. V. 35. N. 3. P. 221–6.
 9. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord / Majore I. et al. // *Stem Cell Rev.* 2011. V. 7. N. 1. P. 17–31.
 10. Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells / Zeng H.L. et al. // *BMC Cell Biol.* 2011 V. 9. N. 12. P. 32.
 11. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord / Majore I. et al. // *Cell Commun Signal.* 2009. V. 7. N. 6. doi: 10.1186/1478-811X-7-6.
 12. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia / Mitchell K.E. et al. // *Stem Cells.* 2003. V. 21. N. 1. P. 50–60.
 13. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord / Wang H.S. et al. // *Stem Cells.* 2004. V. 22. N. 7. P. 1330–7.
 14. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord / Yang C.C. et al. // *PLoS One.* 2008. V. 3 N. 10. P. 33–6.

ISOLATION OF MULTIPOTENT STROMAL CELLS FROM RAT UMBILICAL CORD USING AN EXPLANTS METHOD

I.V. Arutyunyan, A.V. Makarov, T.H. Fathudinov, A.V. Elchaninov, D.V. Goldstein, G.B. Bolshakova

The paper presents a description of the preparation of the primary culture of multipotent stromal cells of the umbilical cord of rats by the explant, the advantages of this method (the simplicity and high efficiency).

Key words: umbilical cord-derived multipotent stromal cells, rat, explants method

Информация об авторах

Арутюнян И.В. – научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Макаров А.В. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Фатхудинов Т.Х. – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Большакова Г.Б. – докт. биол. наук, заведующая лабораторией роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.
E-mail: morfolhum@mail.ru

Материал поступил в редакцию 13 августа 2012 года.

ПРОБЛЕМА МЕТАПЛАЗИИ ЭПИТЕЛИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА В ИСТОРИЧЕСКОМ АСПЕКТЕ: ОТ ВЗГЛЯДОВ КУПФЕРА И ВИРХОВА ДО СОВРЕМЕННОСТИ

С.В. Вернигородский

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова

На основе анализа литературы и результатов собственных наблюдений показано формирование взглядов на проблему метаплазии слизистой оболочки желудка в историческом аспекте – от трудов Купфера и Вирхова до современности.

Ключевые слова: метаплазия, слизистая оболочка желудка, история вопроса, современный взгляд

Одним из проявлений тканевой изменчивости в условиях патологии является метаплазия. При изучении явлений метаплазии обсуждению подвергаются не только границы возможных превращений той или иной ткани, но и сущность самого феномена, а также причины, его вызывающие.

Проблема метаплазии традиционно рассматривается как пограничная между биологией и патологией, поскольку сам феномен связан, с одной стороны, с изменчивостью тканей, а с другой – с предраковым процессом. Несмотря на большое число работ о предраковых изменениях, участие метаплазии в возникновении рака остается до конца не выясненным. Значительно меньше освещена эта проблема с общебиологической точки зрения, что обусловлено некоторым отрывом патологической морфологии от биологии.

В патологической анатомии термином «метаплазия» называют переход одной ткани в другую в пределах одного зародышевого листка вследствие нарушения дифференцировки стволовых клеток [8, 11], патологический процесс, при котором одна вполне дифференцированная ткань замещается другой вполне дифференцированной тканью в пределах одного гистiotипа [6]. Различают метаплазию эпителиальных тканей, соединительнотканых производных и так называемую миелоидную. Нервным и мышечным тканям метаплазия не свойственна.

В практическом отношении наиболее важной является метаплазия эпителиальных тканей. Именно с ней связано представление о метаплазии как предраковом состоянии. Дело в том, что в эпителии принято различать два противоположных свойства – детерминацию и пластичность. Благодаря детерминации тканям свой-

ственно сохранение своей специфической структуры после повреждения. Пластичность обеспечивает возможность различных преобразований. Детерминация и пластичность являются проявлениями наследственности. Консерватизм наследственности обуславливает тканевую детерминацию, изменчивость наследственности – тканевую пластичность. При оценке консерватизма наследственности ткани необходимо учитывать время появления ее в филогенезе. Чем ткань детерминированнее, тем она менее пластична, и наоборот. Филогенетически наиболее древними являются эпителии кожи и кишечника. Их производные, в частности образованные из них железы, моложе. Морфогенетические потенции тканей, а следовательно, и границы метаплазии зависят как от консерватизма наследственности и филогенетической древности ткани, так и от различных видов патологии развития, с разной силой расшатывающих этот консерватизм.

Морфологическое исследование имеет решающее значение в изучении границ метаплазии и объема предполагаемых тканевых преобразований, но именно здесь толкование феномена оказывается сложным и запутанным. Если проследить историю изучения метаплазии как общебиологического понятия, можно отметить противоречивость мнений исследователей: от признания самых широких межтканевых преобразований до почти полного отрицания метаплазии.

Впервые метаплазия слизистой оболочки желудка (СОЖ) упоминается Купфером в 1883 году [28]. В 1884 году Вирхов ввел это понятие в медицинскую практику [42]. Как считал Вирхов, метаплазия есть изменение характера ткани при сохранности ее клеток. Он не разграничивал метаплазию, эмбриональные диф-

ференцировки и изменчивость. Также Вирхов выделял прямую метаплазию, возникающую без размножения клеток, и косвенную, связанную с пролиферацией.

Начиная с работ Вирхова и Купфера до настоящего времени относительно морфогенетических потенций эпителиальных тканей позвоночных животных и человека было высказано много различных мнений. В.П. Михайлов [5] выделял четыре основные точки зрения исследователей на метаплазию:

- первая определяет границы метаплазии достаточно широко, признавая не только возможность разных изменений внутри эпителиальных тканей, но и превращение соединительной ткани в эпителий и наоборот;
- вторая, самая распространенная точка зрения, делает широкие преобразования внутри эпителиальных тканей, но отрицает вероятность трансформации эпителия в соединительную ткань или соединительной ткани в эпителий;
- третья признает возможность преобразования эпителиев только внутри отдельных гистогенетических групп, отрицая переход одного типа эпителия в другой, например энтодермального в эктодермальный;
- четвертая вообще отрицает существование метаплазии и объясняет все случаи трансформации тканей (примеры метаплазии) развитием обособленных эмбриональных зачатков, гетероплазией, прозоплазией.

Разнообразие приведенных взглядов свидетельствует о том, что вопрос о границах метаплазии не может быть решен путем патогистологического исследования. Для решения проблемы необходимо использовать концепции общепатологического порядка [4].

Еще в 1883 году Купфером впервые была высказана гипотеза о гетеротопическом происхождении кишечного эпителия в желудке, которая долгое время поддерживалась отдельными авторами. Состояла она в том, что метаплазированный эпителий желудка еще до рождения может быть сформирован как интестинальный или иметь вид недифференцированных клеток, детерминированных таким образом, что в дальнейшем они дифференцируются в кишечный эпителий. При различных заболеваниях гетеротопические элементы могут размножаться или дифференцироваться и замещать СОЖ. Эта гипотеза подтверждалась рядом эмбриологических и электронномикроскопических исследований. Так, P. Salenius et al. [35], W. Rubin et al. [36] постоянно находили кишечный эпителий в человеческих желудках (особенно часто в пилорическом и кардиальном отделах). По их данным, кишечный эпителий сохраняется у плода до момента рождения.

Эти исследования опровергаются наблюдениями Ю.М. Лазовского и И.В. Василенко [7]. Так, по данным И.В. Василенко и соавт., которые изучили 1200 детских гастробиоптатов, ячейки кишечного эпителия были обнаружены лишь у трех человек во фрагментах СОЖ,

полученных из зоны пилорической складки, что свидетельствует в пользу метапластического происхождения этих очагов.

Определение метаплазии Орта [34]: «метаплазия есть превращение одной достаточно характерной ткани в другую, также вполне характерную ткань, которая отличается от первой морфологически и функционально», по сей день сохраняет содержание классического. Благодаря ему удалось отделить от метаплазии ряд других, в определенной степени похожих процессов. Так, из понятия метаплазии были исключены нормальная эмбриональная дифференцировка и различные нарушения ее в виде дистопий и гетероплазий, а также гистологическая аккомодация, опухолевые изменения и различные незавершенные процессы дифференцировки, в результате которых возникают структуры, в дальнейшем подвергающиеся атрофии и гибели.

Существенное уточнение в определении метаплазии добавил Бенчини [13], понимавший метаплазию как превращение одной вполне дифференцированной ткани в другую, также хорошо дифференцированную, которая морфологически и функционально отличается от первой и не находится на пути нормального развития. Последняя часть определения вносит значимую поправку в известное определение Орта. Также Бенчини подчеркивал, что многочисленные изменения тканевой дифференцировки, которые относят, как правило, к метаплазии (новообразования хрящевой и костной тканей в необычном месте, «миелоидная метаплазия» при экстрамедуллярном миелопоэзе и другие), следует рассматривать как гиперплазии и дифференцировку тканей при гетеротопном и гетерохронном развитии. Наряду с метаплазией необходимо учитывать и явления дисплазии – изменения ткани, обусловленные снижением уровня дифференцировки, и прозоплазии – его повышением по сравнению с предыдущим уровнем.

Большинство авторов связывают появление кишечного эпителия в желудке с метаплазией [1, 2, 6]. Эта гипотеза подтверждается данными, полученными S. Ming et al. [31] находили клетки с тинкториальными свойствами обоих типов (желудочного и кишечного) эпителия. Они окрашивались и кармином Беста, и муцикармином, в них определялись как кислые, так и нейтральные мукополисахариды. Наличие этих «переходных» клеток является достаточно убедительным доказательством того, что кишечный эпителий в СОЖ – результат метаплазии.

Часто бокаловидные и абсорбтивные клетки, свойственные кишечному эпителию, встречаются на валиках и в верхних отделах желудочных ямок. При этом в серийных срезах СОЖ не проявляются элементы кишечных крипт, из которых могли бы возникнуть энтероциты. По мнению Д.С. Саркисова и Л.И. Аруина [8], источником кишечного эпителия в желудке являются те клетки, которые обеспечивают постоянное обновление желудочного эпителия. Следовательно, его ямочный

и метаплазированный эпителий образуется из одних и тех же камбиальных элементов, расположенных в глубине ямок и шеечных отделах желез желудка.

Таким образом, можно считать, что кишечная метаплазия (КМ) вызвана нарушением регенерации. В обычных условиях пластичность тканей ограничена их наследственными свойствами. Консерватизм наследственности определяет специфическую тканевую дифференциацию и ответствен за то, что из недифференцированных клеток образуется только желудочный эпителий. Нарушение регенерации с преобладанием фазы пролиферации над фазой дифференцировки до некоторой степени «раскачивает» наследственность, что приводит к замене «детерминации» на «пластичность» с расширением формообразующих потенциалов тканей. Следовательно, клетки герминативной зоны могут дифференцироваться в кишечный эпителий [1]. Причины подобного искаженного хода регенерации не выяснены, дискуссионным остается вопрос об отнесении ее к вариантам репаративной или физиологической.

С учетом возражения против вероятности развития прямой метаплазии утвердилось представление о метаплазии как об атипичической регенерации. Выделены даже этапы развития «регенерационной метаплазии», а именно: 1) упрощение строения клеток, 2) их размножения, 3) превращение в клетки другого вида. Превалирует мнение о том, что границы метаплазии зависят от потенциалов, которые сохранились в камбиальных клетках на момент регенерации. Было установлено, что искаженное направление регенерации обусловлено изменениями условий существования ткани и возникшая метаплазированная ткань является более приспособленной к этим новым условиям.

Если понимать под регенерацией восстановление формы и функции, то понятия «регенерация» и «метаплазия» несовместимы. И форма, и функция при метаплазии меняются. Если регенерацию сопровождает метаплазия, следует сделать вывод, что процесс не является физиологическим. Метаплазия выступает как индикатор патологического характера регенерационного процесса.

Общепризнанным является представление о метаплазии как о процессе, который в большинстве случаев возникает в пределах близкородственных тканей. Относительно ткани феномен метаплазии необходимо рассматривать как нарушение нормальной для данного места и времени ее дифференцировки в пределах филогенетически обусловленной тканевой специфичности. По отношению к клетке термин «метаплазия» вряд ли может быть применен [5].

В экспериментальных работах введение в СОЖ клеток эмбриональной кишечной мезенхимы приводило к формированию кишечных ворсинок и крипт [27]. В метаплазированных железах происходила реорганизация эпителия со смещением зоны пролиферативного компартмента от перешейка желез к их основанию и моди-

фикация стромальных клеток собственной пластинки слизистой оболочки с появлением фибробластов, окружающих измененные железы кишечного типа. Данные признаки свидетельствуют о том, что КМ – процесс образования целостной ткани с трансформированными свойствами, а не только нарушения дифференциации эпителия [14].

Видимо, правомерно говорить о клеточной предтерминации, понимая под этим изменения эпигенетической системы соматических клеток, вследствие чего происходит перепрограммирование их белкового синтеза, который определяет принадлежность к определенной ткани [5]. Эпигенетическими принято называть изменения активности различных групп генов, оставляющих нетронутым сам генетический материал (ДНК).

Регенерация эпителия СОЖ, как и любой другой ткани в организме человека, включает помимо пролиферации его детерминацию, дифференцировку и специализацию. Согласно современным взглядам, стволовая клетка полипотентна, ее развитие однозначно еще не детерминировано. Тканевая детерминация, или достижение специфичности, которая является проявлением наследственности, реализуется в дочерних клетках. Механизм детерминации связан с репрессией (блокировкой) и дерепрессией (деблокированием) генов. Изменения активности генетического аппарата в процессе тканевой детерминации в дальнейшем реализуются в определенных линиях специфической дифференцировки. При этом детерминация тканевых свойств клеток осуществляется на уровне синтеза иРНК, в то время как дифференцировка происходит путем трансляции генетического кода с молекулы иРНК на специфические молекулы белка, который синтезируется.

Дифференцировка клеток представляет собой сложный процесс, при котором совершенствуются внутриклеточные структуры и функции клеток. На основе глубокого анализа литературы по клеточной дифференцировке, выполненного Д. Трумэнном [10], можно сделать вывод, что изменения и усовершенствования структуры и функции клеток при их дифференцировке возникают без изменений клеточного генома, но с активацией или репрессией различных групп генов (его составляющих).

На основе этих данных низкодифференцированные клетки генеративных зон являются пулом дочерних клеток стволового эпителиоцита слизистой. Они уже имеют направление в дифференцировке в соответствии с набором активированных и репрессированных генов. Последующая дифференцировка происходит благодаря редукции одних и развитию других внутриклеточных структур.

Изменение программы дифференцировки стволовой клетки СОЖ, расположенной в зоне перешейка желез, является пусковым механизмом метаплазии [26], но некоторые авторы придерживаются теории дедифференцирования, согласно которой зрелая клетка СОЖ – бокаловидная клетка – теряет признаки специализации

и становится похожей на стволовую клетку [23]. Также существует теория развития КМ из стволовых клеток костного мозга, которые с током крови попадают в СОЖ [23].

Восстановление плюрипотентности в дифференцированных клетках и связанные с этим процессы репрограммирования генома – актуальные проблемы современной биологии. Посвященные им исследования, кроме прикладных аспектов (получение иммуносовместимых клеток для трансплантологии), имеют также фундаментальное значение (регуляция активности генов, процессов индивидуального развития и т.д.). В течение нормального развития эмбриональные клетки при дифференциации теряют свою первоначальную плюрипотентность, в результате чего специализированные клетки лишены потенциала преобразования в другие типы клеток. Долгое время считалось, что потеря плюрипотентности необратима. Впрочем, в экспериментах на амфибиях и млекопитающих было показано, что ядра дифференцированных клеток, изъятых у взрослого животного, после пересадки в энуклеированные ооциты способны обеспечить развитие организма [41]. Полное репрограммирование ядра терминально дифференцированной соматической клетки также происходит при слиянии зрелой специализированной клетки с эмбриональной стволовой [32, 33]. Эти данные свидетельствуют о том, что ядра отдельных дифференцированных клеток могут быть репрограммированы цитоплазматическими факторами ооцита [10].

Феномен репрограммирования ядра зрелой соматической клетки интенсивно изучается в последнее время в связи с перспективой получения «пациент-специфических» плюрипотентных клеток, подобных эмбриональным стволовым. При реализации этого феномена под влиянием неизвестных факторов в ядре соматической клетки происходят активация генов раннего эмбриогенеза и ингибирование генов, ответственных за дифференцировку и специализацию. При полном репрограммировании теряется как специализированная генетическая, так и эпигенетическая информация, и клетка приобретает свойства плюрипотентной.

Механизмы и факторы, регулирующие реализацию репрограммирования ядра дифференцированной соматической клетки, остаются неизученными. До сих пор считалось, что дифференцированные клетки могут возникать из зародышевых или стволовых клеток, но сейчас известно, что путем трансдифференцировки зрелые клетки одного фенотипа могут превращаться в полностью дифференцированные клетки другого [18].

Метаплазия, в широком аспекте использования термина, может возникать, таким образом, как в результате нарушения дифференцировки стволовых клеток, так и трансдифференцировки (прямой конверсии) уже дифференцированных клеток.

Трансдифференцировка – это разновидность метаплазии, которая характеризуется необратимым переходом уже дифференцированных клеток в другой тип вследствие утраты одного фенотипа и появления другого.

Трансдифференцировка может происходить двумя основными путями:

- привлечение клеточного деления, дедифференцировки через промежуточный тип клеток и появление нового фенотипа без свойств первичной дифференцированной клетки (преобразование пигментных эпителиальных клеток радужки глаза в хрусталик);
- прямая трансдифференцировка без клеточного деления (например, превращение клеток поджелудочной железы в гепатоциты) [12, 15, 19, 39].

В норме дедифференциация и клеточное деление являются существенными промежуточными процессами развития клетки, но они не обязательны для всех случаев. Трансдифференцировка ассоциирована с изолированным изменением в программе экспрессии генов и является прямым прототипом связи между двумя клеточными линиями (видами).

Таким образом, метаплазию можно рассматривать как потенциально обратимое изменение, при котором дифференцированные типы клеток замещаются другими дифференцированными типами клеток, как правило лучше приспособленными к трансформированным условиям среды [37].

На молекулярном уровне причиной трансдифференцировки, вероятно, являются изменения в экспрессии главного гена-переключателя (гомеотического гена), способного различать две клеточные линии при нормальном развитии.

О тесной патогенетической связи метаплазии с системой генетической детерминации тканей свидетельствуют и результаты опытов с использованием Cdx2-трансгенных мышей [16, 22, 24, 28], а также исследований гастробиопсий в клинике [20, 21].

После того как открыли и изучили гомеобоксные гены дрозофилы, похожие гены были найдены у всех других многоклеточных организмов от нематоды до человека.

Большое количество транскрипционных факторов многоклеточных организмов вовлечено в обеспечение их развития. Определяющая черта этих факторов – наличие в их составе одного или более ДНК-связывающих доменов, которые взаимодействуют с определенными участками ДНК, расположенными в регуляторных областях генов. Гомеодоменные белки связывают гомеобокс (особый участок ДНК) и играют ключевую роль в индивидуальном развитии организмов – онтогенезе [25]. В геноме человека обнаружено более 2600 белков, имеющих ДНК-связывающий домен, и большинство из них – факторы транскрипции [38]. Вследствие этого они составляют наибольшее семейство белков человека.

Многие гены регулируются корпоративным взаимодействием различных факторов транскрипции, что создает уникальность регуляции каждого гена в процессе развития организма.

Сегодня до конца не выяснено, как происходит спецификация (специализация, детерминация) кишечной энтодермы. Считается, что она дифференцируется локально на ранних стадиях эмбриогенеза и спецификация детерминируется во взаимодействии с окружающей мезенхимой. Модель экспрессии гомеобоксных генов (Hox), как полагают, ответственна за спецификацию различных органов. Гены Hox кодируют белки, регулируют транскрипцию и определяют структуры тела и их расположение в переднезаднем направлении. Работая в соответствии с генетической программой, они инициируют или подавляют транскрипцию определенных генов в ответ на внешние воздействия, что приводит к изменению морфологии, дифференциации клеток, морфогенеза, органогенеза.

Cdx1 и Cdx2 – это каудально связанные гомеобоксные транскрипционные факторы с селективной локализацией в ядрах эпителиоцитов слизистой оболочки тонкой и толстой кишки плодов и взрослых. В неизменной слизистой оболочке желудка они не экспрессируются. В слизистой оболочке здорового кишечника Cdx2 экспрессируются преимущественно в дифференцированных энтероцитах ворсин, а Cdx1 – в недифференцированных клетках пролиферативного компартмента крипт [14]. Многочисленные исследования показали, что аберрантная экспрессия Cdx1 и Cdx2 в СОЖ может иметь ключевую роль в развитии кишечной метаплазии. Так, P. Mesquita et al. [29] доказали, что Cdx2 активирует экспрессию кишечного муцинового гена MUC2 в желудочных клетках, индуцируя интестинальную трансдифференцировку как в участках кишечной метаплазии, так и в отдельных типах рака желудка.

В дифференцировке желудочного эпителия участвуют гены Runx3, Sox2, Shh и Ptc. Потеря их функции, вероятно, также может приводить к трансдифференцировке клеток желудочного типа в кишечный. В нормальной СОЖ экспрессия Cdx2 может прямо или косвенно подвергаться супрессии при участии Runx3, Sox2, Shh и Ptc [40]. Молекулярно-биологические исследования показывают, что Cdx2 путем активации собственного промотора может закреплять кишечный фенотип за клетками, что противоречит концепции обратимости метаплазии.

Таким образом, дальнейшие исследования феномена КМ могут прояснить молекулярно-генетические механизмы ее развития и уточнить наши представления о проблеме метаплазии в целом.

Литература

1. Аруин Л.И. О морфогенезе кишечной метаплазии слизистой оболочки желудка / Под ред. В.Х. Василенко и А.С. Ло-

гинова // Актуальные вопросы гастроэнтерологии: Сборник трудов. М., 1972. С. 103–108.

2. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М: Триада-Х, 1998. 496 с.
3. Баттулин Н.Р. Экспрессия эпигенетических генов OCT4 и NANOG, ответственных за поддержание плюрипотентности, и тканеспецифических генов в межвидовых эмбриональных стволовых гибридных клетках: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2010. 20 с.
4. Головин Д.И. О метаплазии эпителиев: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Л., 1953. 28 с.
5. Михайлов В.П. Современные представления о метаплазии. Метаплазия тканей. М.: Наука, 1970. 198 с.
6. Пальцев М.А., Аничков Н.М., Литвицкий П.Ф. Патология человека: учебник: В 2 т. Т. 1. Общий курс. М.: Медицина, 2009. С. 164.
7. Предрак и рак желудка: этиология, патогенез, морфология, лечебный патоморфоз / Василенко И.В., Садчиков В.Д., Галахин К.А. и др. К: Книга плюс, 2001. 232 с.
8. Саркисов Д.С., Аруин Л.И. Обновление структур организма: Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / Под ред. Д.С. Саркисова. М.: Медицина, 1987. С. 49–57.
9. Струков А.И., Серов В.В. Патологическая анатомия: учебник. 5-е изд., стер. М.: Литтерра, 2010. 848 с.
10. Трумэн Д. Биохимия клеточной дифференцировки. М.: Мир, 1976. 188 с.
11. Шлопов В.Г. Патологічна анатомія: Підручник. Нова книга, 2004. 768 с.
12. Beresford W.A. Direct transdifferentiation: Can cells change their phenotype without dividing? // Cell Differ. Dev. 1990. N. 29. P. 81–93.
13. Bencini B. Basi biologiche, dottrina e interpretazione dei fenomeni metaplastici // Pathologica. 1936. N. 28. P. 531.
14. Cdx1 induced intestinal metaplasia in the transgenic mouse stomach: comparative study with Cdx2 transgenic mice / H. Mutoh et al. // Gut. 2004. V. 53. P. 1416–23.
15. Chia-Ning Shen. Transdifferentiation, Metaplasia and Tissue Regeneration. Review / Z.D. Burke, D. Tosh // Organogenesis, 2004. N. 1:2. P. 36–44.
16. Development of Gastric Carcinoma from Intestinal Metaplasia in Cdx2-transgenic Mice / M. Hiroyuki et al. // Cancer Research. 2004. V. 64. P. 7740–7.
17. Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia / T. Tsukamoto et al. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2004. V. 130. N. 3. P. 135–45.
18. Eberhard D. Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease / D. Tosh // Cellular and molecular life sciences CMLS. 2008. V. 65, Issue: 1. P. 33–40.
19. Eguchi G. Introduction: Transdifferentiation // Semin. Cell Biol. 1995. N. 6. P. 105–8.
20. Expression of CDX2 and Li-cadherin in intestinal metaplasia and adenocarcinoma of the stomach / K. Samuel et al. // Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2004. V. 45. P. 4242.

21. Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia / A. Eda et al. // *J. Gastroenterol.* 2002. V. 37. N. 2. P. 94–100.
22. *Fukamachi H.* Runx3 controls growth and differentiation of gastric epithelial cells in mammals // *Dev. Growth and Differ.* 2006. V. 48. N. 1. P. 1–13.
23. Gastric cancer originates from bone marrow-derived cells / J. Houghton et al. // *Science.* 2004. V. 306. P. 1568–71.
24. Gastrointestinal differentiation marker Cytokeratin 20 is regulated by homeobox gene CDX1 / W. M. Carol Chan et al. // *PNAS.* 2009. V. 106. No. 6. P. 1936–41.
25. *Gehring W.J.* “Homeodomain proteins”. Annual review of biochemistry / M. Affolter, T. Bürglin. 1994. V. 63. P. 487–526.
26. *Gutierrez-Gonzalez L.* Biology of intestinal metaplasia in 2008: More than a simple phenotypic alteration / N.A. Wright // *Dig. Liver Dis.* 2008. V. 40. P. 510–22.
27. Intestine-like remodeling of adult mouse glandular stomach by implanting of fetal intestinal mesenchyme / Y. Sakagami et al. // *Cancer Res.* 1984. V. 44. P. 5845–9.
28. *Kupffer C.* Epithel und Drüsen des menschlichen Magens / *Festschr. Arztl. Ver., München*, 1883. 22 p.
29. Metaplasia – A Transdifferentiation Process that Facilitates Cancer Development: The Model of Gastric Intestinal Metaplasia / P. Mesquita et al. // *Critical Reviews™ in Oncogenesis.* 2006. V. 12(1–2). P. 3–26.
30. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early cancer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis / T. Kirchner et al. // *Virchows Arch.* 2001. V. 439. N. 4. P. 512–22.
31. *Ming S.C.* Intestinal metaplasia and histogenesis of carcinoma in human stomach. Light and electron microscopic study / H. Goldman, D.G. Frieman // *Cancer.* 1967. V. 20. P. 1418–29.
32. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells / C.A. Cowan et al. // *Science.* 2005. V. 309. P. 1369–73.
33. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells / M. Tada et al. // *Curr. Biol.* 2001. N. 11. P. 1553.
34. *Orth. Ruckblicke / Orth // Virch. Arch., 1910.*
35. *Salenius P.* On the ontogenesis of the human gastric epithelial glands // *Acta anat.* 1962. V. 5. Suppl. 46.
36. Some physiologic properties of heterotopic intestinal epithelium: Its role in transporting lipid into the gastric mucosa / W. Rubin et al. // *Lab. Invest.* 1967. V. 16. P. 813–27.
37. *Stemmermann G.N.* Intestinal metaplasia of the stomach. A status report // *Cancer.* 1994. V. 74. P. 556–64.
38. Structure and evolution of transcriptional regulatory networks / M.M. Babu et al. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2004. V. 3. N. 14. P. 283–91.
39. *Tosh D.* How cells change their phenotype / J.M.W. Slack // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. N. 3. P. 187–94.
40. Transcription of Sonic Hedgehog, a Potential Factor for Gastric Morphogenesis and Gastric Mucosa Maintenance, Is Up-regulated in Acidic Conditions / A. Dimmler et al. // *Laboratory investigation.* 2003. V. 83. N. 12. P. 1829–37.
41. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells / I. Wilmut et al. // *Nature.* 1997. V. 385. P. 810–13.
42. *Virchow R.* Über Metaplasie // *Virch. Arch.* 1884. 97.

METAPLASIA OF GASTRIC MUCOSA IN THE HISTORICAL ASPECT: FROM KUPFFER AND VIRCHOW TO THE PRESENT

S.V. Vernigorodskiy

The history of the views concerning metaplasia of the gastric mucosa, from Kupffer’s and Virchow’s proceedings to the present was investigated based on the analysis of literature and our own research.

Key words: metaplasia, gastric mucosa, history, modern view

Информация об авторе

Вернигородский С.В. – канд. мед. наук, доцент кафедры патологической анатомии с курсами судебной медицины и права Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова
Адрес: 21018, Украина, Винница, ул. Пирогова, д. 56. Телефон 380 (432) 50-03-60. E-mail: vernsot@rambler.ru

Материал поступил в редакцию 8 июля 2012 года

ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КАХАЛЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

С.О. Кирюхин¹, Т.И. Хомякова², М.Т. Добрынина¹, О.В. Макарова^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

²ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Интерстициальные клетки Кахаля (ИКК) играют важную роль в моторике желудочно-кишечного тракта и имеют дискретное распределение в мышечном слое ЖКТ. Уменьшение количества ИКК связано с рядом заболеваний человека. ИКК обычно идентифицируют по экспрессии тирозинкиназного рецептора c-kit, выявляемого иммуногистохимическим методом. В обзоре приводятся основные морфологические и функциональные характеристики ИКК, их роль в патогенезе болезней, а также методы выявления этих клеток.

Ключевые слова: интерстициальные клетки Кахаля, моторика ЖКТ, пейсмейкерная активность

Интерстициальные клетки Кахаля – это один из типов интерстициальных клеток мышечной оболочки (*tunica muscularis*) различных отделов желудочно-кишечного тракта. Основными функциями ИКК являются генерация и проведение медленных волн – периодических изменений трансмембранного потенциала мембран гладкомышечных клеток [7]. Впервые клетки Кахаля были описаны испанским гистологом Сантьяго Рамон-и-Кахалем в 1892 году. Пейсмейкерная активность субпопуляции ИКК, желудочно-кишечного тракта была показана в 1982 году [27]. Механизмы генерации и поддержания медленных волн перистальтики обусловлены колебаниями уровня внутриклеточного кальция, которые ритмически активизируют ионные каналы плазматической мембраны [10, 22]. Колебания концентрации кальция осуществляются за счет выделения и поглощения ионов кальция из цистерн гладкой эндоплазматической сети и митохондрий (рис. 1). Колебания трансмембранного потенциала распространяются через щелевые контакты на мембраны миоцитов. При достижении определенного значения разности потенциалов генерируется потенциал действия, повышается концентрация внутриклеточного кальция и происходит сокращение гладких миоцитов [25].

Перистальтическая активность ЖКТ регулируется на многих уровнях, начиная от центральной нервной системы и заканчивая регуляцией се-

кретами энтероэндокринных клеток. Нервная регуляция осуществляется симпатическими и парасимпатическими отделами вегетативной нервной системы, а также автономной нервной системой кишечника, которая имеет собственные чувствительные, вставочные и двигательные нейроны. Акцепторами нервных сигналов являются ИКК и фибробластоподобные клетки, которые передают эти сигналы на гладкие миоциты мышечной оболочки [13, 21]. ИКК обнаруживают фенотипические черты, свойственные одновременно и нервным клеткам, и гладким миоцитам. Они характеризуются аргирофильностью, наличием виментиновых промежуточных филаментов, имеют звездчатую или



Рис. 1. Схема активации пейсмейкерной активности ИКК по Takaki (2003) и Helden et al. (2010)

отростчатую форму [4], в зависимости от популяции ИКК. Сократительные актино-миозиновые филаменты отсутствуют. Некоторые исследователи отмечают наличие в цитоплазме и около мембраны ИКК плотных телец — структур, присущих гладким миоцитам, с которыми связаны пучки промежуточных филаментов [20].

При ультраструктурном исследовании выявляются прерывистая базальная мембрана, множество кавеол на поверхности клетки, центральное ядро с пристеночным гетерохроматином овальной или фестончатой формы, хорошо развитая гладкая эндоплазматическая сеть, большое количество митохондрий, расположенных главным образом в отростках клеток. В ИКК хорошо развит аппарат Гольджи, выражена гранулярная эндоплазматическая сеть. Ультраструктурная характеристика ИКК имеет различия в зависимости от отдела ЖКТ, а также от вида животных [14].

В настоящее время выделяют несколько субпопуляций ИКК.

Интерстициальные клетки Кахаля, ассоциированные с межмышечным сплетением (ИКК-МС), которые располагаются в области Ауэрбахова нервного сплетения, между кольцевым и продольным слоями гладкой мускулатуры. Клетки этой субпопуляции имеют звездчатую форму с 3–5 цитоплазматическими отростками, которые ветвятся, образуя вторичные и третичные отростки. Отдельные клетки этой субпопуляции объединены в единую сеть с помощью щелевых контактов. Популяция ИКК-МС в толстой кишке и желудке менее выражена, чем в тонкой кишке [14, 24].

Интерстициальные клетки Кахаля, ассоциированные с подслизистым сплетением (ИКК-ПСС), располагающиеся в области слизистого (Мейснерова) сплетения желудка и толстой кишки, обнаруживаются и в других отделах ЖКТ. Клетки этой субпопуляции многополюсны и объединены в сеть [14, 24].

Внутримышечные интерстициальные клетки Кахаля (ИКК-ВМ) веретеновидные, с отростками, неодинаково выраженными в разных отделах ЖКТ. Длинная ось ИКК-ВМ ориентирована вдоль мышечного слоя. В толще мышечного слоя клетки этой субпопуляции ассоциированы с нервными волокнами и формируют с их расширениями (так называемыми варикозными расширениями) контакты наподобие синаптических. ИКК-ВМ распространены равномерно во всех отделах ЖКТ, но отличаются в разных отделах степенью разветвленности и числом контактов с нервными волокнами [14, 24].

Клетки Кахаля глубокого мышечного сплетения (ИКК-ГМС) располагаются между двумя кольцевыми слоями гладких миоцитов, прилежащих к подслизистому сплетению тонкой кишки. Клетки имеют звездчатую форму с несколькими неветвящимися отростками, которые контактируют между собой, образуя сеть [14, 24].

Клетки Кахаля, располагающиеся в прилежащем к серозной оболочке слое гладких миоцитов (ИКК-СП).

Эту субпопуляцию выделяют в тонкой и толстой кишке мышц. Клетки характеризуются звездчатой формой с небольшим количеством отростков [14, 24].

Некоторые исследователи предлагают делить ИКК на субпопуляции по функциональной характеристике. Предполагают, что ИКК-МС тонкой, толстой кишки и желудка выполняют пейсмейкерную функцию, а ИКК-ВМ – функцию передачи нервных сигналов к гладкомышечным клеткам [11].

Клетки Кахаля имеют тесные структурные связи с другими компонентами мышечной оболочки кишечника – гладкомышечными клетками и нейронами.

С гладкомышечными клетками ИКК соединены щелевыми контактами [5, 14, 21] (рис. 2), связь между клетками осуществляется через белковые каналы – коннексоны, через которые могут передаваться ионы и небольшие (до 1 кД) молекулы. Видимо, через них происходит передача сигнала (потенциала действия)

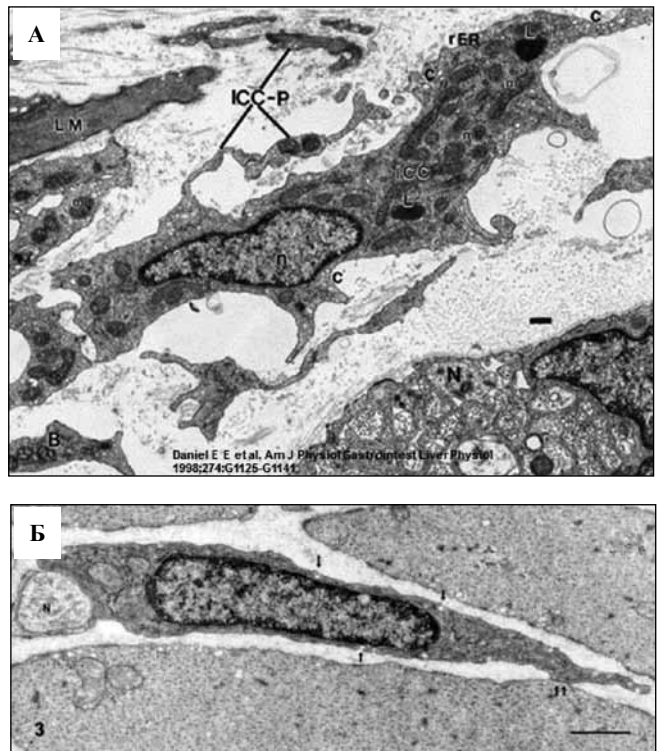


Рис. 2. Интерстициальные клетки Кахаля различных популяций.

- А – интерстициальная клетка Кахаля межмышечного сплетения (ИКК-МС). L – лизосомы, С – кавеолы, N – ядро, gER – гранулярный эндоплазматический ретикулум, М – митохондрии. N – нервные волокна. ICC – интерстициальная клетка Кахаля межмышечного сплетения (ИКК-МС). ICC-P – цитоплазматические отростки ИКК-МС (по Е.Е. Daniel et al. 1998)
- Б – интерстициальная клетка Кахаля внутримышечной популяции (ИКК-ВМ). N – нейрон. Стрелки обозначают кавеолы. Двойная стрелка показывает щелевой контакт с гладкомышечной клеткой (по Т. Komuro, 2006)

с ИКК на миоциты, а также осуществляется электро-механическое сопряжение близко расположенных миоцитов для создания единой сократительной структуры в стенке кишки. Щелевые контакты в мышечной оболочке кишки можно обнаружить на электронномикроскопическом уровне или при окраске антителами к белку Cx43 (Connexin 43) [14].

Взаимодействие ИКК с нейронами обеспечивается синаптоподобными контактами отростков клеток Кахала с варикозными расширениями на аксонах нейронов [9, 21, 22] (рис. 2). Показано, что в варикозных расширениях, тесно контактирующих с клетками Кахала, обнаруживаются белки семейства SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor), в частности синтаксин, синаптотагмин и SNAP25 (Synaptosomal-associated protein, 25 kD). Эти белки не обнаруживаются в области отростков нейронов, располагающихся вблизи гладких миоцитов. SNARE-белки играют важную роль в процессе слияния везикул, содержащих нейромедиаторы с пресинаптической мембраной нервного окончания, таким образом обеспечивая нейротрансмиттерную функцию. Полученные данные подтверждают роль ИКК в перистальтике ЖКТ [4].

Предполагается также возможность существования «объемного» переноса медиатора [23], когда последний поступает не в узкую синаптическую щель (классический синапс), а в межклеточное пространство. Таким способом одна клетка-мишень получает сигналы от нескольких нервных окончаний одновременно, а одно нервное окончание оказывает эффект сразу на группу клеток. Оба типа контактов могут быть представлены в различных субпопуляциях ИКК [32].

ИКК некоторых субпопуляций, например ИКК-ВМ, имеют тенденцию к ассоциации с нервными волокнами [5]: ИКК, нитроергические волокна и фибробластоподобные клетки внутреннего анального сфинктера мышцей образуют в толще мускулатуры единые «тяжи», в которых максимальное расстояние между поверхностями клеток меньше 1 мкм. Таким образом, может обеспечиваться максимальная эффективность передачи сигнала с нервной системы через ИКК на эффекторные клетки.

ИКК принимают участие в механорецепции и развитии перистальтического рефлекса [10, 17]. В экспериментах с мышами *c-kit*-мутантных линий, например WBB6F1-W/W^v, показано, что ИКК-МС необходимы для сокращения и расслабления мускулатуры стенки подвздошной кишки в ответ на растяжение [19]. ИКК могут принимать участие в развитии и модуляции воспалительного ответа. Показано, что при трихинеллезе на ранних сроках ИКК-МС образуют тесные контакты типа *peg-and-socket* с активированными макрофагами. На более поздних сроках отмечается формирование специализированных контактов между ИКК-МС и лимфоцитами [28]. Функциональная активность ИКК регулируется провоспалительными и противовоспалитель-

тельными цитокинами, серотонином и его производными [3].

Впервые ИКК были обнаружены при серебрении (окрашивании солями серебра) гистологических срезов стенок разных органов ЖКТ. Отростчатые клетки выявлялись в области межмышечного (Ауэрбахова) нервного сплетения, поэтому многие исследователи считали их примитивными нейронами. Более поздние исследования показали, что этот тип интерстициальных клеток по ряду ультраструктурных характеристик имеет сходство не только с нейронами, но и с гладкомышечными клетками.

Серебрение не позволяло дифференцировать ИКК от морфологически сходных клеток нейроэктодермального происхождения, поэтому был разработан подход с использованием иммуногистохимического маркера.

В настоящее время иммуногистохимические методы наиболее широко используются для выявления ИКК. Интерстициальные клетки Кахала селективно связывают антитела к мембранному белку-рецептору *c-Kit*. Белок *c-Kit* представляет собой рецептор к фактору стволовых клеток (Stem cells factor, SCF), обладающий тирозинкиназной активностью. Этот рецептор участвует в процессах дифференцировки многих клеток разных тканей организма. Например, в результате связывания поверхностных молекул *c-Kit* рецептора на ранних пре-В-клетках происходит активация *c-Kit*, что влечет за собой усиление пролиферации и переход В-клеточных предшественников на следующий уровень дифференцировки – стадию поздних пре-В-клеток. Однако в стенке ЖКТ *c-Kit* экспрессируют только два типа клеток – клетки Кахала и тучные клетки.

В 1994 году Torihashi et al. обнаружили, что антитела к продукту экспрессии протоонкогена *c-kit* специфически связываются с ИКК кишки мыши [26]. Этот методический подход позволил изучить трехмерную структуру сетей клеток Кахала на протяжении всех отделов ЖКТ, а также исследовать их роль в развитии нарушений нормальной функции кишечника.

Недавно было показано, что маркеры ИКК в ЖКТ могут быть также белки семейства *Ano1* (Anostamin 1), которые обеспечивают ионный транспорт. На биопсийном материале толстой кишки пациентов со сниженной скоростью пассажа содержимого кишечника выявлено уменьшение количества *c-Kit*-положительных клеток и показана корреляция между числом *c-Kit* и *Ano1*-положительных клеток и клиническими проявлениями заболевания [12].

При иммуногистохимическом исследовании *c-Kit*-положительные клетки, морфологически подобные ИКК, выявляются и в других полых органах – мочеточнике, мочевом пузыре, матке, а также в предсердии и выводных протоках простаты, молочных желез, поджелудочной железы и желчевыводящих протоках, в выносящих сосудах клубочка нефрона, воротной вене, других кровеносных и крупных лимфатических

сосудах [8, 17]. Показано, что в воротной вене, лимфатических сосудах, выводных протоках простаты и мочеточниках они выполняют пейсмейкерную функцию [17].

Исследование эмбрионального развития с-Kit-положительных клеток у мышей показало, что транскрипция гена *c-kit* начинается на 9-й день эмбрионального развития, белок с-Kit выявляется с помощью антител на 12-й день. К 15-му дню эмбрионального развития в стенке кишки формируется кольцевой слой гладких миоцитов, экспрессирующих десмин, γ -актин и гладкомышечный миозин. На периферии мышечного слоя в зоне формирующегося межмышечного сплетения выявляются с-Kit-положительные клетки, собранные в кластеры. Они экспрессируют виментин, и некоторые десмин. Затем до 18-го дня эмбрионального развития происходит разделение с-Kit-положительных клеток на два «класса» – клетки на периферии (близкие к серозной оболочке) перестают экспрессировать с-Kit и приобретают характеристики гладкомышечных клеток, становясь продольным слоем гладких миоцитов мышечной оболочки кишки, в то время как внутренний слой клеток сохраняет экспрессию с-Kit, развиваясь в ИКК-МС. К моменту рождения в кишечнике плода выявляется только один слой с-Kit-положительных клеток – между кольцевым и продольным слоями гладких миоцитов. Второй слой с-Kit-положительных клеток обнаруживается после рождения в слое недифференцированных клеток кольцевого слоя миоцитов со стороны слизистой оболочки. Часть из них впоследствии становится клетками Кахала, часть (ближе к слизистой оболочке) приобретает фенотипические черты гладкомышечных клеток [31]. Нейротрофический фактор глиальных клеток (Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) обеспечивает функционирование норадренергических нейронов *in vivo*. Эксперименты с аганглионарными сегментами кишки GDNF-нокаутных мышей показали, что в отсутствие нейробластов развитие клеток Кахала из с-Kit-положительных клеток не нарушается [30].

Таким образом, клетки Кахала имеют не только мезенхимальное происхождение, но и предшественника, общего с гладкомышечными клетками. При некоторых заболеваниях, связанных с нарушением перистальтики, уменьшение численности популяции ИКК связывают с возможной трансдифференцировкой последних в гладкомышечные клетки [16].

Полное формирование сети и контактов между клетками мышечного слоя органов ЖКТ и функциональное созревание ИКК завершаются в постнатальном периоде развития. Способность к генерации медленных волн появляется у ИКК желудка мыши на 19-й день эмбрионального развития, а формирование «взрослого» типа перистальтической активности – на 10-й день после рождения. Время, необходимое для развития функциональной зрелости ИКК, увеличивается от верхних к нижним отделам ЖКТ. В подвздошной кишке медлен-

ные волны появляются на 3-й день после рождения, а в толстой кишке – спустя неделю [26].

Роль с-Kit-рецептора важна в дифференцировке и поддержании функциональной активности ИКК во взрослом организме [16]. При деактивации с-Kit блокаторами, такими как иматиниб (противоопухолевый препарат, ингибитор протеинтирозинкиназы и селективный ингибитор с-Kit-рецептора), происходит угнетение перистальтической активности кишечника, а также трансдифференцировка клеток Кахала в клетки с гладкомышечным фенотипом [16]. Лигандом к с-Kit-рецептору является фактор стволовых клеток. Источник этого фактора в мышечной стенке кишечника – нервные и гладкомышечные клетки, а также ИКК. Клетки мышечной стенки ЖКТ экспрессируют две изоформы SCF – растворимую и мембранно-связанную. Последняя, обнаруженная на поверхности гладкомышечных клеток, играет главную роль в дифференцировке ИКК. При связывании SCF с с-Kit-рецептором активируется с-Kit-сигнальный путь, приводящий к приобретению с-Kit-положительными клетками фенотипических черт клеток Кахала. Известно, что при связывании с SCF с-Kit-рецептор аутофосфорилируется, активизируются сайты связывания PI3-киназы (Phosphatidylinositol 3-kinases), фосфолипазы C, связанной с рецепторными и нерцепторными тирозинкиназами, и G-белком p21ras [29]. Как известно, основным субстратом фосфолипазы C в эукариотических клетках при концентрации ионов кальция, близких к физиологическим, является PI-4,5-P2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). Его гидролиз приводит к образованию двух ключевых вторичных посредников – инозит-1,4,5-трифосфата и диацилглицерина. Последний остается в мембране, активируя важнейший сигнальный фермент – протеинкиназу C, а IP3 (Inositol trisphosphate) диффундирует в цитоплазму и связывается с рецепторами на мембране ретикулума, в результате чего открываются ионные каналы и в цитоплазму из внутриклеточных депо поступают ионы кальция [2].

Нарушение дифференцировки, численности популяций ИКК, их распределения в гладкой мускулатуре, альтеративные изменения при патологических процессах играют важную роль в развитии ряда заболеваний человека, таких как болезнь Гиршпрунга, болезнь Крона, гастроэзофагеальный рефлюкс, некротизирующий энтероколит, парез желудка, ахалазия и другие.

Ахалазия – редкое заболевание, связанное с нарушением моторики пищевода и нижнего пищеводного сфинктера. Нейромышечные нарушения характеризуются дегенеративными изменениями нервных сплетений, приводящими к селективной утрате ингибиторных нервных окончаний. Последствиями этого становятся необратимое нарушение перистальтической активности и механизмов расслабления нижнего пищеводного сфинктера в ответ на акт глотания. При ахалазии происходят ультраструктурные изменения ИКК нижнего пищеводного сфинктера – «осветле-

ние» цитоплазмы, сокращение числа митохондрий и цистерн гладкого эндоплазматического ретикулума. Эти изменения сочетаются с сокращением числа контактов между отростками нервов и ИКК [6].

Идиопатический парез желудка – недостаточность моторной функции стенки желудка – проявляется такими клиническими симптомами, как тошнота, рвота, абдоминальные боли. При идиопатическом парезе желудка у крыс с сахарным диабетом, индуцированным перитонеальным введением стрептозоцина, отмечается уменьшение числа с-Kit-положительных клеток в мышечной оболочке тела желудка по сравнению с контрольными животными [18].

Детский гипертрофический стеноз привратника желудка клинически проявляется увеличением времени нахождения пищи в желудке вследствие гипертрофии внутреннего слоя гладкомышечных клеток пилорического отдела. При этом заболевании наблюдается потеря некоторых типов иннервации (например, повреждение NO-синтазы нейронов), а также локальное снижение числа с-Kit-положительных клеток в гипертрофированной мускулатуре, однако вопрос о связи между потерей нитрической иннервации, потерей клеток Кахалю и гипертрофией остается открытым [17].

Болезнь Гиршпрунга – генетическое заболевание, при котором уменьшается число нейронов (аганглиоз) в дистальных отделах толстой кишки, что приводит к непроходимости кишечника и некрозу. Причина аганглиоза – мутация генов, ответственных за миграцию нейробластов. Точные мутации генов не установлены. Предполагают, что при болезни Гиршпрунга нарушается синтез факторов миграции в клетках не только нервного гребня, но и кишечной мезенхимы. В пользу этой теории говорит и то, что отмечается уменьшение количества и обширности сети клеток Кахалю, хотя показано, что их развитие не зависит от наличия нейронов, по крайней мере до рождения. Так или иначе, нарушения перистальтики могут быть объяснены именно снижением числа клеток Кахалю [17].

При *запорах* затруднено проведение каловых масс по дистальным отделам толстой кишки. У пациентов отмечено значительное уменьшение количества клеток Кахалю во всех отделах толстой кишки, а также снижение экспрессии с-Kit [17].

Диабетические гастропарез, запоры и диарея. От 25 до 76% пациентов с сахарным диабетом страдают от нарушений моторной функции ЖКТ. Уменьшение числа клеток Кахалю и нарушение их ультраструктуры продемонстрированы в целом ряде исследований. У мышей линии C57/BL6 с экспериментально вызванным сахарным диабетом 1-го типа и снижением экспрессии фактора стволовых клеток обнаружено уменьшение численности клеток Кахалю, связанное именно с недостаточной экспрессией SCF, а не с гипергликемией. При введении мышам экзогенного SCF

было зарегистрировано улучшение моторной функции ЖКТ и увеличение числа клеток Кахалю [15].

Существует ряд *злокачественных опухолей кишечника и желудка*, которые образуются из с-Kit-положительных клеток. Наиболее часто они встречаются в тонкой кишке (20–40% случаев) и желудке (40–70% случаев). Размеры опухолей этого типа могут быть от долей миллиметров до нескольких сантиметров. Небольшие опухоли клинически не проявляются, крупные характеризуются болью, кровотечениями, расстройствами моторики кишечника и другими нарушениями – так называемыми симптомами острого живота. Этот тип стромальных опухолей хорошо поддается лечению химиотерапевтическим препаратом Гливек® (иматиниб) [1].

При заболеваниях ЖКТ кроме клеток Кахалю изменениям часто подвергаются нейроны кишечных сплетений и миоциты, поэтому на поздних стадиях болезни зачастую невозможно определить роль клеток Кахалю в патогенезе заболевания.

На основании исследований последних лет можно сделать вывод, что интерстициальные клетки Кахалю – это полифункциональные клетки, играющие важную роль в моторике ЖКТ и других полых органов. Они распространены как в области нервных сплетений стенки, так и в мышечном слое стенки полых органов.

В ЖКТ клетки Кахалю дифференцируются из клеток мезенхимы кишечника в ходе эмбрионального развития через активацию с-Kit пути, а также имеют общее с гладкомышечными клетками предшественника. Характерные черты ИКК – отростчатая форма клетки, крупное ядро, хорошо развитая вакуолярная система, большое количество митохондрий. Этот тип интерстициальных клеток выполняет ряд важных функций, таких как создание и проведение пейсмейкерного потенциала, передача нервных и, возможно, гуморальных сигналов на гладкомышечные клетки.

Создание и проведение пейсмейкерного потенциала на мембране клеток Кахалю осуществляется за счет колебаний уровня кальция в цитоплазме, что активирует ионные каналы плазмалеммы и создает медленные волны деполяризации мембраны, передающиеся на гладкомышечные клетки.

Нервная регуляция моторики кишечника основана на изменении свойств клеток Кахалю, через которые сигнал передается на гладкие миоциты, однако возможно и непосредственное влияние нервных сигналов на гладкомышечные клетки.

Очевидно, в развитии различных заболеваний, характеризующихся нарушением моторной активности ЖКТ, важную роль играют повреждение, изменение численности и распределения в гладкой мускулатуре клеток Кахалю. Изучение роли ИКК в нарушении моторики полых органов может стать основой для создания новых средств диагностики, лечения и профилактики заболеваний.

Литература

1. *Кравцов В.Г.* Клинико-морфологическая иммуногистохимическая характеристика, критерии прогноза гастроинтестинальных стромальных опухолей. М., 2007.
2. *Северин Е.С., Муйжнек Е.Л., Северин С.Е.* Концепция вторичных месенджеров: от фундаментальных основ к клинической практике. М.: Димитрейд график Групп, 2005. 336 с.
3. *Akiho H., Ihara E., Motomura Ya., Nakamura K.* Cytokine-induced alterations of gastrointestinal motility in gastrointestinal disorders // *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2011. V. 15; 2(5). P. 72–81.
4. *Beckett E.A.H., Takeda Y., Yanase H., Sanders K.M., Ward S.M.* Synaptic specializations exist between enteric motor nerves and interstitial cells of Cajal in the murine stomach // *J Comp Neurol.* 2005. V. 493. P. 193–206.
5. *Cobine C.A., Hennig G.W., Kurahashi M., Sanders K.M., Ward S.M., Keef K.D.* Relationship between interstitial cells of Cajal, fibroblast-like cells and inhibitory motor nerves in the internal anal sphincter // *Cell Tissue Res.* 2011. V. 344(1). P. 17–30.
6. *Dughera L., Chiaverina M., Cacciotella L., Cisarò F.* Management of achalasia // *Clin Exp Gastroenterol.* 2011. V. 4. P. 33–41.
7. *Helden D.F., Laver D.R., J Holdsworth J., Intiaz M.S.* Generation and propagation of gastric slow waves // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010. V. 37. P. 516–24.
8. *Hinescu M.E., Gherghiceanu M., Mandache E., Ciontea S.M., Popescu L.M.* Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization // *J Cell Mol Med.* 2006. V. 10(1). P. 243–57.
9. *Horiguchi K., Sanders K.M., Ward S.M.* Enteric motor neurons form synaptic-like junctions with interstitial cells of Cajal in the canine gastric antrum // *Cell Tissue Res.* 2003. V. 311. P. 299–313.
10. *Huizinga J.D., Golden C.M., Zhu Y., White E.J.* Ion channels in interstitial cells of Cajal as targets for neurotransmitter action // *Neurogastroenterol Motil.* 2004. V. 16 (1). P. 106–11.
11. *Huizinga J.D., Lammers W.J.* Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009. V. 296. G1–G8.
12. *Kashyap P., Gomez-Pinilla P.J., Pozo M.J., Cima R.R., Dozois E.J., Larson D.W., Ordog T., Gibbons S.J., Farrugia G.* Immunoreactivity for An1 detects depletion of Kit-positive interstitial cells of Cajal in patients with slow transit constipation // *Neurogastroenterol Motil.* 2011. V. 23(8). P. 760–5.
13. *Kim H.J.* A Functional Role for the ‘Fibroblast-Like Cells’ in Gastrointestinal Smooth Muscles // *J Physiol.* 2011. V. 589 (Pt3). P. 697–710.
14. *Komuro T.* Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract // *J Physiol.* 2006. V. 576(3). P. 653–8.
15. *Lin L., Xu L.M., Zhang W., Ge Y., Tang Y., Zhang H., Li X., Jiande D.Z. Chen.* Roles of stem cell factor on the depletion of interstitial cells of Cajal in the colon of diabetic mice // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010. V. 298. G241–G247.
16. *Mei F., Han J., Huang Y., Jiang Z., Xiong C., Zhou D.* Plasticity of interstitial cells of Cajal: a study in the small intestine of adult guinea pigs // *The Anatomical record.* 2009. V. 292. P. 985–93.
17. *Mostafa R.M., Moustafa Y.M., Hamdy H.* ICC, the Maestro in health and disease // *World J Gastroenterol.* 2010. V. 16(26). P. 3239–48.
18. *Negreanu L.M., Assor P., Mateescu B., Cirstoiu C.* Interstitial cells of Cajal in the gut—a gastroenterologist’s point of view // *World J Gastroenterol.* 2008. V. 14. P. 6285–8.
19. *Okishio Yu., Takeuchi T., Fujita A., Suenaga K., Fujinami K.* Ascending contraction and descending relaxation in the distal colon of mice lacking interstitial cells of Cajal // *J. Smooth Muscle Res.* 2005. V. 41 (3). P. 163–74.
20. *Radenković G., Nikolić I., Todorović V.* Interstitial cells of Cajal – pacemakers of the intestinal musculature // *Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology.* 2005. V. 12(1). P. 1–5.
21. *Sanders K.M., Hwang S.J., Ward S.M.* Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs // *J Physiol.* 2010. V. 588(23). P. 4621–39.
22. *Sanders K.M., Koh S.D., Ward S.M.* Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract // *Annu Rev Physiol.* 2006. V. 68. P. 307–43.
23. *Sarna S.K.* Are interstitial cells of Cajal plurifunction cells in the gut? // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008. V. 294. G372–G390.
24. *Streutker C.J., Huizinga J.D., Driman D.K., Riddell R.H.* Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: Normal ICC structure and function with associated motility disorders // *Histopathology.* 2007. V. 50. P. 176–89.
25. *Takaki M.* Gut Pacemaker Cells: the Interstitial Cells of Cajal (ICC) // *J. Smooth Muscle Res.* 2003. V. 39 (5). P. 137–61.
26. *Torihashi S., Ward S.M., Sanders K.M.* Development of c-Kit-positive cells and the onset of electrical rhythmicity in murine small intestine // *Gastroenterology.* 1997. V. 112. P. 144–55.
27. *Thuneberg L.* Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? // *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 1982. V. 71(1). P. 130.
28. *Wang X.Y., Berezin I., Mikkelsen H.B., Der T., Bercik P., Collins S.M., Huizinga J.D.* Pathology of interstitial cells of Cajal in relation to inflammation revealed by ultrastructure but not immunohistochemistry // *Am J Pathol.* 2002. V. 160(4). P. 1529–40.
29. *Ward S.M., Sanders K.M.* Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001. V. 281. G602–G611.
30. *Ward S.M., Sanders K.M.* Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract // *J Physiol.* 2006. V. 576(3). P. 675–82.
31. *Wu J.J., Rothman T.P., Gershon M.D.* Development of the interstitial cell of Cajal: origin, kit dependence and neuronal and nonneuronal sources of kit ligand // *J Neurosci Res.* 2000. V. 59. P. 384–401.
32. *Yun H., Sung R., Kim Yo., Choi W., Kim H.S.* Regional Distribution of Interstitial Cells of Cajal (ICC) in Human Stomach // *Korean J Physiol Pharmacol.* 2010. V. 14. P. 317–24.

INTERSTITIAL CELLS OF CAJAL IN ANIMAL AND HUMAN GASTROINTESTINAL TRACT

S.O. Kiryukhin, T.I. Khomyakova, M.T. Dobrynina, O.V. Makarova

Interstitial cells of Cajal (ICC) play an important role in gastrointestinal (GI) motility. They are discretely distributed within the tunica muscularis of the GI tract. ICC depletion is associated with several disorders. ICC are usually detected by immunolabeling of the cKit receptor tyrosine kinase. The main features of ICC, their contribution to the pathogenesis of some diseases and methods for ICC detection are reviewed in the article.

Key words: interstitial cells of Cajal; GI tract motility; pacemaker activity

Информация об авторах

Макарова Ольга Васильевна – докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе НИИ морфологии человека РАМН, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления.

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

Материал поступил в редакцию 13 августа 2012 года.

РОЛЬ ПАНДЕМИИ ГРИППА А (H1N1) 2009 ГОДА В ГЛОБАЛЬНОМ УВЕЛИЧЕНИИ МАТЕРИНСКОЙ СМЕРТНОСТИ

А.П. Милованов, И.М. Расстригина, Е.А. Помазанова

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

После первых зарегистрированных случаев заболевания, вызванного новым вирусом гриппа А (H1N1), в Мексике 15 августа 2009 года ВОЗ официально объявила о начале пандемии гриппа с признаками мутации, быстрым размножением в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей и легких, а также тяжелыми осложнениями. В группы риска входили, в том числе, и беременные женщины. Пандемия стремительно распространялась в США, Бразилии, Колумбии, странах Ближнего Востока и Азии, затем лавинообразно распространилась в европейских странах, постсоветских республиках и России. Несмотря на предпринимаемые эпидемиологические и лечебно-профилактические меры, грипп А (H1N1) привел к значительному росту уровня материнской смертности, в частности в США от него умерли 75, в Украине – 131, в России 116 беременных женщин с вирусологически подтвержденным диагнозом. Несмотря на отсутствие суммарного числа аналогичных материнских смертей в мире, имеются убедительные данные, что пандемия гриппа А (H1N1) привела к существенному росту глобального коэффициента материнской смертности. В ходе пандемии все страны по-разному боролись с распространением вируса А (H1N1) и негативным влиянием его на население. 10 августа 2010 года было объявлено о завершении пандемии и переходе к постэпидемическому периоду. Необходимо учесть как положительный опыт, так и неизбежные ошибки, возникшие при разработке и выполнении противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: пандемия гриппа А (H1N1), распространение в мире, материнская смертность

15 апреля 2009 года войдет в историю современной медицины как дата объявления ВОЗ пандемии гриппа А (H1N1), когда вирусологические лаборатории США, Канады и Мексики подтвердили появление новой легкой инфекции.

По масштабам распространения она отвечала понятию «пандемия», поскольку в дальнейшем грипп данной разновидности был зафиксирован во многих странах и на многих континентах. Она соответствовала двум бывшим ранее пандемиям: в 1918 году (испанский грипп) умерли 27% от всех заболевших беременных женщин, в 1957 году (азиатский грипп) умерли 47% всех заболевших беременных.

Структура нового возбудителя, впервые зафиксированного в Мексике, была представлена генами гриппа, поражающего свиней, и близка сезонному гриппу людей с более быстрыми и тяжелыми осложнениями. В дальнейшем установлено, что вирус А (H1N1) попадает в дыхательные пути, всего через 6–8 часов начинает активно размножаться (10^3) и в конце первых суток достигает огромного количества (10^{27}), главным образом в клетках эпителия слизистых оболочек верхних дыхательных путей и бронхиальной системы легких. Массивное отторжение пораженных эпителиальных

клеток вызывает их распад, а их продукты – выраженную интоксикацию. При распространении вируса по организму он избирательно поражает эндотелий кровеносных сосудов, повышает их проницаемость и вызывает вторичное повреждение внутренних органов – полиорганную недостаточность.

Эпидемиология пандемии гриппа А (H1N1) сначала ограничивалась США, Мексикой и Бразилией. Наиболее уязвимыми для свиного гриппа оказались лица со сниженным иммунитетом, беременные женщины и дети. В США сразу был создан центр регистрации этой контагиозной инфекции у беременных с целью их быстрого выявления и вакцинации. Уже за первый месяц (май) в 13 штатах США были выявлены 34 инфицированные пациентки, еще через месяц (июнь) число инфицированных беременных женщин удвоилось и шесть из них умерли от острого респираторного дистресс-синдрома. Эпидемия гриппа А (H1N1) в США продолжалась до 10 августа 2010 года: из 347 беременных женщин с подтвержденным вирусологически гриппом А (H1N1) 272 пациентки выжили в результате интенсивной комплексной терапии, но 75 беременных умерли, что составило 4,3 на 100 000 живорожденных детей (коэффициент материнской смертности, КМС).

Это обусловило существенный подъем КМС за 2009 год в США до показателя 15,6 [5, 8].

Летом и осенью 2009 года пандемия быстро распространилась в Бразилии, Колумбии и других странах мира. Первые патологоанатомические исследования умерших от гриппа А (H1N1) были проведены в Бразилии [10]. Там проанализировали 21 аутопсию с подтвержденным гриппом А (H1N1), среди них было 5 беременных женщин. Выявлены следующие изменения в легких:

- диффузные альвеолярные поражения (95% всех случаев);
- некротизирующий бронхит (33,3%);
- обширные геморрагии (21,3%);
- преобладание клеток воспаления (CD8+ и Т-лимфоциты), а также гранзим В-положительных клеток при явном ослаблении легочного иммунного статуса.

Изменения в других органах характеризовались вторичными проявлениями полиорганной недостаточности.

Дальнейшее распространение пандемии гриппа А (H1N1) шло в направлении Северной Африки и Центральной Азии. В Египте было 258 умерших с подтвержденным свиным гриппом, Иране – 147, Саудовской Аравии – 128, Сирии – 138, Марокко – 64. Встречались они и в африканских странах, но там и подсчитать число умерших от гриппа А (H1N1), в том числе беременных женщин, оказалось невозможно [12]. В целом пандемия гриппа 2009 года распространялась среди населения слаборазвитых стран. В государствах с высокоэффективной медициной, таких как Канада [9], Япония [11], Австралия [7], при минимальном числе заболевших беременных женщин летальные исходы не отмечены или они были в единичных случаях.

В Европейском регионе сведения о стремительном распространении вируса А (H1N1) напомним информации о боевых потерях: в начале августа в 46 из 53 государств – членов Европейского региона ВОЗ зарегистрировано свыше 33 000 случаев подтвержденного пандемического гриппа, через месяц – в 48 из 53 государств 49 000, в октябре – 52 000, а в ноябре – свыше 61 000 случаев.

На Украине с начала эпидемии (30 октября 2009 года) умерла 131 беременная женщина, тогда как за весь 2008 год материнская смертность составила 101 случай без единого летального исхода от гриппа. В дальнейшем аналогичные случаи были зарегистрированы во всех постсоветских республиках. Начинаясь регистрация случаев гриппа А (H1N1) в июле (Грузия, Казахстан), в августе они были отмечены в Киргизии, в сентябре – в Азербайджане, Молдове и Беларуси. Пик высокой активности пандемического вируса А (H1N1) пришелся на период с 5 по 12 ноября в Беларуси, Болгарии, Ирландии, Исландии, Казахстане, Норвегии, Польше, Молдове, Северной Ирландии, Турции, Украине, Финляндии и Швеции.

Европейский регион ВОЗ последовательно увеличивал фазы предупреждения о пандемии от 4-й до 6-й степени, поскольку имела место устойчивая передача вирусной инфекции в местных сообществах более чем в одном регионе мира (Америка, Азия, Европа).

В России пандемия свиного гриппа началась с осени 2009 года, и ей, как обычно, предшествовала чиновничья неразбериха. Только к 30 октября, когда инфекция, вызванная вирусом А (H1N1), превысила 75–80% заболевших сезонным гриппом, пандемия была официально признана властями. Было потеряно много времени, столь необходимого для развертывания противоэпидемических мероприятий и накопления средств противовирусного лечения, несмотря на 6-ю фазу предупреждения ВОЗ о развернувшейся пандемии гриппа А (H1N1) во всех странах Европы и окружающих постсоветских республиках.

Первые беременные женщины, массово заболевшие свиным гриппом, были зарегистрированы в Забайкалье (Читинская область). Это регион, жители которого часто посещают соседнюю Монголию, где с 24 ноября появились первые больные и были отмечены летальные исходы (в Улан-Баторе насчитывалось 1123 верифицированных пациента, и 20 человек умерли, в провинциях, соответственно, было 785 заболевших и 11 летальных исходов) [13]. По данным официальной статистики, свиным гриппом переболели 11% всех жителей Забайкалья и 28% беременных женщин. Летальность в общей популяции составила 0,05%, среди беременных – 0,12% [1]. Среди 682 беременных женщин, перенесших пандемический грипп, 3 пациентки прервали беременность на 12-й неделе гестации из-за выявления врожденных пороков развития (гидроцефалия, гастрошизис). У 9 женщин (1,32%) в острый период заболевания произошли спонтанные аборт в I триместре. У переболевших гриппом А (H1N1) во II и III триместрах фиксировались серьезные осложнения: невынашивание, патология амниона, плацентарная недостаточность, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, холестаза беременных (все $p < 0,05$), чаще в сравнении с неболевшими родильницами.

В Москве в течение октября–декабря 2009 года умерли 40 человек, включая двух беременных женщин, у которых методом ПЦР в назофарингеальных образцах обнаружена РНК вируса А (H1N1), а также определены антитела к этому вирусу в титрах от 1:40 до 1:80. По данным А.Л. Черняева, О.В. Заратьянца и соавт. [4], у всех умерших выявлены фоновые, сочетанные или сопутствующие заболевания, которые снижали защитные функции организма:

- ожирение II–III степени (43,2%);
- хронический алкоголизм (35,1%);
- вторичный иммунодефицит (лейкозы, злокачественные опухоли с химио- или лучевой терапией) (7,5%);
- хронические сердечно-сосудистые, эндокринные, нефрологические и другие заболевания (14,1%).

Патоморфологическая картина легких в общих чертах повторяла описанную бразильскими исследователями:

- гиалиновые мембраны (85%);
- десквамация эпителия (некроз) трахеи и бронхов (85%);
- эритроциты в альвеолах (80%);
- интраальвеолярный отек (80%);
- интерстициальное воспаление (40%);
- бронхопневмония (20%).

В итоге оказалось, что при тяжелом течении свиного гриппа преобладали диффузное альвеолярное поражение, развитие инфекционно-токсического шока, вирусемия без присоединения вторичной бактериальной флоры, то есть типичная вирусная интерстициальная пневмония, тяжесть течения которой связана с фоновой или сопутствующей патологией и общим снижением иммунитета.

В письме Минздравсоцразвития России от 21.02.2011 № 15-4/10/2-1694 «О материнской смертности в Российской Федерации в 2009 году» [3] указано, что в 2009 году в России зарегистрировано 116 вирусологически подтвержденных случаев материнской смерти от свиного гриппа А (H1N1). Наибольшая материнская смертность отмечена в Приволжском (27 случаев), Центральном (20), Сибирском (19) и Южном (19) федеральных округах. Если судить по уровням КМС, максимальные ее значения отмечены в Северо-Западном (8,57 на 100 000 живорожденных), Уральском (7,79), Приволжском (7,41) и Сибирском (6,95) округах (в целом по России 6,58).

Первый летальный исход у беременной женщины с подтвержденным вирусом А (H1N1) отмечен 24 октября 2009 года, в ноябре их уже было 73, в декабре – 41 случай. Много пациенток умерло после прерывания беременности в срок до 28 недель, в том числе 7 после самопроизвольного выкидыша на сроке от 19 до 26 недель и 22 после прерывания беременности по медицинским показаниям на сроке от 8 до 27 недель, а также 53 (45,7%) в послеродовом периоде.

Как было подчеркнуто выше, для летальных исходов у беременных женщин характерны сопутствующие болезни (81,9% аутопсий), в том числе эндокринной системы (31 случай из 116), мочевыделительной (21), сердечно-сосудистой (17), гинекологические заболевания (56, или 48,3%), в частности воспалительные (31).

В письме Минздравсоцразвития России объективно выявлены ошибки на разных этапах оказания помощи этим женщинам: отсутствие госпитализации в профильный стационар (10) и стационар высокой степени риска (11), неполная (10) и несвоевременная (9) диагностика, недооценка тяжести состояния (23), отсутствие адекватной противовирусной терапии (30). Предотвратимыми признаны только 2 (1,7%) случая материнской смертности от осложнений гриппа А (H1N1), условно предотвратимыми – 71 (61,2%) и непротвратимыми – 43 (37,1%).

Столь значительный рост экстрагенитальных заболеваний (52,7%) в структуре материнских смертей в России в 2009 году обусловлен в значительной степени эпидемией гриппа А (H1N1). Большинство беременных (99,1%) заболели гриппом и умерли во II–III триместрах при наличии сопутствующей патологии (81,9%) и позднем поступлении в стационар в тяжелом и крайне тяжелом состоянии (53,5%).

Подводя промежуточные, пока неполные, итоги пандемии гриппа А (H1N1) по ноябрь 2009 года, констатируем, что, по данным ВОЗ, общее число лабораторно подтвержденных случаев гриппа А (H1N1) в мире составило 482 300, включая 6071 случай с летальным исходом (1,25%). Несмотря на то, что 10 августа 2010 года генеральный директор ВОЗ доктор Маргарет Чен заявила, что новый вирус гриппа А (H1N1) завершил цикл своего развития, у медицинских работников должна сохраняться некоторая настороженность, и необходимо извлечь уроки, чтобы снизить материнскую смертность. По всем странам, где было приведено число летальных исходов у беременных или родивших женщин, пандемия свиного гриппа привела к увеличению уровня материнской смертности на 12–15%. Мы не застрахованы от новой мутации вируса гриппа, поэтому на будущее должны учесть следующее.

Нельзя терять драгоценное время и дожидаться официального признания эпидемии гриппа, которое запоздало, несмотря на своевременное 7-месячное предупреждение ВОЗ (апрель 2009 года) и начало пандемии в ближайших странах Европы и Азии.

Необходимо без промедления развернуть эпидемиологическую профилактическую работу и противовирусное лечение беременных пациенток, составляющих главную группу риска по гриппу А (H1N1).

Литература

1. Белокриницкая Т.Е., Кошмелева Е.А., Трубицина А.Ю. и др. Репродуктивные проблемы и потери в очаге пандемического гриппа А (H1N1). V Международный конгресс по репродуктивной медицине. Москва, 2011 год. С. 10–11.
2. Всемирная организация здравоохранения. Новости Европейского регионального бюро ВОЗ, 2009.
3. Письмо Минздравсоцразвития России от 21.02.2011 № 15-4/10/2-1694 «О материнской смертности в Российской Федерации в 2009 году. 20С.
4. Черняев А.Л., Зайратьянц О.В., Поляно Н.И. и др. Патологическая анатомия гриппа А (H1N1). Архив патологии. 2010. Т. 72. № 3.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) – Maternal and infant outcomes among severely ill pregnant and postpartum women with 2009 pandemic influenza A (H1N1) – United States, April 2009 – August 2010. MMWR Morb Mortal Wkly Кузю 2011 Sep 9; 60 (35): 1193–6.
6. Donbass UA – ВОЗ: пандемия свиного гриппа . 29.01.2010.
7. Hewagama S., Walker S.P., Stuart R.L. et al. 2009 H1N1 Influenza A and Pregnancy Outcomes in Victoria, Australia // Clin Infect Dis. 2010. Jan 25.

8. Louie J.K., Acosta M., Jamieson D.J. et al. Severe 2009 H1N1 influenza in pregnant and postpartum women in California // N Engl J Med. 2010 Jan 7; 362 (1): 27–35. Epub 2009 Dec 23.
9. Malinowski A.K., McGeer A., Robertson J. et al. H1N1 in pregnancy: a tertiary care centre experience // O Obstet Gynaecol Can 2011 Jul; 33(7): 698–704.
10. Mauad T., Hajjar L.A., Callegari G.D. et al. Lung Pathology in Fatal Novel Human Influenza A (H1N1) Infection // Am J Respir Crit Care Med. 2009 Oct 29.
11. Yamada T., Yamada T., Morikawa M. Pandemic (H1N1) 2009 in pregnant Japanese women in Hokkaido // O Obstet Gynaecol Res 2011 Sep 28 doi: 10.1111/j. 1447-0756.2011.01644x.
12. WHO EMRO – Pandemic (H1N1) 2009 Week 1–7 February 2010.
13. WHO Mongolia – Other news – H1N1 Mongolia update for November 4, 2009.

ROLE OF PANDEMIC INFLUENZA A (H1N1) 2009 IN THE GLOBAL INCREASE IN MATERNAL MORTALITY

A.P. Milovanov, I.M. Rasstrigina, E.A. Pomazanova

The first cases of the disease caused by a new influenza A (H1N1) virus were reported in Mexico. On August 15, 2009, the World Health Organization officially declared the start of a pandemic influenza with mutation capacity, rapid replication within epithelial cells of the upper respiratory tract and lungs as well as severe complications. Pregnant women were particularly at risk. The pandemic was spreading rapidly throughout United States, Brazil, Colombia, the Middle East and Asia, and then there has been an explosive increase of influenza in European countries, former Soviet republics and Russia. Despite ongoing epidemiological and prophylactic measures, influenza A (H1N1) pandemic significantly increased maternal mortality. Thus, the number of deaths of pregnant women with virologically confirmed diagnosis of influenza A (H1N1) was 75 in USA, 131 in Ukraine, 116 in Russia. Despite the lack of the similar total number of maternal deaths in the world, there is strong evidence that influenza A (H1N1) pandemic led to the substantial increase in global maternal mortality ratio. During a pandemic, all countries have fought in different ways with the spread of the A (H1N1) virus and its negative impact on the population. On August 10, 2010, the World Health Organization announced that the H1N1 influenza virus moved into the post-pandemic period. Both a positive experience and the inevitable errors incurred during development and implementation of anti-epidemic measures must be remembered.

Key words: pandemic influenza A (H1N1), the spread in the world, maternal mortality

Информация об авторах

Милованов Андрей Петрович – докт. мед. наук, профессор, заведующий лабораторией патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: 8 (499) 129-5501. E-mail: a_p_milovanov@mail.ru

Расстригина Ирина Михайловна – научный сотрудник лаборатории патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: 8 962 933-0270. E-mail: runa.77@mail.ru

Помазанова Елена Анатольевна – младший научный сотрудник лаборатории патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: 8 916 602 97-13. E-mail: pathologya@rambler.ru

Материал поступил в редакцию 20 августа 2012 года.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

Журнал издается Научно-исследовательским институтом морфологии человека РАМН.

Научные статьи, публикуемые в журнале «Клиническая и экспериментальная морфология», отражают круг интересов в области медицины и биологии, в частности клинической и экспериментальной морфологии, патологии.

В журнале могут быть опубликованы оригинальные исследования, новые методы, обзоры и дискуссии, а также краткие сообщения, случаи из практики и хроники.

Все статьи, представляемые к публикации, рецензируются в обязательно порядке.

Редакция журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» предъявляет следующие требования к оформлению статей и других материалов, представляемых для публикации:

1. Статья должна иметь визу руководителя и сопроводительное письмо учреждения (с круглой печатью), а в необходимых случаях – акт экспертизы.

2. Статья (текст, иллюстрации, таблицы, подписи под рисунками, список литературы и реферат) направляется в двух экземплярах компьютерного текста, напечатанного через 1,5 интервала с полями по 2,5 см с каждой стороны. Максимальный объем оригинальных статей не должен превышать 7–8 страниц (включая иллюстрации, таблицы и список литературы), кратких сообщений – 3–4 страницы, обзорных и дискуссионных статей – 10–12 страниц.

3. В начале страницы указываются ключевые слова, название статьи, затем инициалы и фамилия автора (авторов), ниже – полное название учреждения и город. Перед началом текста статьи печатается краткий реферат, размером 1/4 машинописной страницы, в котором отражается основное содержание работы. На отдельной странице необходимо представить перевод названия статьи, фамилии авторов, реферата и ключевых слов на английский язык.

Образец первой страницы:

Ключевые слова

ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОДИНАМИКИ У БОЛЬНЫХ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

И.И. Иванов, М.П. Николаев

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»,
Москва

4. В тексте оригинальных статей должны быть выделены следующие рубрики: «Материал и методы», «Результаты» «Обсуждение», «Выводы» или «Заключение».

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

6. Кроме общепринятых сокращений единиц измерения, физических, химических и математических величин и терминов (например, РНК), допускаются аббревиатуры словосочетаний, часто повторяющихся в тексте (не более 4 аббревиатур). Все вводимые автором буквенные обозначения и аббревиатуры должны быть расшифрованы в тексте при их первом упоминании. Не допускаются сокращения простых слов, даже если они часто повторяются. Единицы измерения даются по системе СИ.

7. Объем иллюстративного материала (рисунки, чертежи, диаграммы, фотографии) должен быть минимальным. Оба экземпляра иллюстраций должны быть идентичны (по качеству, увеличению и размерам). Фотографии должны быть контрастными, напечатанными на глянцевой бумаге, на обороте каждой ставится номер, фамилия автора и пометки «верх» и «низ». Рисунки, чертежи, диаграммы должны быть выполнены тушью.

8. Статьи с иллюстрациями низкого качества возвращаются.

Место расположения рисунков и таблиц обозначается на полях, в тексте статьи на них дается ссылка.

Подписи к рисункам и фотографиям выполняются на отдельном листе.

9. Таблицы должны быть наглядными, озаглавленными и пронумерованными, заголовки граф – соответствовать их содержанию, цифры в таблицах – соответствовать цифрам в тексте.

10. Цитаты, приводимые в статье, должны быть тщательно выверены и заверены подписью автора на полях. В ссылке обязательно нужно указать источник (автор, название, издание, том, год, выпуск, страница).

11. Библиографические ссылки в тексте статьи даются **в квадратных скобках** номерами в соответствии с приставленным списком литературы.

12. Библиография должна содержать помимо основополагающих работ публикации за последние 5 лет. **В оригинальных статьях цитируется не более 15–20 источников, в переводных статьях и обзорах – не более 50.** Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

Список литературы должен быть напечатан на отдельном листе.

13. При представлении в печать экспериментальных работ авторы должны руководствоваться Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Кроме вида, пола и количества использованных животных, авторы обязательно должны указывать применявшиеся при проведении болезненных процедур методы обезболивания и методы умерщвления животных. При отсутствии этих данных работы приниматься не будут.

14. Список литературы оформляется в соответствии с ГОСТ 7.1-2003; ГОСТ 7.82-2001:

- а) библиографические источники должны быть расположены в алфавитном порядке и пронумерованы (сначала отечественные, затем иностранные), ссылки на них в тексте статьи приводятся в квадратных скобках;
- б) если цитируются несколько работ одного автора, их нужно указывать по возрастанию годов издания;
- в) статьи (монографии), написанные коллективом авторов от 1 до 3, помещаются в списке литературы по фамилии 1-го автора, затем дается название работы, ставится косая черта и приводится имя, отчество, фамилия всех авторов (для статьи: ФИО 1-го автора. Название / И.О.Ф. авторов // Название журнала. – Год. – Т., № – С.; для монографии: ФИО 1-го автора. Название: в 3 т.: пер. с англ. / ИОФ авторов; под ред. ИОФ редактора. – Место издания: Издательство, Год. – кол-во с.).
- г) статьи (монографии), написанные коллективом авторов (более 3 человек), помещаются в списке литературы по названию работы, затем ставится одна косая черт и приводится имя, отчество, фамилии первого автора с добавлением слов [и др.], для иностр.-[et al.];
- д) для монографий необходимо указать место издания, издательство, год и кол-во страниц; для периодических и продолжающихся изданий – полное название источника, год, том, номер (выпуск), страницы (от и до);
- е) в монографиях и сборниках при наличии двух мест издания приводят оба и отделяют их друг от друга точкой с запятой (М.; Л., Л.; Новосибирск);

Образец оформления литературы:

Шестак Н. Ревматический кардит / Н. Шестак // *Врач.* – 2004. – № 4. – С. 5-9.

Маринзук В.Л. Психологические основы формирования профессионально значимых качеств: автореф. дис. ... д-ра психол. наук / В.Л. Маринзук. – М., 2003. – 35 с.

Леорда А.И. Оксигеназы биологических мембран / А.И. Леорда; Ин-т физиологии АН Респ. Молдова. – Кишинев, 1998. – 7 с. – Деп. в ВИНТИ 30.12.98, № 3980-98.

Лудевит Р. Острые отравления: пер. с нем. / Р. Лудевит, К. Лос; под ред. Е.В. Гембицкого. – М.: Медицина, 1986. – 560с.

Губарев Ю.А. Проблемы боевого стресса в авиации / Ю.А. Губарев, И.Б. Ушаков, С.И. Ромасюк // *Боевой стресс: сб. науч. тр.* / под общ. ред. И.Б. Ушакова, Ю.С. Голова. – М.: Воениздат, 2002. – С. 7–11.

Руководство по урологии: в 3 т. / В.П. Авдомин [и др.]; под ред. Н.А. Лопаткина. – М.: Медицина, 1988. – Т. 2. – 786 с.

15. Статья должна быть подписана всеми авторами. В конце статьи следует указать полный почтовый адрес автора, его телефон, электронную почту, фамилию, имя, отчество полностью.

Статьи, отосланные авторам для исправления, должны быть возвращены в редакцию не позднее, чем через месяц после получения. При возвращении статьи в более поздние сроки меняются дата ее поступления в редакцию и сроки публикации.

16. Нельзя направлять в редакцию работы, ранее напечатанные или посланные в другие журналы.

17. К тексту необходимо приложить электронную копию статьи и всех прилагающихся материалов (иллюстрации, рисунки, фото) на носителях CD-R, CD-RW в формате Microsoft Word с расширением doc. или RTF на дискете 3,5", или. Шрифт Times New Roman, 14 пунктов. Формат абзацев: полуторный интервал, красная строка каждого абзаца начинается отступом в 0,75 см. Формат заглавия: название работы – прописными буквами полужирным шрифтом; имена авторов (инициалы, фамилия) – курсивом; полное название организации (с указанием города) – обычным шрифтом. Иллюстративный материал представляется в формате рисунков TIFF.

18. К статье обязательно прикладывается полная информация об авторах (соавторах) статьи, включающая ученую степень, ученое звание, должность и место работы, адрес электронной почты автора и адрес учреждения, в котором работает автор (соавторы.)

19. Редакция оставляет за собой право корректировать и сокращать тексты материалов, представляемых к публикации. Статьи, не принятые к печати, не возвращаются.

Адрес редакции: 117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 3 Редакция журнала «Клиническая и экспериментальная морфология»

Дополнительную информацию можно узнать по телефону +7(903)641-82-85 к.м.н. *Мнихович Максим Валерьевич* (mnichmaxim@yandex.ru)