

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

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

ISSN 2226-5988

№ 4/2012

«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*

Д.б.н. *А.М. Ковригина*

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

- Н.В. Яглова, В.В. Яглов*
Биология секреции тучных клеток
- 4 *N.V. Yaglova, V.V. Yaglov*
Biology of mast cell secretion

КЛИНИЧЕСКАЯ МОРФОЛОГИЯ CLINICAL MORPHOLOGY

- Н.В. Лобанова, Д.Л. Ротин, Г.Л. Кобяков,
Л.В. Шишкина, О.В. Паклина,
М.А. Степанян, Е.Р. Ветлова*
Клинико-прогностическое значение
иммуногистохимических маркеров рака
молочной железы в метастазах в головной мозг
- 11 *N.V. Lobanova, D.L. Rotin, G.L. Kobaykov,
L.V. Shishkina, O.V. Paklina, M.A. Stepanyan,
E.R. Vetlova*
Clinical predictive value of the immunohistochemical
markers of breast cancer in brain metastases
- Е.М. Непомнящая, О.В.Тарнопольская,
Х.Г. Мамулян*
Прижизненная флуориметрия клеток
перстневидноклеточного рака желудка
с применением флуорохромов АНС и ДСМ
- 18 *E.M. Nepomnyaschaya, O.V. Tarnopolskaya,
H.G. Mamulyan*
In vivo fluorimetry of signet ring cell carcinoma of the
stomach with fluorescent probes ANS and DSM
- А.Л. Черняев, Ю.С. Березовский,
А.А. Сердюк, Л.М. Михалева, М.В. Самсонова,
К.С. Войтковская*
Гранулематоз Вегенера у молодых пациентов:
два клинических наблюдения
- 23 *A.L. Chernyaev, Yu.S. Berezovskiy, A.A. Serdyuk,
L.M. Mikhaleva, M.V. Samsonova, K.S. Voytkovskaya*
Wegener's granulomatosis in young patients:
two clinical observations

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

- С.В. Буравков, Т.А. Белоусова, В.П. Черников*
Применение метода спектроскопии
характеристических потерь энергии электронов
в биологии и медицине
- 31 *S.V. Buravkov, T.A. Belousova, V.P. Chernikov*
Application of electron energy loss spectroscopy
method in biology and medicine
- Е.С. Половьян, Р.А. Москаленко, Н.Д. Чемич,
А.Н. Романюк, С.Д. Бончев*
Морфологические изменения печени
при экспериментальной острой кишечной
инфекции в условиях терапии
коллоидным наноаквахелатом серебра
- 37 *E.S. Polovyan, R.A. Moskalenko, M.D. Chemych,
A.M. Romanyuk, S.D. Bonchev*
Morphological changes in the liver during
experimental acute intestinal infection
under therapy with colloidal nano silver water

- И.В. Арутюнян, А.В. Макаров, Т.Х. Фатхудинов, А.В. Ельчанинов, Д.В. Гольдштейн, Г.Б. Большакова*
Особенности первичной культуры клеток из амниотической жидкости крыс на поздних сроках гестации **42** *I.V. Arutyunyan, A.V. Makarov, T.Kh. Fathudinov, A.V. Elchaninov, D.V. Goldstein, G.B. Bolshakova*
Characteristics of cultured primary cells from rat amniotic fluid in late pregnancy
- О.В. Макарова, Л.П. Михайлова, Е.И. Сидорова, А.С. Сладкопевцев, Е.В. Никонова*
Сравнительная структурно-функциональная характеристика легких крыс Вистар и Спрейг-Доули **49** *O.V. Makarova, L.P. Mikhailova, E.I. Sidorova, A.S. Sladkoptsev, E.V. Nikonova*
Comparative structural and functional characteristics of the lungs of Wistar and Sprague-Dawley rats
- С.А. Минаева, А.В. Васильев, Т.Б. Бухарова, Е.Н. Антонов, Г.Б. Большакова, Д.В. Гольдштейн, В.К. Попов, А.В. Волков*
Использование спектроскопии комбинационного рассеяния для изучения минерализации костных регенератов **53** *S.A. Minaeva, A.V. Vasilyev, T.B. Bukharova, E.N. Antonov, G.B. Bolshakova, D.V. Goldstein, V.K. Popov, A.V. Volkov*
Application of raman scattering spectroscopy for study of the mineralization of bone regenerates

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

- А.В. Ельчанинов, Т.Х. Фатхудинов, А.В. Макаров, В.В. Глинкина, Г.Б. Большакова*
Регенерация печени млекопитающих **57** *A.V. Elchaninov, T.Kh. Fatkhudinov, A.V. Makarov, V.V. Glinkina, G.B. Bolshakova*
Mammalian liver regeneration
- М.В. Кондашевская*
Роль гепарина в иммунных, воспалительных и репаративных процессах **62** *M.V. Kondashevskaya*
The role of heparin in immune processes, inflammation and reparation
- А.П. Милованов, И.М. Расстригина, Т.В. Фокина*
Роль металлопротеиназ типа 2 и 9 при физиологической и осложненной беременности **70** *A.P. Milovanov, I.M. Rasstrigina, T.V. Fokina*
The role of matrix metalloproteinase -2 and -9 in physiological and pathological pregnancy

ИНФОРМАЦИЯ INFORMATION

- 24-й Европейский конгресс патологов **75** 24th European Congress of Pathology
- V съезд Российского общества патологоанатомов **77** V Congress of the Russian Society of Pathologists

БИОЛОГИЯ СЕКРЕЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

Н.В. Яглова, В.В. Яглов

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

В статье освещены современные представления о секреции тучных клеток, морфологических методах ее оценки и об участии медиаторов тучных клеток в регуляции функций организма. Авторами намечены дальнейшие направления исследований цитофизиологии тучных клеток.

Ключевые слова: тучные клетки, секреция, дегрануляция, медиаторы

Тучные клетки (ТК) – уникальный клеточный элемент рыхлой соединительной ткани. Они располагаются преимущественно по ходу кровеносных, лимфатических сосудов и нервных стволов, вблизи желез, а также под эпителиальными пластами кожи и слизистых оболочек, которые подвергаются антигенным воздействиям [11]. ТК выделяют широкий набор биологически активных веществ (БАВ) – медиаторов [32], благодаря которым принимают участие в реализации защитных реакций гомеостатического типа: врожденном и приобретенном иммунитете [17], трофике тканей [6, 9], аллергических реакциях [20], воспалении [32], склерозе [22], адаптации организмов к действию вредных факторов окружающей среды антропогенного происхождения [14] и т.д. Изучению биологии ТК посвящено много исследований, однако, несмотря на это, немало ее аспектов еще недостаточно изучено. В первую очередь это касается секреции ТК. Данный аспект биологии ТК и будет предметом рассмотрения в этой статье с целью обобщения современных представлений о секреции ТК и определения наиболее перспективных направлений в ее дальнейшем изучении.

Согласно современным представлениям, ТК образуются в костном мозге и других гемопоэтических тканях. Источником их развития является плюрипотентная гемопоэтическая клетка с иммунофенотипом CD34+. Образовавшиеся в кроветворных органах клетки-предшественники ТК выходят в кровотоки. Для них характерны фенотип CD34+, FcεR1-, c-kit+ [33]. Считают, что клетки-предшественники морфологическими методами не выявляются, поскольку в них еще нет секреторных гранул – основного структурного показателя дифференцированной ТК [33]. Зрелые секреторные гранулы ТК окрашиваются сафранином и проявляют метакромагические свойства при окраске толуидиновым синим. ТК имеют овальную или оторостчатую форму. В цитоплазме ТК содержатся ядро и умеренно развитый набор органелл. Среди них располагаются секреторные гранулы. Каждая гранула окружена мембраной и заполнена осмиофильным веществом разной электронной плотности. Структура осмио-

фильного содержимого секреторной гранулы имеет видовые особенности строения [27]. Выделяемые ТК БАВ подразделяют на две группы – преформированные медиаторы, содержащиеся в секреторных гранулах ТК, и медиаторы, образующиеся при действии некоторых триггеров, то есть *de novo* синтезируемые медиаторы, не входящие в состав гранул. В таблице 1 приведены основные данные о составе преформированных медиаторов и их эффектах, а в таблице 2 дана характеристика *de novo* синтезируемых медиаторов.

Секреторные процессы в ТК недостаточно изучены. Это объясняется тем, что у исследователей до настоящего времени нет единой методологии изучения секреции как фундаментального процесса, лежащего в основе жизнедеятельности организма. Большинство исследователей под секрецией понимают в буквальном смысле этого термина только процесс выделения секреторного продукта за пределы железистой клетки, однако, согласно современным представлениям, секреция представляет собой биологический процесс, который включает в себя последовательно текущие этапы (фазы): поступление исходных продуктов для образования секрета, его продукцию и оформление в секреторные гранулы, их накопление в клетке (для преформированных секретов) и выделение секрета за ее пределы [2, 8, 10, 12, 13]. Исходные продукты для образования БАВ ТК – аминокислоты, мономеры углеводов, жирные кислоты и т.д. Особенностью ТК является способность поглощать избытки биогенных аминов из матрикса рыхлой соединительной ткани и повторно накапливать их в секреторных гранулах [1]. Из этого следует, что начальная фаза секреторного цикла ТК включает в себя два процесса: поступление исходных продуктов для образования БАВ и захват готовых биогенных аминов, содержащихся в межклеточном веществе соединительной ткани, с целью их утилизации и повторного использования. В фазе образования секреторных продуктов принимают участие рибосомы и каналцы эндоплазматической сети. Образовавшиеся БАВ с помощью везикулярного транспорта доставляются в комплекс Гольджи. В нем осуществляются их

Таблица 1

Преформированные медиаторы тучных клеток и их эффекты (по Т.С. Theoharides, et al. [32] с изменениями и дополнениями)

Медиаторы	Главные эффекты
Биогенные амины	
Гистамин	Вазодилатация, ангиогенез, митогенез, боль
Серотонин	Вазоконстрикция, боль
Хемокины	
Интерлейкин-8 (CXCL8); моноцитарные хемоаттрактантные белки MCP-1 (CCL2), MCP3 (CCL7), MCP4; RANTES (CCL5); эотаксин-1(CCL11)	Хемоаттракция и тканевая инфильтрация
Ферменты	
Арилсульфатазы	Гидролиз липидов и протеогликанов
Карбоксипептидаза А	Процессинг пептидов
Химаза	Повреждение ткани, боль, синтез ангиотензина II
Киногеназы	Синтез вазодилаторных киназ
Фосфолипазы	Образование арахидоновой кислоты
Триптаза	Повреждение ткани, активация PAR, воспаление, боль
Металлопротеиназы матрикса	Повреждение ткани, модификация цитокинов/хемокинов
Пептиды	
Ангиогенин	Неоваскуляризация
Кортикотропин-рилизинг гормон	Воспаление, вазодилатация
Эндорфины	Аналгезия
Кинины (брадикинин)	Воспаление, боль, вазодилатация
Лептин	Провоспалительное действие
Ренин	Синтезы ангиотензина
Соматостатин	Подавление воспаления
Субстанция Р	Воспаление, боль
Урокортин	Воспаление, вазодилатация
Фактор роста эндотелия сосудов	Новообразование сосудов, вазодилатация
ВИП	Вазодилатация, дегрануляция тучной клетки
Хондроитин сульфат	Синтез хряща, подавление воспаления
Протеогликаны	
Гепарин	Образование сосудов, фактор стабилизации роста нервов
Гиалурионовая кислота	Образование межклеточного вещества соединительной ткани, фактор стабилизации роста нервов

Таблица 2

De novo синтезируемые медиаторы и их эффекты (по Т.С. Theoharides, et al. [32] с изменениями и дополнениями)

Медиаторы	Главные эффекты
Оксид азота	Вазодилатация
Цитокины	
Интерлейкины-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 13, 16, 18	Воспаление, миграция лейкоцитов, боль
Интерфероны-α, β, γ; макрофагальный ингибирующий белок; фактор некроза опухоли-α; макрофагальный белок воспаления 1α; моноцитарный хемоаттрактантный белок	Воспаление, пролиферация, активация лейкоцитов
Факторы роста	
Фактор стволовых клеток (SCF); колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-SCF); фактор роста фибробластов β (β-FGF); нейротрофин-3; фактор роста нервов NGF; тромбоцитарный фактор роста (PDGF); трансформирующий фактор роста-β (TGF-β); фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	Рост различных клеток
Метаболиты фосфолипидов	
Лейкотриен В4	Хемотаксис лейкоцитов
Лейкотриен С4	Вазоконстрикция, боль
Фактор активации тромбоцитов	Активация тромбоцитов, вазодилатация
Простогландин D2	Бронхоконстрикция, боль

адресная сортировка и модификация. Комплекс Гольджи ТК осуществляет полимеризацию углеводов и их соединение с белками.

В первую очередь это касается образования гепарина. Гепарин – кислый сульфатированный глюкозаминогликан. Сульфатные группы придают ему сильный отрицательный заряд и средство с основными красителями. Гепарин у крыс составляет 25% сухой массы содержимого секреторной гранулы ТК [11]. В секреторной грануле он связывается с белком, образуя гепариновый протеогликан. Благодаря отрицательному заряду

и структуре молекулы гепарин образует матрикс секреторной гранулы. К нему с помощью ионных связей прикрепляются биогенные амины, обладающие основными свойствами. В секреторной грануле с гепарином связаны также нейтральные протеазы и некоторые лизосомальные ферменты. Образовавшиеся секреторные продукты с помощью мембран комплекса Гольджи оформляются в секреторные гранулы, в которых завершается процесс конденсации (уплотнения) их содержимого. Образовавшиеся зрелые секреторные гранулы постепенно заполняют цитоплазму ТК, и она переходит в следующую фазу – фазу накопления секреторных гранул, создавая резервный запас БАВ. За фазой накопления секреторных гранул следует фаза выделения секреторного продукта. Выделение секретов ТК зависит от набора рецепторов, воспринимающих информацию о состоянии внутренней среды, и триггеров, вызывающих выделение БАВ.

Триггерами для ТК являются различные по химической структуре и биологическим функциям вещества – рилизинг-факторы, гормоны, интерлейкины, ферменты, активные формы кислорода. Ингибиторами выделения БАВ выступают хондроитин, гепарин, интерлейкин-10, оксид азота, трансформирующий фактор роста- β , и т.д. [32]. Различают два способа, приводящих к выделению медиаторов ТК, – иммунный и неиммунный [15].

Иммунный механизм обусловлен попаданием в организм антигенов, которые, соединяясь со специфическими иммуноглобулинами, фиксированными на IgE-рецепторах плазмолеммы ТК, формируют комплекс антиген–антитело. Его образование вызывает выделение БАВ ТК [23]. Характерно, что при иммунном механизме выделения преформированных секреторных продуктов выделяются и другие *de novo* образующиеся медиаторы аллергической реакции атопического типа – медленно действующее вещество анафилаксии и хемокины (факторы привлечения нейтрофилов и эозинофилов).

Завершающая фаза секреторного цикла ТК – это фаза выделения преформированных БАВ. Она получила название «дегрануляция». Описано три способа дегрануляции – постепенная дегрануляция (*piecemeal degranulation*), экзоцитоз и быстрая дегрануляция (*rapid degranulation*). В функциональном отношении различные способы дегрануляции ТК рассматривают как механизмы регулируемого выделения медиаторов, обеспечивающих адекватное их поступление во внутреннюю среду организма в зависимости от его функционального состояния [25, 27, 31]. Предпосылками открытия постепенной дегрануляции железистыми клетками послужили наблюдения за фазой выделения катехоламинов хромоаффинными клетками мозгового вещества надпочечников [12, 34]. Было показано, что перед вступлением хромоаффинных клеток в фазу выделения катехоламинов в их цитоплазме среди секреторных гранул появляются мелкие везикулы и вакуоли, после чего из набухших секреторных гранул, теряющих свои четкие контуры, осуществляется выделение кате-

холаминов. Эта фаза секреторного цикла хромоаффинной клетки мозгового вещества надпочечников была названа фазой оводнения секреторных гранул [12, 13].

В чем же заключается биологическая суть оводнения секреторных гранул хромоаффинных клеток, выделяющих биогенные амины – адреналин и норадреналин? Разгадка этого механизма была найдена в работах группы шведских ученых [26, 29, 30]. Установлено, что в состав содержимого секреторной гранулы хромоаффинной клетки помимо катехоламинов входят аденозинтрифосфат (АТФ), неорганические фосфаты и водорастворимый белок. Эти компоненты, соединяясь с помощью ионных связей, фиксируют катехоламины и препятствуют их выделению из секреторных гранул, однако такая связь катехоламинов, АТФ, неорганических фосфатов и водорастворимого белка очень нестойкая. В опытах с изолированными секреторными гранулами было показано, что помещение их в гипотонические растворы вызывает нарушение ионной связи между катехоламинами и АТФ, в результате чего эти вещества свободно выделяются из них в культуральную среду [26]. Позже фаза оводнения была описана в секреторном цикле слизисто-белковых клеток экзокринных желез верхнечелюстной пазухи [5]. Это позволяет считать данный процесс общим предшествующим механизмом, благодаря которому осуществляется дезинтеграция содержимого секреторных гранул эндокринных и экзокринных клеток с последующим выделением из них секретов.

Из сказанного выше можно сделать заключение, что оводнение секреторных гранул, с одной стороны, является ключевым механизмом постепенной дегрануляции железистых клеток, выделяющих секреты, а с другой – по мнению некоторых исследователей [3, 25], набухание секреторных гранул осуществляет гидратацию их содержимого и повышение гидростатического давления внутри секреторной гранулы, необходимые для выделения секрета механизмом экзоцитоза. Таким образом, есть основания рассматривать постепенную дегрануляцию и экзоцитоз как разные адаптивные секреторные механизмы, регулирующие адекватное выделение БАВ в зависимости от изменения физиологических потребностей организма.

Ультроструктурные проявления постепенной дегрануляции секреторных гранул, по мнению ряда авторов, реализуются механизмом регулируемой везикулопосредованной дегрануляции [27, 34]. Этот процесс начинается с оводнения и набухания секреторной гранулы с последующей дезинтеграцией ее содержимого. Затем от мембраны, окружающей содержимое секреторной гранулы, отделяются мелкие везикулы, заполненные секреторным продуктом. Далее они транспортируются к плазмолемме клетки, и путем микроэкзоцитоза секрет выделяется за ее пределы. Потом везикулы, заполненные жидким содержимым матрикса соединительной ткани, возвращаются к оводненной секреторной грануле и выделяют в нее свое содержи-

мое, то есть этот способ постепенной дегрануляции функционирует по челночному принципу [25]. Однако данный механизм, по-видимому, является не единственным механизмом постепенной дегрануляции ТК.

В наших опытах [16, 18] по изучению ультраструктурных показателей секреции ТК щитовидной железы при введении крысам липополисахарида (ЛПС) был обнаружен молекулярный способ постепенной дегрануляции. Ультраструктурно в нем выделен ряд стадий, первой из которых является оводнение секреторных гранул. Оно проявляется сначала образованием вокруг секреторных гранул осмиофобных везикул, не окруженных мембраной, приводящих в конечном счете к их набуханию. Далее следует растворение плотного содержимого гранул, что проявляется в виде его диспергирования и последующего выделения в цитоплазму. В процессе выделения осмиофильность содержимого секреторной гранулы постепенно снижается. При полном его выделении секреторная гранула превращается в гидропическую вакуоль [18].

Другим способом выделения преформированных продуктов из секреторных гранул ТК является экзоцитоз [31], при котором оводненные секреторные гранулы перемещаются к плазмолемме ТК в область поросомы. Поросомы – это постоянные супрамолекулярные липопротеиновые структуры плазмолеммы, с которой в процессе выделения секрета мимолетно стыкуются и сливаются окруженные мембранами секреторные гранулы. Образуется пора, через которую выделяется содержимое секреторной гранулы. Это обеспечивается повышением внутривезикулярного давления, реализующегося активным транспортом воды через водные каналы мембран секреторных гранул [3]. Данный способ выделения экзоцитозом через поросому получил название kiss and run (дословно – поцеловались и разбежались) [24]. В некоторых клетках этот способ выделения обеспечивает частичное многократное выделение секрета из секреторной гранулы, однако ряд исследователей полагают, что через поросому возможно и полное выделение содержимого секреторной гранулы.

Третий способ выделения преформированных продуктов ТК – быстрая дегрануляция. Она обусловлена выбросом целых секреторных гранул в матрикс соединительной ткани и часто наблюдается на светооптическом уровне. Такой же механизм выделения специфических гранул присущ эозинофилам крови.

Судьба выделенных гранул до настоящего времени остается не ясной. Как реализуется столь большой объем выделенных БАВ? В этом отношении заслуживают пристального внимания эксперименты группы исследователей с целью выяснения внеклеточной функции гранул эозинофилов крови человека. Было установлено, что изолированные гранулы эозинофилов здоровых людей способны к автономному внеклеточному функ-

ционированию, экспрессируя мембранные рецепторы, связывающиеся с цитокинами, интерфероном-гамма, также сопряженные с G-белками, взаимодействующие с эотаксином. Осуществляемая эозинофильными гранулами реакция вызывает активацию сигнальных путей внутри гранул, инициирующую их секреторную активность [28], то есть происходит регулируемое выделение БАВ из гранул в зависимости от их потребности организмом. Исходя из принципов блоковой системы организации функций организма [7], можно предполагать, что выделяемые в ходе быстрой дегрануляции секреторные гранулы ТК также способны внеклеточно функционировать как регулируемые секреторные образования, но такая гипотетическая аналогия с эозинофильными гранулами требует дальнейших исследований и, по сути, может составить новое направление в изучении гормональной регуляции функций организма. В понимании секреции ТК остаются еще мало исследованными структурные основы выделения и механизмы регуляции *de novo* образованных медиаторов.

Все сказанное свидетельствует о том, что ТК обладает широкими возможностями адаптивно выделять нужное количество БАВ в зависимости от потребности организма, включая механизмы регулируемой постепенной дегрануляции, экзоцитоза и быстрой дегрануляции (рис. 1). При проведении морфологических исследований функциональной активности ТК на светооптическом уровне важно соотносить структурные показатели с механизмами секреции.

Наш опыт показывает, что наиболее информативными показателями этого процесса являются средний гистохимический коэффициент (СГК), индекс дегрануляции и соотношение степеней дегрануляции [16]. Определение этих параметров позволяет охарактеризовать как постепенную дегрануляцию, так и быструю дегрануляцию в динамике. Определение СГК по G. Astaldi и L. Verga, ранее рассматриваемого как показатель насыщенности ТК секреторными продуктами [21], как показателя постепенной дегрануляции было предложено Н.В. Ягловой [18]. В ее модификации СГК высчитывается как сумма доли очень темных ТК × 3, доли темных клеток × 2, доли светлых

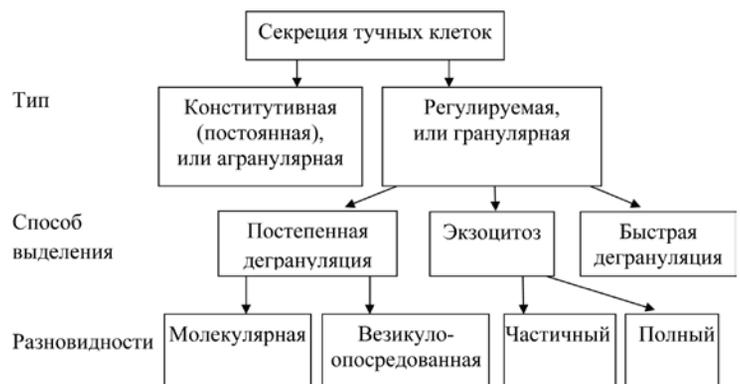


Рис. 1. Типы секреции тучных клеток

клеток $\times 1$ и доли очень светлых клеток $\times 0$. Таким образом, максимальное значение СГК, соответствующее максимальному содержанию секреторного материала в ТК, равно 3, а минимальное – 0.

Определение темных и светлых ТК при окраске их толуидиновым синим основано на методе, предложенном Д.П. Линдер и соавт. [4]. Комплексная оценка изменения количества выявляемых ТК, их СГК, индекса дегрануляции и степеней дегрануляции (слабой, умеренной, сильной) [4] позволяет судить об интенсивности секреции и преобладании того или иного способа выделения секрета ТК в эксперименте. Например, при введении липополисахарида через 1 час в щитовидной железе отмечалось значительное снижение СГК и индекса дегрануляции ТК при неизменном количестве выявляемых ТК в единице площади гистологического среза. Эти данные свидетельствуют, что воздействие ЛПС вызывало усиленное выделение секрета способом

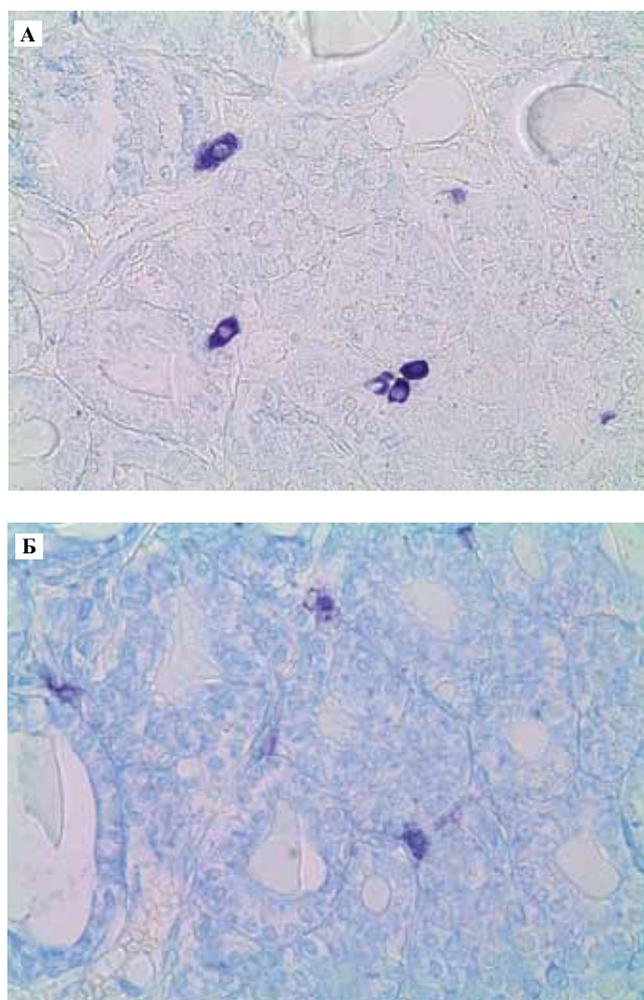


Рис. 2. Тучные клетки щитовидной железы интактной крысы (А) и через 1 час после введения липополисахарида (Б). А – насыщенность тучных клеток секреторным материалом высокая (преобладают темные и очень темные клетки); Б – насыщенность тучных клеток секреторным материалом понижена. Окраска толуидиновым синим, $\times 400$.

постепенной дегрануляции (рис. 2). Исследование с помощью трансмиссионной электронной микроскопии подтвердило эти данные, выявив признаки оводнения секреторных гранул, растворения их содержимого и выделения в цитоплазму, то есть функционирования молекулярного способа выделения секрета ТК (рис. 3). Дальнейшие исследования по корреляции светооптических и электронно-микроскопических показателей секреции ТК могут расширить методические подходы к оценке функциональной деятельности ТК в норме и патологии.

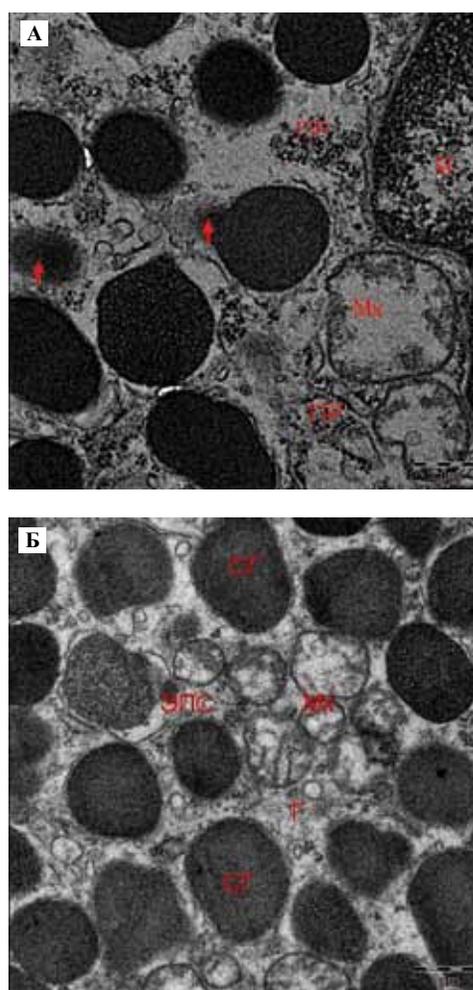


Рис. 3. Ультраструктура тучных клеток щитовидной железы интактной крысы (А) и через 1 час после введения липополисахарида (Б).

А – секреторные гранулы (СГ) заполнены осмиофильным содержимым высокой электронной плотности. Некоторые гранулы окружены канальцами агранулярной ЭПС. Гиалоплазма (Г) без изменений. В митохондриях (Мх) хорошо развиты кристы.

Б – по периферии секреторных гранул располагаются везикулы, заполненные осмиофильным содержимым. В некоторых секреторных гранулах наблюдаются растворение содержимого и выход его из гранулы в цитоплазму (указано стрелкой). В цитоплазме множественные полирибосомы (ПР). Деструктивные изменения крист митохондрий (Мх)

Литература

1. *Гордон Д.С.* Тучные клетки в эксперименте / Д.С. Гордон. Чебоксары, 1982.
2. *Григорьева Т.А.* Морфологические основы секреторной деятельности экзокринных и эндокринных железистых клеток / Т.А. Григорьева, А.М. Астахова, В.В. Яглов // Железы, их гистофизиология и нервная регуляция: сб. трудов Московского общества испытателей природы / Под ред. О.В. Волковой М.: Наука, 1971. С. 15–30.
3. *Лазришвили И.Л.* Поросомы: новая органелла и универсальный секреторный механизм клетки / И.Л. Лазришвили, М.Г. Жвания // Цитология. 2010. Т. 52. № 7. С. 534–536.
4. Морфометрический анализ популяции тучных клеток / Д.П. Линднер и др. // Архив патологии. 1980. Т. 42. № 6. С. 60–64.
5. *Пискунов С.З.* Гистофизиология слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи / С.З. Пискунов // Железы, их гистофизиология и нервная регуляция: сб. трудов Московского общества испытателей природы / Под ред. О.В. Волковой. М.: Наука, 1971. С. 10–114.
6. *Проценко В.А.* Тканевые базофилы и базофильные гранулоциты крови / В.А. Проценко, С.И. Шпак, С.М. Доценко. М.: Медицина, 1987.
7. *Уголев А.М.* Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций / А.М. Уголев Л.: Наука, 1985.
8. *Хириш Г.* О принципе «конвейера» в выработке ферментов экзокринными клетками поджелудочной железы / Г. Хириш: в кн. Функциональная морфология клетки. М.: Иностранная литература, 1963. С. 167–184.
9. *Швалев В.Н.* Развитие морфоклинических представлений о нейротканевых связях: роль тучных клеток в нервной трофике / В.Н. Швалев // Казанский медицинский журнал. 2010. Т. 1. № 5. С. 87–689.
10. *Шубникова Е.А.* Цитология и цитофизиология секреторного процесса / Е.А. Шубникова. М.: Издательство МГУ, 1967.
11. *Юрина Н.А.* Функциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани / Н.А. Юрина, А.И. Радостина. М.: Издательство Университета дружбы народов, 1990.
12. *Яглов В.В.* Цитологическое и гистохимическое исследование секреторной деятельности хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечника: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.В. Яглов. М., 1966. 15 с.
13. *Яглов В.В.* Цитофизиология хромоаффинной клетки мозгового вещества надпочечника / В.В. Яглов // Железы, их гистофизиология и нервная регуляция: сб. трудов Московского общества испытателей природы / Под ред. О.В. Волковой. М.: Наука, 1971. С. 130–138.
14. *Яглов В.В.* Морфофункциональные показатели влияния пиракрила на органы женской половой системы крыс / В.В. Яглов, Н.И. Шеина, М.А. Фесенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1990. № 5. С. 508–510.
15. *Яглов В.В.* Роль тканевых базофилов в патогенезе пневмококиозов / В.В. Яглов, Й. Гурих, Р. Голуша // Гигиена труда и профессиональные заболевания. 1990. № 10. С. 24–31.
16. *Яглова Н.В.* Цитофизиологические особенности популяции тучных клеток щитовидной железы при воздействии липополисахарида / Н.В. Яглова // Морфологические ведомости. 2008. № 3–4. С. 94–98.
17. *Яглова Н.В.* Тучные клетки и врожденный иммунитет / Н.В. Яглова // Иммунология. 2009. Т. 30. № 2. С. 139–143.
18. *Яглова Н.В.* Морфологическое и биохимическое исследование секреторной деятельности щитовидной железы при экспериментальном синдроме нетиреодных заболеваний: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2011. 44 с.
19. *Яглова Н.В. Яглов В.В.* Секретия тучных клеток щитовидной железы при воздействии тиреотропного гормона // Клиническая и экспериментальная морфология. 2012. № 2. С. 36–40.
20. *Asboe-Hansen G.* The mast cell / G. Asboe-Hansen // Int. Rev. Cytol. 1954. V. 3. P. 399.
21. *Astaldi G.* The glycogen content of the cells of lymphatic leukaemia / G. Astaldi, L. Verga // Acta haematol (Basel). 1957. V. 173. P. 129.
22. *Atkins F.* Mast cells and fibrosis / F. Atkins, A. Clark. // Arch. Dermatol. 1987. V. 123. P. 191–3.
23. *Blank U.* The ins outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis / U. Blank, J. Rivera // Trends immunol. 2004. V. 25. P. 266–73.
24. *Burgoyne R.* Secretory granule exocytosis / R. Burgoyne, A. Morgan // Physiol. Rev. 2003. V. 83. P. 581–632.
25. Cell secretion mediated by granule-associated vesicle transport: a glimpse at evolution // E. Crivellato et al. // The anatomical record. 2010. V. 293. P. 1115–24.
26. Distribution of pressor amines and adenosintriphosphate (ATP) in adrenal medullary granules / H. Blaschko et al. // Biochem. J. 1956. V. 62. N. 2. P. 18.
27. *Dvorak A.* New aspects of mast cell biology / A. Dvorak // Int. Arch. Allergy Immunol. 1997. V. 114. N.1. P. 1–9.
28. Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles / J. Neves et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. N. 47. P. 18478–83.
29. *Falck B.* Content and intracellular distribution of adenosine triphosphate in cow adrenal medulla / B. Falck, N. Hillarp, B. Högborg // Acta physiol. scand. 1956. V. 36. N. 4. P. 360–76.
30. *Hillarp N.* Adenosine triphosphate in the adrenal medulla of the cow / N. Hillarp, B. Nilson, B. Högborg // Nature. 1955. V. 176. P. 1032–3.
31. *Lindau M.* Techniques and concepts in exocytosis: focus on mast cells / M. Lindau, B. Gomperts // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1071. P. 429–71.
32. Mast cells and inflammation / T. Theoharides et al. // Biochimica et biophysica Acta. 2012. V. 1822. N. 1. P. 21–33.
33. *Metcalfe D.* Mast cell ontogeny and apoptosis / D. Metcalfe, Y. Mekori, M. Rottem // Exp. Dermatol. 1995. V. 4. P. 227–30.
34. Ultrastructural evidence of vesicle-mediated mode of cell degranulation in chicken chromaffin cells during the late phase of embryonic development / E. Crivellato et al. // J. Anat. 2009. V. 214. P. 310–17.

BIOLOGY OF MAST CELL SECRETION

N.V. Yaglova, V.V. Yaglov

In this review we summarize our current knowledge about the release of biologically active substances from mast cells, morphological methods for evaluation of secretion, and the involvement of mast cells mediators in the regulation of body functions. The authors outline further directions of research on cytophysiology of mast cells.

Key words: mast cells, secretion, degranulation, mediators

Информация об авторах

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

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

Яглов Валентин Васильевич – 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

Материал поступил в редакцию 28 августа 2012 года.

КЛИНИКО-ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В МЕТАСТАЗАХ В ГОЛОВНОЙ МОЗГ

*Н.В. Лобанова¹, Д.Л. Ротин², Г.Л. Кобяков², Л.В. Шишкина²,
О.В. Паклина¹, М.А. Степанян², Е.Р. Ветлова²*

¹ФГУ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

²НИИ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко РАМН, Москва

В работе было проведено изучение значимости основных иммуногистохимических маркеров (ER, PR, Her-2-neu, Ki-67) в метастазах рака молочной железы в головной мозг и их влияния на течение и прогноз заболевания.

Работа выполнена на операционном материале, полученном от 90 больных, которым проводилось хирургическое и/или комплексное лечение за период с 2004 по 2008 год. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование проводилось в 79 случаях на репрезентативных образцах опухолевой ткани. Иммуногистохимическое исследование проводилось на серийных парафиновых срезах толщиной 2 мкм по методике, рекомендованной фирмой-производителем, с применением моноклональных антител к рецепторам эстрогенов (ER), прогестерона (PR), рецептору Her-2-neu, E-cadherin, маркеру пролиферативной активности Ki-67. Проведенное исследование показало, что в МГМ РМЖ амплификация гена Her-2-neu составила 42% случаев. Это значительно больше, чем в первичной опухоли молочной железы, где амплификация гена Her-2-neu равна 20–25%. С учетом высокой конкордантности по гену Her-2-neu между первичной опухолью и ее метастазами при РМЖ можно сделать вывод, что опухоли с амплификацией гена Her-2-neu чаще метастазируют в головной мозг.

Ключевые слова: рак молочной железы, метастазы, головной мозг, экспрессия маркеров, амплификация

Метастазы в головной мозг (МГМ) являются самой частой опухолью среди злокачественных новообразований центральной нервной системы, по частоте в несколько раз превышающей злокачественные глиомы [1]. Среди первичных локализаций опухоли рак молочной железы (РМЖ) занимает второе место по развитию метастазов в головной мозг, уступая только раку легкого [2]. К сожалению, число пациенток с МГМ РМЖ постоянно увеличивается, при этом больше становится доля молодых женщин. Прижизненная диагностика МГМ РМЖ составляет не более 30%, что чаще обусловлено недооценкой жалоб и малосимптомным течением заболевания. По данным аутопсии частота обнаружения МГМ РМЖ у больных онкологического профиля находится в пределах 20–40% [3, 4]. В современной медицине применяются различные системы оценки прогноза у пациентов с МГМ: RPA (Recursive Partitioning Analysis), GPA (Graded Prognostic Assessment), BSBM (Basic Score for Brain Metastases) [5]. Тем не менее в них не отражены биологические особенности метастазов опухоли, которые могут являться связующим звеном

между клиническими данными о пациенте, лечением и прогнозом заболевания.

В современной отечественной и зарубежной литературе большое внимание уделяется иммуногистохимическим (ИГХ) характеристикам первичного рака молочной железы. Ассоциацией американских клинических онкологов на основании ИГХ маркеров принято деление на молекулярные подварианты строения опухолей [6]. Каждому варианту строения свойственны свои биологические особенности и прогноз, от которых зависит тактика лечения больных данной категории. К основным маркерам относятся рецепторы эстрогенов (ER), рецепторы прогестерона (PR), белок Cerb-B2 (продукт амплификации гена Her-2-neu), маркер пролиферации – Ki-67. Количественная и качественная их оценка в клетках опухоли – золотой стандарт морфологического исследования РМЖ. В последнее время появилось много публикаций, посвященных сопоставлению экспрессии основных ИГХ-маркеров в первичном РМЖ и МГМ РМЖ [7, 9]. Большинство исследователей отмечают, что наиболее стабильным ИГХ маркером яв-

ляется Her-2-neu, различия его экспрессии в первичной опухоли и метастазах не превышают 2–8% [8, 9]. Способность опухолевых клеток экспрессировать ER и PR в РМЖ и его метастазах более изменчива, поэтому конкордантность для ER колеблется в интервале 9–14%, а для PR может достигать 25–30% [10, 11, 12]. При этом роль ИГХ маркеров в МГМ РМЖ, а также их влияние на прогноз и исход заболевания в настоящее время не исследованы. Подобно первичному РМЖ, его МГМ представляют собой гетерогенную группу опухолей с различными молекулярными особенностями опухолевых клеток и биологическим поведением [13, 14]. В практической работе диагностика МГМ РМЖ, как правило, заключается в светооптическом исследовании с учетом клинических данных предшествующего РМЖ.

Согласно последним данным ВОЗ, в гистологическую классификацию опухолей молочной железы внесены кардинальные изменения. Термин «протоковый рак» признан некорректным вследствие неспецифичности эпителия протоков молочной железы, поэтому рекомендовано применять термин «инвазивный рак неспециального типа» [23]. Дольковый РМЖ следует относить к специальным типам, так как он развивается из специфического эпителия долек молочной железы. При исследовании МГМ РМЖ их гистологическая структура представлена солидными пластами опухолевых клеток, поэтому необходимо дополнительное ИГХ исследование, позволяющее отнести метастаз к определенному варианту гистологического строения РМЖ. Самый распространенным маркером является E-cadherin, представляющий собой мембранный белок, который позволяет дифференцировать неспециальный и специальные варианты строения РМЖ [19, 20]. В неспециальном варианте наблюдается выраженное мембранное окрашивание E-cadherin, в дольковом (специальном варианте) – полная потеря опухолевых клеток к экспрессии данного антигена [19, 21].

В связи с внедрением новых таргетных препаратов, способных проникать через гематоэнцефалический барьер при лечении злокачественных новообразований [24], а также ростом числа больных с МГМ РМЖ изучение биологических особенностей и биомаркеров в метастатической опухоли является актуальной проблемой современной нейрохирургии и онкологии.

Целью исследования было изучение значимости основных иммуногистохимических маркеров (ER, PR, Her-2-neu, Ki-67) в метастазах рака молочной железы в головной мозг и их влияния на течение и прогноз заболевания.

Работа выполнена на операционном материале, полученном от 90 больных с МГМ РМЖ, которым проводилось хирургическое и/или комплексное (операция, лучевая и химиотерапия) лечение за период с 2004 по 2008 год в НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко РАМН и ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России. Возраст больных составил 29–72 лет (медиана – 52 года).

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование проводилось в 79 случаях на репрезентативных образцах опухолевой ткани. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином по стандартной методике. Иммуногистохимическое исследование проводилось на серийных парафиновых срезах толщиной 2 мкм по методике, рекомендованной фирмой-производителем, с применением моноклональных антител к рецепторам эстрогенов (ER), прогестерона (PR), рецептору Her-2-neu, E-cadherin, маркеру пролиферативной активности Ki-67 (Клон MiB-1) (DAKO). Использовалась система визуализации En Vision Flex (DAKO).

Оценку экспрессии рецепторов ER и PR проводили количественным методом по сумме баллов, складывающейся из доли окрашенных ядер в баллах от 0 до 5 и интенсивности окраски от 0 до 3. Полученная сумма, равная 3 баллам или больше, расценивалась как положительная, менее 3 баллов – как отрицательная. Для Ki-67 вычисляли процент окрашенных ядер на 100 исследованных ядер [35, 36].

Оценка экспрессии Her-2-neu проводилась количественным методом, согласно рекомендациям ASCO (Американской ассоциации клинических онкологов): (0; 1+) – отрицательная реакция (полное отсутствие или слабое мембранное окрашивание менее 30% опухолевых клеток); (2+) – неопределенная реакция, требующая подтверждения методом FISH (умеренное мембранное окрашивание более 30% опухолевых клеток); (3+) – положительная реакция (однородное интенсивное мембранное окрашивание более 30% опухолевых клеток).

Для оценки экспрессии E-cadherin использовали полуколичественный метод, основанный на 4-балльной шкале: 0 (негативное окрашивание), 1+ (слабое окрашивание), 2+ (умеренное окрашивание) и 3+ (стойкое окрашивание). В итоге образцы с умеренным и выраженным окрашиванием (2+, 3+) принимались за положительные, а образцы с негативным и слабым окрашиванием (0, 1+) – как негативные [16, 17].

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH-метод) выполнялась на 50 репрезентативных образцах опухолевой ткани с различными результатами ИГХ окрашивания Her-2-neu (от 0, 1+ до 3+). FISH-исследование проводили на парафиновых срезах опухолевой ткани толщиной 3 мкм с использованием локус специфической ДНК пробы HER-2 DNA Probe Kit (Path Vysion). После депарафинирования срезы обрабатывали протеазой, фиксировали в формалине и проводили по спиртам. Денатурация FISH-пробы осуществлялась в гибридизационной камере при температуре +76°C с последующей гибридизацией при +37°C. Затем срезы промывали в буфере с формамидом, стандартном солевом растворе, окрашивали красителем DAPI и заключали в монтирующую среду. Сигналы изучали в 20 отдельно лежащих ядрах интерфазных клеток каждого образца. Кариотипический профиль считался

нормальным или сбалансированным, если более 50% опухолевых клеток содержали по 2 зеленым и 2 красным сигнала. Наличие амплификации расценивалось при соотношении оранжевых сигналов (Her-2-neu) к зеленым (СЕР) больше 2,2 и 6–8 Her-2-neu сигналов в ядре клетки.

Для уточнения течения и исхода заболевания 90 больных с МГМ РМЖ использовали метод анкетирования. Выживаемость анализировалась методом Каплана–Майера, достоверность различий между кривыми выживаемости подтверждалась Лог-ранговым тестом с использованием пакета программ Statistica для Microsoft Windows, версия 6,1. За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$ [18].

Результаты гистологического исследования с учетом ИГХ реакции с E-cadherin показали, что среди МГМ неспециальный вариант РМЖ составил 69% наблюдений (62/90) (рис. 1 А, Б), дольковый (специальный) – 12% (11/90) (рис. 1 В, Г), смешанный (неспециальный с участками дольковой дифференцировки) – 4% (4/90) (рис. 1 Д), слизистый рак – 2% (2/90) (рис. 1 Е) [18]. Наиболее частым являлся неспециальный вариант гистологического строения, что соответствует данным литературы по первичному РМЖ [21, 22, 23].

Среди МГМ РМЖ экспрессия ER выявлена в 44% случаев (35/79), PR – в 22% (17/79). Характерно, что среди женщин моложе 50 лет преобладали МГМ с отсутствием экспрессии ER – 62% (21/34), против 38% (13/34) с экспрессией ER. Среди женщин старше 50 лет соотношение ER+ и ER- было практически одинаковым – соответственно, 49% (22/45) и 51% (23/45). Достоверной корреляции между возрастом и экспрессией к рецепторам ER и PR не отмечено ($p=0,2$).

Отрицательная экспрессия Her-2-neu выявлена в 21% случаев (17/79), неопределенная – в 33% (26/79) и положительная в 46% (36/79). После проведения FISH-исследования в 13 образцах с отрицательной ИГХ реакцией HER-2-neu амплификация не выявлена ни в одном образце (рис. 2, А, Б). Среди 16

образцов МГМ РМЖ с гиперэкспрессией Her-2-neu амплификация выявлена в 13 образцах, в 3 амплификация отсутствовала на фоне полисомии гена Her-2-neu (рис. 2 В–Д). Среди 21 образца с сомнительной оценкой экспрессии Her-2-neu амплификация выявлена в 8, в остальных 13 она отсутствовала (рис. 2 Е, Ж). Как правило, амплификация гена Her-2-neu была представлена увеличением количества копий гена или появлением кластеров (см. рис. 2 Г). Среди пациенток моложе 50 лет амплификация гена Her-2-neu встречалась чаще, чем у женщин более старшего возраста. В нашем исследовании не было выявлено достоверной корреляционной связи между возрастом и наличием амплификации гена Her-2-neu ($p=0,19$).

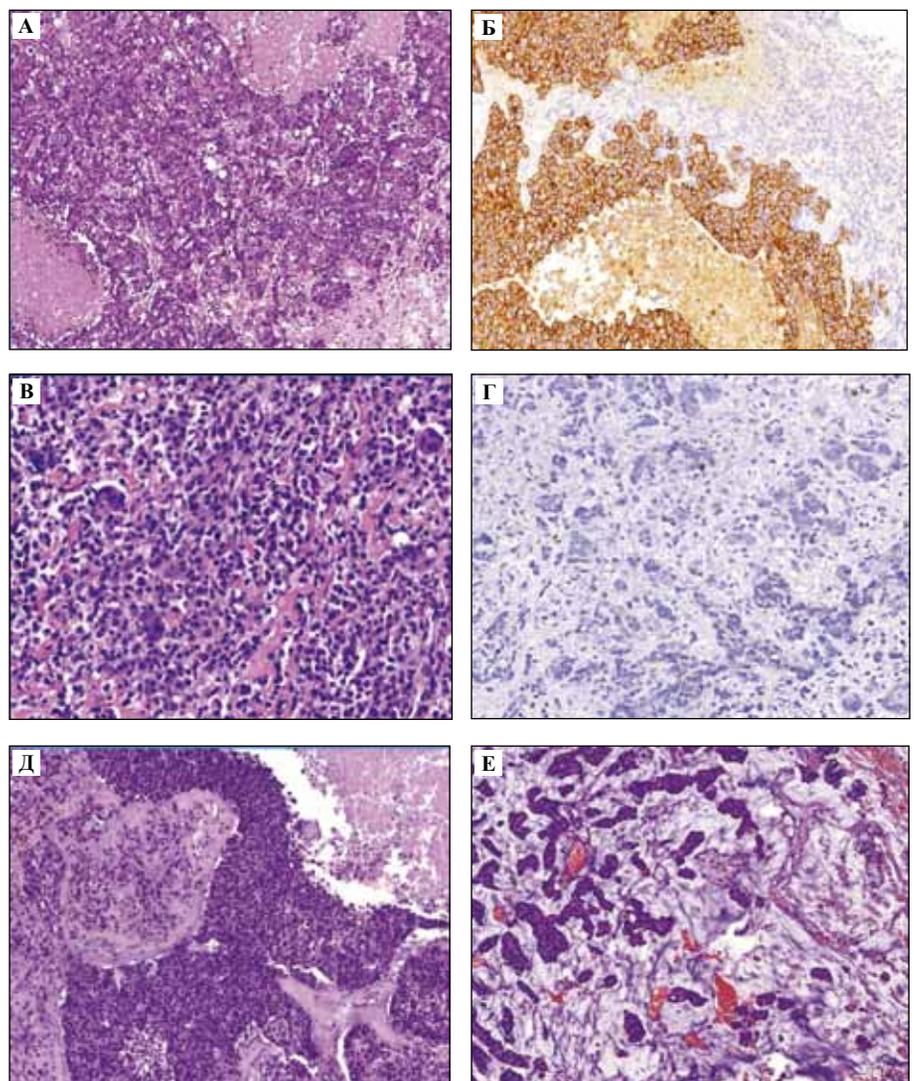


Рис. 1. Морфологические варианты строения МГМ РМЖ: А – неспециальный вариант (протоковый) РМЖ; Б – положительная экспрессия E-cadherin в неспециальном варианте РМЖ; В – дольковый рак; Г – отрицательная экспрессия E-cadherin в дольковом раке; Д – дольково-протоковый рак; Е – слизистый рак; А, В, Д, Е – окраска гематоксилином и эозином, Б, Г – иммуногистохимическая реакция с антителами к E-cadherin, А, Д, Е $\times 60$, Б, В, Г $\times 120$

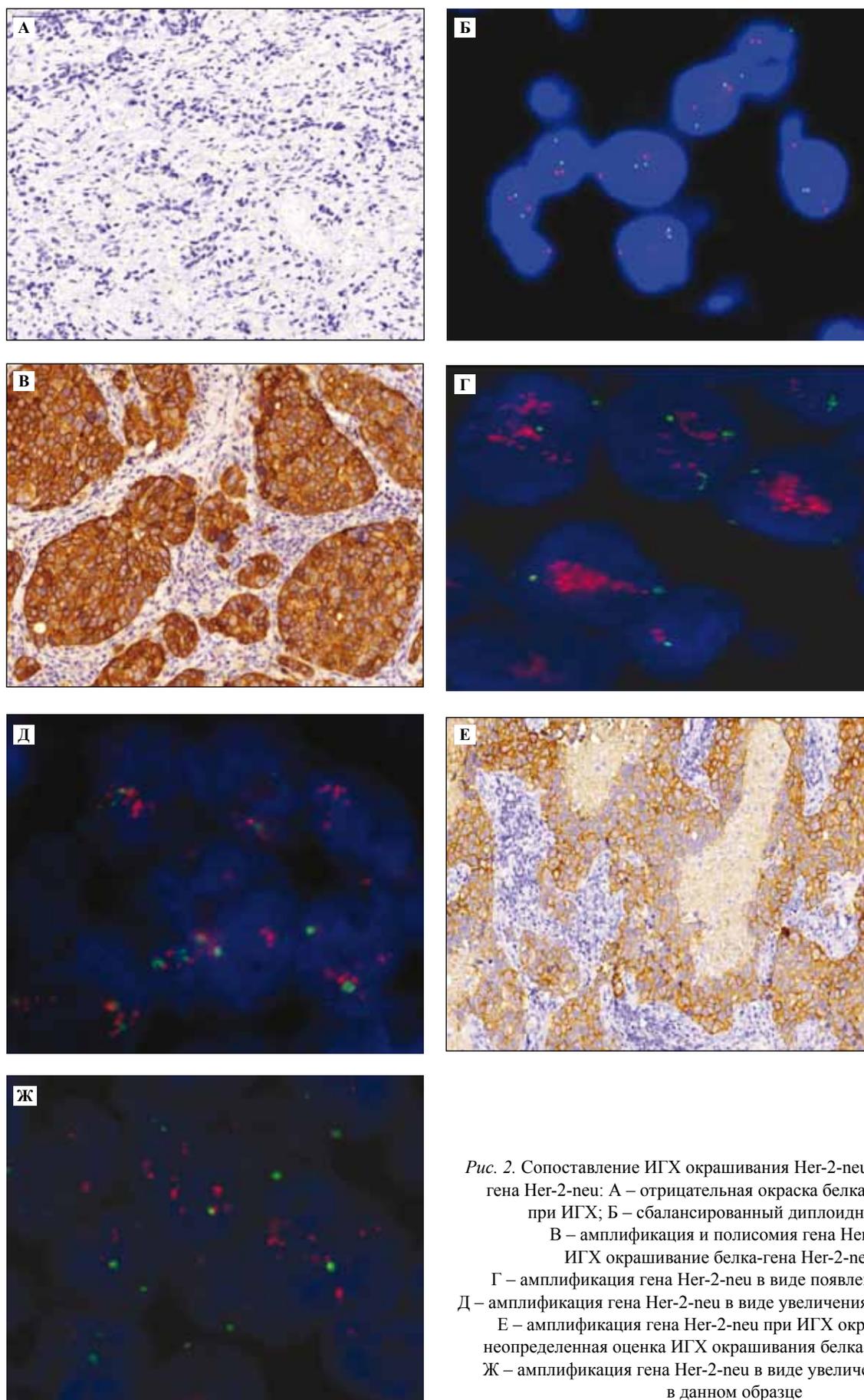


Рис. 2. Сопоставление ИГХ окрашивания Her-2-neu и амплификации гена Her-2-neu: А – отрицательная окраска белка гена Her-2-neu при ИГХ; Б – сбалансированный диплоидный набор; В – амплификация и полисомия гена Her-2-neu, ИГХ окрашивание белка-гена Her-2-neu 3+; Г – амплификация гена Her-2-neu в виде появления кластеров; Д – амплификация гена Her-2-neu в виде увеличения числа копий гена; Е – амплификация гена Her-2-neu при ИГХ окрашивании 2+, неопределенная оценка ИГХ окрашивания белка гена Her-2-neu; Ж – амплификация гена Her-2-neu в виде увеличения копии гена в данном образце

Таблица 1

Молекулярная классификация РМЖ [5]

ER позитивные			ER негативные	
Her2 (-)		Her2 (+)	Her2 (+)	Her2 (-)
ER(+)/Her2(-) Ki-67 low	ER(+)/Her2(-) Ki-67 high	ER(+)/Her2(+)	ER(-)/Her2(+)	ER(-)/Her2(-)
Люминальный А 9% (8/90)	Люминальный В 3% (3/90)	Люминальный Her-2-neu 27% (24/90)	Her-2-neu позитивный 22% (20/90)	Тройной негативный 27% (24/90)

Таблица 2

Временные характеристики для ER позитивных и ER негативных МГМ РМЖ

МГМ в зависимости от экспрессии ER	Медиана времени (месяцев) с момента диагностики РМЖ до операции на МГМ	Общая выживаемость (месяцев) с момента появления первых симптомов МГМ РМЖ
ER позитивные МГМ РМЖ	48	9
ER негативные МГМ РМЖ	30	7,5

В патологоанатомической практике индекс пролиферативной активности принято определять на основании индекса мечения ядер Ki-67. Существование различных клонов данного антитела, а также интерпретация количественной оценки указанного маркера делают его применение в повседневной практике diskutabelnym [19], однако именно благодаря Ki-67 можно провести дифференцировку между люминальными подтипами А и В рака молочной железы. В нашем исследовании индекс пролиферативной активности оказался высоким (>14%) у 68% больных (54/79), в остальных 32% случаев (25/79) он был низким.

На основании ИГХ маркеров среди МГМ РМЖ наиболее частыми молекулярными типами являлись люминальный Her-2-neu и тройной негативный (табл. 1).

Обнаружено, что у пациенток с МГМ РМЖ и амплификацией гена Her-2-neu отмечалось укорочение времени от момента диагностики первичной опухоли молочной железы до нейрохирургической операции в сравнении с больными без амплификации гена Her-2-neu, а также укорочение общей выживаемости (рис. 3).

При сравнении пациенток с МГМ РМЖ двух групп (с экспрессией ER и без нее) отмечалось увеличение медианы времени от момента диагностики РМЖ до операции на МГМ и общей выживаемости в ER-позитивной группе (табл. 2).

Достоверные корреляции между наличием амплификации гена Her-2-neu и общей выживаемостью с момента первых симптомов МГМ РМЖ не выявлены (p=0,62), тем не менее прослеживается достоверная прямая корреляционная связь между наличием экспрессии рецепторов ER и общей выживаемостью (r=0,27, при p=0,15).

Также выявлено достоверное увеличение выживаемости среди больных, имеющих положительный гормональный статус (рис. 4) (p=0,029). При анализе общей выживаемости в зависимости от наличия или отсутствия амплификации гена Her-2-neu достоверные различия не выявлены (p=0,62).

Таким образом, проведенное исследование показало, что в МГМ РМЖ амплификация гена Her-2-neu составила 42% случаев. Это значительно больше, чем в первичной опухоли молочной железы, где амплификация гена Her-2-neu равна 20–25% [21, 22, 23]. С учетом высокой конкордантности по гену Her-2-neu между первичной опухолью и ее метастазами при РМЖ можно сделать вы-

вод, что опухоли с амплификацией гена Her-2-neu чаще метастазируют в головной мозг.

Несмотря на отсутствие достоверной корреляции между наличием амплификации гена Her-2-neu и общей выживаемостью пациентов с МГМ РМЖ, все-таки отмечается тенденция к укорочению времени от момента возникновения РМЖ до метастатического поражения головного мозга, а также времени общей выживаемости больных. Гипотетически это может быть связано с назначением герцептина для лечения пациентов с амплификацией гена Her-2-neu. Герцептин (трастузумаб) представляет собой моноклональные антитела, являющиеся антагонистами внеклеточного домена Her-2 рецептора [25]. Применение его при лечении РМЖ и отдаленных метастазов улучшает прогноз заболевания [26]. Тем не

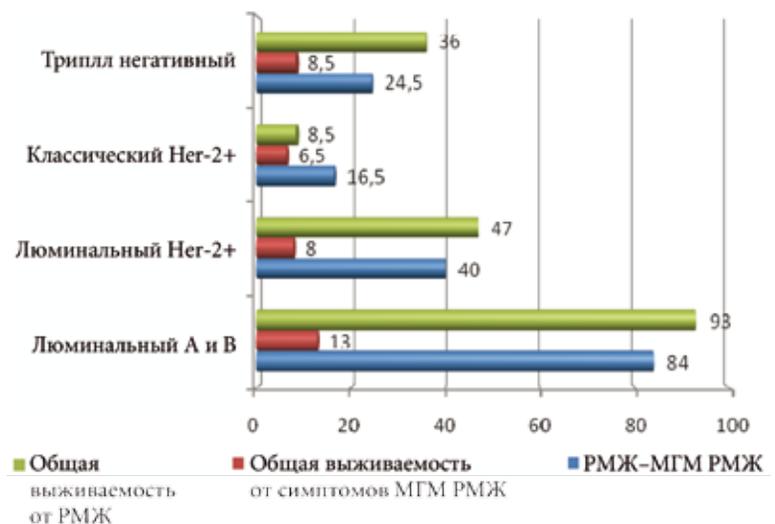


Рис. 3. Медиана времени при различных молекулярных вариантах

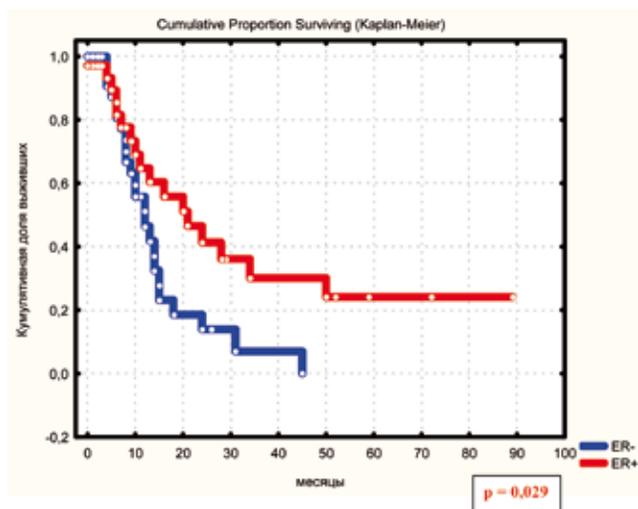


Рис. 4. Зависимость выживания больных от экспрессии ER

менее некоторые исследователи отметили факт более частого метастатического поражения головного мозга после первичного РМЖ именно среди больных, получавших герцептин [28, 29]. Существует гипотеза, что опухолевые клетки РМЖ могут мигрировать в головной мозг во время терапии герцептином, поскольку данный препарат не проникает через гематоэнцефалический барьер [28, 29, 30]. Механизмы метастазирования и влияние определенных препаратов на темпы развития метастазов и их локализацию в настоящее время остаются неясными, и их изучение продолжается.

В результате комплексного исследования выявлена достоверная корреляция между экспрессией клетками опухоли ER и общей выживаемостью, поэтому целесообразно дальнейшее применение антигормональных препаратов в лечении именно больных с МГМ РМЖ на примере подобного лечения рака грудной железы у мужчин [31, 32].

В результате проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

1. E-cadherin является маркером, необходимым для дифференциального диагноза основных гистологических вариантов МГМ при РМЖ.

2. При наличии амплификации гена *Her-2-neu* среди больных с МГМ РМЖ отмечаются укорочение интервала между диагностикой РМЖ и развитием метастазов в головном мозге, уменьшение общей выживаемости, хотя достоверная корреляция между амплификацией гена *Her-2-neu* и общей выживаемостью не выявлена.

3. Для больных с наличием положительного гормонального статуса в МГМ РМЖ характерно достоверное увеличение общей продолжительности жизни.

4. Экспрессия рецепторов ER является важным прогностическим фактором среди больных как с МГМ РМЖ, так и с РМЖ. Амплификация гена *Her-2-neu* не имеет прогностической значимости среди пациентов с МГМ РМЖ, несмотря на распространенные и широко известные данные о прогностической значимости указанного признака среди больных с первичным РМЖ.

Литература

1. Мельникова Е.А. Метастазы опухолей в головной мозг / Е.А. Мельникова // Нейрохирургия. 2005. № 3. С. 61–65.
2. Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study / H. Sihto et al. // Breast Cancer Res. 2011. V. 13(5). P. 87.
3. Metastatic Cancer to the Central Nervous System / Einstein D.B. et al. Oncology. 2006. V. 7. P. 1621–34.
4. Validation of the new graded prognostic assessment scale for brain metastases: a multicenter prospective study/ Weber D.C. et al. // Radiation Oncology. 2011. V. 6. P. 23.
5. Strategies for subtypes – dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 / A. Godhirsch et al. // Ann Oncol. 2011. August. V. 22(8). P. 1736–47.
6. Changes in the ER, PgR, HER2, p53 and Ki-67 biological markers between primary and recurrent breast cancer: discordance rates and prognosis / R. Nishimura et al. // World Journal of Surgical Oncology. 2011. V. 9. P. 13.
7. Comparative study of the immunohistochemical detection of hormone receptor status and HER-2 expression in primary and paired recurrent metastatic lesions of patients with breast cancer / E. Sari et al. // Med Oncol. 28(1):57–63(2011).
8. Conversion of epidermal growth factor receptor 2 and hormone receptor expression in breast cancer metastases to the brain / R. Duchnowska et al. Breast Cancer. 2012; Aug 16–14(4).
9. Breast cancer subtypes and outcome after local and regional relapse / E. Montagna et al. // Ann Oncol. 2011. 23(2): P. 324–331.
10. Discordance between receptor status in primary and metastatic breast cancer: an exploratory study of bone and bone marrow biopsies / E. Amir et al. Clin Oncol. 20(10):763–8(2008).
11. Prognostic impact of discordance between triple-receptor measurements in primary and recurrent breast cancer / C. Liedtke et al. Ann Oncol. 20(12):1953–8(2009).
12. *Beasley K.D.* The molecular pathobiology of metastasis to the brain: a review / K.D. Beasley, S.A. Toms // Neurosurg Clin N Am. 2011 Jan.22(1):7–14.
13. *Jung S.Y.* Factors associated with mortality after breast cancer metastasis. / S.Y. Jung, M. Rosenzweig // Cancer Causes Control. 2012 Jan.23(1):103–12.
14. An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ / M. Götte et al. Breast Cancer Res. 2007; 9(1).
15. E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer / R. Singhai et al. N Am J Med Sci. 2011 May,3(5): 227–33.
16. Статистический анализ медицинских данных / Реброва О.Ю. М.: Медиа Сфера, 2002. 312 с.
17. *Dabbs David J.* Immunogistochemistry / David J. Dabbs, 2002. P. 1–673.
18. *Dabbs David J.* Brest Pathology / David J. Dabbs, 2012 P. 1–800.
19. *Hicks D.G.* Diagnostic pathology / D.G. Hicks, S. C. Lester // Brest. 2012. P. 2–230.
20. *Tavassoli F.A.* Tumor of the Brest and Female Genital Organs / F.A. Tavassoli, P. Devilee, 2003. P. 1–432.
21. WHO Classification of Tumors of the Brest/ Sunil R. Lakhahi et all. Lyon, 2012. P. 1–240.

22. *Metro G.* New target therapies for brain metastases from breast cancer / G.Metro, Fabi A. // *Curr Cancer Drug Targets.* 2012;Mar.12(3):210–7.
23. Lapatinib Distribution in HER2 Overexpressing Experimental Brain Metastases of Breast Cancer / Kunal S. Taskar et al. *Pharm Res.* 2012;Mar.29(3):770–81.
24. *Seal M.D.* Outcomes of women with early-stage breast cancer receiving adjuvant trastuzumab / M.D. Seal, C.H. Speers // *Curr Oncol.* 2012; August.19(4):197–20.
25. HER2 in Brain Metastases: Issues of Concordance, Survival, and Treatment / I. B. Fuchs et al. *Journal of Clinical Oncology.* V. 20-Issue19(October). 2002;4130–3.
26. HER2 significance and treatment outcomes after radiotherapy for brain metastases in breast cancer patients / V. Wolstenholme et al. *Breast.* 2008;Dec.17(6):661–5.
27. Metastatic Sites in Patients with Advanced Breast Cancer Treated with Trastuzumab-based Therapy / D. Pectasides et al. *Anticancer Res.* 2006; Jan-Feb.26(1B):647–53.
28. *Kirsch D.G.* Targeting HER2 in Brain Metastases from Breast Cancer / D.G. Kirsch, F.H.Hochberg // *Clin Cancer Res.* 2003;Nov. 15; 9(15):5435–6.
29. *Gonzalez-Perez L.M.* Nasosinusal metastasis of a breast cancer in a man / L.M. Infante-Cossio, P. Gonzalez-Perez // *Presse Med.* 2010; Dec.39(12):1340–2.
30. Mandibular metastases as first clinical sign of an occult male breast cancer / L.M. Gonzalez-Perez et al. // *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012;Mar;23.
31. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype / M. Yanagawa et al. *BMC Res Notes.* 2012;5: 376.
32. Ki-67 labeling index is associated with recurrence after segmentectomy under video-assisted thoracoscopic surgery in stage I non-small cell lung cancer / S. Yamashita et al. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.*2011;17(4):341–6.

CLINICAL PREDICTIVE VALUE OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS OF BREAST CANCER IN BRAIN METASTASES

N.V. Lobanova, D.L. Rotin, G.L. Kobayakov, L.V. Shishkina, O.V. Paklina, M.A. Stepanyan, E.R. Vetlova

We studied prognostic importance of major immunohistochemical markers (ER, PR, Her-2-neu, and Ki-67) in brain metastases from breast cancer and their impact on the course and prognosis of the disease.

The work has performed using tumor samples obtained from 90 patients undergoing surgical and/or combined treatment for the period from 2004 to 2008. Histological and immunohistochemical study was carried out in 79 cases on representative samples of tumor tissue. Immunohistochemistry was undertaken on serial paraffin 2 μ sections with the method recommended by the manufacturer using monoclonal antibodies to the receptors of estrogen (ER), progesterone (PR), and Her-2-neu as well as E-cadherin and proliferative marker Ki-67. The study showed that in brain metastases from breast cancer, Her-2- gene was amplified in 42% of cases. This is significantly higher than in primary breast tumors where the frequency of HER-2/neu gene amplification was 20–25%. Given the high concordance in Her-2-neu gene expression between primary tumor and metastases during breast cancer, it can be concluded that tumors with Her-2-neu amplification more often spread to the brain.

Key words: breast cancer, metastases, brain, marker expression, amplification

Информация об авторах

Лобанова Н.В. – врач патологоанатомического отделения ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.
Адрес: 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23.

Ротин Д.Л. – канд. мед. наук, старший научный сотрудник патологоанатомической лаборатории НИИ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко РАМН.
Адрес: 125047, Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, д. 16.

Кобяков Г.Л. – докт. мед. наук, старший научный сотрудник 7-го нейрохирургического отделения НИИ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко РАМН.
Адрес: 125047, Москва, ул.4-я Тверская-Ямская, д. 16.

Шишкина Л.В. – канд. мед. наук, заведующая патологоанатомическим отделением НИИ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко РАМН.
Адрес: 125047, Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, д.16

Паклина О.В. – докт. мед. наук, заведующая патологоанатомическим отделением ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.
Адрес: 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23.

Стеpanyan М.А. – докторант 6-го нейрохирургического отделения НИИ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко РАМН.
Адрес: 125047, Москва, ул.4-я Тверская-Ямская, д.16.

Ветлова Е.Р. – канд. мед. наук, научный сотрудник отделения радиологии НИИ нейрохирургии имени акад. Н.Н. Бурденко РАМН.
Адрес: 125047, Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, д. 16.

Материал поступил в редакцию 4 сентября 2012 года.

ПРИЖИЗНЕННАЯ ФЛУОРИМЕТРИЯ КЛЕТОК ПЕРСТНЕВИДНОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЖЕЛУДКА С ПРИМЕНЕНИЕМ ФЛУОРОХРОМОВ АНС И ДСМ

Е.М. Непомнящая, О.В.Тарнопольская, Х.Г. Мамулян

ФГБУ «РНИОИ» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Исследовали флуоресцентные показатели и морфологию клеток перстневидноклеточного рака желудка и инфильтрирующих эту опухоль лейкоцитов. Показано, что лейкоциты, инфильтрирующие опухоль перстневидноклеточного рака желудка, в 3 раза более гиперполяризованы по сравнению с клетками опухоли. Прижизненная окраска клеток перстневидноклеточного рака желудка красителем ДСМ позволяет наблюдать взаимодействие ядра и вакуоли, смещающей ядра к периферии. В отличие от ядерной мембраны, которая заряжена отрицательно, мембрана вакуоли заряжена положительно – она не пропускает катион ДСМ внутрь вакуоли, которая выглядит темной.

Ключевые слова: перстневидноклеточный рак желудка, потенциалозависимые флуоресцентные зонды АНС и ДСМ, мембранный потенциал

В последние годы перстневидноклеточному раку посвящено все больше исследований отечественных [1, 3, 6] и зарубежных авторов [9]. Подчеркивается, что перстневидноклеточный рак относится к самостоятельной форме рака желудка, преобладает у женщин, лиц молодого возраста. Для этой формы рака желудка характерны высокий процент раннего дебюта, низкая частота метастазов в регионарных лимфатических узлах, T1–T2 опухолях, высокая частота метастазирования непосредственно в перигастральную клетчатку по брюшине, в яичники, низкая частота метастазов в печени. Гистохимическое исследование муцинов при перстневидноклеточном раке может дать дополнительную информацию о прогнозе болезни [7]. Большое значение приобретают биофизические исследования функционального состояния мембран клеток опухоли [4], поэтому изучение различных аспектов данного гистотипа рака желудка является актуальной задачей.

Флуоресцентная микроскопия с помощью окрашивания различными флуорохромами позволяет обнаружить новые свойства и особенности клеток, хорошо известных клиническим цитологам, наблюдающим их фиксированными на мазке при рутинной окраске по Паппенгейму. Особенно интересны клетки, окрашенные витально, находящиеся в физиологической среде. В нашей работе такое окрашивание позволило исследовать физико-химические и физиологические особенности клеток опухоли перстневидноклеточного рака желудка, что представляет несомненный интерес не только для фундаментальной онкологии и цитологии. Изучали такую интегральную характеристику

клеток как их средний мембранный потенциал. Мембранный потенциал (МП) опухолевых клеток является важной биофизической и биохимической основой во взаимодействии опухолевых клеток с цитостатиками, антибиотиками, различными по валентности и массе ионами внеклеточной среды, при взаимодействии клеток с лимфоцитами, лейкоцитами и другими клетками. Для оценки соотношения мембранных потенциалов клеток в клеточной суспензии успешно применяют неинвазивный метод флуоресцентных зондов, используя известный ряд так называемых потенциалозависимых флуоресцентных зондов, или красителей [5]. В работе [3] авторы применили эту пару потенциалозависимых зондов АНС и ДСМ для оценки среднего мембранного потенциала лимфоцитов в суспензии. Изучена [4] неоднородность по мембранному потенциалу клеток аденокарциномы предстательной железы, где клетки пунктата аденокарциномы окрашивали этими красителями, а в работе [8] прослежена флуоресценция клеток поджелудочной железы, витально окрашенных АНС, ДСМ и доксорубицином. Нам представляется важной эта же характеристика мембран опухолевых клеток желудка в сопоставлении с мембранным потенциалом лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль. Флуоресцентный краситель (4-(*n*-диметиламиностирил)-1 метилпиридиний), или ДСМ, в физрастворе является катионом, который легко проникает в живые клетки, их органеллы, и окрашивает их, выделяя митохондрии, ядро и ядрышки, и различные вакуоли. Структурные химические формулы катиона ДСМ и аниона АНС представлены в [4]. Интенсивность флуоресценции

клетки, окрашенной ДСМ, прямо пропорциональна ее мембранному потенциалу. Анионный краситель АНС, напротив, имеет тем меньшую интенсивность свечения в клетке, чем больше ее мембранный потенциал.

Целью работы было изучение соотношения цитометрических и флуоресцентных показателей (мембранный потенциал) живых клеток перстневидноклеточного рака желудка и лейкоцитов, присутствующих в нем.

Материалы и методы

В данное исследование были включены клетки из удаленной опухоли трех больных перстневидноклеточным раком желудка. Гистотип опухоли пациентов – перстневидноклеточный рак с инвазией всех слоев стенки. Возраст больных – 62–65 лет. Распространенность опухолевого процесса у всех пациентов соответствовала Т3N0–1M0.

Из удаленной опухоли желудка (не более 30 минут после резекции) получали клеточную взвесь путем измельчения скальпелем на стекле в 200 мкл забуференного физраствора. Полученную взвесь клеток отмывали центрифугированием при 200 g. Препарат для микрофотографирования представлял собой предметное стекло с каплей клеточной взвеси объемом 30 мкл, в которую уже было добавлено 10 мкл разведенного на физрастворе флуоресцентного красителя, каплю накрывали покровным стеклом. Такие препараты живых клеток после 10-минутной инкубации с различными флуорохромами при температуре 25°C исследовали под микроскопом Axio Imager M2 Zeiss. Микросъемку производили на максимально возможном увеличении ($\times 1000$) цветной цифровой камерой AxioCam HRC, а измерения проводили с помощью программного обеспечения AxioVision, rel.4.8. От каждого наблюдения готовили 6–10 препаратов для микрофотографирования, чтобы исключить эффекты от высыхания препаратов. Из каждого препарата получали от 10 до 40 цифровых изображений, в зависимости от числа флуоресцирующих клеток в одном снимке (в одном поле зрения). Измеряли около 100 клеток опухоли в каждом наблюдении и все попавшие при этом в поле зрения лейкоциты, в том числе лимфоциты. Используемый нами флуоресцентный краситель АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат) произведен фирмой Serva, а ДСМ синтезирован сотрудниками Ростовского научно-исследовательского онкологического института при ЮФУ. Длина волны возбуждения для АНС составляла 375 нм, для ДСМ – 480 нм, длины волн эмиссии для АНС равнялись 450 нм, а для ДСМ – 520 нм. Концентрация АНС в препарате для микрофотографирования была 40 мкМ, ДСМ – 20 мкМ. При микросъемке каждого цифрового изображения строго соблюдали одинаковое разрешение и экспозицию для всех проб. Измеряемые характеристики клеток были следующими: площадь клетки, площадь ядра, ядерно-цитоплазматический индекс (отношение площади ядра к площади цитоплазмы (ЯЦИ), яркость клетки опухоли и лейкоцитов

по АНС и по ДСМ. Обязательно определяли яркость фона рядом с каждой измеряемой клеткой, которую затем вычитали для получения истинной величины яркости клетки. Для изучения морфологии ядер и подсчета ядерно-цитоплазматического соотношения также использовали флуорохром акридиновый оранжевый.

Данные измерений клеток от множества цифровых фотографий сохраняли в приложении AxioVision, rel.4.8 в файле, совместимом с Exel (Microsoft Office-2003), которые затем сводили в общие электронные таблицы и статистически обрабатывали в Exel, применяли параметрические показатели (среднее и стандартное отклонение).

Результаты и обсуждение

Известно, что флуоресцентный зонд АНС почти не проникает в цитоплазму и совсем не проникает в ядро клетки, оставляя его темным. Клетки, связавшие зонд АНС, имели голубой цвет по области цитоплазмы и темное, плохо просматриваемое ядро (рис. 1 А, Б). Флуорохром ДСМ, напротив, легко проникает и в цитоплазму, и в ядра клеток, он является полихроматическим красителем – ядра оранжевые или бурые, а цитоплазма зеленая, митохондрии ярко-желтые, ядрышки желто-оранжевые (рис. 2 А–Г; рис. 4). Клетки опухоли перстневидноклеточного рака желудка в окраске ДСМ можно было легко идентифицировать, четко выделялась темная вакуоль, оттесняющая на периферию бурое ядро. Тот факт, что эта вакуоль темная, означал, что ее оболочка-мембрана положительно заряжена и не пропускает краситель-катион ДСМ. Ядерная мембрана заряжена отрицательно, и на рисунке 2 наблюдалось взаимодействие этих двух самых крупных клеточных органелл, которое деформировало ядро из круглого в серповидное или распластанное по цитоплазме внутри клеточной поверхности. В окраске АНС более светлая область клетки по сравнению с областью ядра соответствовала области с характерной вакуолью, что еще раз подтверждает противоположность знака заряда мембраны ядра и вакуоли.

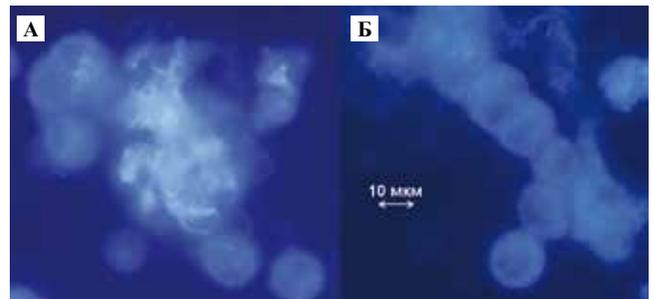


Рис. 1 (А, Б). Два поля зрения с клетками опухоли перстневидноклеточного рака желудка. Клетки витально окрашены флуоресцентным зондом анионом АНС. Ядра выглядят темными, а внутриклеточная вакуоль более яркой, ядра смещены к периферии. $\times 100$

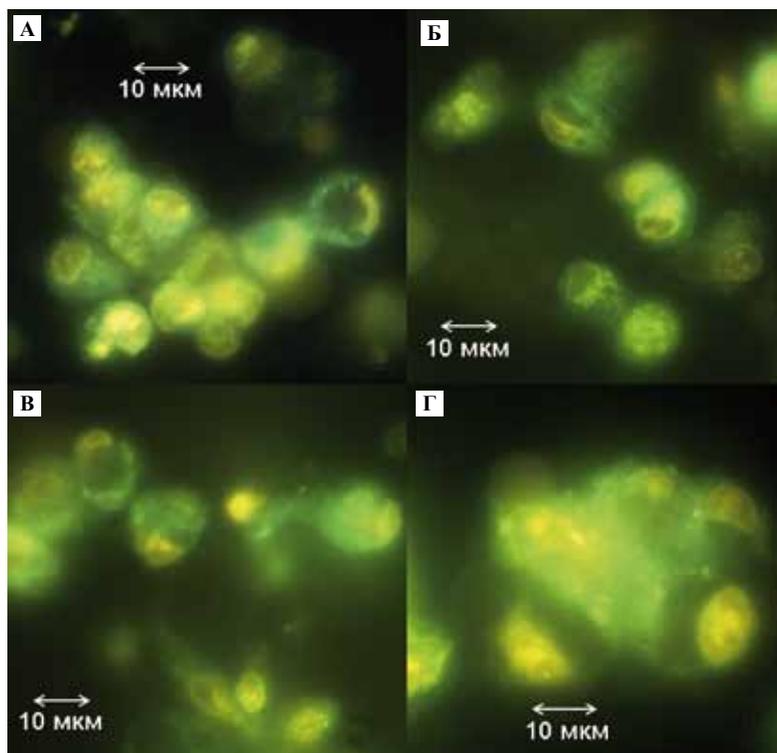


Рис. 2 (А, Б, В, Г). Клетки опухоли перстневидноклеточного рака желудка, витально окрашенные флуоресцентным зондом катионом ДСМ. 4 поля зрения. Вакуоль, идентифицирующая данный гистотип карциномы желудка, сдвигающая ядро на периферию клетки, выглядит темной, почти черной областью. Это еще больше усиливает сходство таких клеток с перстнями. Хорошо видны желто-оранжевые ядрышки. × 100

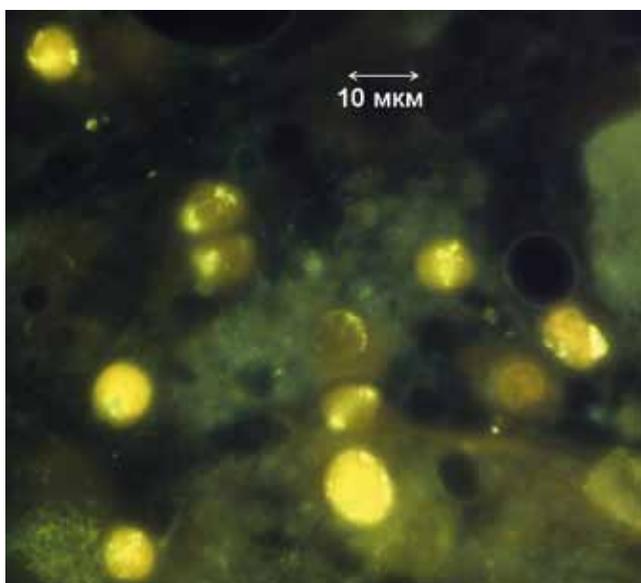


Рис. 3. Лимфоциты среди клеток опухоли перстневидноклеточного рака желудка, витально окрашенные флуоресцентным зондом катионом ДСМ. Митохондрии окрашены ярко-желтым. × 100

В своих предыдущих работах [2, 4, 8] и в данном исследовании мы успешно применили именно эту пару потенциалозависимых флуорохромов, которые позволяют не только оценить изменения МП клеток, увидеть соотношение МП для разных клеток, но и рассмотреть особенности внутриклеточных органелл, их разные оттенки цвета и форму при окраске ДСМ. Величина средней яркости этих флуорохромов, связавшихся с клетками опухоли желудка и лейкоцитами, свидетель-

ствовала об уровне среднего МП этой клеточной популяции.

Результаты измерения яркости целых клеток рака желудка и лейкоцитов опухоли представлены в таблице. Анализируя эти данные, можно сделать вывод, что клетки раковой опухоли желудка каждого больного (каждой пробы) неоднородны по яркости (то есть по МП) как по ДСМ, так и по АНС. Об этом свидетельствовала большая доля величины стандартного отклонения к средней яркости флуоресценции. Отношение стандартного отклонения к средней величине яркости клеток опухоли в каждой пробе изменялось по ДСМ от 17 до 22%, а по АНС – от 38 до 45%. Более неоднородна по яркости популяция лейкоцитов, найденных и измеренных среди опухолевых клеток: по ДСМ – от 20 до 42%, по АНС – от 25 до 56% (отношение стандартного отклонения к среднему). Среди лейкоцитов встречались лимфоциты, сегментоядерные нейтрофилы, моноциты (рис. 4).

Следует отметить, что у больных в окраске ДСМ лейкоциты хорошо экспрессировали ярко-желтые митохондрии, вносящие существенный вклад в общую яркость целой клетки (см. рис. 4). Число найденных лейкоцитов в серии изображений каждой пробы было от 13 до 32. У пациента № 1 МП лейкоцитов (по яркости АНС) в 4 раза больше, чем МП клеток рака желудка, у пациента № 2 МП лейкоцитов в 2,7 раза больше МП опухолевых клеток, а у пациента № 3 МП лейкоцитов в 2,4 раза больше МП опухолевых клеток, то есть лейкоциты, инфильтрирующие опухоль, намного гиперполяризованнее, чем клетки опухоли. Это подтверждают и показатели в окраске катионом ДСМ – лейкоциты

Таблица

Показатели прижизненной флуориметрии клеток рака желудка и инфильтрирующих ее лейкоцитов, средние значения \pm стандартное отклонение (отн. ед.)

Пациент, №	Флуорохром	N_{lc} – число лейкоцитов	D_{lc} – средний диаметр лейкоцитов \pm ст. откл., (мкр)	S_{lc} – средняя площадь лейкоцитов \pm ст. откл., (мкр. кв.)	B_{lc} – средняя яркость (Brightness) флуоресцирующих лейкоцитов (отн. ед.)	N – число клеток опухоли	S – средняя площадь клеток опухоли \pm ст. откл., (мкр. кв.)	B_{tr} – средняя яркость (Brightness) флуоресцирующих клеток опухоли \pm ст. откл., (отн. ед.)	B_{lc} / B_{tr} отношение яркостей лейкоцитов к опухолевым клеткам	Ядерно-цитоплазматическое отношение в опухолевых клетках
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
№ 1	АНС	18	5,8 \pm 1,9	29 \pm 18	2,4 \pm 0,6	98	270 \pm 230	9,6 \pm 3,6	0,25 \pm 0,2	
	ДСМ	31	10,4 \pm 2,9	91 \pm 60	16,3 \pm 3,8	108	317 \pm 210	10,2 \pm 1,7	1,6 \pm 0,4	0,42 \pm 0,4
№ 2	АНС	14	8,7 \pm 2,3	63 \pm 33	30,9 \pm 17,4	92	167 \pm 100	83,5 \pm 36,0	0,37 \pm 0,3	
	ДСМ	32	6,7 \pm 1,6	38 \pm 19	30,5 \pm 6,3	94	168 \pm 73	20,2 \pm 4,5	1,5 \pm 0,4	0,46 \pm 0,5
№ 3	АНС	13	5,4 \pm 1,1	24 \pm 10	15,5 \pm 7,3	96	174 \pm 68	37,8 \pm 1,7	0,41 \pm 0,3	
	ДСМ	16	8,2 \pm 1,4	54 \pm 19	40,8 \pm 4,5	99	158 \pm 68	33,3 \pm 7,3	1,23 \pm 0,2	0,39 \pm 0,6

Примечание. В столбцах 3–6 приведены показатели лейкоцитов, в столбцах 7–9 – показатели опухолевых клеток/

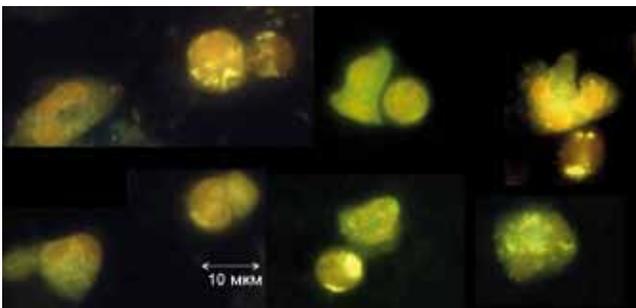


Рис. 4. Лейкоциты в клеточной взвеси опухоли перстневидноклеточного рака желудка, витально окрашенные флуоресцентным зондом катионом ДСМ. Ярко-желтым флуоресцируют митохондрии лейкоцитов. Ядра имеют окраску от оранжевой до бурой. $\times 100$

имеют выше МП, чем МП клеток опухоли, но численно менее выражено по сравнению с окраской АНС: от 1,2 до 1,6 раза. На рисунке 3 изображено поле зрения клеточной взвеси с яркими в окраске ДСМ лимфоцитами на фоне темных клеток опухоли. В лимфоцитах хорошо видны ярко-желтые митохондрии.

Другие лейкоциты, также как лимфоциты, в окраске ДСМ обнаружили обилие ярких митохондрий, которые часто были собраны в цепочки (см. рис. 4). Таким образом, применение двух выбранных флуорохромов позволяет дополнять и подтверждать информацию о соотношении МП разных клеток в клеточной взвеси.

Выводы

Прижизненная окраска флуорохромом ДСМ клеток опухоли перстневидноклеточного рака позволяет выделить отличительные особенности этого гистотипа. Данная окраска дает возможность идентифицировать

темную характерную вакуоль, благодаря которой этот гистотип опухоли получил название «перстневидноклеточный рак».

Измерение яркости флуоресценции АНС опухолевых клеток и лейкоцитов, инфильтрирующих опухоль, показало, что средний МП лейкоцитов существенно превышает (от 2 до 4 раз) средний МП клеток опухоли. Является это соотношение нормой либо отражает физиологическое состояние ткани опухоли или пациентов, покажут дальнейшие исследования. Получена достоверная разница ($p=0,02$) в МП клеток рака и лейкоцитов в пробах, окрашенных АНС, а окраска клеток ДСМ подтвердила тенденцию соотношения МП лейкоцитов и клеток рака и позволила оценить особенности взаимодействия электрически противоположно заряженных мембран ядра и вакуоли, смещающей ядро на периферию.

Литература

1. Белоус Т.А. Начальный перстневидноклеточный рак желудка / Т.А. Белоус, Г.А. Франк, К.К. Пугачев // Архив патологии. 1995. Т. 57. № 3. С. 35–40.
2. Златник Е.Ю. Влияние наночастиц цинка и железа на мембранный потенциал лимфоцитов *in vitro* / Е.Ю. Златник, О.В.Тарнопольская, Л.В. Пердерева // Материалы 4-й международной научной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». 22 сентября 2011 года, Ростов-на-Дону. С. 144.
3. Лазарев А.Ф. Характеристика ядрышкового аппарата опухолевых клеток при раке желудка / А.Ф. Лазарев, В.В. Климачев, И.П. Бобров, В.А. Лубенников // Архив патологии. 2002. № 6. С. 30–32.
4. Максимов Г.К. Неоднородность клеток эпителия пунктата аденокарциномы предстательной железы по мембранному

- потенциалу / Г.К. Максимов, О.В. Тарнопольская, А.И. Шихлярова, Е.М. Непомнящая, В.А. Сергань // Вестник Южного Научного Центра РАН. 2012. Т. 8. № 3. С. 55–60.
5. Морозова Г.А. Флуоресценция 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния в живой клетке / Г.А. Морозова, Г.Е. Добрецов, Г.Я. Дубур, Р.Р. Дубуре, В.М. Голицын, Г.М. Баренбойм, Ю.А. Владимиров // Цитология. 1981. Т. 23. № 8. С. 916–923.
 6. Неред С.Н. Клинико-морфологические особенности перстневидноклеточного рака желудка / С.Н. Неред, А.А. Клименков, А.Г. Перевошиков // Вестник Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина РАМН. 2004. № 3. С. 37–42.
 7. Неред С.Н. Перстневидноклеточный рак желудка: клинико-морфологические аспекты, результаты хирургического лечения и прогноз / С.Н. Неред, А.А. Клименков, И.С. Стилиди, А.Г. Перевошиков, В.В. Делекторская // Вопросы онкологии. 2006. Т. 52. № 3. С. 294–300.
 8. Тарнопольская О.В. Флуоресценция доксорубина в клеточной взвеси аденокарциномы поджелудочной железы у больных после предоперационной лучевой терапии / О.В. Тарнопольская, Е.М. Непомнящая, А.С. Горностаев // Материалы VI пленума президиума Российского общества патологоанатомов. 15–17 мая 2012 года, Нижний Новгород. С. 27–28.
 9. Lauwers G.Y. Gastric carcinoma. WHO classification of tumours of the Digestive System / Lauwers G.Y., Carneiro F., Graham D.Y., Curado M.P. // (IARC) Lgon, 2010. P. 48–68.

IN VIVO FLUORIMETRY OF SIGNET RING CELL CARCINOMA OF THE STOMACH WITH FLUORESCENT PROBES ANS AND DSM

E.M. Nepomnyaschaya, O.V. Tarnopolskaya, H.G. Mamulyan

We studied fluorescent indicators and morphology of the cells of signet ring cell carcinoma of the stomach and leukocytes infiltrating the tumor tissue. It was shown that hyperpolarization of white blood cells infiltrating the signet ring cell carcinoma is three times intensive than that of tumor cells. Vital staining of the cells of signet ring cell carcinoma of the stomach with potential-sensitive fluorescent probe DCM visualized the interactions between nucleus and vacuole displacing the nucleus to the periphery of the cell. The vacuolar membrane is positively charged unlike negatively charged nuclear membrane; it is impermeable for DSM cations inside vacuoles, which appear as dark bodies.

Key words: signet ring cell carcinoma of the stomach, fluorescent probes ANS and DSM, membrane potential

Информация об авторах

Непомнящая Евгения Марковна – докт. мед. наук, профессор, руководитель патологоанатомического отделения Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Тарнопольская Ольга Владимировна – канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник биохимической лаборатории Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Мамулян Хорен Гергиевич – аспирант Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Адрес: 344037. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63. ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России.

Mail: mioi@list.ru.

Federal State Institution «Rostov Cancer Research Institute» of Healthcare and Social Development Ministry of Russian Federation. 344037.

Rostov-on-Don, 14 Line, 63, Russia.

Mail: mioi@list.ru

Переписку вести с Тарнопольской Ольгой Владимировной

E-mail: mioi-patology@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 13 августа 2012 года.

© Коллектив авторов, 2012

УДК 616-002.7

ГРАНУЛЕМАТОЗ ВЕГЕНЕРА У МОЛОДЫХ ПАЦИЕНТОВ: ДВА КЛИНИЧЕСКИХ НАБЛЮДЕНИЯ

*А.Л. Черняев¹, Ю.С. Березовский², А.А. Сердюк¹, Л.М. Михалева³,
М.В. Самсонова¹, К.С. Войтковская³*

¹ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Москва

²ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН, Москва

³ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Описано два наблюдения из практики: подростки 14 лет (пациент Н.) и 16 лет (пациент М.). Пациент М. страдал гранулематозом Вегенера с поражением легких и почек. Смерть больного наступила на 14-е сутки от начала заболевания. Пациент Н. страдал гранулематозом Вегенера с поражением верхних дыхательных путей и легких. Выявлен при плановом осмотре, наблюдался как пациент с кавернозным туберкулезом легких. Диагноз «гранулематоз Вегенера» поставлен при исследовании операционного материала, полученного при выполнении краевой резекции легкого. В статье рассматриваются клиничко-лабораторные показатели, результаты аутопсии и гистологического исследования легких и почек. Особенностью наблюдения является быстро прогрессирующее течение заболевания у подростков мужского пола.

Ключевые слова: гранулематоз Вегенера, диагностика, ANCA

Гранулематоз Вегенера (ГВ) относится к системным ANCA-ассоциированным васкулитам, поражающим преимущественно сосуды среднего и мелкого калибра [1, 12]. Первые три наблюдения описаны F. Wegener (1937) [23]. Заболевание относится к группе редких. Распространенность системных васкулитов составляет 0,4–14 на 100 тыс. населения. Чаще болеют мужчины в возрасте 40–50 лет, однако описаны случаи возникновения болезни у детей и подростков [13, 15].

Этиология системных васкулитов неизвестна. ГВ (синонимы – риногенный гранулематоз, некротический неинфекционный гранулематоз, гигантоклеточная гранулема дыхательных путей, некротизирующий ангиит, респираторно-рениальная форма узелкового периартериита, гранулематоз с полиангиитом) нередко связывают с инфекциями, вызванными золотистым стафилококком и пневмоцистой, а также перенесенными острыми вирусными инфекциями, приемом антибиотиков, сульфаниламидов, препаратов, содержащих серу, воздействием вредных профессиональных факторов, длительным употреблением кокаина [3]. Большое значение придается аутоиммунным нарушениям, предполагается, что ГВ – аутоиммунное заболевание [9, 11, 25].

Для системного генерализованного ГВ характерно наличие триады: поражение ЛОР-органов (носоглотки, придаточных пазух носа, уха, гортани), легких и почек [12]. Описывают варианты с поражением верхних дыхательных путей и легких, легких и почек, реже

изолированный вариант с поражением только легких. Поражение верхних дыхательных путей встречается в 87% наблюдений, как правило в дебюте болезни, при развернутой стадии в 90–94% случаев. Поражение легких наблюдается в 69%, почек в 48% случаев [12]. В верхних дыхательных путях развивается гнойное воспаление, появляются носовые кровотечения, изъязвление носовой перегородки и формируется седловидная форма носа. Около трети пациентов имеют так называемую обезглавленную форму болезни, при которой поражение носоглотки отсутствует. При такой форме заболевания в легких возникают округлые образования, одиночные или множественные, с деструкцией ткани и образованием полостей по типу абсцессов, кровотечениями, может развиваться геморрагический плеврит [21]. Довольно часто изменения в легких сочетаются с поражением почек, что приводит к выраженной почечной недостаточности. Течение заболевания носит прогрессирующий характер и довольно часто заканчивается летальным исходом, если болезнь не диагностирована вовремя и не назначено адекватное лечение.

Критерии для диагностики гранулематоза Вегенера до сих пор остаются предметом дискуссии. Консенсусная конференция в Чалл-Хили в 1994 году дала следующее морфологическое определение ГВ: гранулематозное воспаление, поражающее респираторный тракт, в сочетании с некротизирующим васкулитом сосудов

мелкого и среднего калибра, включая капилляры, венулы, артериолы и артерии, характерным проявлением является некротизирующий гломерулонефрит [16]. В то же время в 1990 году Американская коллегия ревматологов разработала следующие классификационные критерии ГВ [20]:

- воспаление в полости рта или носа: развитие болезненных или безболезненных язв полости рта или гнойное либо геморрагическое отделяемое из полости носа;
- рентгенография органов грудной клетки: узелки, фиксированные инфильтраты или полости в легких;
- изменения в моче: микрогематурия (>5 эритроцитов в поле зрения) или наличие эритроцитарных цилиндров в мочевом осадке;
- гистологические признаки гранулематозного воспаления в стенках артерий или периваскулярной и экстраваскулярной зоны артерии или артериолы.

Пациенту может быть поставлен диагноз «гранулематоз Вегенера» при наличии 2 из 4 названных выше критериев. Чувствительность этих критериев составляет 88,2%, специфичность – 92,0%.

Важную роль в диагностике ГВ играет обнаружение ANCA (антител к цитоплазме нейтрофилов) в серологических реакциях. Чувствительность метода обнаружения cANCA (антитела к протеиназе 3 (PR3) и pANCA (антитела к миелопероксидазе (MPO) методом ELISA при ГВ, соответственно, 80 и 10%. Доказано, что ANCA являются не просто диагностическими маркерами, но участвуют в патогенезе заболевания. Исследования на лабораторных животных и *in vitro* показали, что MPO-ANCA и PR3-ANCA могут активировать нейтрофилы и моноциты, вызывая их адгезию к эндотелиальным клеткам и повреждение этих клеток. Однако наряду с ANCA для развития заболевания необходимо, чтобы MPO или PR3 экспрессировались на поверхности нейтрофилов. Доставка MPO и PR3 к поверхности нейтрофилов происходит под действием TNF и других провоспалительных цитокинов. Разрешающим фактором *in vivo* может быть респираторная инфекция. Кроме того, имеют значение генетические факторы. Показано, что у пациентов с ГВ повышена экспрессия PR3 на мембране нейтрофилов [14]. Также к повышению доступности мишеней для ANCA может приводить aberrантная транскрипция генов в нейтрофилах и, как следствие, потеря эпигенетического подавления генов MPO и PR3 [17].

Заболевание, как правило, начинается с лихорадки, часто септического типа. Наблюдаются мучительный кашель, кровохарканье, боли в грудной клетке, одышка, похудание, артралгии и миалгии. На коже и слизистых оболочках могут появляться язвы и узелки, множественный мононеврит. Встречаются также дисфагия, афтозный стоматит, глоссит, экзофтальм, полиаденит, перикардит, миокардит, коронарит, язвенно-некротические изменения тонкой кишки, различные

варианты гломерулонефрита (чаще диффузный некротический) [1].

Для подтверждения диагноза ГВ необходимо учитывать клиническую картину болезни, провести клинико-инструментальное исследование, лабораторную диагностику и при возможности морфологическое исследование биопсии легкого и почек [7].

Инструментальные методы исследования включают рентгенографию, компьютерную томографию легких, МРТ-ангиографию для определения локализации процесса. Спирометрия, бодиплетизмография, исследование диффузионной способности легких позволяют выявить субклинические проявления заболевания. Более чем у 59% больных имеет место обструктивный тип нарушения функции внешнего дыхания, в 30–40% случаев отмечается рестриктивный тип нарушения. Бронхоскопия и исследование бронхоальвеолярного лаважа необходимы для подтверждения альвеоло-геморрагического синдрома.

Рентгенологические изменения в легких выявляются в 95% наблюдений, в дебюте болезни в 45%. Рентгенологически в легких выявляются солитарные или множественные, иногда «летучие», инфильтраты, имеющие склонность к образованию полостей до 2–5 см в диаметре по типу фибринозно-гнойной пневмонии с некрозом, могут иметь место геморрагические инфаркты. В части наблюдений встречаются мелкоочаговые участки затемнения на фоне усиления легочного рисунка за счет интерстициальной ткани. При компьютерной томографии в легких определяются множественные, реже одиночные, очаги диаметром 2–4 см, в большинстве наблюдений двусторонние, таких очагов может быть до 10. Очаги округлой и овальной формы могут быть хорошо или плохо очерчены, никогда не обывествляются, характеризуются образованием полостей по типу абсцессов. Очаги не имеют какой-либо предпочтительной локализации. Наличие участков консолидации и/или участков типа «матового стекла» является еще одним признаком ГВ, они могут располагаться изолированно от описанных выше образований и представлять собой зоны кровоизлияний. Рентгенологические признаки патологии легких в 65% случаев сочетаются с клиническими проявлениями [2].

При проведении клинического анализа крови можно выявить нормохромную анемию, тромбоцитоз, нейтрофильный лейкоцитоз, повышение СОЭ. В биохимическом анализе крови наблюдаются увеличение С-реактивного белка, изменения креатинина и почечных ферментов. Общий анализ мочи может выявить патологию функции почек. Иммунологическое исследование в сыворотке крови с ANCA подтверждает диагноз ГВ [10, 24].

Оценку активности васкулита проводят на основании индекса клинической активности – BVAS, адаптированного для ГВ в 2001 году (BVAS/WEG) и модифицированного в 2003 году (BVAS2003). При этом учитывают признаки, обусловленные васкулитом, при-

сутствующие на момент осмотра, а также появившиеся и прогрессирующие в течение последнего месяца до настоящего исследования. В зависимости от активности процесса выделяют фазы заболевания: ремиссия, частичная ремиссия, низкая (персистирующая) активность, неактивная фаза, большое и малое обострение, рефрактерное течение болезни. Персистенция активности ГВ (BVAS/WEG) определяется наличием клинического проявления и отсутствием его ухудшения в течение 28 дней с момента предыдущего осмотра пациента. Кроме того, используется кумулятивный индекс васкулитного повреждения, который отражает наличие у больного необратимых изменений органов и систем, совпадающих с началом развития воспалительных изменений в стенке сосудов, и обусловлено ими [1].

Основной метод лечения для достижения ремиссии включает в себя назначение системных глюкокортикостероидов и цитостатиков (циклофосфамид, метотрексат, азотиоприн), в ряде случаев используют плазмаферез и внутривенное введение иммуноглобулинов [4]. Индукция ремиссии занимает от 3 до 6 месяцев, поддержание ремиссии в течение 2–5 лет. Однолетняя выживаемость при ГВ составляет 83,3%, пятилетняя – 74,2% [19]. Известно, что смертность пациентов с ГВ до использования комбинированного лечения глюкокортикостероидами и циклофосфамидом составляла 100%, в настоящее время такая терапия снизила смертность до 5% [8, 22]. В то же время при длительном лечении может развиваться иммуносупрессия, приводящая к возникновению В-клеточной лимфомы и пневмоцистной пневмонии при отсутствии ВИЧ-инфекции [5, 18].

Дифференциальный диагноз при ГВ проводят с заболеваниями, имеющими легочно-почечный синдром. К таким заболеваниям относят микроскопический полиангиит, синдром Чарджа–Стросс, синдром Гудпасчера, геморрагический васкулит, системную красную волчанку, стрептококковую пневмонию с гломеруло-нефритом, лимфоматоидный гранулематоз, лимфому, опухоли, системные микозы, ВИЧ-инфекцию, саркоидоз, туберкулез, лепру. При локальных формах ГВ с поражением только легких проводят дифференциальную диагностику достаточно сложно. Открытая или видеоторакоскопическая биопсия легкого позволяет диагностировать ГВ, однако ее следует делать после культуральных исследований для исключения инфекционной патологии.

Заболеваемость ГВ у детей составляет 0,03–3,2 случая на 100 000 в год. Средний возраст на момент постановки диагноза – 14,2 года, чаще болеют девочки [6]. Наиболее частыми симптомами болезни являются общие проявления – недомогание, слабость, лихорадка, потеря веса (89,2%), легочные (80,0%), проявления со стороны ЛОР-органов (80,0%) и почечные (75,4%). Средний временной интервал от появления симптомов до установления диагноза составляет 2,7 месяца и значительно увеличивается при диагностике ГВ у пациентов с ЛОР-проявлениями и поражением

кожи. Среди патологии со стороны ЛОР-органов наблюдаются носовые кровотечения, изъязвления в полости носа, гнойно-геморрагические корки (64,6% случаев), синуситы (60%), подглоточный, трахеальный или эндобронхиальный стеноз (16,9%), язвы полости рта (9,2%). Серологические тесты у детей выявляют сANCA в 66,2% случаев и рANCA в 21,5% случаев. Таким образом, рANCA при ГВ у детей выявляют чаще, чем у взрослых.

Приводим собственные наблюдения.

Наблюдение 1

Пациент М., 16 лет, поступил в клинику 27 марта 2012 года с жалобами на кашель с трудно отделяемой мокротой, общую слабость, повышение температуры тела до 39°C.

Анамнез. Болен в течение недели, когда после охлаждения отметил повышение температуры до 39°C, сухой кашель с присоединением болей в грудной клетке. Наблюдался в поликлинике, за 2 дня до поступления назначен амоксициллин. 27 марта в поликлинике выполнена рентгенография грудной клетки, на которой выявлено неоднородное инфильтративное затемнение в 3-м сегменте правого легкого, прилегающее к междолевой плевре, в 6-м сегменте правого легкого, четкого отграничения от окружающей ткани не обнаружено, корни легких расширены, левый плохо контурируется, усиление легочного рисунка на остальном протяжении. Был поставлен диагноз «двусторонняя пневмония», и больной направлен в стационар.

При осмотре состояние средней тяжести, кожные покровы бледные, чистые. В легких жесткое дыхание с участками ослабления в средней доле правого легкого. ЧД 20 в 1 мин, тоны сердца ритмичные, приглушены ЧСС 90 в 1 мин. АД 120/80 мм рт. ст., температура 39°C.

Анализ крови при поступлении: лейкоциты $11,9 \times 10^9/\text{л}$, 28 марта – $12,1 \times 10^9/\text{л}$, 4 апреля – $20,4 \times 10^9/\text{л}$, палочкоядерные лейкоциты 5–11%, сегментоядерные 71–69%, Нв крови 140 г/л, 28 марта – 125 г/л, 4 апреля – 87 г/л, тромбоциты $226 \times 10^9/\text{л}$, $235 \times 10^9/\text{л}$, $154 \times 10^9/\text{л}$, соответственно, СОЭ 59 мм/ч. В моче белок 0,072–0,085 г/л, число эритроцитов 5–6 – 35–40 в поле зрения. В анализе мокроты эритроциты, слизь, лейкоциты 0–4 в поле зрения, грамположительные кокки и палочки единичные в редких полях зрения. На рентгенографии легких 30 марта – выраженная массивная гомогенная инфильтрация в обоих легких с уплотнением междолевой плевры в правом легком. Диагноз – «двусторонняя пневмония». 31 марта, 1 апреля, 3 апреля рентгенограммы легких без динамики. 4 апреля обнаружена положительная динамика в виде повышения пневматизации в обоих легких, инфильтрация сохраняется.

С первого дня госпитализации пациент получал антибактериальную терапию (цефтриаксон, доксициклин; после смены антибиотиков – ванкомицин, эдизин, меронем), пульмикорт, октагам, инфузионную

терапию, однако 29 марта его состояние ухудшилось, и 30 марта он был переведен в отделение реанимации. В момент перевода состояние больного тяжелое, в сознании, ориентирован в пространстве и времени, вялый, сонливый. Жалобы на слабость, продуктивный кашель с кровохарканьем. Дыхание 22–26 в 1 мин, при аускультации дыхание жесткое, ослаблено во всех отделах обоих легких, больше в средних отделах правого легкого по задней поверхности, выслушивается шум трения плевры. SaO_2 – 87–91% поддерживается на инсуффляции O_2 12 л/мин. По кардиомонитору синусовая тахикардия до 116 уд. в 1 мин. АД 110–120/70 мм рт. ст. Температура тела 38,2–37,6°C. P_{CO_2} 38, P_{O_2} – 60,1, pH – 7,51. Биохимический анализ крови: общий белок – 60 г/л, билирубин прямой – 5,1 мкмоль/л, железо – 9,3 мкмоль/л, КФК – 248 Ед/л. В отделении реанимации пациент получал меронем 1 г и пульмикорт. 31 марта больший переведен на ИВЛ в режиме ViPAP со следующими параметрами: DO = 600 ЧД 23 в 1 мин. При этом P_{CO_2} – 38, BE – 22, pH – 7,42, ПДКВ – 7, SaO_2 – 92–94, Fi O_2 – 70–80%. 1 апреля произведена трахеостомия. Санируется большое количество геморагического отделяемого со сгустками крови. Нв крови – 74 г/л. 2 апреля P_{CO_2} – 78,7, P_{O_2} – 58,5, индекс оксигенации 72. Состояние расценено как крайне тяжелое. При трахеобронхоскопии через трахеостомическую трубку 3 апреля – картина диффузного катарального бронхита, признаки кровотечения из периферических бронхов. 3 апреля была взята кровь для определения антител к цитоплазме нейтрофилов, но ответ получен 11 апреля после смерти больного: рANCA – отрицательна, cANCA в титре 640, антитела к базальным мембранам почек – отрицательны, антитела к кардиолипину (IgG, IgA, IgM) – отрицательны. Несмотря на массивную антибактериальную и дезинтоксикационную терапию, состояние пациента прогрессивно ухудшалось, и 4 апреля 2012 года он скончался.

Заключительный клинический диагноз.

Основное комбинированное заболевание. 1. Острая внебольничная полисегментарная вирусно-бактериальная пневмония. 2. Синдром Гудпасчера.

Осложнения. Острый респираторный дистресс-синдром взрослых. Сепсис. Полиорганная недостаточность. Постгеморрагическая анемия. Кровотечение из периферических бронхов. Отек легких. Отек головного мозга.

Сопутствующие заболевания. Диффузный катаральный бронхит. Эрозивный гастродуоденит.

Патологоанатомическое исследование трупа.

Труп юноши, среднего роста, правильного телосложения, нормального питания. Кожные покровы чистые с сероватым оттенком, холодные, суховатые. На коже шеи, ниже щитовидного хряща на 4,0 см (над яремной вырезкой), трахеотомическая рана длиной 3,0 см. В правой подключичной области установлен венозный катетер, конец которого, проходя через правую подключичную вену, лежит в просвете верхней полой вены.

Склеры мутные, тусклые, бледные. Слизистая оболочка трахеи и бронхов бледно-красная, тусклая, покрыта слизистыми массами. Масса легких: левого – 1050 г, правого – 1100 г. Ткань легких на ощупь плотная во всех долях слева и справа, пестрого вида: темно-красные участки легкого чередуются с желтовато-розовыми. На разрезе ткань легких полнокровная, все доли легких представлены темно-красной тканью печеночной плотности, чередующиеся с более светлыми (желто-розовыми) участками. В толще легочной паренхимы обоих легких плотноэластичные участки грязно-серого цвета размерами от 1 до 1,5 см в диаметре, в 6-м сегменте левого легкого округлое образование с довольно четкими границами, размерами 10,0 × 7,0 × 6,0 см, сероватого цвета с участком желтоватого цвета в центре диаметром 2 см (рис. 1). В просвете бронхов густая сероватая слизь, стенки бронхов тонкие, сероватого цвета, над поверхностью разрезов не выступают. В просветах основного ствола и ветвях легочных артерий жидкая кровь, интима их гладкая, цвета слоновой кости.

Почки бобовидной формы, общей массой 220 г, капсула снимается легко, обнажая гладкую поверхность, с множеством точечных подкапсульных кровоизлияний в корковом веществе. На разрезе рисунок строения сохранен, корковый слой бледно-серого цвета, толщиной 0,7 см, пирамиды красно-серые. Лоханки несколько расширены, слизистая их и мочеточников сероватая, гладкая, влажная, блестящая.

Другие паренхиматозные органы в состоянии выраженной дистрофии.

При гистологическом исследовании в зоне описанного выше образования в ткани легкого множественные базофильные некрозы с лейкоцитарной инфильтрацией. Местами некрозы имеют вид микроабсцессов с наличием лимфоцитов, плазматических клеток, гистиоцитов. Расположение некрозов напоминает

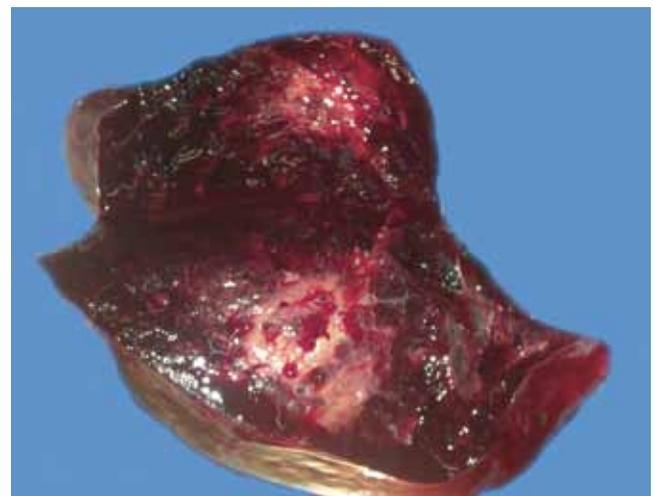


Рис. 1. Макропрепарат: фрагмент легкого. Округлое серовато-желтоватое образование с нечеткими границами, выраженное геморагическое пропитывание окружающей ткани легкого

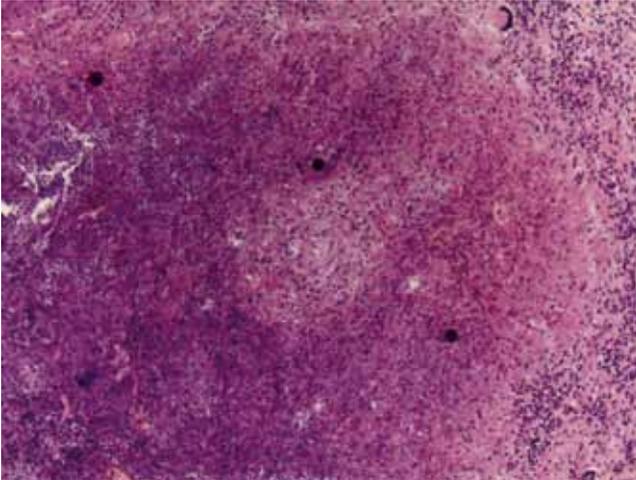


Рис. 2. Некроз ткани легкого, в центре которого определяется сосуд, стенки его инфильтрированы лейкоцитами, лимфоцитами, единичными эозинофилами, по периферии зоны некроза – единичные гигантские многоядерные клетки. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

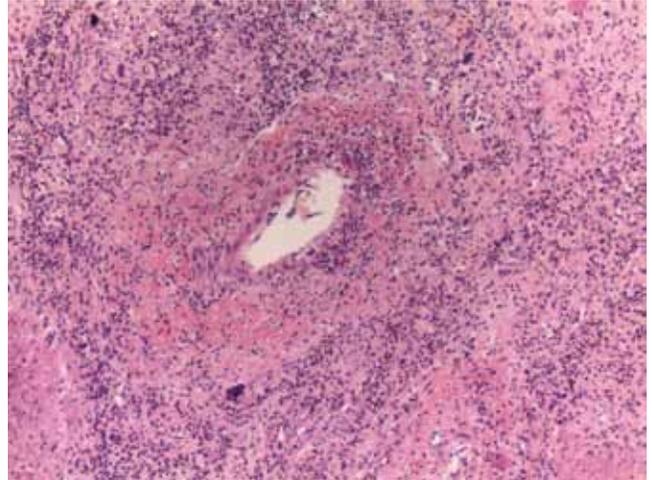


Рис. 3. Продуктивный васкулит в сочетании с некрозом. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

«географическую карту» (рис. 2). Здесь же множественные гигантские многоядерные клетки инородных тел, лежащие по одной и небольшими группами, напоминают неправильной формы гранулемы, эти же клетки обнаруживаются в стенках ветвей легочной артерии, в центре части таких некрозов контуры и отдельные фрагменты ветвей легочной артерии и вен. В отдельных ветвях легочной артерии отек стенок, включая интиму, неравномерное утолщение их с выраженной лимфоцитарной инфильтрацией (рис. 3). По периферии таких участков зоны фиброза, стенки альвеол несколько утолщены, умеренно инфильтрированы лимфоцитами, очаговая картина капиллярита с наличием полиморфно-ядерных лейкоцитов, в просветах альвеол скопления эритроцитов с сидерофагами, фибрина и полиповидной грануляционной ткани, такая же ткань в асти просветов терминальных бронхиол с сужением их просветов.

В ткани почек увеличение клеточности между петлями клубочков, местами в клубочках большое количество эритроцитов с примесью лейкоцитов, фибриноидное набухание стенок капилляров – геморрагический гломерулонефрит.

На основании макро- и микроскопического исследования легких и почек, исследования сывороточных сANCA антител был сформулирован патологоанатомический диагноз.

Основное заболевание. Гранулематоз Вегенера с поражением легких и почек: некротический гранулематозный васкулит, альвеолярный геморрагический синдром в сочетании с капилляритом и некрозами стенок альвеол, альвеоло-геморрагический синдром, облитерирующий бронхиолит с организующейся пневмонией, геморрагический гломерулонефрит, сANCA сыворотки крови – 640 ед.

Осложнения. Постгеморрагическая анемия (Hb – 87 г/л, эритроциты – $2,88 \times 10^{12}$ /л, малокровие внутренних органов). Дистрофия внутренних органов. Трахеостомия (1 апреля 2012 года). Отек головного мозга.

Особенности приведенного наблюдения

У пациента отсутствовало поражение верхних дыхательных путей, поражение почек было в виде геморрагического гломерулонефрита без некрозов сосудов и паренхимы почек. Основные изменения наблюдали в ткани легких, однако рентгенологически эти изменения были приняты за двустороннюю пневмонию. У больного имел место геморрагический легочный синдром, что привело к постановке диагноза «синдром Гудпасчера». Возможно, компьютерная томография легких позволила бы приблизиться к правильному диагнозу, учитывая наличие острого начала болезни с высокой лихорадкой после переохлаждения, кашель с трудно отделяемой мокротой, боли в грудной клетке, наличие инфильтрата при рентгенографии в 3-м сегменте правого легкого и кровохарканье при дальнейшем развитии заболевания.

Наблюдение 2

Пациент Н., 14 лет, поступил в клинику 28 июня 2012 года для диагностической операции с клиническим диагнозом «кавернозный туберкулез верхней доли правого легкого», МБТ (-).

При поступлении жалоб не предъявлял.

Анамнез. Изменения в легком выявлены в июне 2012 года при плановом обследовании. Консультирован в ЦНИИТ, направлен для проведения диагностической операции.

При осмотре состояние удовлетворительное. Кожные покровы и видимые слизистые физиологической окраски. ЧСС 76 в 1 мин, АД 120/75 мм рт. ст., тоны

сердца ясные, ритмичные. При аускультации дыхание везикулярное, проводится по всем полям, хрипов нет. ЧД 16 в 1 мин.

Клинический анализ крови от 29 июня: эритроциты $4,75 \times 10^{12}$, Нв крови 118 г/л, лейкоциты $10,6 \times 10^9$, палочкоядерные лейкоциты 4%, сегментоядерные 73%, эозинофилы 1%, базофилы 0%, лимфоциты 15%, моноциты 7%, тромбоциты 258×10^9 /л, СОЭ 115 мм/ч.

Клинический анализ крови от 13 июля: эритроциты $5,19 \times 10^{12}$, Нв крови 128 г/л, лейкоциты $11,7 \times 10^9$ /л, палочкоядерные 4%, сегментоядерные 58%, эозинофилы 1%, базофилы 0%, лимфоциты 22%, моноциты 12%, тромбоциты 362×10^9 /л, СОЭ 81 мм/ч.

Биохимический анализ крови от 29 июня: общий билирубин 5 мкмоль/л, тимоловая проба 1,7, АЛТ 16 ЕД, АСТ 21 ЕД, холестерин – 3,3 ммоль/л, креатинин 90 мкмоль/л, мочевины 4,0 мкмоль/л, общий белок 72 г/л, альбумин 45 г/л.

Биохимический анализ крови от 5 июля: общий билирубин 10 мкмоль/л, тимоловая проба 0,7, АЛТ 14 ЕД, АСТ 29 ЕД, холестерин – 3,9 ммоль/л, креатинин 78 мкмоль/л, мочевины 3,4 мкмоль/л, общий белок 63 г/л, альбумин 41 г/л.

Коагулограмма от 29 июня: АПТВ 35", протромбиновый индекс 101%, МНО 1,01, АТ III 115%, Fbg 4,66, ТТ 19", толерантность плазмы к гепарину 6'10, активность фибринстабилизирующего фактора 99%, РФКМ 190 мг/л.

Коагулограмма от 5 июля: АПТВ 35", протромбиновый индекс 92%, МНО 1,05, АТ III 92%, Fbg 4,51, ТТ 19", толерантность плазмы к гепарину 6'10, активность фибринстабилизирующего фактора 123%, РФКМ 210 мг/л. Заключение: Состояние гиперкоагуляции с ВСК.

Компьютерная томография от 18 июня: в $S_{1,2}$ правого легкого имеется округлое образование с полостью распада (рис. 4). В остальном легкое без особенностей. Органы средостения без патологии. Синусы свободны.

Поскольку у пациента предполагали туберкулез легких, проводилось следующее лечение: амоксицилин 1,2 × 2 р/д в/в № 5, амикацин 1,0 × 1 р/д в/в № 5, фосфоглив 1 × 3 р/д, азитромицин 0,25 × 2 р/д.

Рентгеновское исследование от 18 июля: состояние после резекции $S_{1,2}$ правого легкого. Легкое расправлено. Органы средостения существенно не смещены. Дополнительных очагов не выявлено.

4 июля 2012 года выполнена операция – видеoaссистированная торакоскопия справа и краевая резекция $S_{1,2}$.

Цитологическое исследование мазков-отпечатков биоптата образования в $S_{1,2}$ правого легкого: в препаратах на фоне значительного количества эритроцитов отмечается большое количество макрофагов (часто с пенистой цитоплазмой; в виде многоядерных форм; с включениями гемосидерина), нейтрофилов, лимфоцитов и эозинофилов, встречаются тучные клетки, участки некроза, единичные участки фиброза. Кислотоустойчивые микобактерии не обнаружены.



Рис. 4. Компьютерная томография высокого разрешения. Округлое образование в ткани легкого с полостью распада и инфильтрацией по периферии

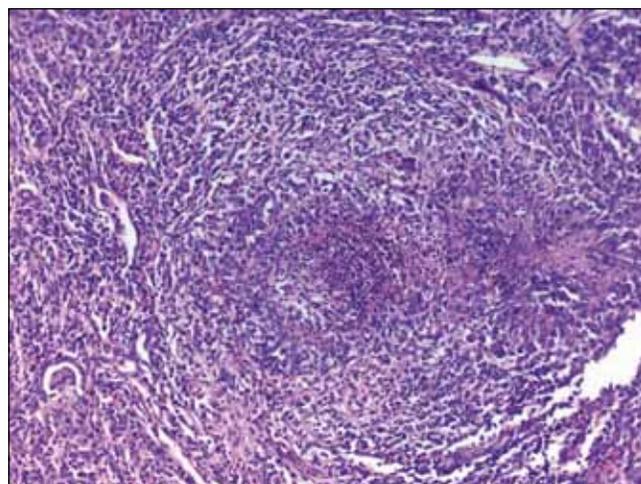


Рис. 5. Микроабсцессы с некрозом стенок сосудов. Окраска гематоксилином и эозином, × 100

При патогистологическом исследовании операционного материала в ткани легкого множественные некрозы с очаговой лейкоцитарной инфильтрацией по типу «географической карты», очаговые микроабсцессы с захватом стенок сосудов и ткани легкого (рис. 5), по периферии которых скопления множества гигантских многоядерных клеток инородных тел (рис. 6), еще дальше по периферии этих зон в просветах терминальных бронхиол и альвеол скопления фибрина и грануляционной ткани, очаговый некроз стенок терминальных бронхиол с лейкоцитарными скоплениями, такие же скопления встречаются в ряде просветов терминальных бронхиол. Некрозы с лейкоцитами стенок ветвей легочной артерии и легочных вен мелкого и среднего калибра, иногда с полным закрытием просветов, в части

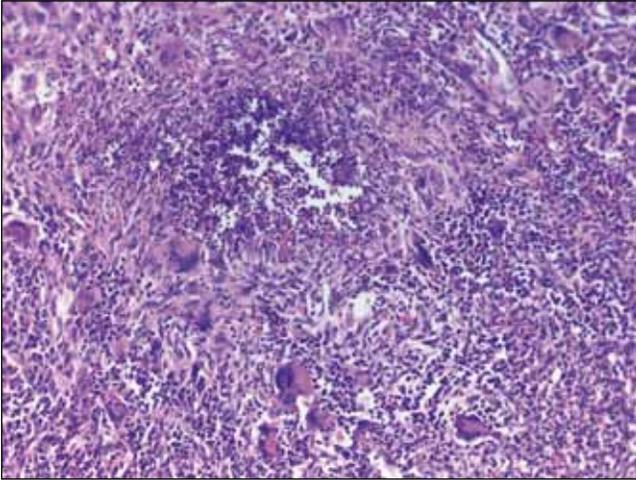


Рис. 6. Некроз стенки сосуда, по периферии – множество гигантских многоядерных клеток. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

стенок сосудов скопление лейкоцитов секторальное и по их периметру, в части стенок сосудов лимфоцитарная инфильтрация, очаговое периваскулярное разрастание фиброзной ткани, иногда с обширными некрозами с лейкоцитарной инфильтрацией с примесью гигантских многоядерных клеток. Лимфоцитарные скопления в виде фолликулов с герминативными центрами периваскулярно и в стенках терминальных бронхиол. Стенки большинства альвеол, вне зон некрозов, тонкие, инфильтрированы лимфоцитами, в просвете альвеол эритроциты, сидерофаги, лимфоциты, макрофаги.

При патогистологическом анализе операционного материала признаки туберкулезного воспаления не выявлены. Гистологическая картина некротизирующего васкулита с развитием гранулематозной реакции в легочной ткани.

При микроскопическом исследовании на гистологических срезах кислотоустойчивые микобактерии не обнаружены.

ДНК микобактерий туберкулеза при ПЦР исследовании не обнаружена.

Послеоперационный период проходил без осложнений. Рана зажила первичным натяжением.

Особенности приведенного наблюдения

Молодому пациенту, у которого при проведении КТ обнаружили округлое образование с полостью распада, был поставлен диагноз «туберкулез легких», поскольку в этой возрастной группе такую картину наиболее часто дает туберкулезный процесс. В целях уточнения диагноза выполнена видеоассистированная торакоскопия и краевая резекция $S_{1,2}$ правого легкого, при исследовании операционного материала микобактерии туберкулеза не обнаружены ни одним из диагностических тестов, что позволило исключить туберкулез. В то же время появилась новая диагностическая гипотеза: гистологическая картина некротизирующего васкулита

с развитием гранулематозной реакции легочной ткани позволила заподозрить гранулематоз Вегенера. При последующем целенаправленном расспросе пациент предъявил жалобы на першение в горле, отделение корочек, кровоизлияния и кровотечения из носа. После гистологического исследования материала в сыворотке крови выявлены сANCA-антитела в диагностическом титре 124 ед. Функция почек не изменена и почки в патологический процесс не вовлечены.

Таким образом, у пациента Н. выявлено 3 из 4 диагностических критериев гранулематоза Вегенера: 1) некротизирующий васкулит по данным биопсии, 2) округлое образование с полостью распада в легких при КТ-исследовании, 3) отделение кровянистых и гнойных корочек из носа, носовые кровотечения. С учетом высокого титра антител сANCA диагноз «гранулематоз Вегенера» был полностью подтвержден.

Литература

1. Баранов А.А. Легочные васкулиты. Респираторная медицина: Руководство / Под ред. А.Г. Чучалина. Т. 2. М.: Геотар-Медиа, 2007. С. 108–132.
2. Труфанов Г.Е. Лучевая диагностика заболеваний и поврежденных органов грудной полости: Атлас рентгено-компьютерно-томографических изображений: Руководство для врачей / Митусова Г.М. / Под ред. Г.Е. Труфанова, Г.М. Митусовой. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2008. С. 197–256.
3. A case of clozapine-induced panhypopituitarism with human neutrophil elastase-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibodies / de Lange T.E. et al. // Eur J Endocrinol. 2009. V. 160. N. 3. P. 499–502.
4. A typical Wegener's granulomatosis – but not pauci-immune! / Joerg L. et al. // Minerva Urol Nefrol. 2012. V. 64. N. 2. P. 149–52.
5. Case 38: central nervous system lymphoma in a patient previously treated for Wegener's granulomatosis / Lowry L. et al. // Leuk Lymphoma. 2008. V. 49. N. 8. P. 1610–1.
6. Classification, presentation and initial treatment of Wegener's granulomatosis in childhood / Cabral A.C. et al. // Arthritis & rheumatism. 2009. V. 60. N. 11. P. 3413–24.
7. Common and uncommon manifestations of Wegener granulomatosis at chest CT: radiologic-pathologic correlation / Martinez F. et al. // Radiographics. 2012. V. 32. N. 1. P. 51–69.
8. Hoffman G.S. Wegener's granulomatosis an analysis of 158 patients / Kerr G.S., Leavitt K. // Ann Intern Med. 1992. V. 116. P. 488–98.
9. Is Wegener's granulomatosis an autoimmune disease? / Hewins P. et al. // Curr Opin Rheumatol. 2000. V. 12. N. 1. P. 3–10.
10. James D.G. Respiratory diseases. Reviews in Medicine / Sharma O.M. // Postgrad Med J. 1990. V. 66. P. 1–15.
11. Lamprecht P. Wegener's granulomatosis / Gross W.L. // Herz. 2004. V. 29. N. 1. P. 47–56.
12. Lie J.T. Wegener's granulomatosis: histological documentation of common and uncommon manifestations in 216 patients // Vasa. 1997. V. 26. N. 4. P. 261–70.
13. Liebow A.A. The J. Burns Amberson lecture: pulmonary angiitis and granulomatosis // Am Rev Respir Dis. 1973. V. 108. P. 1–17.

14. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined / Schreiber A. et al. // J Am Soc Nephrol. 2003. V. 14. P. 68–75.
15. Necrotizing sarcoid granulomatosis in a 14-year-old female / Tauber E. et al. // Eur Respir J. 1999. V. 13. P. 703–5.
16. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference / Jeanette J.C. et al. // Arthritis and rheumatism. 1994. V. 37. N. 2. P. 187–92.
17. Normal gene silencing mechanisms in mature neutrophils are disrupted in ANCA vasculitis / Preston G.A. et al. // APMIS. 2009. V. 117. P. 122–3.
18. Pneumocystis pneumonia in non HIV patients. / Battikh R. et al. // Med Mal Infect. 2007. Vol. 37. N. 9. P. 605–8.
19. Takala J.H. Survival of patients with Wegener's granulomatosis diagnosed in Finland in 1981–2000 / Kautiainen H., Leirisalo-Repo M. // Scand J Rheumatol. 2010. V. 39. N. 1. P. 71–6.
20. The American College of Rheumatology 1990; criteria for the classification of Wegener's granulomatosis / Laevitt R.Y. et al. // Arthr Rheum. 1990. V. 33. P. 1101–7.
21. Wegener's granulomatosis with multiple pulmonary nodules – diagnostic difficulties / Jose R.J. et al. // J R Soc Med Sh Rep. 2010. V.1. P. 34–6.
22. Wegener's granulomatosis: a rare, chronic and multisystem disease. / Khan A.M. et al. // Surgeon. 2006. V. 4. N. 1. P. 45–52.
23. Wegener F. On generalized septic vessel diseases. Translation of classic paper // Thorax. 1987. V. 42. P. 918–9.
24. Wilk A. Clinical and pathophysiological significance of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in vasculitis syndromes // Med Rheumatol. 2009. V. 19. P. 590–9.
25. Yi E.S. Wegener's granulomatosis / Colby T.V. // Semin Diagn Pathol. 2001. V. 18. N. 1. P. 34–46.

WEGENER'S GRANULOMATOSIS IN YOUNG PATIENTS: TWO CLINICAL OBSERVATIONS

A.L. Chernyaev, Yu.S. Berezovskiy, A.A. Serdyuk, L.M. Mikhaleva, M.V. Samsonova, K.S. Voytkovskaya

We describe two clinical observations of adolescents: patient N, 14 years of age, and patient M, 16 years of age. Patient M. suffered from Wegener's granulomatosis with renal and pulmonary involvement. The patient died on day 14 after symptom onset. Patient N. developed Wegener's granulomatosis with upper respiratory tract and pulmonary involvement found during scheduled inspection. He was treated as a patient with cavernous tuberculosis. Wegener's granulomatosis was diagnosed on the basis of the study of surgical specimens obtained during marginal lung resection. Clinical, autopsy and additional laboratory findings as well as histology of lung and kidneys were analyzed. The cases were characterized by rapidly progressive course of the disease in male adolescents.

Key words: Wegener's granulomatosis, diagnostics, ANCA

Информация об авторах

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

Материал поступил в редакцию 26 августа 2012 года.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА СПЕКТРОСКОПИИ ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИХ ПОТЕРЬ ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОНОВ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

С.В. Буравков^{1,2}, Т.А. Белоусова¹, В.П. Черников¹

¹ ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва,

² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В статье представлены данные литературы по применению метода спектроскопии характеристических потерь энергии электронов на базе трансмиссионного электронного микроскопа в сравнении с рентгеновским локальным микроанализом. Отмечается, что основная проблема применения данного метода заключается в выборе адекватного способа подготовки биологического материала для анализа химических элементов. Собственные данные авторов, представленные в статье, получены с использованием электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Результаты исследования позволили оценить аналитические возможности нового метода, а также сложность подготовки препаратов. Рассматриваются вопросы перспективности использования метода спектроскопии характеристических потерь энергии электронов в биологических и медицинских исследованиях.

Ключевые слова: электронная спектроскопия, картирование химических элементов, трансмиссионная электронная микроскопия, рентгеновский микроанализ

Одним из новых направлений аналитической электронной микроскопии в настоящее время наряду с рентгеновским микроанализом (energy dispersive X-ray spectroscopy – EDS) является спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (electron energy loss spectroscopy – EELS). Метод EELS, позволяющий анализировать химический состав элементов на ультраструктурном уровне, широко используется в физической химии и физике твердого тела, однако в биологических и медицинских исследованиях он применяется достаточно редко. В чем же заключаются возможности использования этого метода в биологии и медицине и что ограничивает его перспективы?

В статье проанализирован зарубежный и собственный опыт использования EELS на основе аналитического трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 со встроенным в колонну энергетическим фильтром Omega (Carl Zeiss, Германия). Следует сказать, что в настоящее время в отечественной литературе отсутствуют работы, содержащие данные, полученные с применением этого метода в биологии и медицине.

Комбинирование традиционной электронной микроскопии и спектроскопии открывает новые возможности для изучения элементного состава клеток и субклеточных структур благодаря высокой чувствительности спектроскопических методов. EDS представляет собой метод исследования спектров рентгеновского излучения, образующегося при взаимодействии электронного луча с образцом, в результате чего гене-

рируется характеристическое рентгеновское излучение, в энергетическом спектре которого присутствуют соответствующие пики химических элементов. Характерные особенности этого метода – возможность локального анализа и построение карт распределения химических элементов как на ультратонких (100 нм), так и на полутонких (2–4 мкм) срезах. В настоящее время хорошо разработаны и полуколичественные, и количественные методы рентгеновского анализа.

EELS является относительно новым методом в электронно-микроскопических исследованиях. Он основан на том, что поглощение электронов зависит от химического состава твердого тела. Аналитическая информация при этом получается из неэластически рассеянных электронов с использованием спектроскопии потерь их энергии при детектировании характеристических краев, соответствующих возбуждению электронов в атомном ядре. Использование этого метода в биологических и медицинских исследованиях в основном ограничивается получением характеристических изображений по выбранным химическим элементам (electron spectroscopic imaging – ESI), однако для этого требуется работать только на ультратонких срезах и желательно без использования веществ, обладающих контрастирующими свойствами (осмий, уранилацетат, свинец и т.д.), широко применяемых в электронной микроскопии. Высокая чувствительность этого метода, а она на порядок выше, чем у рентгеновского микроанализа, теоретически предоставляет возможность выяв-

ления единичных атомов. Кроме того, сочетание EELS с трансмиссионной электронной микроскопией при анализе обеспечивает очень высокое пространственное разрешение, достигающее в настоящее время нескольких нанометров. Последнее обстоятельство позволяет считать его одним из перспективных методов анализа в нанотехнологиях.

Критическими моментами для аналитической электронной микроскопии являются методы подготовки биологических образцов. Использование традиционных для электронной микроскопии методов (с двойной фиксацией, обезвоживанием и дальнейшей заливкой в смолы – эпон, аралдит, вестопал и т.д.), хорошо зарекомендовавших себя при исследовании ультраструктуры клеток, приводит к значительным и необратимым потерям легкодиффундирующих молекул. Однако названные методы подготовки могут с успехом использоваться для исследования иммобилизованных химических элементов и продуктов гистохимических реакций. Методы криофиксации и криоультрамикротомии дают полную сохранность всех присутствующих в клетках и субклеточных структурах химических элементов, но при этом требуют дорогостоящего оборудования. Криогенные методы до сих пор являются весьма трудоемкими и не могут считаться рутинными.

В настоящее время накоплен значительный опыт использования обоих методов аналитической электронной микроскопии при изучении различных тканей на ультраструктурном уровне. Можно отметить работы, выполненные на растительных тканях (зеленые морские водоросли) [2], эксперименты, касающиеся определения тяжелых металлов в грибах [4], а также целый ряд статей, содержащих результаты исследований, выполненных на клетках животных: определение церия при гистохимическом выявлении щелочной фосфатазы (зрительные луковицы крысы) [6], выявление кальция в остеобластах [1] и синаптических везикулах спинного мозга крыс [5] и многие другие.

Особое место занимают работы, выполненные на криосрезах, что позволяет детектировать легкодиффундирующие химические элементы. Примером может служить определение распределения бора, нашедшего широкое распространение при нейтронной терапии, в модельных экспериментах на культуре клеток меланомы человека [3].

На рисунке 1 приведен пример полученного нами спектра рентгеновского излучения с криостатного среза печени крысы (рис. 1 А) с использованием рентгеновского энергетического спектрометра фирмы Kevex 5100 в качестве приставки к растровому электронному микроскопу Hitachi S-500 (Япония). Видны характеристические пики фосфора, серы, хлора и калия, свидетельствующие о хорошей сохранности элементного состава в ткани (рис. 1 Б).

Применение методов рентгеновского локального микроанализа и EELS на криоультрасрезах позволяет локально определять содержание воды и сухой массы

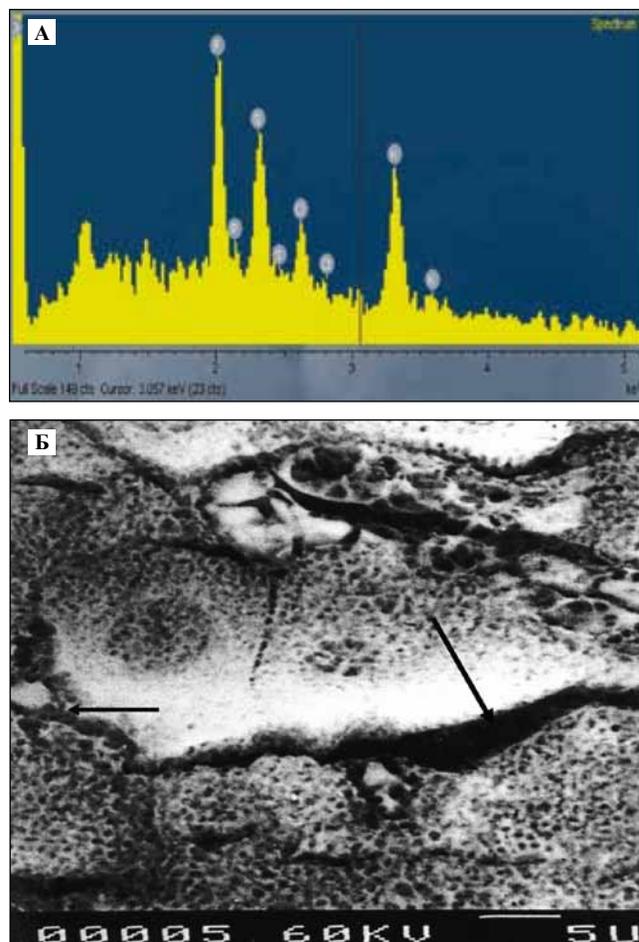


Рис. 1. EDS, локальный рентгеновский микроанализ ткани печени крыс.

А – спектр рентгеновского излучения, полученного с криостатного среза гепатоцита печени крысы,

Б – сканирующая электронная микроскопия криостатного среза печени крысы (сушка среза толщиной 5 мкм в криостате при температуре -30°C). Границы гепатоцита указаны стрелками. Длина маркера – 5 мкм

в любых компартаментах клеток [7], а также оценивать локализацию антигенов в клетках прямым методом без мечения первичных антител [8].

В наших исследованиях с применением спектрометра энергетических потерь электронов, встроенного в колонну трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120, были использованы ультратонкие (100 нм) эпоксидные срезы печени крыс (фиксация 2,5% глутаровым альдегидом на 0,1 М фосфатном буфере и 1% OsO_4 , без дополнительного контрастирования уранил-ацетатом и цитратом свинца). Анализировалось содержание в данных образцах фосфора и железа. С целью проверки спектрометра перед исследованиями проводили анализ тест-объекта, представленного в виде перфорированной углеродной пленки. На рисунке 2 можно увидеть изображения, полученные в области фона при 268 eV (рис. 2 А), а также в области пика углерода при 303 eV (рис. 2 Б). Для верификации ре-

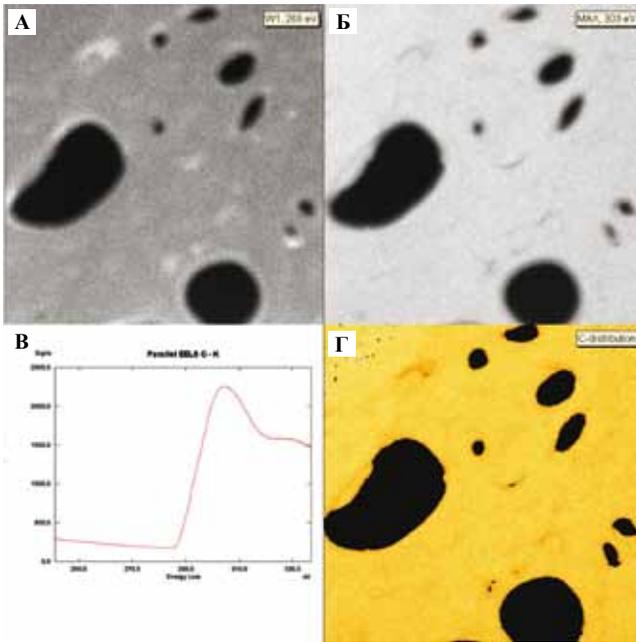


Рис. 2. EELS, распределение углерода на перфорированной углеродной подложке.

А – спектральное изображение при 268 eV (фоновое изображение), Б – при 303 eV (изображение углерода в пике), В – спектр углерода, Г – «чистое» изображение распределения углерода

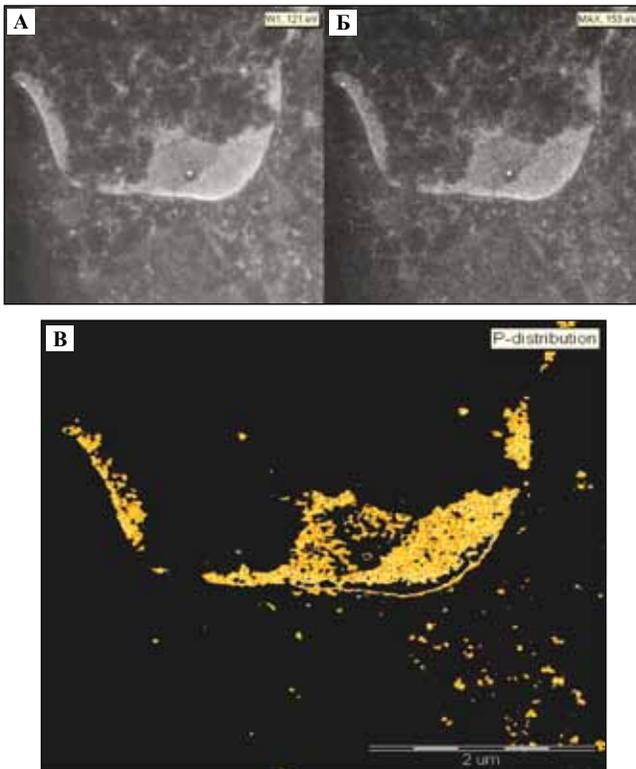


Рис. 3. EELS, распределение фосфора в ядре гепатоцита на фиксированных 2,5% глутаровым альдегидом и 1% тетраоксидом осмия.

А – спектральное изображение при 121 eV (фоновое изображение), Б – при 153 eV (изображение фосфора в пике), В – «чистое» изображение распределения фосфора. Длина маркера – 2 мкм

гистрировали спектр (рис. 2 В), на котором отчетливо виден пик углерода. Полученное изображение «чистого» углерода представлено на рисунке 2 Г.

Результаты исследования по распределению фосфора на фиксированных и заключенных в смолу препаратах печени крыс представлены на рисунках 3 и 4. Отмечалось скопление фосфора (вероятно, обусловленное фосфопротеинами) в электронно плотных участках ядер гепатоцитов.

При попытке выявить на тех же препаратах распределение железа в эритроцитах лишь в отдельных случаях удавалось получить слабый пик этого элемента (рис. 5). Исследование углерода при этом не проводили, поскольку срезы располагались на углеродной подложке. Другие химические элементы на таких препаратах выявить не удалось. По-видимому, это связано с тем, что указанная выше подготовка образцов приводит к практически полному вымыванию других неорганических элементов. Данное предположение доказывает и тот факт, что после высушивания на воздухе отмытых эритроцитов из крови человека (рис. 6 А) всегда регистрировали отчетливый пик железа (рис. 6 В). То же относится, например, и к железосодержащему раствору ферритина, приготовленному аналогичным способом (рис. 6 Б). Нам удалось с помощью EELS выявить на ультратонких срезах миокарда крысы наличие железа в молекулах ферритина, располагающихся в просвете кровеносных капилляров. Ферритин животным вводили внутривенно, а образцы ткани фиксировали только 1% раствором тетраоксида осмия с последующей заливкой в эпоксидную смолу

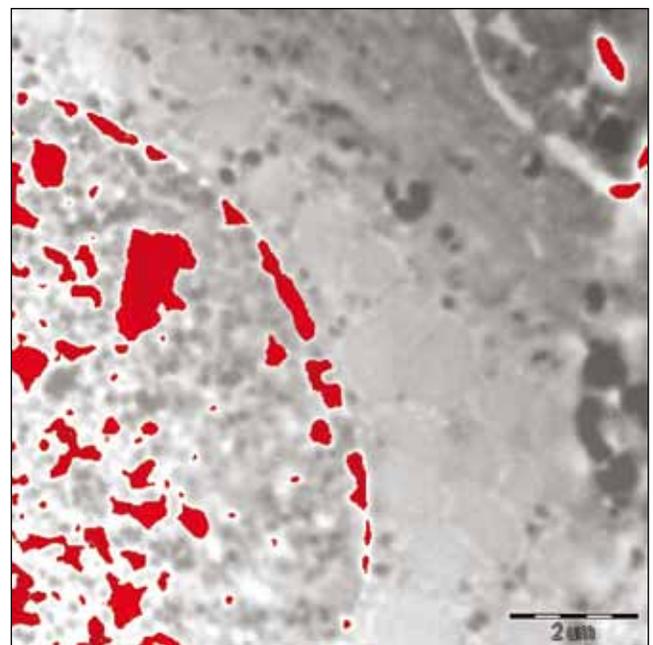


Рис. 4. Изображение распределения фосфора (красный цвет) в ядре гепатоцита после фиксирования 2,5% глутаровым альдегидом и 1% тетраоксидом осмия, наложенное на трансмиссионное изображение. Длина маркера – 2 мкм

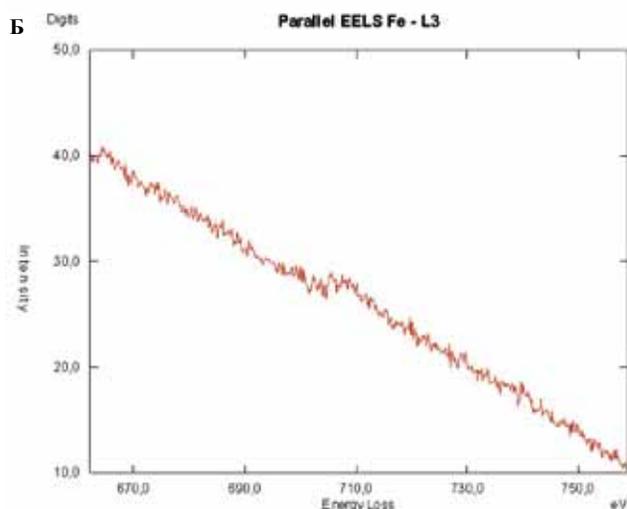
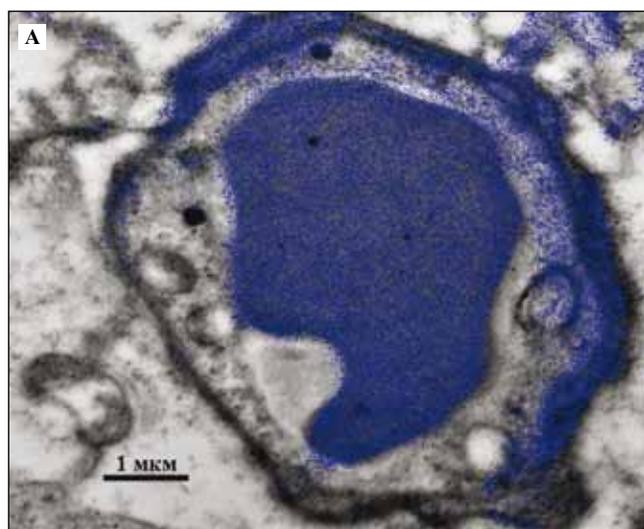


Рис. 5. Распределение железа в эритроците из печени крысы; двойная фиксация – 2,5% глутаровым альдегидом и 1% тетраоксидом осмия, заливка в эпон-аралдит.

А – изображение распределения железа (синий цвет) в эритроците, Б – спектр EELS с небольшим пиком Fe в максимуме 710 eV

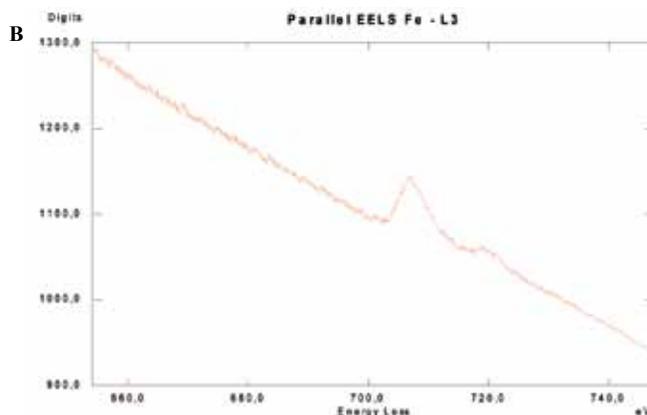
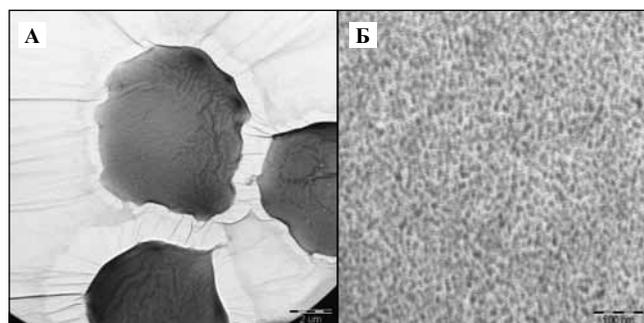


Рис. 6. Распределение железа в эритроцитах и растворе ферритина в препаратах, высушенных на воздухе.

А – эритроциты из крови человека, высушенные на сеточках, трансмиссионная электронная микроскопия,

Б – изображение молекул ферритина из капли раствора, высушенного на сеточке, трансмиссионная электронная микроскопия,

В – спектр EELS, указывающий на присутствие железа в эритроцитах

без предварительной фиксации глутаровым альдегидом и дополнительного контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца (рис. 7).

Мгновенная криофиксация и криоультрамикротомия на сегодняшний день являются наиболее адекватными методами подготовки материала при исследовании легкодиффундирующих химических элементов с помощью EELS, однако в наших условиях эти способы были недоступны.

В таблице приведены основные различия двух применяющихся в настоящее время в электронной микро-

скопии аналитических методов – рентгеновского микроанализа и спектроскопии потерь энергии электронов.

В заключение следует сказать, что, несмотря на сложность данных методов и трудоемкость подготовки образцов, аналитическая электронная микроскопия все чаще применяется в медицинской практике. Наглядным подтверждением этого является использование EELS для определения локального накопления меди в биоптатах печени пациентов, страдающих болезнью Коновалова–Вильсона [9], и железа в случаях наследственного гемохроматоза у детей [10].

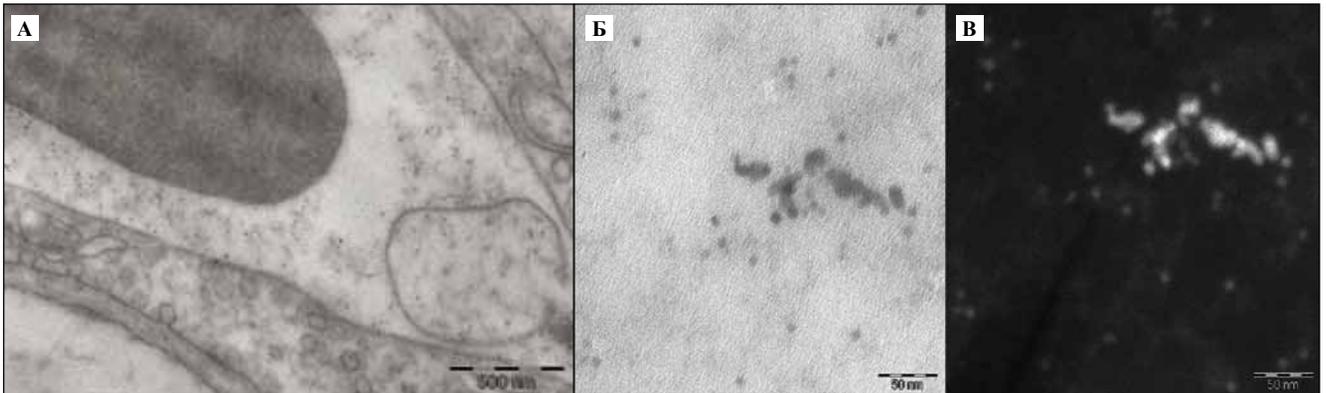


Рис. 7. Ферритин в кровеносном капилляре миокарда крысы; фиксация 1% тетраоксидом осмия.
 А – электронно-микроскопическое изображение предполагаемых агрегатов молекул ферритина внутри сосуда
 при внутривенном введении, Б – увеличенное изображение зерен ферритина,
 Б – ESI, изображение железа в пике при 710 eV (то же, что Б)

Таблица

Сравнение рентгеновского микроанализа (EDS) и спектроскопии энергетических электронных потерь (EELS)

Рентгеновский микроанализ	Спектроскопия потерь электронов
<ul style="list-style-type: none"> • Использование толстых, полутонких и ультратонких образцов. • Чувствительность и пространственное разрешение взаимосвязаны. • Получение изображений по элементам возможно, но с меньшим разрешением. • Хорошо разработанный количественный метод. • Анализ всех химических элементов от бора до урана. 	<ul style="list-style-type: none"> • Использование только ультратонких образцов (<100 нм). • Высокая чувствительность метода (на порядок больше, чем у EDS). • Преимущественное использование для получения спектроскопических изображений. • Отсутствие на сегодняшний день надежных количественных подходов. • Преимущественно анализ легких элементов.

Литература

1. Direct visualization of intracellular calcium in rat osteoblasts by energy-filtering transmission electron microscopy / Bordat C. et al. // *Histochem. Cell Biology*. 2004. V. 121. P. 31–8.
2. Use of energy filtering transmission electron microscopy for image generation and element analysis in plant organisms / Lutz-Meindel U. // *Micron*. 2007. V. 38. P. 181–96.
3. Subcellular localization of boron in cultured melanoma cells by electron energy-loss spectroscopy of freeze-dried cryosections / Michel J. et al. // *J. Microsc.* 2003. V. 210. P. 25–34.
4. Heavy metals and thiol pool in three strains of *Tetradium Marchalianum* / Miersch J. et al. // *Mycological Progress*. 2005. V. 4(3). P. 185–94.
5. Microwave fixation and localization of calcium in synaptic terminals using x-ray microanalysis and electron energy loss spectroscopy imaging / Mizuhira V. and Hasegawa H. // *Brain Res. Bull.* 1997. V. 43. P. 53–8.
6. Specific visualization of precipitated cerium by energy-filtered transmission electron microscopy for detection of alkaline phosphatase in immunoenzymatic double labeling of tyrosine hydroxylase and serotonin in the rat olfactory bulb / Radcke C. et al. // *Histochem. Cell Biology*. 2002. V. 118. P. 459–72.
7. Quantitative water mapping of cryosectioned cells by electron energy-loss spectroscopy / Sun S.Q. et al. // *J. Microsc.* 1995. V. 177. P. 18–30.
8. Electron energy loss spectroscopy (EELS) as a method for the localization of antigens and other substances in cells and tissues / Wolf B. and Bessler W.G. // *Naturwissenschaften*. 1990. V. 77(3). P. 110–5.
9. Electron microscopic detection of copper in the liver of two patients with Morbus Wilson by EELS and EDX / Jonas L. et al. // *Ultrastruct Pathol.* 2001. V. 25. P.111–8.
10. Hereditary haemochromatosis of a young girl. Detection of early iron deposition in liver cell lysosomes using transmission electron microscopy and electron energy loss spectroscopy / Jonas L. et al. // *Ultrastruct Pathol.* 2002. V. 26. P. 23–6.

APPLICATION OF ELECTRON ENERGY LOSS SPECTROSCOPY METHOD IN BIOLOGY AND MEDICINE

S.V. Buravkov, T.A. Belousova, V.P. Chernikov

We present a review of literature on application of electron energy loss spectroscopy in transmission electron microscopy in comparison with X-ray microanalysis. The main problem of using this method is believed to be the choice of adequate sample preparation method for chemical element analysis. Our own data presented in the article were obtained with the use of Zeiss LIBRA 120 electron microscope. Our results allowed us to assess the capabilities of new analytical method as well as difficulties of preparation. In conclusion, the prospects of using electron energy loss spectroscopy in biological and medical investigations are discussed.

Key words: electron energy loss spectroscopy, elemental mapping, transmission electron microscopy, X-ray microanalysis

Информация об авторах

Буравков Сергей Валентинович – докт. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории анализа изображений клеточных структур и тканей, факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 119192, Москва, Ломоносовский проспект, д. 31, корп. 5. E-mail: buravkov@fbm.msu.ru.

Белуосова Татьяна Александровна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: 1200555@mail.ru

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

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: 1200555@mail.ru

Материал поступил в редакцию 3 сентября .2012 года.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ В УСЛОВИЯХ ТЕРАПИИ КОЛЛОИДНЫМ НАНОАКВАХЕЛАТОМ СЕРЕБРА

Е.С. Половьян, Р.А. Москаленко, Н.Д. Чемич, А.Н. Романюк, С.Д. Бончев

Сумский государственный университет, Сумы, Украина

Изучены морфологические изменения печени самцов крыс при острой кишечной инфекции, вызванной условно патогенными микроорганизмами. Применение наноаквахелата серебра уменьшает активность воспалительного процесса и морфологических изменений в печени. Исследование ткани печени с помощью сканирующей электронной микроскопии с микроанализом показало отсутствие накопления серебра в органе.

Ключевые слова: печень, морфология, наноаквахелат серебра, сканирующая электронная микроскопия, острая кишечная инфекция

В последнее десятилетие на Украине, как и во всем мире, ежегодно растет заболеваемость острыми кишечными инфекциями (ОКИ), которые по количественным показателям стабильно занимают второе место в структуре инфекционной патологии. При этом наблюдается увеличение роли условно патогенной микрофлоры (УПМ) семейства Enterobacteriaceae (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* и др.) [2]. Одной из причин высокой частоты ОКИ является значительная пластичность УПМ, обусловленная генетическим контролем активации факторов патогенности, антагонизмом с представителями нормальной микрофлоры, способностью к образованию биопленок [1]. Также, вследствие неконтролируемого использования населением антибиотиков (АБ), происходит искусственная селекция УПМ с множественной устойчивостью к лекарственным препаратам. Таким образом, происходит циркуляция АБ во внешней среде, что приводит к антибиотикорезистентности УПМ [5]. Исходя из этого, возникает необходимость пересмотра традиционного этиотропного лечения ОКИ, вызванных УПМ.

Сегодня значительный теоретический и практический интерес вызывают научные разработки нанотоксикологии и нанофармакологии по выяснению биофизических механизмов действия наночастиц на функции органов и систем организма, различных клеток, их мембран, митохондрий, рибосом, ферментов, нуклеиновых кислот [7]. Современные нанотехнологии

позволяют воздействовать на пораженные органы и системы без негативного влияния на общее состояние здоровья [3, 4]. Например, в качестве альтернативы АБ используется коллоидный наноаквахелат серебра, стабилизированный лимонной кислотой, с размерами частиц 25 нм. Именно такие размеры позволяют действующему препарату занимать большую площадь, что приводит к увеличению контакта серебра с возбудителями инфекционных заболеваний [11].

Для объяснения механизма действия наносеребра используется абсорбционная теория, согласно которой этот химический элемент поглощается бактериальными протопластами с дальнейшим связыванием тиамин и гуанина ДНК и деструкцией мембраны, что приводит к гибели возбудителя [10]. Широкий спектр антисептического действия серебра и отсутствие резистентности к нему у микроорганизмов способствуют повышению интереса исследователей к этому микроэлементу во многих странах мира. На современном этапе серебро относят к группе микроэлементов с мало изученной биологической ролью. Вследствие этого и с учетом изменения физико-химических свойств серебра в нанометровом диапазоне необходимо создать практическую и теоретическую базу нанофармакологии и нанотоксикологии для предупреждения ятрогенных микроэлементозов, в данном случае аргирозов [8].

Целью настоящего исследования является изучение влияния препарата коллоидного наноаквахелата серебра на морфологию печени на экспериментальной модели ОКИ, вызванной УПМ.

Материалы и методы

Эксперимент проводили согласно положению Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985). ОКИ вызывали у 16 половозрелых самцов крыс массой 200–250 г путем перорального введения 1,0 мл смеси культур УПМ каждые 4 часа на протяжении 5 дней (*E. coli* гемолизирующая 10^{10} КОЕ/мл, *K. pneumoniae* 10^{10} КОЕ/мл, *St. aureus* (гиалуронидазная, лецитиназная, коагулазная, гемагглютинирующая активность) 10^{10} КОЕ/мл, *Ps. aeruginosa* 10^{10} КОЕ/мл, *Enterobacter cloacae* 10^{10} КОЕ/мл, *Str. fecalis* 10^{10} КОЕ/мл). Животные были разделены на две группы: 1-й, контрольной, группе (8 крыс) в качестве базисной терапии перорально вводили регидрон (2,5 мл/сут), смекту (0,15 г/сут в 3 приема) и панкреатин (12 мг/сут в 3 приема); 2-я, экспериментальная, группа (8 крыс) на фоне базисной терапии перорально получала по 2 мл коллоидного наноаквахелата серебра (0,02 мг/сут), стабилизированного лимонной кислотой, с концентрацией 10 мг/л каждые (24±2) часа в течение 7 дней. Раствор наносеребра необходимой концентрации готовили *ex tempore*. Общая длительность эксперимента составила 14 дней.

После выведения животных из эксперимента путем декапитации в условиях эфирного наркоза у них брали фрагмент печени. Осуществляли проводку, заливку материала, изготовление гистологических срезов. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике [6]. В печеночной ткани измеряли площадь ядер и цитоплазмы гепатоцитов, подсчитывали количество клеток Купфера в поле зрения и количество гепатоцитов в печеночной балке [9]. Микрофотографии гистологических препаратов получали и обрабатывали с помощью цифровой системы вывода изображения SEO Scan ICX 285 AK-F IEE-1394 и морфометрической программы SEO Image Lab 2.0 (Сумы, Украина).

Для проведения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с микроанализом исследуемые образцы печени нарезали на блоки размерами 3 × 3 мм и толщиной 1–1,5 мм, которые фиксировали в 3,125% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере. Минимальное время фиксации образцов составляло 4–5 часов. Далее образцы промывали фосфатным буфером (рН 7,2) и помещали в 1% раствор тетраоксида осмия на том же фосфатном буфере на 2 часа. После фиксации осмием образцы трижды промывали бидистиллированной водой. Затем проводилась дегидратация в спиртах возрастающей концентрации. Обезвоженные образцы помещали в вакуумную камеру для просушивания под разрежением в течение 5 часов. Далее высушенные образцы монтировали на предметных столиках и напыляли золотом. Исследование проводилось на сканирующем электрон-

ном микроскопе РЕМ 100-У с микроанализом (ПО «Электрон», Сумы).

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента у исследуемых животных на 2-й день (2,88±0,18) введения смеси культур УПМ наблюдалось угнетение познавательной и двигательной активности, снижение потребления корма. К 4-му дню (4,63±0,13) присоединились жажда, жидкий стул зелено-коричневого цвета без примесей слизи, крови; наблюдалось снижение массы тела на 9,81±0,3%.

Во время лечения подопытных крыс обеих групп нормализация двигательной реакции и активности употребления корма наступала в одинаковые сроки – на 2-й день (2,13±0,53) от начала лечения. Использование разных схем лечения повлияло на длительность диарейного синдрома. Так, у крыс 2-й группы быстрее, по сравнению с животными 1-й группы, происходила нормализация функции кишечника на 3-и (3,88±0,13) и 5-е (5,38±0,18) сутки от начала лечения, соответственно, $p < 0,001$. За весь период наблюдения за животными летальных случаев не было.

В условиях базисной терапии ОКИ, вызванной УПМ, в печени были выявлены морфологические изменения. Гистологическая структура печени характеризовалась частичной дискомплексацией печеночных балок, отеком паренхимы. Наблюдалось умеренное количество двуядерных гепатоцитов, некоторые печеночные клетки находились в состоянии выраженной баллонной дистрофии (рис. 1). Портальные тракты были расширены за счет отека и воспалительной инфильтрации. В перипортальной зоне определялась незначительная лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация с формированием одиночных очагов некрозов. В поврежденных портальных трактах отмечались

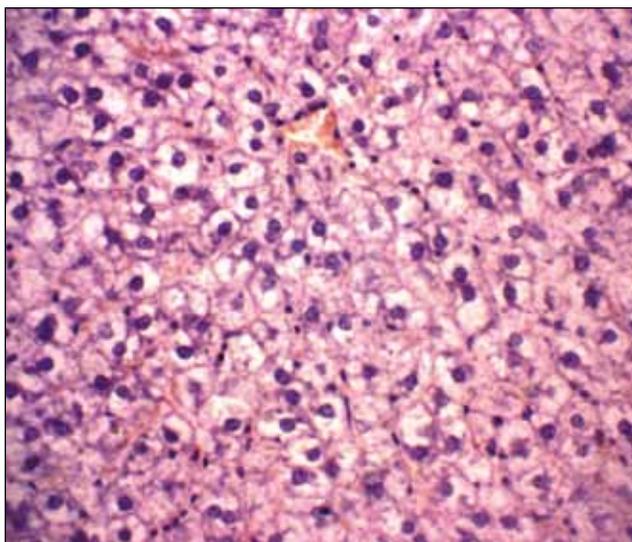


Рис. 1. Печень после базисной терапии ОКИ, вызванной УПМ. Гепатоциты в состоянии баллонной дистрофии. Окраска гематоксилином и эозином, × 360

деструктивные изменения желчных протоков, дистрофические изменения эндотелия сосудов. Воспаление иногда распространялось в порто-портальном направлении, имелись одиночные внутريدольковые инфильтраты. Центральные вены были полнокровны, их эндотелий с признаками десквамации, базальная мембрана утолщена. Большинство синусоидов расширено и содержало цепочки лимфоцитов, наблюдалось увеличение количества клеток Купфера.

В условиях терапии ОКИ раствором наноаквахелата серебра была выявлена нормализация гистологической структуры печени (рис. 2). Отек паренхимы уменьшился, однако сохранялись расширение пространств Диссе и незначительная дисконфлексация печеночных балок. По сравнению с 1-й группой крыс, у животных 2-й группы количество двуядерных гепатоцитов уменьшалось, отдельные гепатоциты находились в состоянии гидропической дистрофии. В части портальных трактов выявлялась умеренная воспалительная лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация, иногда с распространением в перипортальные зоны, одиночные фокусы воспаления встречались внутри долек. В пораженных портальных трактах наблюдались явления деструкции и компенсаторной пролиферации желчных протоков, дистрофические изменения эндотелия сосудов. Также наблюдались полнокровные центральные вен, мелкие кровоизлияния в паренхиме печени. Некоторые синусоиды были расширены, содержали единичные лимфоциты, нейтрофилы.

При исследовании морфометрических показателей ткани печени получены следующие результаты (табл.): средняя площадь ядер гепатоцитов в условиях базисного лечения ОКИ была в 1,4 раза меньше, чем в группе, где использовали наноаквахелат серебра, а средняя площадь цитоплазмы в 1,7 больше. При этом количество клеток Купфера на 73,3% было больше, а количество гепатоцитов в балке на 76,0% меньше в поле зрения по сравнению с показателями, полученными при исследовании печени крыс 2-й группы.

Исследование химического состава образцов печени проходило через всю толщину при помощи СЭМ с микроанализом. Средняя длина сканирования по линии составляла 510 ± 200 мкм. В ходе исследования устанавливали уровни содержания в образцах Fe, Cu, Zn, Ag.

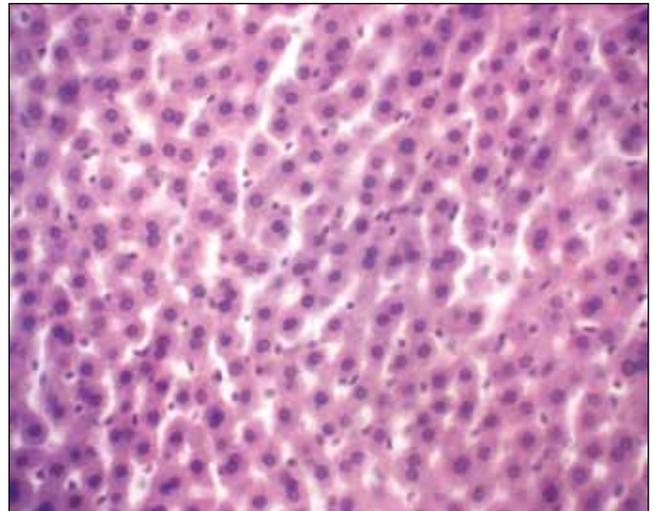


Рис. 2. Печень после лечения наноаквахелатом серебра ОКИ, вызванной УПМ. Гепатоциты без дистрофических изменений, много двуядерных гепатоцитов и клеток Купфера. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 360$

В печени животных, получавших базисную терапию (1-я группа), в ходе микроанализа образцов материалов выявлены следующие уровни содержания в массовых долях: Fe – 0%, Cu – 5,45%, Zn – 2,83%, Ag – 0%. У животных 2-й группы: Fe – 0%, Cu – 4,61%, Zn – 1,95%, Ag – 0%.

Вопрос о физиологической роли серебра изучен недостаточно. Большинство ученых относят серебро к потенциально токсичным и потенциально канцерогенным элементам [8]. Известно, что в организме серебро образует соединения с белками, может блокировать тиоловые группы ферментных систем, угнетать тканевое дыхание. При длительном контакте с серебром в производственных условиях этот элемент может накапливаться в печени [8]. Использование серебра в виде наночастиц предупреждает развитие осложнений, так как показано, что токсичность металлов в атомарном состоянии во много раз меньше, чем в ионном, полученном с применением солей [3]. С другой стороны, биоцидные свойства наночастиц меди, серебра выражены только в отношении микроорганизмов [4].

Гистологическое исследование ткани печени крыс показало наличие морфологических изменений раз-

Таблица

Морфометрические показатели печени крыс опытной и контрольной группы

Группа	Статистический показатель	Площадь, мкм ²		Количество	
		ядра	цитоплазмы	клеток Купфера (в поле зрения)	гепатоцитов в балке
1-я	X ⁻	116,37±6,65	1151,02±44,41	50,63±1,73	17,38±0,68
2-я	X ⁻	168,09±6,21*	679,2 ±23,42*	37,13 ±1,37*	22,88 ±0,64*

* статистически значимые достоверные различия по сравнению с показателями 1-й группы, $p < 0,001$.

ной степени выраженности. Изучение морфометрических показателей печени выявило достоверное различие всех характеристик – средней площади ядра и цитоплазмы, количества клеток Купфера и гепатоцитов в печеночной балке. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в 1-й группе животных составило 0,1, во 2-й группе – 0,25. Существенную разницу в показателях ядра и цитоплазмы в исследуемых группах можно объяснить наличием выраженной баллонной дистрофии гепатоцитов крыс, получавших только базисную терапию. Средняя площадь ядра у животных 1-й группы свидетельствует об угнетении синтетических процессов в клетках печени. Уменьшение количества гепатоцитов в печеночных балках в условиях базисной терапии, по-видимому, обусловлено их повреждением токсинами условно патогенных бактерий и воспалительным процессом, увеличение же количества звездчатых макрофагов (клеток Купфера) является показателем напряженности фагоцитоза, что может быть связано с утилизацией продуктов распада клеточных структур и микробных организмов. Таким образом, в 1-й группе преобладали явления неспецифического гепатита умеренной активности, а во 2-й группе активность воспалительного процесса в исследуемом органе была незначительной или минимальной.

Полученные результаты СЭМ с микроанализом состава микроэлементов в исследуемых образцах показывают наличие меди и цинка в постоянных концентрациях. Наличие серебра и железа в исследуемых образцах печени не было выявлено. При многоточечном исследовании (n=20) микроэлементов путем СЭМ с микроанализом результаты не отличались от тех, которые были получены при сканировании по линии.

Выводы

Активность воспалительного процесса и выраженность морфологических изменений в печени при моделировании острой кишечной инфекции в группе животных, которые получали наноаквахелат серебра, снижается, что свидетельствует о позитивном эффекте исследуемого препарата по сравнению с базисной терапией.

По результатам сканирующей электронной микроскопии с микроанализом накопление серебра в ткани печени не происходит.

Литература

1. *Бондаренко В.М.* Идеи И.И. Мечникова и современная микроэкология кишечника человека / В.М. Бондаренко, В.Г. Лиходед // Журнал микробиологии. 2008. № 5. С. 23–29.
2. *Возианова Ж.И.* Диареогенные кишечные палочки / Ж.И. Возианова // Сучасні інфекції. 2008. № 3. С. 4–9.
3. Использование биологически активных препаратов на основе наночастиц металлов в медицине и сельском хозяйстве / И.П. Арсентьева и др. // Индустрия наносистем и материалы: оценка нынешнего состояния и перспективы развития. М.: Центр «Открытая экономика», 2006. С. 26–33.
4. *Каплуенко В.Г.* Эрозионно-взрывные нанотехнологии на основе нового физического явления / В.Г. Каплуенко, Н.В. Косинов // Вісник Запорізького національного університету. 2008. № 2. С. 80–84.
5. *Копча В.С.* Корекція мікробіоценозу при лікуванні гострих кишкових інфекцій / В.С. Копча, С.А. Деркач // Інфекційні хвороби. 2008. № 2. С. 31–37.
6. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. М.: Медицина, 1996. 542 с.
7. Нанотехнології, наномедицина: перспективи наукових досліджень та впровадження їх результатів у медичну практику / Л.Г. Розенфельд та ін. // Український медичний часопис. 2008. № 5 (67). С. 63–68.
8. *Скальный А.В.* Биоэлементы в медицине / А.В. Скальный, И.А. Рудаков. М.: Оникс 21 век – Мир, 2004. 272 с.
9. *Ткаченко А.В.* Морфофункциональные изменения в печени крыс при экспериментальной гипокинезии / А.В. Ткаченко, Г.И. Губина-Вакулик // Буковинський медичний вісник. 2006. Т. 10. № 2. С. 111–114.
10. *Чекман І.С.* Біохімічний мінімум. Наночастинки: властивості та перспективи застосування / І.С. Чекман // Український біохімічний журнал. 2009. Т. 81. № 1. С. 122–129.
11. *Farah A.A.* Chemically stable silver nanoparticle-crosslinked polymer microspheres / A.A. Farah, R.A. Alzarev-Puebla, H. Fenniri // Colloid Interface Science. 2008. V. 319 N. 2. P. 572–6.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER DURING EXPERIMENTAL ACUTE INTESTINAL INFECTION UNDER THERAPY WITH COLLOIDAL NANO SILVER WATER

E.S. Polovyan, R.A. Moskalenko, M.D. Chemych, A.M. Romanyuk, S.D. Bonchev

We studied morphological changes in the liver of male rats with acute intestinal infection caused by opportunistic microorganisms. The application of nanosilver reduces the activity of inflammatory process and the severity of morphological changes in the liver. Scanning electron microscopy with microanalysis indicated that silver did not accumulate in the liver.

Key words: liver, morphology, nanosilver, scanning electronic microscopy, acute intestinal infection

Информация об авторах

Половьян Екатерина Сергеевна – аспирант кафедры инфекционных болезней с эпидемиологией, курсом микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинского института Сумского государственного университета.

Адрес: д. 15, ул. 20 лет Победы, Сумы, Украина, 40021. Телефон: +380505018850. E-mail: keetys@rambler.ru

Москаленко Роман Андреевич – ассистент кафедры патоморфологии медицинского института Сумского государственного университета

Адрес: д. 25, ул. Мира, Сумы, Украина, 40007. Телефон: +380979802731. E-mail: eriugen@ukr.net

Романюк Анатолий Николаевич – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой патоморфологии медицинского института Сумского государственного университета

Адрес: д. 31, ул. Привокзальная, Сумы, Украина, 40022. Телефон: +380956006435. E-mail: pathomorph@gmail.com

Чемич Николай Дмитриевич – докт. мед. наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней с эпидемиологией, курсом микробиологии, вирусологии и иммунологии медицинского института Сумского государственного университета

Адрес: д. 15, ул. 20 лет Победы, Сумы, Украина, 40021. Телефон: +380506310579. E-mail: chemych@gmail.com

Бончев Сергей Дмитриевич – аспирант кафедры нормальной анатомии медицинского института Сумского государственного университета.

Адрес: д. 31, ул. Санаторная, Сумы, Украина, 40030. Телефон: +380951030027. E-mail: Bonchev_sd@ukr.net

Материал поступил в редакцию 28 августа 2012 года.

ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ИЗ АМНИОТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ КРЫС НА ПОЗДНИХ СРОКАХ ГЕСТАЦИИ

**И.В. Арутюнян^{1,2}, А.В. Макаров^{1,2,5}, Т.Х. Фатхудинов^{1,2,3,5},
А.В. Ельчанинов^{1,3}, Д.В. Гольдштейн^{1,4,5}, Г.Б. Большакова¹**

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

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

³ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

⁴ФГБУ «Медико-генетический научный центр РАМН», Москва

⁵ООО «Клиника регенеративной медицины РМ-клиник», Москва

В статье представлены результаты исследования морфофункциональных свойств первичной культуры клеток, выделенных из амниотической жидкости крыс на поздних сроках гестации. Описаны особенности поведения этих клеток *in vitro*: объединение в группы, очень малое время адгезии к пластику, изменение морфологии и адгезионных свойств клеток в течение первых дней культивирования. Продемонстрирована гетерогенность первичной культуры, охарактеризованы три субпопуляции клеток, различающихся по морфологии, пролиферативной активности и пластичности. Предложен протокол выделения мультипотентных стромальных клеток из амниотической жидкости крыс.

Ключевые слова: мультипотентные стромальные клетки, амниотическая жидкость, первичная культура, крыса

Современные исследователи рассматривают амниотическую жидкость в качестве потенциального источника мультипотентных стромальных клеток (МСК) наряду с другими компонентами пуповинно-плацентарного комплекса – пуповинной кровью, вартоновым студнем пупочного канатика, плацентой и амниотической мембраной [2, 3, 5].

К настоящему времени накоплено достаточно много противоречивых данных о пролиферативном потенциале, пластичности и иммунофенотипе клеток амниотической жидкости. Анализ литературных источников позволяет сделать вывод о высокой степени гетерогенности первичной культуры. Разнообразие клеток не ограничивается только их морфологией. Опубликованы данные о наличии среди клеток амниотической жидкости популяции, экспрессирующей гематопозитический маркер CD34 [8]. Более того, гематопозитический потенциал в условиях *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали и CD34-негативные клетки [9]. Одновременная экспрессия эмбриональных (Oct-4, Nanog, SSEA-4, Rex-1, Runx-1) и мезенхимальных маркеров (CD90, CD105, CD73), наличие некоторых молекул адгезии (CD29, CD44) [2, 4, 14], способность формировать в определенных условиях эмбрионные тельца [12] позволяют некоторым исследователям считать клетки амниотической жидкости промежуточным звеном между эмбриональными плюрипотентными и постнатальными мультипотентными клетками [2, 4, 12].

Вопрос о происхождении клеток амниотической жидкости остается до сих пор дискуссионным [4]. В некоторых работах предпринята попытка классификации культивируемых пластик-адгезивных клеток на три группы [14]. К первой относятся эпителиоидные E-клетки, которые, судя по их характеристикам, могут происходить из эпителиев плода и амниона. Источниками F-клеток являются фиброзная соединительная ткань и дермальные фибробласты. Наконец, к AF-клеткам относят фибробластоподобные клетки амниотической жидкости, происходящие из эмбриональных оболочек и трофобласта. Существует предположение, что в амниотической жидкости одновременно присутствуют незрелые и терминально дифференцированные клетки всех трех зародышевых листков, а их соотношение зависит от срока гестации [8]. При этом необходимо отметить, что подавляющее большинство работ в данной области касается исследований амниотической жидкости человека, полученной во II триместре беременности. Доступность этого биоматериала объяснима распространенностью процедуры амниоцентеза для диагностических целей на данном этапе гестации. Опубликованы лишь немногочисленные исследования клеток амниотической жидкости других плацентарных животных – мышей [9], крыс [10, 11], свиней [12], буйволов [6].

В настоящее время не существует единого протокола ведения первичной культуры клеток амнио-

тической жидкости. Обычно на первом этапе клетки амниотической жидкости осаждают центрифугированием и переносят в культуральную среду. Далее культивируют клетки без какой-либо селекции [5, 11, 13] либо отбирают только клетки, не прикрепившиеся к подложке в течение первых пяти суток [13, 14]. Используют также иммуноселекцию (отбирают CD117+ популяцию) [9, 10] или получают клоны единичных «стартовых» клеток, разделенных методом предельных разведений [1].

Противоречивые данные, касающиеся морфологии, пролиферативного потенциала, степени зрелости и пластичности клеток амниотической жидкости, во многом могут быть объяснены ее забором на разных сроках гестации, видовыми особенностями исходного материала, отсутствием стандартизованных протоколов выделения и культивирования. В настоящей работе представлено исследование морфофункциональных свойств первичной культуры клеток, выделенных из амниотической жидкости крыс на поздних сроках гестации. Нами продемонстрирована гетерогенность первичной культуры и предложен протокол выделения мультипотентных стромальных клеток из амниотической жидкости крыс.

Материалы и методы

Получение первичной культуры клеток амниотической жидкости крыс

Образцы амниотической жидкости ($n=12$) были получены от беременных крыс Вистар ($n=4$) на поздних сроках гестации (19–20-е сутки) путем оперативного вмешательства (кесарево сечение). Амниотическую оболочку плодов прокалывали с помощью шприца (диаметр иглы 0,6 мм), отбирали около 50 мкл околоплодных вод и помещали в культуральную посуду (NUNC), не концентрируя предварительно клетки с помощью центрифугирования. В качестве ростовой среды использовали DMEM/F12 («ПанЭко»), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (PAA Lab.), 2 мМ L-глутамин («ПанЭко»), 1% пенициллина-стрептомицина («ПанЭко»). Культуральную посуду помещали в CO_2 -инкубатор при стандартных условиях (5% CO_2 , 37°C). По мере необходимости добавляли свежую среду. По достижении субконфлюентного монослоя клетки снимали стандартным способом раствором трипсин-ЭДТА («ПанЭко») и рассаживали в новую культуральную посуду.

Исследование распределения колониеобразующих единиц в первичной культуре клеток амниотической жидкости крыс

Количество клеток в образце амниотической жидкости подсчитывали с помощью камеры Горяева («МиниМед»). Клетки рассаживали в 24-луночные планшеты (NUNC) из расчета 1 тысяча клеток на лунку. Через 7 дней образовавшиеся колонии фиксировали 4% нейтральным формалином и окрашивали гематок-

силином и эозином. При подсчете учитывали четко отграниченные колонии, состоящие из 50 и более схожих по морфологическим признакам клеток.

Отбор субпопуляций клеток первичной культуры амниотической жидкости крыс для исследования

С помощью фазово-контрастной микроскопии в культуре клеток из амниотической жидкости крыс визуализировали субпопуляции, различающиеся по морфологическим признакам. Место расположения клеток маркировали с внешней стороны культуральной посуды. Клетки открепляли от подложки в парах трипсина («ПанЭко»), аккуратно отбирали из отмеченной области наконечником автоматического дозатора (Eppendorf) и переносили в новую культуральную посуду.

Индукция адипогенной, остеогенной и хондрогенной дифференцировки субпопуляций клеток амниотической жидкости крыс

Для оценки пластичности выделенных субпопуляций клеток амниотической жидкости крыс использовали клетки второго пассажа. По достижении клетками конфлюентного 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 мМ 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

Получение первичной культуры клеток амниотической жидкости крыс

Образцы амниотической жидкости крыс напрямую переносили в культуральную посуду с ростовой средой, минуя (в отличие от большинства исследователей) этап концентрирования клеток с помощью центрифугирования и дальнейшего ресуспендирования. Оказалось, что клетки в амниотической жидкости распределены в виде небольших скоплений по 4–20 ошаренных клеток в каждом (рис. 1 А), а не в виде одиночных клеток, как показано в других работах [1, 5, 6, 14].

Все 12 образцов продемонстрировали схожую динамику прикрепления клеток к подложке. Уже через несколько минут скопления клеток начали прикрепляться к пластику. Через 1 час флоатирующих клеток практически не осталось, а прикрепленные клетки

были хорошо распластаны. Полученные данные мало коррелируют с результатами большинства исследователей, работавших с амниотической жидкостью других видов животных. Так, для амниотической жидкости человека (18–28 недель гестации) время адгезии составляет $2,7 \pm 1,6$ суток [1, 5], буйвола (50–70 дней гестации) – не менее 48–72 часов [6], свиньи (ранние сроки гестации) – также около 3 дней [12].

Скопления состояли из плотно прилегающих друг к другу округлых или цилиндрических клеток с центральным расположением ядра и значительным количеством вакуолей в цитоплазме (рис. 1 Б). На следующие сутки в отдельных скоплениях у части клеток появлялись 1 или 2 цитоплазматических выроста, клетки при этом принимали булавовидную или веретеновидную форму и теряли межклеточные контакты (рис. 1 В). Еще через сутки доля веретеновидных клеток увеличивалась, распределение их становилось менее упорядоченным, а количество вакуолей в цитоплазме заметно снижалось. При этом

часть не изменивших форму клеток начинала открепляться от подложки (рис. 1 Г). На 5–6-е сутки происходило массовое открепление округлых клеток, которые удаляли при замене среды на свежую. Описание подобных морфологических изменений клеток амниотической жидкости в течение первой недели культивирования в современной литературе практически отсутствует. Данная реорганизация цитоскелета может указывать на осуществление клетками эпителиально-мезенхимального перехода [7], однако данный вопрос, несомненно, требует более глубокого изучения.

Через 2 недели культуры представляли собой гетерогенную популяцию, клетки которой различались по форме, размеру, упорядоченности распределения, наличию включений в цитоплазме и т.п. У части клеток наблюдались длинные цитоплазматические отростки (рис. 2 А), которые исчезали при достижении клетками конфлюэнтного монослоя (рис. 2 Б).

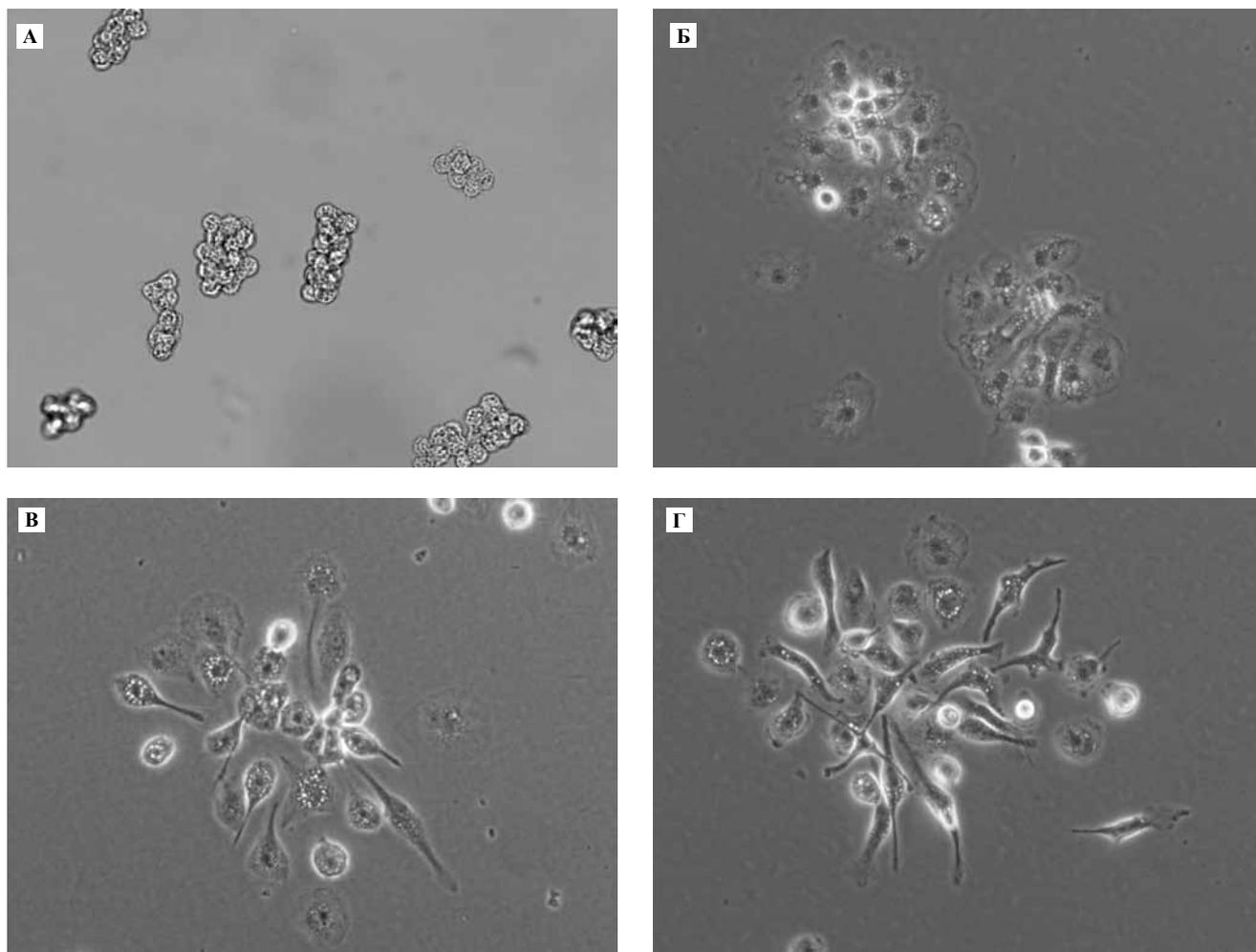


Рис. 1. Изменение морфологии клеток первичной культуры, выделенной из амниотической жидкости крыс. А – 0 минут в культуре. Б – 1 час в культуре. В – 24 часа в культуре. Г – 48 часов в культуре. ФК, $\times 200$

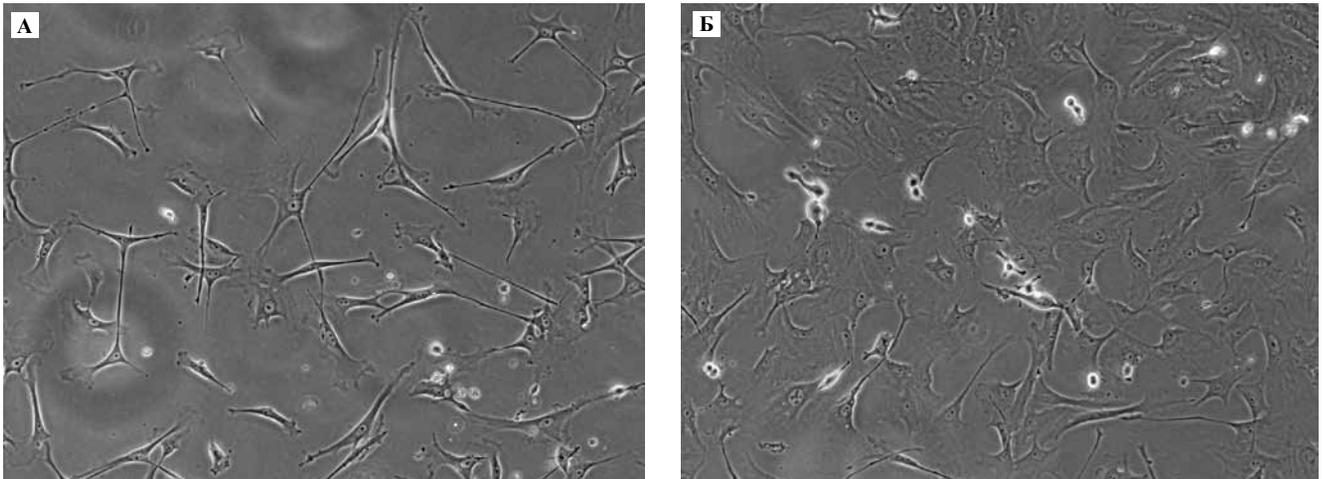


Рис. 2. Первичная культура клеток из амниотической жидкости крыс через 2 недели культивирования.
 А – Длинные цитоплазматические отростки клеток при культивировании в малой плотности.
 Б – Постепенное исчезновение длинных цитоплазматических отростков после достижения клетками конфлюентного монослоя. ФК, $\times 100$

Исследование распределения колониеобразующих единиц в первичной культуре клеток амниотической жидкости крыс

В амниотической жидкости крыс поздних сроков гестации содержалось около 1 тысячи клеток в 1 мкл. Разброс данных был незначительным. По данным литературы, концентрация клеток в амниотической жидкости крыс (16–18 дней гестации) может варьировать от 10^3 до 10^6 клеток в 1 мл [11].

При подсчете колоний было выявлено, что колониеобразующие единицы в первичной культуре клеток амниотической жидкости распределены неравномерно. В половине из 20 лунки колоний клеток не было обнаружено. Следует подчеркнуть, что подсчет клеток проводили на 7-е сутки, то есть уже после открепления от подложки эпителиоидных клеток. Еще в 8 лунках содержалось от 3 до 8 колоний. В оставшихся 2 лунках из 1 тысячи клеток образовалось 28 и 32 колонии, соответственно. Таким образом, из 20 тысяч клеток было получено около 100 колоний, то есть только 0,5% клеток относились к пластик-адгезивной активно делящейся популяции, тогда как большая часть клеток элиминировалась из культуры в течение первой недели культивирования. Отсутствие этапа осаждения–ресуспендирования клеток в протоколе культивирования и неравномерное распределение колониеобразующих единиц в первичной культуре позволяют предположить, что клетки, потенциально относящиеся к МСК, в амниотической жидкости также объединены в группы.

Характеристика субпопуляций клеток первичной культуры амниотической жидкости крыс

Из одного образца первичной культуры клеток амниотической жидкости крысы нами было отобрано несколько колоний для дальнейшего отдельного культивирования. На первом пассаже были выявлены

3 субпопуляции клеток, отличающихся по морфологическим признакам и динамике роста. Клетки первой были крупные, неправильной формы, с многочисленными длинными отростками (рис. 3 А). Во второй субпопуляции, напротив, клетки были мелкие, полигональные, с короткими отростками (рис. 3 Б). В третьей клетки также были небольшого размера, имели веретеновидную форму и формировали в культуре волны, характерные для фибробластоподобных клеток (рис. 3).

Для исследования мультипотентности выделенных субпопуляций мы культивировали клетки до достижения ими конфлюентного монослоя, однако культура клеток субпопуляции 1 так и не достигла полного монослоя на втором пассаже. В культуре наблюдали признаки преждевременного старения – аномальное развитие цитоскелета, отшнуровку участков цитоплазмы, вакуолизацию цитоплазмы, появление микроядер, лопастных ядер и многоядерных клеток. Через некоторое время данная субпопуляция была полностью элиминирована из культуры.

Клетки субпопуляций 2 и 3 продемонстрировали схожую динамику роста и достигли конфлюентного монослоя, но результаты направленной дифференцировки для этих культур были различны. В субпопуляции мелких полигональных клеток ответ на адипогенную индукцию был выявлен уже через 7 дней. На 21-й день наблюдали лишь слабо выраженные признаки хондрогенеза и полное отсутствие остеогенеза (рис. 4 А–Б). Субпопуляция 3 оказалась способна к дифференцировке во всех трех направлениях. Признаки адипогенной дифференцировки были выявлены на 10-е сутки индукции, а остеогенной и хондрогенной – на 21-е сутки. Таким образом, только субпопуляция фибробластоподобных клеток амниотической жидкости обладала признаками мультипотентных стромальных клеток (рис. 5 А–В).

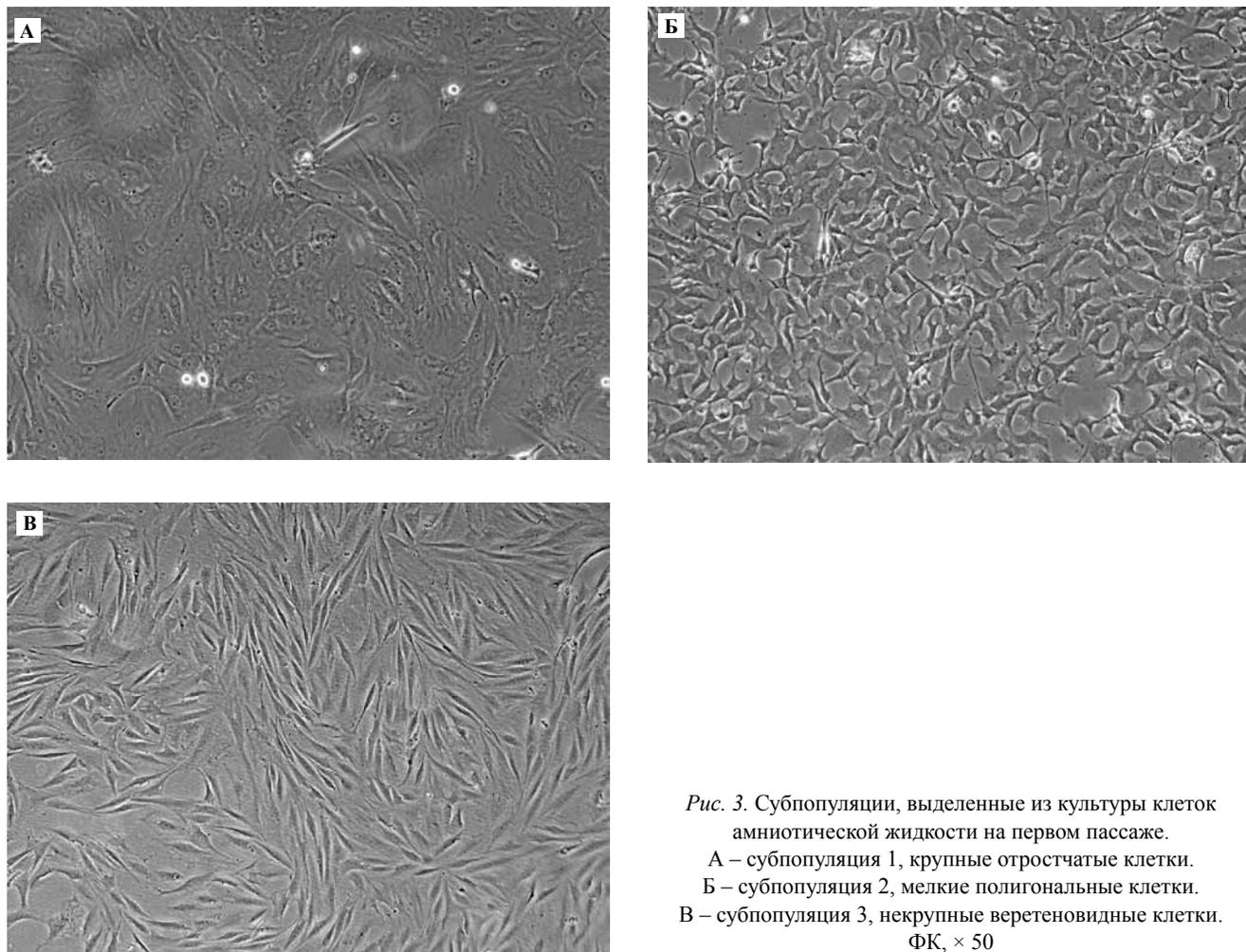


Рис. 3. Субпопуляции, выделенные из культуры клеток амниотической жидкости на первом пассаже.

А – субпопуляция 1, крупные отростчатые клетки.

Б – субпопуляция 2, мелкие полигональные клетки.

В – субпопуляция 3, некрупные веретеновидные клетки.

ФК, × 50

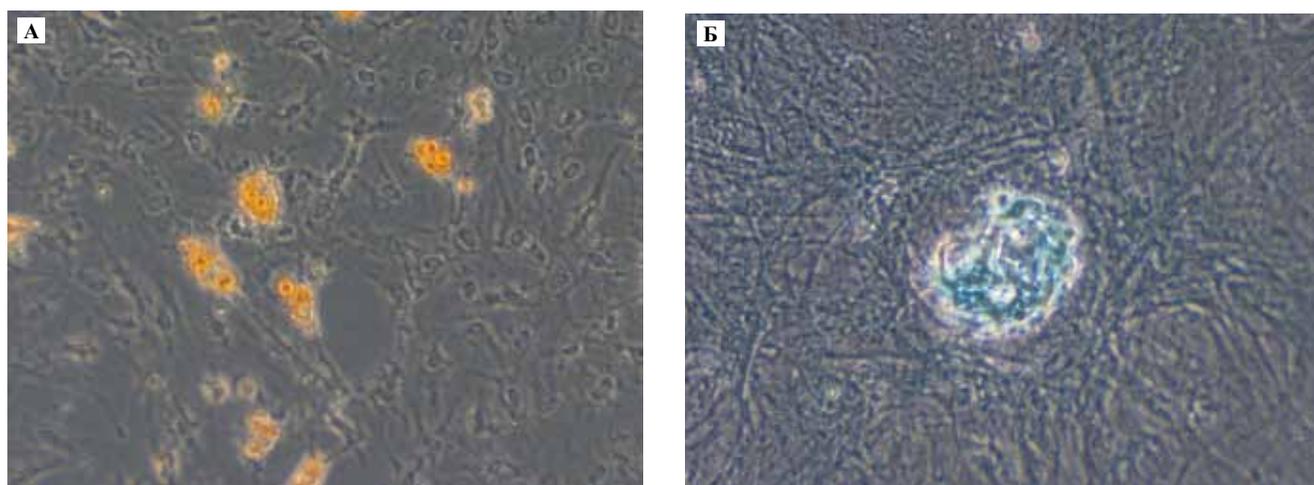


Рис. 4. Направленная дифференцировка субпопуляции мелких полигональных клеток.

А – адипогенез, 7-е сутки индукции, окрашивание Суданом III.

Б – хондрогенез, 21-е сутки индукции, окрашивание альтиановым синим (pH=2,5).

ФК, × 200

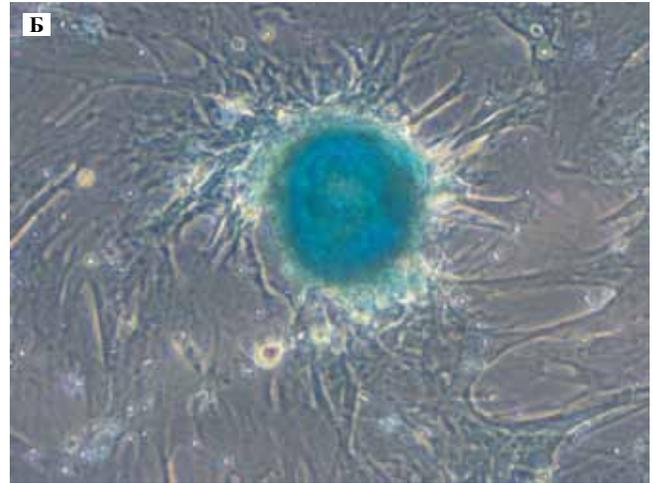
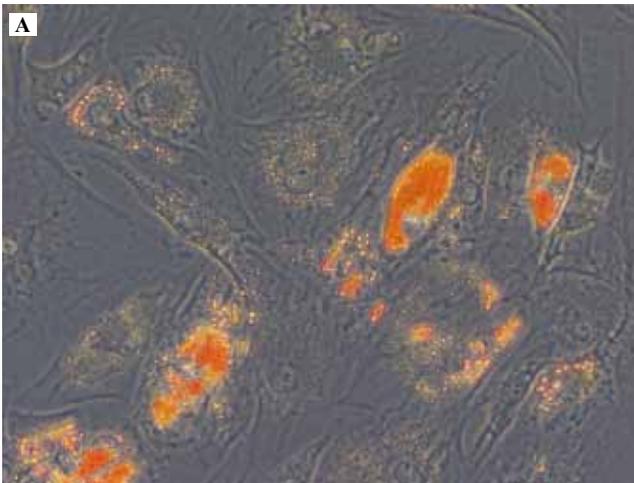


Рис. 5. Направленная дифференцировка субпопуляции веретеновидных клеток.
 А – адипогенез, 10-е сутки индукции, окрашивание Суданом III.
 Б – хондрогенез, 21-е сутки индукции, окрашивание альциановым синим (pH=2,5).
 В – остеогенез, 21-е сутки индукции, окрашивание ализариновым красным (pH=4,7).
 ФК, × 200

Заключение

Разработанный нами протокол выделения первичной культуры клеток из амниотической жидкости крыс на поздних сроках гестации позволяет выявить высокую гетерогенность и особенности поведения этих клеток *in vitro*: объединение в группы, очень малое время адгезии к пластику, изменение морфологии клеток в отдельных скоплениях в течение первых дней культивирования, массовое открепление от подложки клеток, не изменивших форму. Только очень небольшая доля клеток (около 0,5%) представляет собой пластик-адгезивную пролиферирующую популяцию, которая, в свою очередь, также высокогетерогенна. Для отбора субпопуляции мультипотентных стромальных клеток мы предлагаем исключить из протокола выделения первичной культуры этап центрифугирования клеток амниотической жидкости и проводить отбор колоний клеток фибробластоподобной формы уже на первом пассаже.

Литература

1. A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes. / Phermthai T. et al. // BMC Cell Biol. 2010. V. 11. N. 79.
2. Amniotic fluid and placental stem cells / Fauza D. et al. // Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2004. V. 18. N. 6. P. 877–91.
3. 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.
4. Cananzi M. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine / Cananzi M., Atala A., De Coppi P. // Reprod Biomed Online. 2009. V. 18. N. 1. P. 17–27.
5. Comparison of human amniotic fluid-derived and umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stromal cells: Characterization and myocardial differentiation capacity / Bai J. et al. // J Geriatr Cardiol. 2012. V. 9. N. 2. P. 166–71.
6. Derivation, Characterization and Differentiation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Amniotic Fluid Derived Stem Cells / Dev K. et al. // Reprod Domest Anim. 2012. V. 47. N. 5. P. 704–11.

7. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. / Thiery J.P. et al. // *Cell*. 2009. V. 139. N. 5. P. 871–90.
8. Human amniotic fluid as a potential new source of organ specific precursor cells for future regenerative medicine applications / Da Sacco S. et al. // *J Urol*. 2010. V. 183. N. 3. P. 1193–200.
9. Human and murine amniotic fluid c-Kit+Lin- cells display hematopoietic activity / Ditadi A. et al. // *Blood*. 2009. V. 113. N. 17. P. 3953–60.
10. In vitro and in vivo cardiomyogenic differentiation of amniotic fluid stem cell / Bollini S. et al. // *Stem Cell Rev*. 2011. V. 7. N. 2. P. 364–80.
11. Intravenous grafts of amniotic fluid-derived stem cells induce endogenous cell proliferation and attenuate behavioral deficits in ischemic stroke rats / Tajiri N. et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. N. 8. 43779.
12. Isolation and characterization of porcine amniotic fluid-derived multipotent stem cells / Chen J. et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. N. 5. 19964.
13. *Klemmt P.A.* The potential of amniotic fluid stem cells for cellular therapy and tissue engineering / Klemmt P.A., Vafaizadeh V., Groner B. // *Expert Opin Biol Ther*. 2011. V. 11. N. 10. P. 1297–314.
14. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential / Bossolasco P. et al. // *Cell Res*. 2006. V. 16. N. 4. P. 329–36.

CHARACTERISTICS OF CULTURED PRIMARY CELLS FROM RAT AMNIOTIC FLUID IN LATE PREGNANCY

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

We studied morphology and functional properties of cultured primary cells isolated from rat amniotic fluid in the later stages of gestation. During the first days of cultivation, the cells were featured by clustering, a very short time of adhesion to plastic, and changes in cell morphology and adhesion properties. Cellular heterogeneity in primary culture was demonstrated. Three cell subpopulations differing in morphology, proliferation activity and plasticity were characterized. We developed the protocol for isolation of multipotent stromal cells from rat amniotic fluid.

Key words: multipotent stromal cells, amniotic fluid, primary culture, rat

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 1 октября 2012 года.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕГКИХ КРЫС ВИСТАР И СПРЕЙГ-ДОУЛИ

О.В. Макарова, Л.П. Михайлова, Е.И. Сидорова, А.С. Сладкопечев, Е.В. Никонова

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Проведено сравнительное исследование структурно-функциональных особенностей легких у половозрелых самцов крыс Вистар и Спрейг–Доули. Показано, что легкие крыс Вистар, в отличие от легких крыс Спрейг–Доули, характеризуются более высокими показателями сухого остатка и объемной доли соединительной ткани, числа тучных клеток и нейтрофилов. Легкие крыс Спрейг–Доули отличаются большей объемной долей лимфоидных фолликулов в стенке бронхов и содержанием лимфоцитов в жидкости бронхоальвеолярного смыва, сниженная активность кислородозависимых и кислородонезависимых систем фагоцитов.

Ключевые слова: легкие, крысы-самцы Вистар и Спрейг–Доули, структура

Крысы Спрейг–Доули и Вистар – линии белых лабораторных крыс – являются потомками альбиносов черной *Ratus rattus* и серой пасюк – *Ratus norvegicus*. Альбиносов норвежской крысы стали разводить в Англии начиная с XVII века в качестве экзотических экспонатов в зоопарках. Считают, что крысы Вистар, Спрейг–Доули, Левис происходят только от норвежской серой крысы. Для выведения крыс других линий использовались черные и египетские крысы [6, 19].

Крысы Вистар характеризуются низкой частотой спонтанных опухолей, при этом 50% из них составляют феохромоцитомы [13]. Даже у молодых крыс Спрейг–Доули развиваются нейропатия и гломерулонефрит. В возрасте 2 лет, по данным [13], у 66% самцов и 39% самок выявляется гломерулонефрит и практически у 100% самок – опухоли молочных желез. Различия в частоте опухолевых и аутоиммунных хронических воспалительных процессов, очевидно, обусловлены генотипическими особенностями крыс указанных пород.

Данные литературы, касающиеся морфофункциональных различий легких у крыс Вистар и Спрейг–Доули при воспалительных процессах, фрагментарны и противоречивы.

Haworth R. et al. [15] у крыс Вистар и Спрейг–Доули не выявили различий в частоте числа нейроэндокринных клеток в легких, идентифицированных с помощью антител к кальцитонин-генсвязанному пептиду и протеин-Г продукту 9,5 (protein G product 9,5 – PGP 9,5), однако О.В. Макаровой и соавт. [8] показано, что у крыс Спрейг–Доули по сравнению с Вистар выше численность популяции серотонинсекретирующих

ЕС-клеток в тонкой кишке и содержание серотонина в периферической крови.

Однократное воздействие озона (0,5 ppm) в течение 8 часов вызывает у крыс Вистар по сравнению с крысами Спрейг–Доули более выраженную нейтрофильную воспалительную инфильтрацию легких, и концентрация интерлейкина-6 в жидкости бронхоальвеолярного смыва у них выше [14]. В то же время S. Nonnons, J.M. Porcher. [16] на экспериментальной модели силикоза показали, что патологические изменения в легких, такие как метаплазия эпителия, фиброз и эмфизема, у крыс Спрейг–Доули по сравнению с крысами Вистар более выражены.

Таким образом, в связи с тем, что крысы Вистар и Спрейг–Доули достаточно широко используются для моделирования воспалительных процессов в легких, необходимо сравнительное изучение их структурно-функциональных особенностей в норме.

Материалы и методы

Работа выполнена на 29 половозрелых самцах крыс Вистар (питомник «Столбовая») и 32 Спрейг–Доули (питомник «Пушино») массой 200–240 г и 180–220 г, соответственно. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. Легкие крыс фиксировали в жидкости Карнуа, парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, толуидиновым синим (рН 2,0) на тучные клетки соединительной ткани [18]. Фрагменты легких крыс

до высушивания в сухожаровом шкафу и после него взвешивали и вычисляли сухой остаток в процентах. Бронхоальвеолярный смыв получали под эфирным наркозом. В жидкости бронхоальвеолярного смыва подсчитывали в камере Горяева абсолютное количество клеток в 1 мл (цитоз). Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим, ее показатели составили 92–97%. В мазках из жидкости бронхоальвеолярного смыва, окрашенных по Романовскому–Гимзе, проводили дифференцированный подсчет клеточных элементов на 300 клеток, и полученные данные представляли в виде эндопульмональной цитограммы [11]. Содержание лизосомально-катионных белков в нейтрофилах оценивали по цитохимическому индексу в мазках, окрашенных прочным зеленым по В.Е. Пигаревскому и Ю.А. Мазингу [9]. Для исследования функциональной активности нейтрофилов и макрофагов жидкости бронхоальвеолярного смыва проводили реакцию с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) по Ю.М. Бажора и соавт. [2]. Фагоцитарную способность нейтрофилов и макрофагов определяли с использованием *Streptococcus epidermidis* по [3]. На гистологических срезах легких методом точечного счета [1] оценивали объемную долю соединительной ткани. Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках и тучных клеток соединительной ткани подсчитывали на площади гистологического среза легких 0,2 мм². Объемную плотность лимфоидных фолликулов определяли методом точечного счета под лупой (x 7) в стенке продольно рассеченных главных и долевых бронхов после экспозиции легких в течение 18–24 часов в 2% растворе уксусной кислоты по J. Weinenstock [12]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistika 6.1. При помощи метода Колмогорова–Смирнова было установлено, что вариационные ряды данных подчиняются закону нормального распределения, это позволило применить параметрический анализ и сравнить показатели при помощи t-критерия Стьюдента [7].

Результаты и обсуждение

По сравнению с крысами Спрейг–Доули показатели сухого остатка ткани легких у крыс Вистар были ниже

и составили, соответственно, 24,0±1,4 и 28,0±1,5% (p<0,05). При световой микроскопии какие-либо патологические изменения в легких у крыс обеих пород не выявлены. При морфометрическом исследовании у крыс Вистар в легких был более высоким показатель объемной доли соединительной ткани, и в ней большее содержание тучных клеток с высоким индексом дегрануляции. Кроме того, у крыс Вистар по сравнению со Спрейг–Доули были выше показатели числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках. Однако количество лимфоидных фолликулов в стенке бронхов у крыс Спрейг–Доули было в 2 раза больше, чем у крыс Вистар (табл. 1).

Данные по клеточному составу жидкости бронхоальвеолярного смыва крыс Вистар и Спрейг–Доули представлены в таблице 2. По сравнению с крысами Вистар показатели цитоза, содержания лимфоцитов, нейтрофилов и эпителиальных клеток у крыс Спрейг–Доули были более высокими. Исследование функциональной активности фагоцитов (табл. 3) показало, что у крыс Спрейг–Доули была снижена активность кислородозависимой бактерицидной системы макрофагов и нейтрофилов. Процентное содержание НСТ-положительных клеток было статистически значимо выше у крыс Вистар. Показатели кислородонезависимой бактерицидной системы нейтрофилов, оцениваемой по содержанию лизосомально-катионных белков, оказались более низкими у крыс Спрейг–Доули. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов у крыс обеих пород достоверно не различались, однако показатель фагоцитарного индекса нейтрофилов был статистически значимо ниже у крыс Спрейг–Доули.

Сравнительное морфофункциональное исследование легких крыс Вистар и Спрейг–Доули позволило выявить ряд особенностей. С учетом классификации В.Н. Жеденова [5], по внутренней архитектонике легкие крыс Вистар можно отнести к «тяжелому» интерстициальному, а Спрейг–Доули – «легкому» альвеолярному типу. К «тяжелому» интерстициальному типу относят легкие с меньшим развитием альвеолярной части и дыхательной поверхности, но с более выраженным развитием соединительной ткани. Этот тип легких

Таблица 1

Морфометрические показатели легких крыс Вистар и Спрейг–Доули (M±m)

Порода крыс	Параметры				
	Объемная плотность соединительной ткани (%)	Тучные клетки соединительной ткани		Число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках	Число лимфоидных фолликулов в стенке бронхов
		число в поле зрения	индекс дегрануляции		
Вистар (n=12)	6,6±1,0	3,2±0,4	2,5±0,2	3,1±0,6	20,6±0,9
Спрейг–Доули (n=9)	3,8±0,3	1,7±0,2	1,8±0,2	1,9±0,2	42,4±3,1
Доверительная вероятность (p)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,001

Таблица 2

Клеточный состав жидкости бронхоальвеолярного смыва крыс Вистар и Спрейг–Доули* (M±m)

Порода крыс	Цитоз (абс. кол-во клеток в 1 мл × 10 ⁶)	Эндопульмональная цитограмма (%)			
		макрофаги	лимфоциты	нейтрофилы	эпителий
Вистар (n=12)	0,63±0,1	86,9±3,4	4,7±2,4	2,0±0,4	0,6±0,1
Спрейг–Доули (n=19)	1,7±0,2	62,5±9,5	22,0±6,3	9,0±1,9	1,7±0,1
Доверительная вероятность (p)	<0,001	<0,01	<0,05	<0,001	<0,001

* Исследование проводилось в 2 сериях экспериментов в осенне-зимний период.

Таблица 3

Функциональная характеристика фагоцитов жидкости бронхоальвеолярного смыва крыс Вистар и Спрейг–Доули (M±m)

Порода крыс	Показатели						
	Содержание НСТ-положительных (%)		Содержание лизосомально-катионных белков в нейтрофилах	Процент фагоцитирующих		Фагоцитарный индекс	
	нейтрофилов	макрофагов		нейтрофилов	макрофагов	нейтрофилов	макрофагов
Вистар (n=12)	41,8±5,8	51,4±5,5	1,2±0,2	57,0±6,6	61,4±6,4	1,6±0,2	3,3±0,6
Спрейг–Доули (n=19)	11,6±4,7	35,5±3,7	0,7±0,1	66,8±8,0	61,4±13,1	1,1±0,25	4,5±0,6
Доверительная вероятность (p)	<0,001	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

* Исследование проводилось в 2 сериях экспериментов в осенне-зимний период.

соответствует конституциональному типу с пониженным обменом веществ. К альвеолярному типу автор относит легкие с более выраженным респираторным отделом, что обеспечивает большую дыхательную поверхность и их большую жизненную емкость. Легкие этого типа весьма эластичны и соответствуют конституциональному типу с повышенным обменом веществ. По нашим данным, у крыс Вистар по сравнению со Спрейг–Доули легкие характеризуются большим процентом сухого остатка, большей объемной плотностью соединительной ткани и большим количеством в ней тучных клеток. Таким образом, у крыс Вистар фиброэластический каркас легких более выражен, что предполагает большую устойчивость ткани легких при развитии острой компенсаторной, а также хронической эмфиземы [4, 10].

По данным цитологического исследования бронхоальвеолярного смыва легкие крыс Спрейг–Доули по сравнению с Вистар характеризуются более высокими показателями цитоза, а также содержания нейтрофилов и лимфоцитов и объемной доли лимфоидных фолликулов в стенке бронхов. Более высокое содержание нейтрофилов и макрофагов в жидкости бронхоальвеолярного смыва у крыс Спрейг–Доули сочеталось с их сниженной функциональной активностью по

данным НСТ-теста, а также уменьшением содержания лизосомально-катионных белков в нейтрофилах. Увеличение абсолютного количества и снижения функциональной активности фагоцитов у крыс Спрейг–Доули по сравнению с Вистар может быть обусловлено особенностями ферментативных и связанных с ними бактерицидных систем фагоцитирующих клеток [17].

Выводы

Таким образом, легкие крыс Вистар по сравнению со Спрейг–Доули отличает более высокое содержание сухого остатка, что связано с большей выраженностью соединительнотканного каркаса. Большее число тучных клеток в соединительной ткани и нейтрофилов у крыс Вистар обусловлено большим количеством в легких соединительной ткани. Легкие крыс Спрейг–Доули отличают большее число лимфоидных фолликулов в стенке бронхов и более высокие показатели содержания лимфоцитов в бронхоальвеолярном пространстве. Бронхоальвеолярный смыв крыс Спрейг–Доули характеризуется более высокими показателями цитоза и процентного содержания нейтрофилов. Следует отметить, что выявленная у крыс Спрейг–Доули гиперплазия бронхоассоциированной лимфоидной ткани, относительно повышенное содержание в бронхоаль-

веолярном смыве лимфоцитов и нейтрофилов наряду со сниженной активностью кислородозависимой и кислородонезависимой систем фагоцитов не сопровождалась какими-либо морфологическими проявлениями воспаления в легких, поэтому выявленные нами структурно-функциональные различия легких следует расценивать как конституциональные.

Литература

1. *Автандилов Г.Г.* Введение в количественную патологическую морфологию. М.: Медицина, 1980. 216 с.
2. *Бажора Ю.М.* Упрощенный NBT-тест / Тимошевская В.Н., Протченко П.З. и др. // Лабораторное дело. 1981. № 4. С. 148–149.
3. *Дуглас С.Д., Куи П.Г.* Исследование фагоцитоза в клинической практике. М.: Медицина, 1983. 109 с.
4. *Есипова И.К.* Патологическая анатомия легких. М.: Медицина, 1976. 180 с.
5. *Жеденов В.Н.* Легкое и сердце животных и человека. М.: Высшая школа, 1961. 478 с.
6. *Западнюк И.П.* Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.И. Западнюк. Киев: Вища школа, 1974. 383 с.
7. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М.: Высшая школа, 1989. 343 с.
8. *Макарова О.В.* Сравнительная характеристика нейромедиаторных систем и нейроэндокринных клеток крыс Вистар и Спрейг–Доули / Михайлова Л.П., Сладкопцевцев А.С., Андреева Е.В. / Сборник научных трудов «Клиническая морфология новообразований эндокринных желез» М., 2007. С. 114–115.
9. *Пигаревский В.Е.* К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторной диагностической практике / Ю.А. Мазинг // Лабораторное дело. 1981. № 10. С. 579–582.
10. *Поликар А.Г., Гали П.* Бронхо-легочный аппарат. Структура и механизмы в норме и патологии // Новосибирск: Наука, 1977. 333 с.
11. *Романова Л.К.* Эндопульмональная цитограмма – показатель защитных клеточных реакций легких. В кн.: Материалы 2-й всесоюзной конференции морфологов-фтизиологов и пульмонологов «Морфологические аспекты защитных механизмов при туберкулезе». 1985. С. 67–70.
12. *Bienenstock J.* The lung as an immunologic organ // Annual Rev. Med. 1984. V. 35. P. 49–62.
13. *Bulter W.H.* Histological control of spontaneous pathology. In: Animal in toxicological research / Ed. Bartosek, I. Guaitan, E.Pacei-Raven. Press., 1983. P. 71–75.
14. *Dye J.A.* Ozone effects on airway responsiveness, lung injury and inflammation comparative rat strain In vivo/in vitro investigation / Madden M.C., Richards J.H., Lehmann J.R., Delvin R.B., Costa D.L. // Inhal. Toxicol. 1999. V. 11. P. 1015–40.
15. *Haworth R.* Pulmonary Neuroendocrine Cell Hyperplasia: Identification, Diagnostic Criteria and Incidence in Untreated Ageing Rats of Different Strains / Woodfine J., McCawley S., Pilling A.M., Lewis D.J., Williams T.C. // Toxicol. Pathol. 2007. V. 5. P. 735–40.
16. *Honnons S.* In vivo experimental model for silicosis / Porcher J.M. // J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2000. V. 19(4). P. 391–400.
17. *Klebanoff S.J.* The neutrophilic function and clinical disorders / Clark R.A. // Amsterdam North Holland publ. Co. 1978. 313 p.
18. *Lee T.D.* Intestinal mucosal mast cells: isolation from rat lamina propria and purification using unit gravity velocity sedimentation / F. Shanahan, H.R. Miller // Immunology. 1985. V. 55. P. 721–8.
19. *Suckow M.A.* The laboratory rat. Elsevier Academic Press, USA. 2005. 912 p.

COMPARATIVE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THE LUNGS OF WISTAR AND SPRAGUE-DAWLEY RATS

O.V. Makarova, L.P. Mikhailova, E.I. Sidorova, A.S. Sladkoptsev, E.V. Nikonova

We performed the comparative structural and functional study of the lungs in mature male Wistar and Sprague-Dawley rats. The lungs of Wistar rats show higher rates of dry matter and larger volume fraction of connective tissue as well as the number of mast cells and neutrophils. The lungs of Sprague-Dawley rats were characterized by larger volume fraction of lymphoid follicles in the bronchial wall and amount of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid as well as reduced activity of oxygen-dependent and oxygen-independent systems of phagocytes.

Key words: lungs, male rats Wistar and Sprague-Dawley, structural and functional characteristics, morphology

Информация об авторах

Макарова Ольга Васильевна – докт. мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе НИИ морфологии человека РАМН, руководитель лаборатории иммуноморфологии воспаления. Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 120-8065.

Михайлова Лилия Петровна – докт. мед. наук, руководитель лаборатории пульмонологии НИИ морфологии человека РАМН, ученый секретарь. Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 120-8065.

Сидорова Екатерина Игоревна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории пульмонологии НИИ морфологии человека РАМН. Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 120-8065.

Сладкопцевцев Алексей Сергеевич – канд. биол. наук, НИИ морфологии человека РАМН. Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 120-8065.

Материал поступил в редакцию 6 сентября 2012 года.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МИНЕРАЛИЗАЦИИ КОСТНЫХ РЕГЕНЕРАТОРОВ

С.А. Минаева¹, А.В. Васильев², Т.Б. Бухарова³, Е.Н. Антонов¹, Г.Б. Большакова², Д.В. Гольдштейн³, В.К. Попов¹, А.В. Волков²

¹ ОПЛТ «Институт проблем лазерных и информационных технологий» РАН, Москва

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва

³ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва

Оценка состояния костной ткани при биопсийном обследовании материала пациентов с дегенеративными или травматическими заболеваниями является весьма актуальной задачей современной медицины, поскольку позволяет охарактеризовать регенераторные процессы в месте костного дефекта и выбрать наиболее эффективные стратегии лечения.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеивания, костная ткань, гидроксиапатит, регенерация

В настоящее время при изучении костной ткани акцент делается главным образом на структурном анализе компонентов регенерата с привлечением таких методов как рентгенографическое исследование и обзорные гистологические окрашивания. Такие подходы позволяют оценить качественный состав исследуемой ткани, но не дают возможности провести высокочувствительный анализ отдельных компонентов клеточного вещества. Одним из подходов к решению этой проблемы может стать использование спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). В основе метода лежит регистрация комбинационного рассеяния света – эффект Рамана – неупругое рассеяние оптического излучения на молекулах вещества (твердого, жидкого или газообразного), сопровождающееся изменением частоты излучения. Спектры КР специфичны для каждого молекулярного соединения, что может быть использовано для регистрации и идентификации молекул в различных смесях.

Спектроскопия КР имеет ряд преимуществ по сравнению с другими аналитическими методами: в отличие от инфракрасной спектроскопии регистрация ведется в оптическом диапазоне, что обеспечивает высокую чувствительность и удобство в работе, КР спектроскопия является методом бесконтактного, неразрушающего контроля, пригодна для работы с веществами в любой фазе, не требует специальной подготовки образцов, анализ достаточно быстрый (от секунд до минут). Современные КР спектрометры обеспечивают возможность построения карт распределения молекулярных составляющих по поверхности исследуемых образцов.

В этом случае спектрометр совмещают с оптическим микроскопом.

Спектроскопия КР имеет разнообразное применение в биологии и медицине. Она успешно используется в гистологии для цитодиагностики операционного материала [1]. Свое место КР спектроскопия нашла также в морфологических исследованиях в остеологии и регенеративной медицине. Так, с ее помощью исследовалась дифференцировка остеобластов [2], изучалось распределение белков и липидов на разных стадиях деления ооцита [3]. Результаты работы [4] показали, что КР спектроскопия может применяться для мониторинга биохимии кости при исследовании такого заболевания как остеопороз. При этом были проведены испытания препаратов, разработанных для борьбы с указанным заболеванием.

Целями данной работы являлись изучение процесса минерализации костной ткани методом спектроскопии КР и оценка потенциала применения современной КР спектроскопии для определения характеристик формирования и созревания костной ткани.

Материалы и методы

Для изучения структуры и минерализации вновь образованной костной ткани использовали образцы костной ткани, полученные во время исследований по изучению регенеративного материала теменных костей черепа у крыс (n=10). Под комбинированным наркозом (Золетил/Рометар) выполняли трепанацию теменных костей черепа с помощью трепана диаметром 5 мм с сохранением твердой мозговой оболочки.

Образцы тканей извлекали через 30 дней после нанесения повреждения и фиксировали в 4% нейтральном формалине (BioOptica, Италия) в течение 24–72 часов. Затем образцы промывали, обезжизивали и заливали в метилметакрилат по стандартной методике. Из полученных блоков изготавливали сначала первичные срезы толщиной 200 мкм (Lowspeed saw Jet, Швейцария), а затем из них получали вторичные срезы толщиной 40–50 мкм путем шлифования. Контроль толщины среза осуществляли стандартным механическим микрометром барабанного типа.

Регистрацию спектров комбинационного рассеяния проводили на спектрометре Nicolet Omega XR (Thermo Scientific, США) с использованием в качестве возбуждения линии 785 нм полупроводникового лазера. При микроскопическом наблюдении использовали объектив MPlan N 10x/0.25 BD, для которого область облучения составляет 3 мкм. Исследуемый частотный диапазон составил 200–2000 см⁻¹, спектральное разрешение – 4,5 см⁻¹.

Для исследования и характеристики состава среза было использовано картирование. По поверхности среза по точкам с заданным шагом снимали двумерный массив спектров. Анализ костной ткани проводили по спектру их основной минеральной составляющей – гидроксиапатита. Для выбора аналитической полосы предварительно регистрировали спектры гидроксиапатита и полиметилметакрилата, поскольку последний использовали в качестве заливочной среды для получения микросрезов ткани.

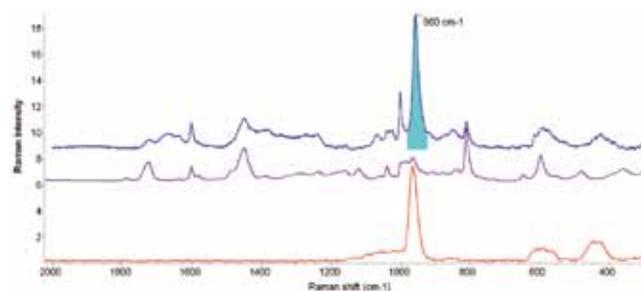


Рис. 1. Полученные спектры КР.

Верхний график – спектр образца, средний – спектр полиметилметакрилата, нижний – спектр гидроксиапатита. Полоса, соответствующая пику гидроксиапатита на спектре образца, выделена синим цветом

Результаты и обсуждение

Спектры КР исследуемого образца, полиметилметакрилата и гидроксиапатита приведены на рисунке 1. Сильная полоса гидроксиапатита, связанная с симметричными колебаниями фосфатной группы, с центром около 960 см⁻¹, присутствующая в спектре образца, обусловлена наличием гидроксиапатита в костной ткани. Эта полоса слабо маскируется линиями полиметилметакрилата. Она была выбрана в качестве аналитической и использовалась для построения карты распределения гидроксиапатита.

На рисунке 2 представлены микрофотография среза образца, карта распределения гидроксиапатита и гибридная карта совмещения карты распределения с фото-

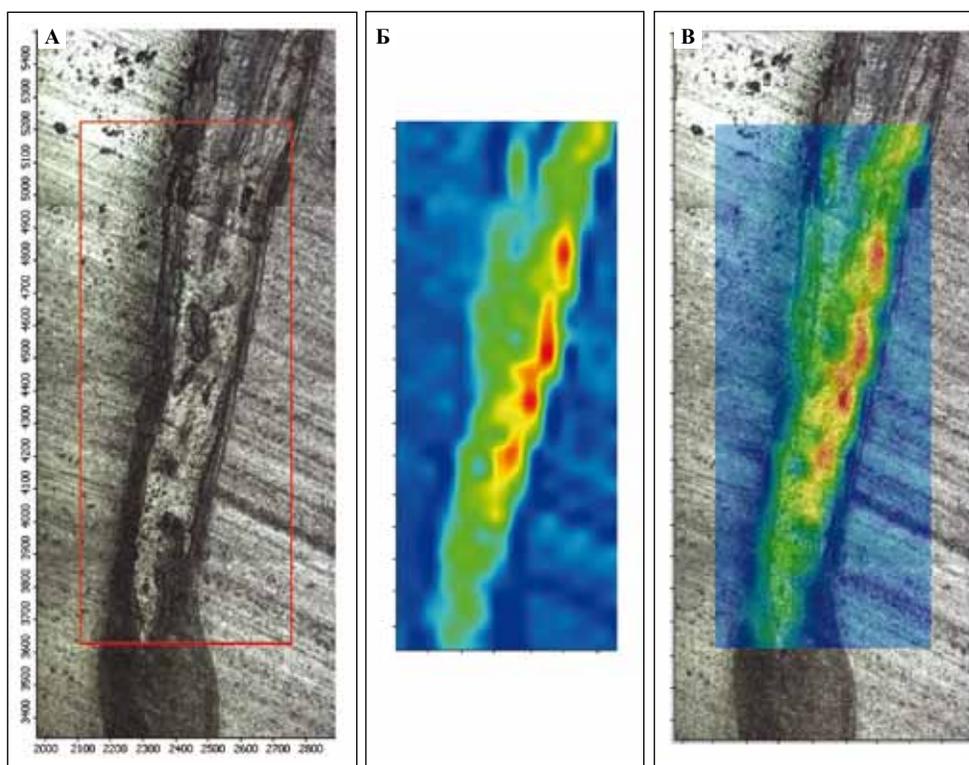


Рис. 2. Микрофотография среза образца с выделенной областью, по которой строилась карта распределения (А), карта распределения гидроксиапатита (Б) и гибридная карта (В)

графия. Исследуемая область, по которой строили карту распределения, отмечена на рисунке 2 А. Ее размер составлял 650 на 1600 мкм². Регистрацию спектров проводили с шагом 50 мкм. Диаметр зондирующего пучка излучения составлял 1 мкм.

Карта показывает интенсивность выбранной полосы гидроксиапатита, которая прямо пропорциональна его количеству в области регистрации спектра и, соответственно, пропорциональна плотности костной ткани. Синим цветом окрашена область, где гидроксиапатит отсутствует. По мере роста интенсивности полосы гидроксиапатита цвет переходит в красный.

Графики относительного количества гидроксиапатита вдоль трех выбранных на карте линий приведены на рисунке 3. Для количественной оценки распределения гидроксиапатита на рисунке приведена цветовая шкала, на которой показано соответствие цвета на карте и интенсивности полосы гидроксиапатита в спектре. Таким образом, для каждой точки исследуемой поверхности могут быть получены количественные значения наличия выбранного молекулярного компонента. Полная трехмерная модель распределения гидроксиапатита в исследуемой области образца приведена на рисунке 4.

Выводы

Методом спектроскопии КР проведено исследование распределения гидроксиапатита в срезе регенеративного материала теменной кости черепа крысы. В результате показано, что метод спектроскопии комбинационного рассеивания может с успехом использоваться для определения характеристик образования, минерализации и созревания костной ткани, выявления локусов с максимальной и минимальной минерализацией. Предложенный и использованный нами метод, в сочетании с методиками определения скорости образования костной ткани, может не только показать статичные характеристики минерализации в костном регенерате, но и определить временные интервалы минерализации с высокой точностью, что недоступно традиционным, в том числе рентгенологическим, методам, поскольку исследование минеральной плотности проводится на гистологическом препарате. Впоследствии данные, полученные при микроскопии КР, могут быть сопоставлены с гистологическими и морфоме-

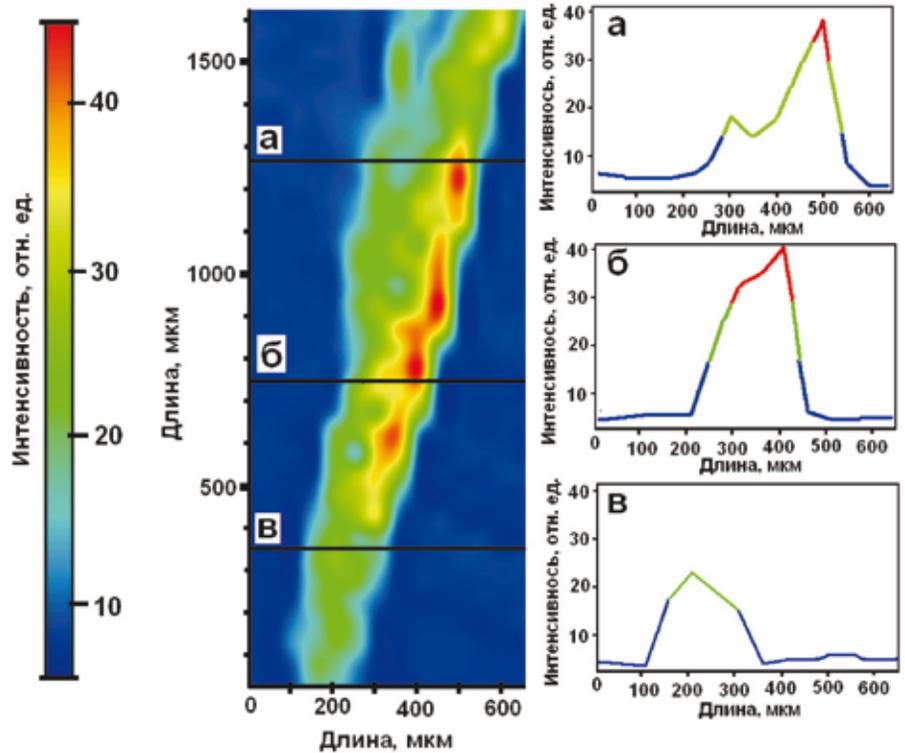


Рис. 3. Цветовая шкала (слева) и графики относительного количества гидроксиапатита вдоль трех выбранных линий в исследуемой области образца

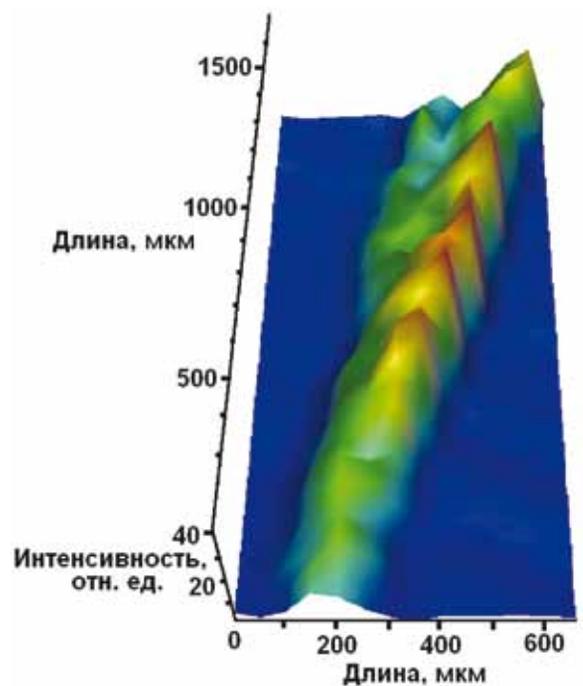


Рис. 4. Трехмерная модель распределения гидроксиапатита по поверхности среза образца

трическими данными и характеристиками костных регенератов в зависимости от экспериментальных и клинических задач.

Литература

1. Barr H., Kendall C., Hutchings J., Bazant-Hegemark F., Shepherd N., Stone N. Rapid endoscopic identification and destruction of degenerating Barrett's mucosal neoplasia // *Surgeon*. 2011. V. 9. P. 119–23.
2. Chiang H.K., Peng F.-Y., Hung S.-C., Fengc Ya-C. In situ Raman spectroscopic monitoring of hydroxyapatite as human mesenchymal stem cells differentiate into osteoblasts // *J. of Raman Spectrosc.* 2009. V. 40. P. 546–9.
3. Davidson B., Spears N., Murray A., Elficka A. The changing biochemical composition and organisation of the murine oocyte and early embryo as revealed by Raman spectroscopic mapping // *J. of Raman Spectrosc.* 2012. V. 43, P. 24–31.
4. Maher J.R., Takahata M., Awad H.A., Berger A.J. Raman spectroscopy detects deterioration in biomechanical properties of bone in a glucocorticoid-treated mouse model of rheumatoid arthritis // *J. of Biomed. Optics*. 2011. V. 16(8). P. 32–36.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-02-01278/12.

APPLICATION OF RAMAN SCATTERING SPECTROSCOPY FOR STUDY OF THE MINERALIZATION OF BONE REGENERATES

S.A. Minaeva, A.V. Vasilyev, T.B. Bukharova, E.N. Antonov, G.B. Bolshakova, D.V. Goldstein, V.K. Popov, A.V. Volkov

We studied the mineralization of bone tissue using Raman scattering spectroscopy and assessed the possibility of using this technique to characterize bone formation and maturation. Bone tissue was sampled during the experiments on regeneration of rat parietal bones to study the structure and mineralization of newly formed bone. It was shown that Raman scattering spectroscopy can be successfully used for assessing bone formation, mineralization and maturation as well as for identification of sites with high and low mineralization. Proposed and used method combined with evaluating the rate of bone formation can not only reveal static characteristics of mineralization in bone regenerate but also precisely determine the time course of the process. This previously could not be achieved with traditional method including X-ray because the study of mineral density is carried on histological slides.

Key words: Raman scattering spectroscopy, bone tissue, hydroxyapatite, regeneration

Информация об авторах

Минаева Светлана Анатольевна – младший научный сотрудник Института проблем лазерных и информационных технологий РАН.

Васильев Андрей – младший научный сотрудник НИИ морфологии человека РАМН.

E-mail: morfolhum@mail.ru

Бухарова Татьяна Борисовна – научный сотрудник Медико-генетического научного центра РАМН.

Адрес: Москва, ул. Москворечье, д. 1.

Антонов Евгений Николаевич – канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник Института проблем лазерных и информационных технологий РАН.

Адрес: Москва, ул. Пионерская, д. 2.

Большакова Галина Борисовна – докт. биол. наук, заведующая лабораторией роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. E-mail: gbolshakova@gmail.com

Гольдштейн Дмитрий Вадимович – докт. биол. наук, профессор, заведующий лабораторией генетики стволовых клеток Медико-генетического научного центра РАМН.

Адрес: Москва, ул. Москворечье, д. 1.

Попов Владимир Карпович – канд. физ.-мат. наук, заведующий лабораторией сверхкритических флюидных технологий Института проблем лазерных и информационных технологий РАН.

Адрес: Москва, ул. Пионерская, д. 2.

Волков Алексей Вадимович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник НИИ морфологии человека РАМН.

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

Материал поступил в редакцию 8 сентября 2012 года.

РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

*А.В. Ельчанинов^{1,2}, Т.Х. Фатхудинов^{1,2}, А.В. Макаров¹,
В.В. Глинкина², Г.Б. Большакова¹*

¹ ФГБУ «НИИ морфологии человека РАМН», Москва

² ГБОУ ВПО «Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва

В статье проанализированы данные о регенерации печени млекопитающих, полученные на модели восстановления массы органа после резекции 70% тканей. Рассматривается роль различных факторов роста, регулирующих восстановление массы печени после резекции. Показано, что у более молодых животных масса печени восстанавливается за счет митотического размножения гепатоцитов, в то время как у более взрослых регенерация печени осуществляется за счет полиплоидизации и гипертрофии гепатоцитов. Обсуждаются молекулярные механизмы этого явления.

Ключевые слова: печень, регенерация, млекопитающие

Разным аспектам регенерации печени млекопитающих посвящено много работ как в отечественной, так и зарубежной литературе [11, 35, 36]. Классической моделью для изучения регенерации печени млекопитающих является восстановление массы органа после резекции 70% по методу G.M. Higgins и R.M. Anderson (1931) [11, 30, 42]. Регенерация печени после такой резекции осуществляется по способу регенерационной гипертрофии, то есть масса органа восстанавливается за счет пролиферации гепатоцитов, но при этом удаленные доли не формируются заново [11]. Такой способ регенерации обнаружен и у печени плодов крысы [4].

На срок восстановления исходной массы органа влияет множество факторов, при этом решающую роль играет возраст животного. Так, у молодых неполовозрелых крыс (масса тела до 100 г) восстановление исходной массы печени после резекции происходит к 5–6-му дню после операции [11, 17, 23]. У взрослых крыс (масса тела 100–200 г) масса печени восстанавливается к 9–14-му дню, а у старых (масса тела свыше 250 г) – к 22-му дню после частичной гепатэктомии [9, 11]. У 17-суточных плодов крысы масса печени, резецированной примерно на 20%, восстанавливается через 2 суток после операции [4].

Полноценное восстановление того или иного органа после утраты части тканей может осуществляться за счет размножения клеток, за счет их полиплоидизации или их гипертрофии в остатке органа [2, 52].

Печень восстанавливается после резекции в основном за счет пролиферации и полиплоидизации гепатоцитов. Считается, что вступление гепатоцитов в митотический цикл индуцирует активность фактора роста гепатоцитов (HGF). Обнаружено, что у крыс в первый час после частичной гепатэктомии концентрация HGF в плазме крови повышается более чем в 20 раз и остается на этом уровне в течение 72 часов, а далее постепенно возвращается к нормальным значениям [25, 35, 36].

Неактивная форма HGF в больших количествах содержится в матриксе соединительной ткани печени, особенно в перипортальной области печеночной доли [37]. После нанесения травмы печени в плазме повышается уровень урокиназы, которая запускает каскад протеолитических реакций, приводящих к деградации межклеточного матрикса печени, что приводит к высвобождению HGF [51, 56]. Главная роль в этом процессе принадлежит семейству матриксных металлопротеиназ [24, 39]. Урокиназа участвует как в высвобождении запасов HGF, так и, возможно, в его активации [35, 37, 51].

Другими факторами роста, вызывающими активацию пролиферации гепатоцитов в печени после резекции, являются эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующий фактор роста- α (TGF α) [53]. Удаление слюнных желез у крыс вызывает снижение концентрации EGF в крови животных, что ведет к снижению восстановительных процессов в печени. TGF α синтезируется гепатоцитами и оказывает аутокринное влияние. Предполагается, что EGF действует на ранних этапах регенерации печени, в то время как TGF α – на более поздней стадии восстановительного процесса, поскольку было показано, что активность его синтеза достигает пика только через 24 часа после резекции [35, 37].

Итог действия перечисленных выше факторов роста – активация экспрессии так называемых ранних генов, в состав которых входит семейство протоонкогенов, побуждающих клетку к делению [25, 26].

Пролиферация гепатоцитов при регенерации печени имеет ряд особенностей. Во-первых, существует латентный период пролиферации, сильно зависящий от возраста особи. У молодых животных после резекции печени пролиферация активируется раньше по сравнению с более взрослыми особями. Так, митотическая активность гепатоцитов у 5-дневных крысят повыша-

ется через 20 часов после операции, у 4–6-недельных крыс – через 24 часа, у 4–6-месячных – через 48 часов, у 16-месячных – через 72 часа [11, 22].

При обширной резекции печени после начала пролиферации гепатоцитов показатели клеточного деления, как правило, достигают наибольшего значения, а далее постепенно снижаются. От возраста животного зависит время достижения пика пролиферации, а также число таких пиков. У новорожденных крыс наблюдают 2 пика пролиферации. Показано, что у молодых особей пролиферация достигает наибольшего уровня раньше, чем у более взрослых животных [17, 18].

У 17-суточных плодов крысы после резекции 20% массы печени митотическое деление гепатоцитов активизируется через 9 часов после операции, наибольшего значения митотический индекс достигает через 12 часов и 24 часа после нанесения повреждения [5, 6]. Таким образом, в регенерирующей печени плодов и новорожденных крыс наблюдают 2 пика пролиферации гепатоцитов [18].

Вариабельность латентного времени пролиферации и времени наступления пика клеточного размножения в регенерирующей печени у животных разных возрастных групп, по-видимому, зависит от уровня экспрессии факторов, подавляющих клеточное деление. В печени плодов крыс перед рождением начинает синтезироваться ингибитор пролиферации *C/EBP α* , что с возрастом приводит к постепенному уменьшению митотической активности гепатоцитов [54]. Показано также, что у молодых животных после частичной гепатэктомии экспрессия *C/EBP α* и ингибитора циклинзависимых киназ *p21* резко снижается, чего не происходит у старых животных [55]. Вероятно, меньший уровень *C/EBP α* и *p21* после резекции печени определяют более раннее начало пролиферации гепатоцитов при регенерации печени у молодых особей. По этой же причине у молодых животных пик митозов гепатоцитов наблюдается при резецировании меньшего объема паренхимы печени по сравнению с взрослыми особями. Так, у взрослых крыс для этого необходимо удалить примерно 40% массы печени, а у крысят в раннем постнатальном периоде – 20% [18, 22]. У 17-суточных плодов крысы пролиферация гепатоцитов активизируется после резекции примерно 20% массы печени [5, 6].

Второй особенностью пролиферации гепатоцитов в регенерирующей печени млекопитающих является то, что в ходе восстановления массы этого органа сокращается длительность фаз митотического цикла гепатоцитов [9]. Это, видимо, связано с тем, что в гепатоцитах происходят активация экспрессии циклинов, циклинзависимых киназ и резкое снижение уровня их ингибитора – белка *p21* [26].

Третья особенность пролиферации гепатоцитов при регенерации печени заключается в суточной периодичности их митотической активности, при этом наибольшее количество митозов приходится на 6–9 часов утра

[11]. Циркадный ритм пролиферации в печени формируется только через 1 месяц после рождения [1, 14], что соответствует времени установления суточной активности так называемых генов биологических часов (*Bmal-1*, *Clock*, *Per1-2*, *Cry1-2*) в печени [40, 44].

Неотъемлемым компонентом регенерации печени млекопитающих является повышение ploидности гепатоцитов [2, 8, 11, 21]. На крысах было показано, что в ходе регенерации печени молодых животных повышается доля в основном тетра- и октаploидных гепатоцитов, тогда как у стареющих крыс заметно увеличивалось число ядер гепатоцитов с $16n$ и $32n$ [7].

Полиploидия широко распространена в живой природе среди животных, растений и грибов [2] и рассматривается как вариант пролиферации, при котором митотический цикл осуществляется не до конца, однако причины ее появления в ходе эволюции по-прежнему неясны. Возможно, полиploидные клетки обладают преимуществами по сравнению с диплоидными. Одним из них является генетическая защищенность клетки, поскольку увеличение числа повторяющихся геномов препятствует проявлению генетических нарушений [2, 13].

В настоящее время предполагают, что повышение ploидности гепатоцитов печени является механизмом защиты наследственного материала от окислительного повреждения [13]. Показано, что увеличение функциональной нагрузки на печень, например при переходе крысят от грудного вскармливания к самостоятельному питанию твердой пищей или после частичной гепатэктомии, сопровождается повышением ploидности гепатоцитов [28, 34]. Кроме того, в указанных случаях в гепатоцитах отмечаются признаки оксидантного стресса: снижение общего содержания глутатиона, активности каталазы, окислительное повреждение ДНК (появление 8-гидроксигуанина) и повышение уровня пероксидного окисления липидов [29, 43]. Таким образом, полиploидизация – это реакция органа на повышенную функциональную нагрузку.

Образование двуядерных клеток в результате ацитокинетического митоза является ключевым этапом в процессе полиploидизации гепатоцитов [2, 33, 38]. Сборка митотического веретена и цитотомия в митозе регулируются в клетке ингибитором циклинзависимых киназ белком *p21*, которому в настоящее время отводится главная роль в полиploидизации. Об этом свидетельствуют следующие факты: у взрослых крыс начало полиploидизации гепатоцитов после частичной гепатэктомии совпадает с возобновлением экспрессии *p21*; у трансгенных мышей с повышенной активностью *p21* уровень полиploидизации выше. Кроме того, повышение ploидности гепатоцитов с возрастом животного сочетается с увеличением экспрессии белка *p21* и другого ингибитора пролиферации – *C/EBP α* [29, 55]. Таким образом, система циклинзависимых киназ, связанный с ними белок *p21*, а также фактор транскрипции *C/EBP α* играют ключевую роль в пролиферации гепатоцитов как при регенерации, так и при нормальном росте.

Помимо митотического размножения гепатоцитов в восстановление массы печени после резекции может вносить вклад увеличение их размеров. Истинной гипертрофией клеток принято считать рост цитоплазмы, который не сопровождается увеличением плоидности ядра [2]. Вклад митотического деления гепатоцитов и их гипертрофии в регенерацию печени зависит от возраста животного. В раннем постнатальном периоде масса печени восстанавливается в основном за счет гиперплазии гепатоцитов, а у взрослых и стареющих животных все большее значение приобретает гипертрофия [1, 9, 55]. При регенерации печени плодов крысы гипертрофия гепатоцитов по сравнению с контролем не обнаружена [5]. В связи с этим особый интерес представляют данные о том, что в раннем постнатальном периоде наблюдается интенсивный рост цитоплазмы гепатоцитов, не связанный с синтезом ДНК [3, 12]. Таким образом, гипертрофия гепатоцитов вносит значительный вклад в рост печени на этом этапе развития, однако как элемент восстановления массы печени после резекции, видимо, отсутствует.

Увеличение размеров клеток при регенерации рассматривается как способ восстановления утраченной массы органа, альтернативный митозу, особенно в том случае, когда клеточное деление по каким-либо причинам невозможно [47, 55], например в печени стареющих животных, у которых митоз в гепатоцитах часто необратимо блокирован [32, 45]. Напротив, в пренатальном периоде гепатоциты легко вступают в митоз [54], что, видимо, исключает возможность гипертрофии.

В основе феномена гипертрофии гепатоцитов лежат следующие молекулярные механизмы. Обнаружено, что у интактных молодых мышей размножение гепатоцитов обратимо блокирует ингибитор пролиферации С/ЕВРа. У старых особей в печени накапливается модифицированный С/ЕВРа, который необратимо репрессирует E2F-зависимые промоторы и их гены. Смена способа подавления митотического размножения гепатоцитов с возрастом приводит к увеличению вклада их гипертрофии в регенерацию печени [32, 45].

Возраст животного играет важную роль в формировании внутренней структуры регенерирующей печени. Это прежде всего относится к возможности новообразования печеночных долек в ходе регенерации печени. Показано, что формирование новых долек после резекции печени у крыс возможно только в возрасте до 2 недель постнатальной жизни. По-видимому, это обусловлено интенсивным образованием долек в интактной печени в тот же период. При резекции печени у крыс в возрасте 24–28 дней (к данному сроку процесс образования печеночных долек уже завершен) регенерировавшая печень состоит в основном из гипертрофированных долек, то есть образование новых долек не происходит [10, 11]. Подобные данные были получены и на свиньях [20].

После того как в процессе репаративной регенерации масса печени достигает исходных значений,

восстановительный процесс завершается. Фактором, который, по-видимому, прекращает репарацию печени, является TGF- β 1 [25, 26, 36], поскольку было показано, что он ингибирует пролиферацию в культуре гепатоцитов. Концентрация TGF- β 1 в плазме крови после частичной гепатэктомии постепенно нарастает и достигает стабильно высокого уровня через 48–72 часа, однако точные механизмы влияния TGF- β 1 на гепатоциты по-прежнему до конца не выяснены [35, 36, 50].

После частичной гепатэктомии в постнатальном периоде в печени млекопитающих наряду с активацией пролиферации отмечается также усиление апоптоза гепатоцитов. Одной из причин гибели клеток может быть оксидантный стресс, признаки которого обнаруживаются в печени после резекции [15, 43, 48]. После резекции 20% печени плодов крысы мы обнаружили экспрессию каспазы 3 только в гемопоэтических клетках [6].

До настоящего времени мало исследованы механизмы, которые запускают процессы регенерации и регулируют их течение в зависимости от утраты массы органа.

Предполагается, что организм получает сигнал об уменьшении размеров печени при участии желчных кислот [31]. Как известно, между печенью и кишечником происходит кишечно-печеночная циркуляция желчных кислот. Резекция печени вызывает относительное увеличение входящего тока желчных кислот в орган из кишечника, что активирует ядерные рецепторы, в том числе FXR и связанные с ним сигнальные пути, стимулирующие рост печени. После того как исходная масса печени достигнута, относительный ток желчных кислот из кишечника нормализуется. Активация соответствующих ядерных рецепторов прекращается, и экспрессия связанных с этими рецепторами генов возвращается к базальному уровню. Рост печени после резекции рассматривают как гомеотрофический, то есть восстанавливающий функциональную способность органа и гомеостаз [52].

Таким образом, можно сделать вывод, что желчные кислоты играют важную роль в регуляции репаративного роста печени, однако требуется дальнейшее изучение вопроса, как соотносится этот регуляторный каскад с функцией основных факторов роста, которые участвуют в регенерации печени. Кроме того, неизвестна роль желчных кислот в регуляции роста печени в пренатальном периоде [31].

Несмотря на значительные успехи в понимании молекулярных механизмов регенерации печени млекопитающих, в настоящее время в данной области знаний остается много проблем, решение которых позволит приблизиться к направленному влиянию на восстановительные процессы в организме млекопитающих.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по государственному контракту № 8718.

Литература

1. *Бабаева А.Г.* Регенерация: факты и перспективы. М.: Издательство РАМН, 2009. 336 с.
2. *Бродский В.Я., Урываева И.В.* Клеточная полиплоидия. Проллиферация и полиплоидия. М.: Наука, 1981. 259 с.
3. *Делоне Г.В., Урываева И.В., Корецкий В.Ф., Бродский В.Я.* Анализ постнатального роста печени мыши на основе учета числа гепатоцитов, их массы и плоидности. Онтогенез. 1987. № 3. Т. 18. С. 304–307.
4. *Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б.* Репаративная регенерация печени плодов крыс после частичной гепатэктомии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2010. № 9. С. 352–355.
5. *Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б.* Динамика пролиферации гепатоцитов регенерирующей печени плода крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2011. № 3. С. 352–355.
6. *Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б.* Проллиферация и клеточная гибель гепатоцитов регенерирующей печени плодов крыс // Цитология. 2012. № 54. Т. 4. С. 313–317.
7. *Рябинина З.А., Бенюш В.А.* Полиплоидия и гипертрофия клеток в процессах роста и восстановления. М.: Медицина, 1973. 207 с.
8. *Сакута Г.А., Байдюк Е.В., Жумагалиева А.А., Кудрявцев Б.Н.* Особенности регенерации печени китайского хомячка *Cricetulus griseus* // Цитология. 2011. № 53. Т. 11. С. 868–873.
9. *Сидорова В.Ф.* Возраст и восстановительная способность органов у млекопитающих. М.: Медицина, 1976. 199 с.
10. *Сидорова В.Ф.* Постнатальный рост и восстановление внутренних органов у позвоночных. М.: Наука, 1969. 189 с.
11. *Сидорова В.Ф., Рябинина З.А., Лейкина Е.М.* Регенерация печени у млекопитающих. М.: Медицина, 1966. 205 с.
12. *Шалахметова Т.М., Кудрявцева М.В., Завадская Е.Э., Комарова Н.И., Комаров С.А., Кудрявцев Б.Н.* Содержание гликогена в синтезирующих и не синтезирующих ДНК гепатоцитах крыс разного возраста // Цитология. 1981. № 23. Т. 5. С. 539–544.
13. *Anatskaya O.V., Vinogradov A.E.* Genome multiplication as adaptation to tissue survival: Evidence from gene expression in mammalian heart and liver // Genomics. 2007. V. 89. P. 70–80.
14. *Barbason H., Fourré F., Focan C.* Synchronizing effect of corticosterone's circadian rhythm on the DNA synthesis rate in the liver of the young rat // Pathol. Biol. (Paris). 2003. V. 51. N. 4. P. 210–1.
15. *Bras M., Queenan B., Susiin S.A.* Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying // Biochemistry (Mosc.). 2005. V. 70. N. 2. P. 231–9.
16. *Bucher N.R., Glinos A.D.* The Effect of Age on Regeneration of Rat Liver // Cancer Research. 1950. V.10. N. 5. P. 324–32.
17. *Bucher N.R., Swaffield M.N.* The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised // Cancer Research. 1964. V. 24. P. 1611–25.
18. *Bucher N.R., Swaffield M.N., DiTroia A.F.* The influence of age upon the incorporation of thymidine-2-C¹⁴ into the DNA of regenerating rat liver // Cancer Research. 1964. V. 24. P. 509–12.
19. *CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice / Timchenko N.A. et al. // Mol. Cell Biol. 1997. V. 17. N. 12. P. 7353–61.*
20. *Cellular Liver Regeneration after Extended Hepatic Resection in Pigs / Ladurner R. et al. // HPB Surgery. 2009. Article ID 306740, 7 p.*
21. *Celton-Morizur S., Desdouets C.* Polyploidization of liver cells // Adv Exp Med Biol. 2010. V. 676. P. 123–35.
22. *Control of rate and extent of the proliferative response after partial hepatectomy / Lambotte L. et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1997. V. 273. P. 905–12.*
23. *Experimental models of hepatectomy and liver regeneration using newborn and weaning rats / Tannuri A.C.A. et al. // Clinics. 2007. V. 62. N. 6. P. 757–62.*
24. *Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat / Knittel T. et al. // Histochem. Cell Biol. 2000. V. 113. P. 443–53.*
25. *Fausto N.* Knocking out genes to study liver regeneration: present and future // Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1999. V. 277. P. 917–21.
26. *Fausto N.* Liver regeneration // Journal of Hepatology. 2000. V. 32 (suppl. 1). P. 19–31.
27. *Gentric G. et al.* Polyploidy and liver proliferation // Clin Res. Hepatol. Gastroenterol. 2012 V. 36. N. 1. P. 29–34.
28. *Gorla G.R., Malhi H., Gupta S.* Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells // Journal of Cell Science. 2001. V. 114. P. 2943–51.
29. *Gupta S.* Hepatic polyploidy and liver growth control // Seminar in Cancer biology. 2000. V. 10. P. 161–71.
30. *Higgins G.M., Anderson R.M.* Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. 72: 186–202, 1931.
31. *Huang W., Ma K., Zhang J., Qatanani M., Cuvillier J., Liu J., Dong B, Huang X, Moore D.D.* Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration // Science. 2006. N. 312. P. 233–6.
32. *Iakova P., Awad S.S., Timchenko N.A.* Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBP α growth arrest // Cell. 2003. V. 113. P. 495–506.
33. *Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes / Guidotti J.-E. et al. // The journal of biological chemistry. 2003. V. 278. N. 21. P. 19095–101.*
34. *Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis / Margall-Ducos G. et al. // Journal of Cell Science. 2007. V. 120. P. 3633–39.*
35. *Michalopoulos G.K.* Liver regeneration after partial hepatectomy. critical analysis of mechanistic dilemmas // The American Journal of Pathology. 2010. V. 176. N. 1. P. 2–13.
36. *Michalopoulos G.K.* Liver regeneration // J. Cell. Physiol. 2007. V. 213, N. 2. P. 286–300.
37. *Michalopoulos G.K., DeFrances M.C.* Liver regeneration // Science. 1997. V. 276. P. 60–5.
38. *Nadal C., Zajdela F.* Polyploidie somatique dans le foie de rat I. Le rôle des cellules binucléées dans la genèse des cellules polyploïdes // Experimental Cell Research. 1966. V. 42. P. 99–116.

39. Olle E.W., Ren X., McClintock Sh.D., Warner R.L., Deogracias M.P., Johnson K.J., Colletti L.M. Matrix Metalloproteinase-9 Is an Important Factor in Hepatic Regeneration After Partial Hepatectomy in Mice // *Hepatology*. 2006. V. 44. N. 3. P. 540–8.
40. Ontogeny of circadian organization in the rat / Yamazaki S. et al. // *Biol. Rhythms*. 2009. V. 24. N. 1. P. 55–63.
41. p53-insensitive PUMA down-regulation is essential in the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice / Chen S. et al. // *J. Hepatol.* 2010. V. 52. N. 6. P. 864–71.
42. Palmes D., Spiegel H.-U. Animal models of liver regeneration // *Biomaterials*. 2004. V. 25. P. 1601–11.
43. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events / Sigal S.H. et al. // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999. V. 276. P. 1260–72.
44. Postnatal ontogenesis of the circadian clock within the rat liver / Sládek M. et al. // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2006. V. 292. P. 1224–29.
45. Pregnancy restores the regenerative capacity of the aged liver via activation of an mTORC1-controlled hyperplasia/hypertrophy switch / Gielchinsky Y. et al. // *Genes & Development*. 2010. V. 24. P. 543–8.
46. Prometheus' challenge: molecular, cellular and systemic aspects of liver regeneration / Pahlavan P.S. et al. // *Journal of Surgical Research*. 2006. V. 134. P. 238–51.
47. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat / Nagy P. et al. // *Hepatology*. 2001. V. 33. N. 2. P. 339–45.
48. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation / Azad N. et al. // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.* 2010. V. 1203. P. 1–6.
49. Rossio V., Galati E., Piatti S. Adapt or die: how eukaryotic cells respond to prolonged activation of the spindle assembly checkpoint // *Biochem. Soc. Trans.* 2010. V. 38. N. 6. P. 1645–9.
50. Sánchez A., Fabregat I. Growth factor- and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation // *World J Gastroenterol*. 2010. V. 41. N. 16. P. 5148–61.
51. Shanmukhappa K., Matte U., Degen J.L., Bezerra J.A. Plasmin-mediated Proteolysis Is Required for Hepatocyte Growth Factor Activation during Liver Repair // *The Journal Of Biological Chemistry*. 2009. V. 284. N. 19. P. 12917–123.
52. Stanger B.Z. Organ size determination and the limits of regulation // *Cell Cycle*. 2008. V. 7. N. 3. P. 318–24.
53. Tomiya T., Ogata I., Yamaoka M., Yanase M., Inoue Y., Fujiwara K. The Mitogenic Activity of Hepatocyte Growth Factor on Rat Hepatocytes Is Dependent upon Endogenous Transforming Growth Factor-A // *American Journal of Pathology*. 2000. V. 157. N. 5. P. 1693–701.
54. Timchenko N.A., Wilde M., Darlington G.J. C/EBPalpha regulates formation of S-phase-specific E2F-p107 complexes in livers of newborn mice // *Mol. Cell Biol*. 1999. V. 19. N. 4. P. 2936–45.
55. Timchenko N.A. Aging and liver regeneration / Timchenko N.A. et al. // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009. V. 20. N. 4. P. 171–6.
56. Zhang W. Hepatic non-parenchymal cells and extracellular matrix participate in oval cell-mediated liver regeneration // *World J. Gastroenterol*. 2009. V. 15. N. 5. P. 552–60.

MAMMALIAN LIVER REGENERATION

A.V. Elchaninov, T.Kh. Fatkhudinov, A.V. Makarov, V.V. Glinkina, G.B. Bolshakova

The paper analyzes data on the mammalian liver regeneration after 70% liver resection. The role of different growth factors that regulate liver weight restoration after resection is discussed. It is shown that in younger animals liver mass is restored by mitotic reproduction of hepatocytes while in older liver regeneration is carried out by hepatocytes polyploidization and hypertrophy. We discuss the molecular mechanisms of this phenomenon.

Key words: liver, regeneration, mammals

Информация об авторах

Ельчанинов Андрей Владимирович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и гистологии лечебного факультета Российского научно-исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 120-1456. E-mail: elchandrey@yandex.ru

Фатхудинов Тимур Хайсамудинович – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и гистологии лечебного факультета Российского научно-исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 120-1456. E-mail: tfat@yandex.ru

Макаров Андрей Витальевич – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 120-1456. E-mail: anvitmak@yandex.ru

Глинкина Валерия Владимировна – докт. мед. наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и гистологии лечебного факультета Российского научно-исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1. E-mail: vglinkina@mail.ru

Большакова Галина Борисовна – докт. биол. наук, заведующая лабораторией роста и развития НИИ морфологии человека РАМН

Адрес: 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 120-1456. E-mail: gbolshakova@gmail.com

Материал поступил в редакцию 10 августа 2012 года.

РОЛЬ ГЕПАРИНА В ИММУННЫХ, ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССАХ

М.В. Кондашевская

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

Гепарин, применяющийся в клинической практике как антикоагулянт первого выбора, обладает целым рядом свойств, выходящих за рамки антикоагулянтной системы. В обзоре приведены сведения об участии гепарина в иммунных, воспалительных и репаративных процессах. Обобщены данные о механизмах действия гепарина. Сделан вывод, что эффекты гепарина в значительной мере зависят от состояния организма.

Ключевые слова: гепарин, антикоагулянт, иммунная система, воспаление, репарация

Широко распространено мнение, что активно разрабатываемые новые лекарственные средства в конечном счете заменят такие традиционные антикоагулянты как высокомолекулярный гепарин и низкомолекулярные формы гепарина, объективно нуждающиеся в усовершенствовании. Однако трудно представить, что новые препараты, обладающие в основном монотерапевтическим действием, смогут заменить традиционные препараты гепарина, характеризующиеся политерапевтическим эффектом. Гепарин, применяющийся в клинической практике как антикоагулянт первого выбора, обладает целым рядом свойств, выходящих за рамки антикоагулянтной системы.

Роль комплексных соединений гепарина

Способность образовывать специфические стабильные комплексы и изменять активность биологически активных сигнальных молекул во многом объясняет эффекты гепарина как в системе свертывания крови, так и в других системах. Гепарин образует комплексные соединения и с положительно заряженными, и с отрицательно заряженными молекулами органического и неорганического происхождения.

Образуя комплексы с белками, гепарин смещает их изоэлектрическую точку. Таким образом, при образовании комплексов с гепарином активность ферментов, гормонов и других активных сигнальных веществ стабилизируется, регулируется и распределяется. В комплексных соединениях гепарин выполняет роль структуроорганизующей или даже оптимизирующей (модулирующей) среды – матрикса. Степень изменения вещества под действием гепарина зависит от их сродства, степени сульфатирования молекулы гепарина и концентрации обоих компонентов [3, 4, 5].

Гепарин – регулятор концентрации ионов кальция

Механизмы действия многих эффектов гепарина объясняются его способностью модулировать уровень ионов кальция (Ca^{2+}). Процесс повышения внутриклеточного уровня Ca^{2+} обусловлен тем, что вследствие активации фосфолипазы С происходит гидролиз фосфоинозитидов, в результате чего образуется инозитол-1,4,5-трифосфат (ИЗФ), который мобилизует выход внутриклеточного Ca^{2+} [3, 4, 5]. Многие эффекты Ca^{2+} опосредованы белком кальмодулином, уровень которого может повышать цАМФ, что приводит к еще большему выходу Ca^{2+} из внутриклеточных резервов [46].

Гепарин регулирует каталитический потенциал фосфолипазы С, участвующей в процессе АТФ-зависимого выделения внутриклеточного Ca^{2+} , посредником которого является ИЗФ [46]. Гепарин оказывает выраженное гиперполяризующее действие и может изменять зарядность мембран, таким образом модулируя действие кальциевых каналов и регулируя уровень свободных ионов кальция, являющихся одним из важнейших индукторов выделения внутриклеточного Ca^{2+} [6, 31].

По данным многих авторов, гепарин оказывает противоопухолевое действие, включающее ингибирование метастазирования опухолей [15, 37]. Механизмы противоопухолевого действия гепарина частично объясняются его способностью ингибировать индукцию протоонкогена *c-fos*, воздействуя на механизмы выброса Ca^{2+} из цитозоля, на факторы роста (ФР) и их рецепторы, а также на эндотелин-1 [17, 43]. Очень важным механизмом противоопухолевого действия гепарина является его воздействие на гепарансульфатсодержащие протеогликаны (ГСПГ), находящиеся на поверхности эндотелиальных и других клеток, а также во внеклеточном матриксе [40]. Кроме того, ге-

парин частично ингибирует агрегацию опухолевых клеток и их взаимодействие с эндотелием, таким образом препятствуя метастазированию опухолей. Использование гепарина в качестве противоопухолевого вещества ограничено из-за его антикоагулянтных свойств, которые могут быть причиной кровотечений. В связи с этим ведутся активные разработки форм гепарина, не обладающих антикоагулянтной активностью, но способных проявлять противоопухолевое действие [6, 15].

Действие гепарина на иммунную систему

Система свертывания крови, в которой гепарин играет существенную роль, в значительной мере связана с иммунной системой. Реакция иммунной системы при воздействии любого антигена проявляется в активации иммунокомпетентных клеток, одним из этапов реализации которой является выделение внутриклеточного Ca^{2+} . Указанные процессы зависят от метаболизма ИЗФ и состояния его рецепторов, регулируемых гепарином [46].

В организме животных и человека происходит постоянная рециркуляция лимфоцитов в лимфоидных органах и периферической крови. Миграция лимфоцитов зависит от взаимодействия (адгезии) с клетками эндотелия. Усиление миграции лимфоцитов наблюдается при различных патологических процессах, часто сопровождающихся повышением концентрации гепараназы, расщепляющей отрицательно заряженные молекулы ГСПГ, входящих в состав внеклеточного матрикса и располагающихся на эндотелиальных клетках, где они составляют большую часть гликокаликса. Происходящее в связи с деградацией гликокаликса снижение отрицательного заряда облегчает адгезию, а затем миграцию активированных Т-клеток через стенки сосудов. Имеются данные, что гепарин и продукты его деградации снижают концентрацию гепараназы и стимулируют синтез и активацию ГСПГ, таким образом воздействуя на миграцию лимфоцитов и течение воспалительного процесса [37].

Кроме гепараназы прохождение активированных молекул и клеток иммунной системы через стенки сосудов обеспечивается действием плазмينا. Активация системы свертывания крови, сопровождающая активацию иммунной системы, приводит к усиленному образованию тканевого активатора пламиногена, а затем плазмينا. Интенсивное образование плазмينا в сосудистой стенке и просвете сосуда вызывает ферментативное разрушение внеклеточного матрикса. Процесс усиленного образования плазмينا наблюдается при таких заболеваниях как атеросклероз, аневризма, венозный варикоз и т.д. [47]. Гепарин способен модулировать действие плазмينا. Экзогенный и эндогенный гепарин образуют комплексы с тканевым активатором пламиногена и плапсином, что переключает ферментативный процесс в неферментативный, останавливая разрушительное действие плазмينا [2, 3, 4, 5].

Физиологическими триггерами процесса адгезии между клетками иммунной системы и эндотелием являются нейротрофические факторы и ФР, цитокины и хемокины. Синтезируются эти факторы во всех тканях организма и функционируют на основе подвижного гомеостатического, составляя уникальную сеть регулирующих взаимодействий, определяющих жизнедеятельность организма на локальном и системном уровнях в антенатальном и постнатальном периодах [6, 11]. Клеточный ответ на действие ФР, цитокинов и хемокинов зависит от гистогенеза тканей и экспрессии рецепторов, а также наличия гепарина, которые характеризуются высокой степенью связывания с молекулами практически всех указанных факторов. Кроме того, в современных работах исследователи подчеркивают опосредованность эффектов любого из этих факторов через связь с ГСПГ [6, 35]. Особенно важна роль ГСПГ в процессах адгезии. Показано, что ГСПГ опосредуют связывание как хемокинов, цитокинов, ФР, так и нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов с эндотелием, таким образом привлекая их в зону воспаления (рис. 1). В этом процессе участвует внеклеточный и внутриклеточный Ca^{2+} . Модуляция экспрессии адгезивных молекул является существенной частью клеточного иммунного ответа [42]. Важнейший эффект действия молекул ГСПГ реализуется путем активации рецепторов фактора некроза опухолей (ФНО) – ключевого регулятора гомеостаза и функционального состояния иммунной системы [38]. В связи с этим понятна значимость роли ГСПГ в патогенезе многих заболеваний [9, 44]. Имеются сведения, что гепарин препятствует связыванию провоспалительных молекул и клеток с активированным эндотелием, блокируя многие селектины и интегрин, а также регулируя концентрацию Ca^{2+} (см. рис. 1) [34, 44].

Гепарин, модулируя синтез и активацию ГСПГ, изменяет важнейшие функции молекул с активации на ингибирование [28, 35]. Гепарин изменяет ориентацию молекул ФР, цитокинов и хемокинов для взаимодей-

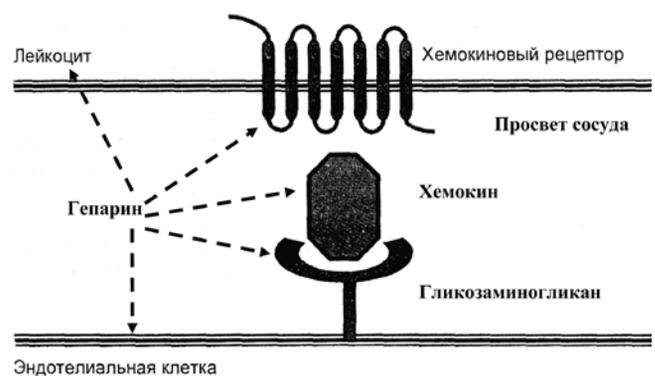


Рис. 1. Представление хемокинов, цитокинов и ростовых факторов циркулирующим лейкоцитам гликоаминогликанами на поверхности эндотелиальных клеток и воздействие на них гепарина. Пунктирными стрелками отмечено модулирующее действие гепарина

ствия с ГСПГ и воздействия на клетку, а также модулирует проникновение указанных молекул через эндотелиальные барьеры [11]. Гепарины и ГСПГ с разной длиной цепи и различной степенью сульфатирования оказывают дифференцированные эффекты в отношении ФР, цитокинов, хемокинов и их рецепторов, стимулируя или ингибируя их продукцию [6, 28].

Одним из путей реализации иммунного ответа является непосредственный контакт клеток с молекулами семейства низкомолекулярных адгезионных факторов, а также лиганд–рецепторные взаимодействия, описанные выше. Гуморальное звено регуляции обеспечивается ФР, цитокинами и хемокинами, являющимися модуляторами многих функций лимфоцитов и других клеток. Имеются сведения, что гепарин и продукты его деградации способны модулировать секрецию активированными Т-лимфоцитами различных ФР, цитокинов и хемокинов, например таких, как ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-8 [22, 24]. Таким образом, гепарин может оказывать противовоспалительное (ФНО α и ИЛ-1 β) действие, стимулировать дифференцировку (ИЛ-4 и ИЛ-5) и миграцию активированных Т-клеток, макрофагов и нейтрофилов в очаг воспаления (ИЛ-8). Кроме того, известно, что гепарин стимулирует секрецию Т-лимфоцитами ИЛ-12 и интерферона- γ [36]. Судя по данным литературы, эти цитокины индуцируют активацию и поляризацию иммунного ответа по клеточному Th1 типу, при котором многие воспалительные заболевания протекают более благоприятно [3, 4].

Роль гепарина при воспалительных процессах

Воспаление – наиболее древняя и сложная защитно-приспособительная реакция на повреждение, направленная не только на ликвидацию альтерирующего агента, но и на восстановление поврежденной ткани. В воспалительных реакциях тучным клеткам принадлежит важная роль. На любые воздействия тучные клетки отвечают стереотипной реакцией – изменением количества клеток, дегрануляцией, выбросом медиаторов из гранул, снижением содержания в них гепарина [2, 4]. При стрессорных, антигенных и других воздействиях тучные клетки реагируют секрецией стабильных субмикронных гепаринсвязывающихся микровезикул, содержащих ФНО и другие белки. Микровезикулы перемещаются по системе лимфатических сосудов к лимфатическим узлам и другим органам иммунной системы. Гепарин предотвращает связывание реактивных иммунных комплексов, содержащих антигены и антитела, с ГСПГ, что предупреждает или замедляет развитие воспаления [45].

В воспалительной реакции участвуют разнообразные, мигрирующие в зону по-

вреждения клетки, молекулы агонистов и антагонистов, регулирующие процессы миграции. Мобилизация лейкоцитов из кровеносного русла развивается как каскадный процесс. Начинается он с миграции активации хемокинами, цитокинами и ФР перекачивания лейкоцитов (нейтрофилов, моноцитов), опосредованного L-селектинами (рис. 2). Все эти этапы регулируются потенциалом мембраны и Ca²⁺. Под контролем различных интегринов и других адгезивных молекул происходит стабильное связывание лейкоцитов с эндотелием. Гепарин предотвращает активацию и дегрануляцию тучных клеток, нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, блокирует мобилизацию лейкоцитов, ингибируя многие хемоаттрактанты, селектины и интегрины, а также препятствует связыванию провоспалительных клеток и молекул с активированным эндотелием, регулируя концентрацию Ca²⁺ (рис. 2, табл.). Следует отметить, что эти эффекты гепарина проявляются независимо от его антикоагулянтных свойств [29, 39].

Ключевую роль среди медиаторов воспаления играют биогенные амины (гистамин, серотонин); плазменные системы (система кининов, система гемостаза и фибринолиза, фрагменты комплемента); ФР, цитокины и хемокины; производные арахидоновой кислоты (простагландины, лейкотриены, хемотаксические липиды); кислородные радикалы и гидроперекиси липидов. Эти медиаторы секретируются сосудистым эндотелием, активированными тучными клетками, тромбоцитами, нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами. Гепарин эффективно регулирует уровень провоспалительных медиаторов и модулирует активность воспалительных клеток, так как он служит матрицей (местом взаимо-

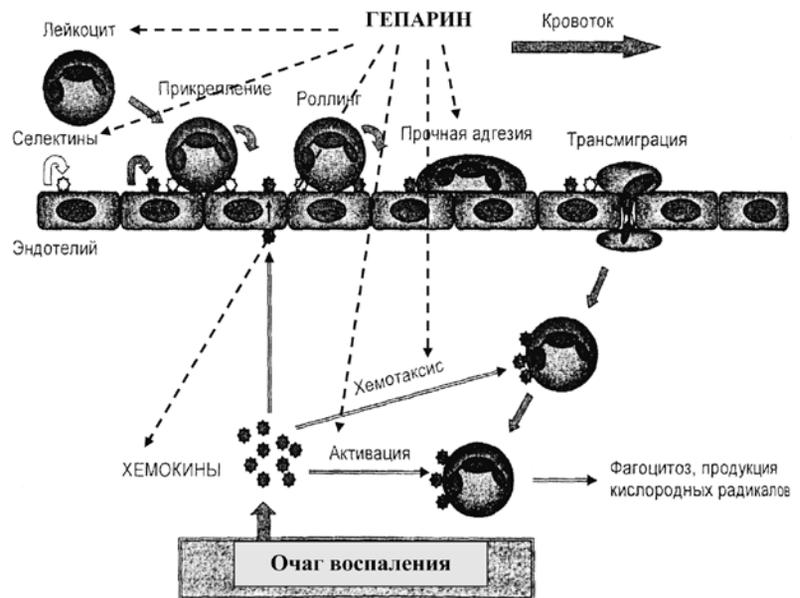


Рис. 2. Роль гепарина в мобилизации и миграции лейкоцитов из сосудистого русла в очаг воспаления. Пунктирными стрелками отмечено ингибирующее действие гепарина

Таблица

Роль гепарина в воспалительно-репаративных реакциях

Воспаление	Фаза альтерации	<p>Стимуляция ↓</p> <p>Повреждение</p>	Инфекция	Ингибирование адгезии, антимикробное, детоксикационное действие	←	Гепарин	
	Фаза экссудации		Травма	Ингибирование выброса Ca ²⁺ , антиоксидантное действие			←
			Стресс	Антистрессорное, антиноцицептивное, антиоксидантное действие			
Рубцевание	Фаза пролиферации	<p>Активация и мобилизация клеток крови (тромбоцитов, лейкоцитов и т.д.), ткани (тучных клеток и т.д.), эндотелия и т.д.</p> <p>Локальная продукция и выход в кровотоки ↓</p> <p>Хемокины Интерлейкины Факторы роста Гистамин</p> <p>Индукция ↓</p> <p>Движение клеток, стимуляция адгезивных молекул</p>	Ингибирование активации и мобилизации клеток крови, ткани, эндотелия	←	Гепарин		
	Фаза рубцевания		<p>Пролиферация и миграция фибробластов, рост сосудов, образование грануляционной ткани</p> <p>Стимуляция секреции фибробластами факторов роста, ускоряющих их дифференциацию и пролиферацию, стимуляция накопления коллагена, усиление ангиогенеза</p>			Ингибирование провоспалительных хемокинов, интерлейкинов, факторов роста, антигистаминное действие, снижение проницаемости кровеносных сосудов	←
				Ингибирование движения воспалительных клеток	←	Гепарин	
				<p>Созревание грануляционной ткани, регенерация паренхиматозных элементов</p> <p>Стимуляция секреции фибробластами факторов роста, ускоряющих их дифференциацию и пролиферацию, стимуляция накопления коллагена, усиление ангиогенеза</p>	←	Гепарин	

действия, интерфейсом) для всех компонентов, участвующих в воспалительном процессе [2, 3, 4, 6, 29].

Особое место в реакции воспаления занимает гистамин, который, как и все остальные медиаторы, содержится в гранулах тучных клеток в связи с гепариновым матриксом. Гистамин выделяется из гранул тучных клеток при иммунной и неиммунной стимуляции. В обоих случаях большую роль играют ионы Ca²⁺, протеинкиназа C, АТФ [2, 3, 4]. Гистамин повышает тромботические свойства крови, вызывает вазодилатацию, увеличивает проницаемость сосудов, оказывает ноцицептивное действие, является одним из наиболее важных медиаторов воспаления. Гепарин, активируя диаминооксидазу, расщепляющую гистамин, и образуя комплексы с гистамином (в комплексном соединении гепарин блокирует функциональную активность гистамина), оказывает антигистаминное действие и проявляет прямо противоположные эффекты – снижает коагулянтную активность крови и проницаемость ка-

пилляров, оказывает противовоспалительное и антиноцицептивное действие [2, 3, 4].

В процессе развития воспаления нарушается антиоксидантная защита клеток, основную роль в которой играет внеклеточная супероксиддисмутаза, защищающая плазматическую мембрану от активных форм кислорода. Одним из источников внеклеточной супероксиддисмутазы являются тучные клетки, в гранулах которых супероксиддисмутаза, как и все остальные молекулы, находится в связанном с гепариновым матриксом виде. Проявление функции внеклеточной супероксиддисмутазы зависит от состояния гепаринсвязывающегося домена ее молекулы. Нарушение в этом домене исследователи соотносят с развитием многих видов патологии [27].

Основные фагоцитарные клетки – нейтрофилы и макрофаги, мигрирующие в зону воспаления, способны секретировать оксиданты, которые вызывают появление кислородных радикалов, разрушающих окружаю-

щие клетки. Оксидативный стресс приводит к повреждению ДНК, липидов, белков, функций различных ФР и является одним из патогенетических механизмов при многих заболеваниях и их осложнениях (гипертензия, сахарный диабет, сердечная недостаточность, атеросклероз и т.д.) [23]. Гепарин проявляет антиоксидантные свойства по отношению к веществам, выделяемым фагоцитарными клетками периферической крови (рис. 2, табл.) [3, 4, 23].

Оксидативный стресс, повышение уровня провоспалительных ФР, цитокинов и внеклеточного Ca^{2+} , появление в кровотоке тромбина приводят к усилению синтеза окиси азота (NO). Молекулы NO могут как подавлять, так и стимулировать воспалительные реакции. Установлено, что гепарин в малых концентрациях повышает синтез NO, активируя NO-синтазу и синтез цГМФ, а в больших – тормозит выделение NO. Примечательно, что описано влияние на NO экзогенного высокомолекулярного гепарина (ВМГ) как с традиционными антикоагулянтными свойствами, так и ВМГ, лишённого антикоагулянтной активности [25].

Большинство воспалительных заболеваний сопровождается чрезмерным экспрессированием гепараназы. Гепараназы, расщепляющая ГСПГ, включается в ряд физиологических и патологических процессов. В частности, распад ГСПГ, происходящий под действием гепараназы, приводит к нарушению барьерных функций эндотелия и базальной мембраны, что имеет решающее значение в патогенезе воспалительных заболеваний. Увеличение уровня гепараназы коррелирует с повышением метастатического потенциала опухолевых клеток. Гепарин является природным ингибитором гепараназы, регулятором активности и метаболизма ГСПГ [10, 16, 26].

Гепарин регулирует каталитический потенциал фосфолипазы A_2 . Этот фермент гидролизует мембранные фосфолипиды до жирных кислот и лизофосфолипидов, которые метаболизируются до медиаторов воспаления (эйкозаноиды, фактор активации тромбоцитов). Повышение уровня жирных кислот играет важную роль в патогенезе таких заболеваний как атеросклероз, сахарный диабет, артериальная гипертензия и т.д. [14, 41].

Воспалительная реакция направлена не только на ликвидацию альтерирующего агента, но и на восстановление поврежденной ткани за счет репарации, миграции и пролиферации гематогенных и гистиогенных клеточных элементов. Традиционно считается, что тучные клетки принимают участие в основном в реакциях воспаления и гиперчувствительности, однако доказано, что гепарин тучных клеток и ряд других медиаторов (эпидермальный ФР, ФР фибробластов-2, тромбоцитарный ФР, трансформирующий ФР- β , ФР нервов, ИЛ-4, ИЛ-8) вносят существенный вклад в противовоспалительный ответ, неоангиогенез, фиброгенез, реэпителизацию, поддержание барьерных функций эндотелия при репаративных процессах (см. табл.) [3, 4, 20].

При новообразовании соединительной ткани в очаг воспаления мигрируют предшественники фиброблас-

тов, которые начинают активно размножаться. Миграция, распластывание и прикрепление фибробластов и других клеток (эндотелиальных) к субстрату опосредуются и регулируются ФР, цитокинами, хемокинами, интегринами, селектинами, ионами кальция и магния (см. рис. 2) [1]. Среди эффектов гепарина, выходящих за рамки антикоагулянтного действия, многие исследователи отмечали ускорение заживления кожной раны при введении гепарина [3, 4, 18, 25]. В этом случае наиболее вероятным механизмом действия является регуляция гепарином биоактивного состояния рецепторов, секреции и активации ФР фибробластов, выделяющихся в зоне повреждения любых тканей (рис. 2, табл.) [13].

Гепарин активно применяется в клеточно-инженерных конструкциях как вещество, улучшающее трофику в области воспаления, но главное его назначение в том, чтобы служить матриксом, удерживающим молекулы – ускорители ранозаживления (чаще всего ростовые и нейротрофические факторы) в пределах клеточно-инженерной конструкции и повышать их биодоступность [8, 21].

Воспаление и ангиогенез – в значительной степени взаимосвязанные процессы во многих физиологических и патологических условиях. Ангиогенез нехарактерен в физиологических условиях для неповрежденных тканей организма взрослых людей и животных, но активизируется при заживлении ран и воспалительных процессах. Так, например, если стимуляция ангиогенеза является основой репаративного морфогенеза при ишемическом поражении миокарда, то активация ангиогенеза включается в патологические процессы при таких заболеваниях как псориаз, диабетическая ретинопатия, ревматоидный артрит, артериосклероз, онкологические заболевания и т.д. [7, 32]. Провоспалительные клетки и молекулы способствуют ангиогенезу, индуцированному ФР фибробластов-2 [32]. Гипоксия, возникающая при различных патологических процессах, является одним из основных факторов, стимулирующих ангиогенез. Кроме того, гипоксия приводит к снижению внеклеточного pH, тогда как эндотелиальный ФР, связываясь с эндотелиальными клетками посредством ГСПГ и фибронектина, приводит к повышению pH [19]. Экзогенное введение гепарина значительно ускоряет процессы регенерации и пролиферации, одновременно индуцируя восстановление барьерных функций сосудистого эндотелия (рис. 2, табл.). Гепарин способен действовать как фактор, стабилизирующий эндотелий без стимуляции пролиферации [12, 30, 33].

Заключение

Гепарин и гепариноподобные гликозаминогликаны представлены практически во всех тканях организма животных и человека, где они участвуют в регуляции ключевых гомеостатических, адаптивных и патологических процессов. Механизмы действия многих эффектов эндогенного и экзогенного гепарина объясняются

его способностью образовывать комплексные соединения с различными активными сигнальными веществами и выполнять роль организующей или даже оптимизирующей среды – матрикса, функционирующей физически и химически. Гепарин может покидать одни комплексные соединения и образовывать другие. При этом в значительной степени активность ферментов, гормонов и других активных сигнальных веществ стабилизируется, регулируется и распределяется при образовании комплексов с гепарином. Степень изменения вещества под действием гепарина зависит от его средства, разновидности цепи гепарина и концентрации обоих компонентов. Кроме этого, важным механизмом влияния гепарина на гомеостаз является его возможность регулировать сигнальное поведение большинства ростовых факторов, цитокинов, хемокинов, молекул, входящих в состав внеклеточного матрикса, уровень ионов кальция и т.д. В результате действия гепарина в конечном счете происходит восстановление защитных свойств плазматических мембран, в том числе сосудистого эндотелия, что обеспечивает нормализацию функции тканей и органов.

В деятельности иммунной системы ключевая роль гепарина состоит в модуляции процессов миграции и рекрутирования клеток иммунной системы, что, несомненно, отражается на течении любых патологических процессов. Следует подчеркнуть, что механизм действия гепарина зависит от состояния организма, окружающей композиции молекул и клеток, длины цепи и степени сульфатирования гепарина. Так, например, при воспалительной реакции без выраженных системных проявлений гепарин способствует регенерации, инициируя ангиогенез, пролиферацию и миграцию клеток, тогда как при выраженных системных проявлениях воспалительного процесса гепарин способствует регенерации, ингибируя ангиогенез, пролиферацию и миграцию клеток. Вероятнее всего, в зависимости от состояния организма животных и человека могут изменяться концентрация, время циркуляции и скорость распада гепарина, а соответственно, степень его воздействия. Следует отметить, что большинство указанных эффектов гепарина не зависит от его антикоагулянтных свойств.

Среди эффектов, не относящихся к функции противосвертывающей системы, у гепарина выявлены детоксикационное, противовирусное, противомикробное, противогрибковое, противовоспалительное, противоотечное, противоопухолевое и антиметастатическое, антигипертензивное, антидиабетическое свойства.

Литература

1. Белоцкий С.М., Авталион Р.Р. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты / С.М. Белоцкий, Р.Р. Авталион. М.: БИНОМ, 2008. 240 с.
2. Кондашевская М.В. Тучные клетки и гепарин – ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах / М.В. Кондашевская // Вестник РАМН. 2010. № 6. С. 49–54.
3. Кондашевская М.В. Современные представления о роли гепарина в гемостазе и регуляции ферментативной и гормональной активности / М.В. Кондашевская // Вестник РАМН. 2010. № 7. С. 35–43.
4. Кондашевская М.В. Гепарин – новая парадигма эффектов действия / М.В. Кондашевская. М.: Студия МДВ, 2011. 276 с.
5. Кудряшов Б.А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания / Б.А. Кудряшов // М.: Медицина, 1975. 486 с.
6. Лукашин Б.П. Гепарин и факторы роста / Б.П. Лукашин, А.Н. Гребенюк, В.В. Зацепин // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8. № 3. С. 16–21.
7. Потапов И.В. Стимуляция ангиогенеза как основа репаративного морфогенеза при ишемическом поражении миокарда / И.В. Потапов, И.А. Кириллов // Вестник РАМН. 2007. № 9. С. 3–9.
8. Ahmed T.A. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications / T.A. Ahmed, E.V. Dare, M. Hincke // Tissue. Eng. Part. B. Rev. 2008. V. 14. N 2. P. 199–215.
9. Alexopoulou A.N. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology / A.N. Alexopoulou, H.A. Mulhaupt, J.R. Couchman // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2007. V. 39. N. 3. P. 505–28.
10. Amirkhosravi A. The role of tissue factor pathway inhibitor in tumor growth and metastasis / A. Amirkhosravi, T. Meyer, M. Amaya et al. // Semin. Thromb. Hemost. 2007. V. 33. N. 7. P. 643–52.
11. Anderson S.M. The phosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) by engineered surfaces with electrostatically or covalently immobilized VEGF / S.M. Anderson, T.T. Chen, M.L. Iruela-Arispe, T. Segura // Biomaterials. 2009. V. 30. N. 27. P. 4618–28.
12. Bezuidenhout D. Covalent surface heparinization potentiates porous polyurethane scaffold vascularization / D. Bezuidenhout, N. Davies, M. Black et al. // J. Biomater. Appl. 2008. V. 24. N. 5. P. 401–18.
13. Bhang S.H. Skin regeneration with fibroblast growth factor 2 released from heparin-conjugated fibrin / S.H. Bhang, A.Y. Sun, H.S. Yang et al. // Biotechnol Lett. 2011. V. 33. N. 4. P. 845–51.
14. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids / G. Boden // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 2011. V. 18. N. 2. P. 139–43.
15. Casu B. Non-anticoagulant heparins and inhibition of cancer / B. Casu, I. Vlodaysky, R.D. Sanderson // Pathophysiol. Haemost. Thromb. 2008. V. 36. N. 3–4. P. 195–203.
16. Deepa P.R. Favourable modulation of the inflammatory changes in hypercholesterolemic atherogenesis by a low-molecular-weight heparin derivative / P.R. Deepa, P. Varalakshmi // Int. J. Cardiol. 2006. V. 106. N. 3. P. 338–347.
17. Domeier T.L. IP3 receptor-dependent Ca²⁺ release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes / T.L. Domeier, A.V. Zima, J.T. Maxwell et al. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2008. V. 294. N. 2. P. H596–604.
18. Durmaz C.E. Comparison of effects of unfractionated heparin and low molecular weight heparin on skin wound healing of rats /

- C.E. Durmaz, A. Ozkan, B. Senel, H.A. Uyar // *Acta Cir. Bras.* 2012. V. 27. N. 9. P. 639–644.
19. Goerges A.L. pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release / A.L. Goerges, M.A. Nugent // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. N. 3. P. 2307–315.
 20. Groot Kormelink T. Immunobiology of antigen-specific immunoglobulin free light chains in chronic inflammatory diseases / T. Groot Kormelink, P.W. Askenase, F.A. Redegeld // *Curr. Pharm. Des.* 2012. V. 18. N. 16. P. 2278–89.
 21. Han D. Optimal delivery systems for bone morphogenetic proteins in orthopedic applications should model initial tissue repair structures by using a heparin-incorporated fibrin-fibronectin matrix / D. Han, W. Liu, Q. Ao, G. Wang // *Med. Hypotheses.* 2008. V. 71. N. 3. P. 374–78.
 22. Hecht I. Heparin-disaccharide affects T cells: inhibition of NF-kappaB activation, cell migration, and modulation of intracellular signaling / I. Hecht, R. Hershkoviz, S. Shvitiel et al. // *J. Leukoc. Biol.* 2004. V. 75. N. 6. P. 1139–1146.
 23. Iida S. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase improves endothelial function in rats with heart failure / S. Iida, Y. Chu, J. Francis et al. // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2005. V. 289. N. 2. P. H525–32.
 24. Ji S.L. Inhibitory effect of heparin-derived oligosaccharides on secretion of interleukin-4 and interleukin-5 from human peripheral blood T lymphocytes / S.L. Ji, H.F. Cui, F. Shi et al. // *World. J. Gastroenterol.* 2004. V. 10. N. 23. P. 3490–4.
 25. Lakshmi R.T. Low molecular weight heparin mediated regulation of nitric oxide synthase during burn wound healing / R.T. Lakshmi, T. Priyanka, J. Meenakshi et al. // *Ann. Burns Fire Disasters.* 2011. V. 24. N. 1. P. 24–29.
 26. Li J.P. Heparin, heparan sulfate and heparanase in cancer: remedy for metastasis? / J.P. Li // *Anticancer. Agents. Med. Chem.* 2008. V. 8. N. 1. P. 64–76.
 27. Liu J. Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of heparin-superoxide dismutase / J. Liu, T. Zhao, H. Tan et al. // *Biomed Pharmacother.* 2010. V. 64. N. 10. P. 686–691.
 28. Mahalingam Y. Cellular adhesion responses to the heparin-binding (HepII) domain of fibronectin require heparan sulfate with specific properties / Y. Mahalingam, J.T. Gallagher, J.R. Couchman // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. N. 5. P. 3221–30.
 29. Mousa S.A. Heparin, low molecular weight heparin, and derivatives in thrombosis, angiogenesis, and inflammation: emerging links / S.A. Mousa // *Semin. Thromb. Hemost.* 2007. V. 33. N. 5. P. 524–33.
 30. Moy A.B. Growth factor- and heparin-dependent regulation of constitutive and agonist-mediated human endothelial barrier function / A.B. Moy, K. Blackwell, M.H. Wu, H.J. Grander // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 2006. V. 291. N. 5. P. H2126–35.
 31. Németh K. Suppression of Ca²⁺ influx by unfractionated heparin in non-excitabile (невозбудимый) intact cells via multiple mechanisms / K. Németh, I. Kurucz // *Biochem. Pharmacol.* 2005. V. 69. N. 6. P. 929–40.
 32. Presta M. Inflammatory cells and chemokines sustain FGF2-induced angiogenesis / M. Presta, G. Andrés, D. Leadi et al. // *Eur. Cytokine Netw.* 2009. V. 20. N. 2. P. 39–50.
 33. Rajangam K. Heparin binding nanostructures to promote growth of blood vessels / K. Rajangam, H.A. Behanna, M.J. Hui et al. // *Nano. Lett.* 2006. V. 6. N. 9. P. 2086–90.
 34. Ramacciotti E. P-selectin/PSGL-1 Inhibitors versus enoxaparin in the resolution of venous thrombosis: A meta-analysis / E. Ramacciotti, D.D.Jr. Myers, S.K. Wroblewski et al. // *Thromb. Res.* 2010. V. 125. N. 4. P. e138–42.
 35. Raman S. Usage of integrin and heparan sulfate as receptors for mouse adenovirus type 1 / S. Raman, T.H. Hsu, S.L. Ashley, K.R. Spindler // *J. Virol.* 2009. V. 83. N. 7. P. 2831–8.
 36. Ranjbaran H. Heparin displaces interferon-gamma-inducible chemokines (IP-10, I-TAC, and Mig) sequestered in the vasculature and inhibits the transendothelial migration and arterial recruitment of T cells / H. Ranjbaran, Y. Wang, T.D. Manes et al. // *Circulation.* 2006. V. 114. N. 12. P. 1293–300.
 37. Ritchie J.P. SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis / J.P. Ritchie, V.C. Ramani, Y. Ren et al. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. N. 6. P. 1382–93.
 38. Sakurai D. TAC1 regulates IgA production by APRIL in collaboration with HSPG / D. Sakurai, H. Hase, Y. Kanno // *Blood.* 2007. V. 109. N. 7. P. 2961–7.
 39. Schlesinger M. Binding between heparin and the integrin VLA-4 / M. Schlesinger, D. Simenis, P. Schmitz et al. // *Thromb. Haemost.* 2009. V. 102. N. 5. P. 816–22.
 40. Schouten M., Wiersinga W.J., Levi M., van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis / M. Schouten, W.J. Wiersinga, M. Levi, T. van der Poll // *J. Leukoc. Biol.* 2008. V. 83. N. 3. P. 536–45.
 41. Seo W.K. Elevated free fatty acid is associated with cardioembolic stroke subtype / W.K. Seo, J. Kim, Y.H. Kim et al. // *Can. J. Neurol. Sci.* 2011. V. 38. N. 6. P. 874–9.
 42. Shulman Z. Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin / Z. Shulman, V. Shinder, E. Klein et al. // *Immunity.* 2009. V. 30. N. 3. P. 384–96.
 43. Song Y. A study on pathological changes and the potential role of growth factors in the airway wall remodeling of COPD rat models / Y. Song, D. Cui, P. Mao // *Zhonghua. Jie. He. Hu. Xi. Za. Zhi.* 2001. V. 24. N. 5. P. 283–7.
 44. Taylor K.R. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation / K.R. Taylor, R.L. Gallo // *FASEB. J.* 2006. V. 20. N. 1. P. 9–22.
 45. Torrent M. Eosinophil cationic protein (ECP) can bind heparin and other glycosaminoglycans through its RNase active site / M. Torrent, M.V. Nogués, E. Boix // *J. Mol. Recognit.* 2011. V. 24. N. 1. P. 90–100.
 46. Yamamura H. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate formation in the voltage-dependent regulation of the Ca²⁺ concentration in porcine coronary arterial smooth muscle cells / H. Yamamura, S. Ohya, K. Muraki, Y. Imaizumi // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012. V. 342. N. 2. P. 486–96.
 47. Zorio E. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms / E. Zorio, J. Gilabert-Estellés, F. España et al. // *Curr. Med. Chem.* 2008. V. 15. N. 9. P. 923–9.

THE ROLE OF HEPARIN IN IMMUNE PROCESSES, INFLAMMATION AND REPARATION

M.V. Kondashevskaya

Heparin, which is used in clinical practice as an anticoagulant of choice, has a number of features that go beyond its function in the anticoagulant system. This review provides information on the involvement of heparin in the immune processes, inflammation and reparation. We summarized the data on the mechanisms underlying the effects of heparin. It was concluded that the impact of heparin is largely dependent on the state of the organism.

Key words: heparin, anticoagulant, immune system, inflammation, reparation

Информация об авторе

Кондашевская Марина Владиславовна – докт. биол. наук, доцент по специальности фармакология, руководитель группы функциональной морфологии стресса НИИ морфологии человека РАМН.

Адрес: Москва, ул. Цюрупы, д. 3. Телефон: 8 (499) 129 5333. E-mail: mariluka@mail.ru

Материал поступил в редакцию 26 сентября 2012 года.

© Коллектив авторов, 2012

УДК 618.2/3-008.9

РОЛЬ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ТИПА 2 И 9 ПРИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

А.П. Милованов, И.М. Расстригина, Т.В. Фокина

ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва

В обзоре систематизированы фрагментарные данные о роли семейства MMPs на разных этапах физиологической и осложненной беременности. Во время имплантации MMP-2 и 9 лизируют маточный эпителий и его базальный слой. Металлопротеиназный каскад, продуцируемый инвазивным цитотрофобластом, осуществляет гестационную перестройку спиральных и в дальнейшем радиальных артерий в маточно-плацентарные артерии с открытыми устьями в межворсинчатое пространство сформированной плаценты. Перед родами активизируется продукция MMP-9 в плодных оболочках, что способствует их своевременному разрыву и завершению родового акта. Дискоординация по типу гипер- или гипофункции MMP-2 и 9 приводит к невынашиванию беременности или является важным звеном патогенеза преэклампсии.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, имплантация, цитотрофобластическая инвазия, роды, преэклампсия

Обширное семейство матриксразрушающих цинк-зависимых металлопротеаз (MMPs) играет важную роль во многих физиологических процессах, таких как морфо-, васкуло- и ангиогенез, ремоделирование, склероз и, наконец, опухолевый рост. Любая доброкачественная и тем более злокачественная опухоль является мощным стимулом для каскада MMPs, который способствует инвазии и метастазированию опухолевых клеток через деградированный матрикс соседних тканей [1, 2]. Менее известны данные о роли металлопротеиназного каскада на различных этапах физиологической и осложненной беременности. Так, имеются сведения о существенном значении MMP-2 и MMP-9 в процессе имплантации бластоцисты в эндометрий матки у обезьян [19] и человека [16], в раннем развитии плаценты и цитотрофобластической инвазии в I и II триместрах беременности [9], а также в амниотической жидкости и плодных оболочках [20]. В условиях патологии беременности роль MMPs рассматривается в основном у пациенток с преэклампсией и при синдроме привычного невынашивания беременности [4]. Следовательно, речь идет о фрагментарном освещении MMPs на разных этапах беременности и редко – при ее патологии.

Цель настоящего обзора – показать значение MMPs для нормальной и осложненной беременности с акцентом на клетки-продуценты MMPs и их регуляцию.

Типы металлопротеиназ

Металлопротеиназы – это ферменты, продуцируемые различными клетками и разрушающие компоненты

внеклеточного матрикса. Семейство металлопротеиназ включает 16 ферментов, которые экспрессируются разными клетками в интерстициальное пространство в виде биологически латентных форм. Активация проферментов происходит под действием протеаз. Молекула металлопротеиназы состоит из четырех доменов: 1) продомена, являющегося сигнальным пептидом, необходимым для секреции фермента; 2) продомена, отщепляемого при активации фермента; 3) каталитического домена, содержащего ион цинка; 4) регуляторного домена, имеющего центр связывания с ингибиторами металлопротеиназ (TIMP) [1]. Металлопротеиназы классифицируются в основном по специфичности компонентов матрикса [2, 11]. Это семейство делится на 4 группы в соответствии со своими свойствами и локализацией [9].

Коллагеназы, действующие преимущественно на фибриллярный коллаген I, II, III типа и включающие интерстициальную коллагеназу (MMP-1), нейтрофильную коллагеназу (MMP-8) [8, 14].

Желатиназы, деградирующие преимущественно денатурированный коллаген (желатин) и нативный коллаген IV типа. Они включают желатиназу А, масса – 72 kDa, или коллагеназу IV типа (MMP-2) и желатиназу В, масса – 92 kDa, или коллагеназу IV типа (MMP-9).

Стромелизины, имеющие широкий спектр влияния на фибронектин, ламинин, коллаген III, IV, V типа, эластин, протеогликановый внутренний протеин. Они включают стромелизин-3 (MMP-11), матрилизин (MMP-7) и металлоэластазу человеческих альвеолярных макрофагов легких.

Мембранный тип металлопротеиназ (МТ-ММРs), составляющих новый субкласс. Они включают МТ-ММР-1, -2 и -3 [8, 10, 14]. Эти МТ-ММРs локализованы на поверхности клеток, и их субстрат пока не совсем ясен. О МТ-ММР-1 известно, что он включен в процесс превращения латентной формы ММР-2 в активную.

Из семейства ММРs желатиназа А (ММР-2) и желатиназа В (ММР-9) занимают ведущее место в деградации компонентов базальной мембраны и матрикса [11]. ММР-2 и ММР-9 и их ингибиторы TIMP-1 и TIMP-2 имеют особое значение при беременности, они определяют ход имплантации, плацентации и инвазивную способность трофобласта в эндометрии [16].

Регуляция активности ММР-2 и ММР-9

Регуляция активности ММР-2 и ММР-9 осуществляется с помощью следующих механизмов.

Эндотелиальный (VEGF), эпидермальный (EGF) и фибробластный (FGF) ростовые факторы являются важными для активации деградации экстрацеллюлярного матрикса в процессе цитотрофобластической инвазии [3, 15]. VEGF, EGF, FGF-4 и FGF-10, но не FGF-2, стимулируют активность ММР-9, в то время как FGF-2 снижает активность ММР-9 до 17% от базового уровня. FGF-4 и FGF-10 также стимулируют активность и ММР-9. Эти результаты подтверждают гипотезу, что ростовые факторы управляют инвазивной способностью цитотрофобласта и поэтому играют значительную роль в развитии плаценты на ранних сроках [3]. При иммуногистохимическом исследовании было обнаружено, что в плацентах I триместра FGF-4 экспрессировался в строме ворсин, особенно в эндотелиальных клетках. FGF-10 экспрессия была локализована во вневорсинчатом трофобласте, инвазирующем децидуальную оболочку.

Активность металлопротеиназ регулируется также специфичными тканевыми ингибиторами (TIMPs). Описана их иммуноэкспрессия в человеческих децидуальных клетках и вневорсинчатом трофобласте [9]. Аналогичные данные получены на макаках резус [18], то есть инвазивная способность цитотрофобласта «сдерживается» на пара- и аутокринном уровнях регуляции. На сегодняшний день описаны три TIMPs. TIMP-1 подавляет все ММРs в активной форме и, более того, ММР-9 (желатиназу В) в латентной и активной форме [9]. TIMP-2 специфичен для ММР-2. TIMPs экспрессируются эндометриальными стромальными и децидуальными клетками человека, действующими в процесс функциональной активности экстрацеллюлярного матрикса [11].

Зафиксировано, что интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли (TNF- α), в русскоязычном варианте ФНО- α , подавляют инвазию вневорсинчатого трофобласта [5, 11], снижая уровень мРНК ММР-9 и/или его активность. Регуляция ММР-2 и ММР-9 экспрессии различна: постоянная ММР-2 и ситуативная ММР-9.

Клетки-продуценты и их локализация в процессе беременности

I триместр. Есть данные, что в плацентах I триместра зафиксировано интенсивное иммуноокрашивание ММР-9 в клеточных колоннах, их инвазивной части, как у человека [9], так и у обезьян [19]. Большинство авторов придерживаются мнения, что ММР-2 и ММР-9 хорошо экспрессируются в цитотрофобласте на границе материнской части и якорных ворсин. Это подтверждает, что плацентарная ткань, в частности ворсинчатый цитотрофобласт, является источником инвазирующих клеток, моделирует и контролирует процесс их миграции посредством экспрессии ММР-2 и ММР-9, отсутствующих в миометрии на ранних сроках беременности. Подобная картина наблюдается и у обезьян, например у макак резус [19]. Есть данные, что мРНК, необходимая для синтеза ММР-9, визуализируется также в децидуальных клетках, но без указания их конкретных типов. Экспрессия ММР-9 зафиксирована в цитотрофобласте эндометрия. У макак резус имплантация бластоцисты проходит на 9,5 день беременности. Присутствие мРНК, необходимой для синтеза ММР-2 и ММР-9, на 12-й день беременности подтверждает их очевидную роль в этом процессе.

II триместр. Имеющиеся данные противоречивы. Некоторые авторы утверждают, что на парафиновых срезах наблюдается экспрессия ММР-9 в инвазивных трофобластных клетках (на криостатных срезах она отсутствовала) [9]. Более распространено мнение, что в процессе нормальной гестации в амниотической жидкости и плодных оболочках обнаруживается ММР-2, и она экспрессируется постоянно, а ММР-9 выявляется чаще перед родами [20].

III триместр. Металлопротеиназа типа 9 в доношенном сроке у человека обнаружена в амниальных клетках и слое цитотрофобласта плодных оболочек, париетальных децидуальных клетках и синцитиотрофобласте ворсин [21]. На криостатных срезах все вневорсинчатые трофобластные клетки, включающиеся в инвазивный фенотип, показывают сильное интра- и экстрацеллюлярное окрашивание [9]. ММР-2 при доношенной беременности и непосредственно перед родами локализована в клетках амниона, трофобласте хориальной оболочки, париетальных децидуальных клетках и сосудистой стенке маточно-плацентарных артерий. В синцитиотрофобласте отмечено лишь слабое окрашивание [20].

Коллаген I типа – важнейший компонент мезенхимальной части в плодных оболочках и стромальных тканях плацентарных ворсин, коллаген IV типа локализован преимущественно в базальных мембранах. В деградации коллагена IV типа участвуют и ММР-2, и ММР-9, а на коллаген I типа действует только ММР-2. Эта характеристика может объяснить то, что ММР-2 представлена преимущественно в стромальной ткани и ее клетках, в то время как ММР-9 больше связана с эпителиальной тканью [20]. ММР-9 более активна на границе материн-

ской и плодной части по сравнению с чисто плодной или материнской частями, подтверждая важность MMP-9 для отделения тканей плаценты во время родов [7].

Влияние естественного родового акта на экспрессию MMPs

В родах MMP-9 – главный представитель MMPs, ответственный за желатинолитическую активность оболочек [19]. При доношенной беременности по сравнению с более ранними сроками MMP-9 значительно повышена в плодных оболочках. Доношенные ворсины плаценты также имеют более высокий уровень MMP-9, чем при недоношенном сроке. Между уровнями MMP-2 в доношенном и недоношенном сроке были найдены незначительные различия [21]. Очень важно, прошла ли плацента через роды. В этой ситуации ткани имеют более высокий уровень MMP-9, чем плацента при доношенном сроке, но не прошедшая через роды, например при родоразрешении путем кесарева сечения [20]. Отметим, что эта особенность характерна для любого срока: даже при преждевременных родах уровень MMP-9 выше в самопроизвольно рожденных плацентах по сравнению с теми, которые прошли через кесарево сечение [18]. По-видимому, эту часть MMP 9 продуцирует синцитиотрофобласт ворсин, как демонстрируют иммуногистохимические исследования [20]. Это подтверждает тот факт, что при срочных родах имеет место разрыв оболочек, сопровождающийся или реализующийся подъемом продукции MMP-9. Подъем MMP-9 может упрощать отделение плаценты от материнских тканей в родах. MMP-2 также обнаруживается в экстрактах плацентарной ткани. Между недоношенным и доношенным сроком и в плодных оболочках его уровень не меняется [21]. Регуляция за счет гормонов и цитокинов (TNF- α и IL-1) может иметь место в процессе родов и быть триггером для подъема уровня MMP-9 в плодных оболочках и плаценте. Это является результатом их повышенной экспрессии в клетках основных типов трофобласта под воздействием гормонов и цитокинов, таких как TNF- α и IL-1.[21]

Преэклампсия и невынашивание беременности

Инвазия цитотрофобласта, сочетающаяся с деградацией экстрацеллюлярного матрикса, – неотъемлемая часть нормальной беременности, в то время как слабая цитотрофобластическая миграция в спиральные артерии играет существенную роль в развитии преэклампсии [20]. При данной патологии инвазия вневорсинчатого трофобласта нарушена, так же как гестационная перестройка спиральных артерий и артериол. В них сохраняются узкий просвет и неизменные мышечно-эластические элементы в стенке, что снижает объем маточно-плацентарного кровотока [11]. Полученные недавно данные о нарушении экспрессии при преэклампсии VEGF и VEGFR позволяют предположить, что система VEGF важна в регуляции инвазии трофо-

бласта в течение нормального и патологического развития плаценты [3]. Экспрессия MMP-9 в децидуальной оболочке, вызванная связанным с преэклампсией интерлейкином 1 в (IL-1 в) и фактором некроза опухоли (TNF- α), также может тормозить инвазию вневорсинчатого трофобласта. На иммуногистохимическом уровне показано, что в децидуальных клетках и соседних с ними клетках интерстициального трофобласта в срезах маточно-плацентарной области при преэклампсии, по сравнению с соответствующими по сроку контрольными плацентами, имеет место более высокий уровень экспрессии MMP-9 [11]. По некоторым данным, при преэклампсии уровень MMP-2 также повышен [12]. В децидуальных клетках при преэклампсии по сравнению с нормальными было зафиксировано статистически значимое увеличение интенсивности окрашивания MMP-9. Вместе с тем существенные различия в экспрессии интерстициальными цитотрофобластными клетками в обеих группах не отмечены, и иммуноокрашивание протеаз не различалось в контрольной и преэкламптической группах. При нарушении процессов, происходящих в децидуальном экстрацеллюлярном матриксе, изменение экспрессии MMP-9 создает условия для развития преэклампсии с нарушением адгезии на различных молекулоспецифичных этапах инвазии вневорсинчатого трофобласта. Провоспалительные цитокины IL-1в и (TNF- α) связаны с разными аспектами преэклампсии [11]. Результаты подтверждают, что подавление децидуальных клеток, экспрессирующих MMP-9, с помощью интерлейкина-1в и фактора некроза опухоли может вызвать изменение нормального хода интегрин-опосредованной инвазии вневорсинчатого трофобласта в децидуальную ткань и послужить причиной плацентарной недостаточности, которая имеет место при преэклампсии [11]. Повышенная экспрессия MMP-9 децидуальными клетками возникает при недостаточной инвазии, компенсируя нормальный ход инвазии вневорсинчатого трофобласта в децидуальную оболочку. Такая дисрегуляция стимулирует продукцию стромелизина-1 (MMP-3) децидуальными клетками. Показано, что это активатор про-MMP-9 [11]. Существуют разные оценки интенсивности окрашивания MMP-2 и MMP-9 в преэкламптической плаценте. По некоторым данным, для доношенной плаценты MMP-2 существенно выше по сравнению с нормой. Экспрессия MMP-9 также существенно выше, чем в норме [13]. В других работах показано, что металлопротеиназа-9 хорошо экспрессируется в большинстве плацент при неосложненной беременности (контрольная группа). Экспрессии MMP-9 при преэклампсии может вообще не быть. В некоторых случаях она слабая [17].

У пациенток со спонтанными абортми и угрозой абортов, а также разрывами плодных оболочек активные формы MMP-2 в амниотической жидкости были существенно снижены по сравнению с нормальными родами в доношенном сроке [21]. Доказано, что при преждевременном разрыве плодных оболочек жен-

шины имеют значительно более высокую активность MMP-9 и концентрацию его в амниотической жидкости [21], однако измеренные с помощью ELISA изменения в сыворотке крови, связанные с синдромом невынашивания и рождением раньше 37 недель гестации, показали, что на содержание MMP-9 в крови этот синдром не влияет [4].

Таким образом, семейство металлопротеиназ – неотъемлемый участник всего процесса репродукции человека: от ранних стадий беременности до ее завершения. В схематичном виде активность MMP-2 и MMP-9 представлена на рисунке. На 6–7-й день после оплодотворения MMP-2 и MMP-9 лизируют маточный эпителий и его базальный слой, состоящий из коллагена IV типа. Этот первый этап контролируют цитокины IL-6 и TGF- β , выделяемые стромальными клетками окружающего эндометрия. В течение I триместра металлопротеиназы, продуцируемые инвазивным цитотрофобластом, разрушают эластические и мышечные компоненты стенок спиральных артерий и превращают их в маточно-плацентарные артерии с открытыми в межворсинчатое пространство устьями, то есть реализуют первую волну цитотрофобластической инвазии.

Во II триместре MMP-2 и MMP-9 участвуют в гестационной перестройке более крупных радиальных артерий матки. Перед родами резко повышается продукция MMP-2 в плодных оболочках с их разрывом и завершением родового акта. Дискоординация по типу гипер- или гипofункции MMP-2 и MMP-9 часто приводит к невынашиванию беременности или является важным звеном патогенеза преэклампсии. Безусловно, новые знания о регуляции металлопротеиназного каскада приблизят нас к расшифровке патогенеза многих тяжелых акушерских осложнений.

Литература

1. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину / М.А. Пальцев. М.: Медицина, 2004. 465 с.
2. Цыганов С.Е. Роль матриксных металлопротеиназ при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы / С.Е. Цыганов и др. // Архив патологии. 2012. № 1. С. 16.
3. Anteby E.Y. Vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor and fibroblast growth factor-4 and -10 stimulate trophoblast plasminogen activator system and metalloproteinase-9 / Anteby E.Y. et al. // Mol Hum Reprod. 2004; Apr, 10(4), 229–35.
4. Anumba D.O. Circulating levels of matrix proteases and their inhibitors in pregnant women with and without a history of recurrent pregnancy loss / D.O. Anumba et al. // Reprod Biol Endocrinol. 2010; Jun, 16(8), 62.
5. Bauer S. Tumor necrosis factor- α inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures / S. Bauer // J Clin Endocrinol Metab. 2004; Feb, 89(2), 812–22.
6. Bellon G. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis / G. Bellon, L. Martiny, A. Robinet // Crit Rev Oncol Hematol. 2004; Mar, 49(3), 203–20.

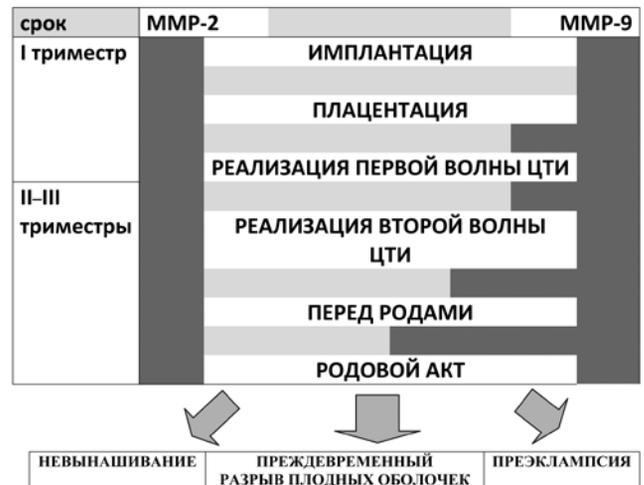


Схема металлопротеиназного каскада на разных этапах физиологической беременности и при ее патологии.

ЦТИ – цитотрофобластическая инвазия

7. Demir-Weusten A.Y. Matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human term placenta. / A.Y. Demir-Weusten et al. // Acta Histochem. 2007; 109(5), 403–12.
8. Dimo B. Comparative study of the immunohistochemical expression of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 between clearly invasive carcinomas and “in situ” trophoblast invasion / B. Dimo et al. // Med Oncol. 2012; 29(3), 2270–5.
9. Huppertz B. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta / B. Huppertz et al. // Cell Tissue Res. 1998; Jan, 291(1), 133–48.
10. Husslein H. Expression, regulation and functional characterization of matrix metalloproteinase-3 of human trophoblast / H. Husslein et al. // Placenta. 2009; Mar, 30(3), 284–91.
11. Lockwood C.J. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidua cells / C.J. Lockwood // Biol Reprod. 2008; Jun, 78(6), 1064–72.
12. Lavee M. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in midtrimester amniotic fluid prior to the development of preeclampsia / M. Lavee et al. // Reprod Biol Endocrinol. 2009; Aug, 23(7), 85.
13. Li J.K. Differences between the expression of matrix metalloproteinase-2, 9 in preeclampsia and normal placental tissues / J.K. Li et al. // Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2007; Feb, 42(2), 73–5.
14. Maymon E. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes / E. Maymon et al. // Am J Obstet Gynecol. 2000; Oct, 183(4), 914–20.
15. Qiu Q. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways / Q. Qiu et al. // Reproduction. 2004; Sep, 128(3), 355–63.
16. Seval Y. Distribution patterns of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy / Y. Seval et al. // Acta Histochem. 2004; 106(5), 353–62.

17. Shokrv M. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human trophoblasts of normal and preeclamptic placentas: preliminary findings / M. Shokrv et al. // *Exp Mol Pathol.* 2009; Dec;87(3),219–25.
18. Sundrani D.P. Matrix metalloproteinase-1 and -9 in human placenta during spontaneous vaginal delivery and caesarean sectioning in preterm pregnancy / D.P. Sundrani et al. // *PLoS One.* 2012; 7(1),1–6.
19. Wang J.P. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (*Macaca mulatto*) during early pregnancy / J.P. Wang et al. // *Biol Reprod.* 2001; Jul,65(1), 31–40.
20. Weiss A. The matrix metalloproteinases (MMPS) in the decidua and fetal membranes / A. Weiss, S. Goldman, E. Shalev // *Front Biosci.* 2007; Jan 1(12),649–59.
21. Xu P. Expression of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor / P. Xu, N. Alfaidy, J.R. Challts // *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; Mar,87(3),1353–61.

THE ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASE -2 AND -9 IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL PREGNANCY

A.P. Milovanov, I.M. Rasstrigina, T.V. Fokina

We reviewed certain data regarding activities of the MMP family members in different stages of physiological and pathological pregnancy. MMP-2 and -9 are involved on the lysis of basal epithelium and its basal layer during implantation. Metalloproteinase cascade produced by invasive cytotrophoblast cells promotes gestational transformation of spiral and further radial arteries into uteroplacental arteries opened into developing intervillous space. MMP-9 secretion is activated in fetal membranes before labor, which contributes to their timely rupture and completion of delivery. MMP-2 and -9 hyperfunction or hypofunction leads to miscarriage or can be an important part of the pathogenesis of preeclampsia.

Key words: matrix metalloproteinases, implantation, cytotrophoblast invasion, delivery, preeclampsia

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

Фокина Татьяна Васильевна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник. лаборатории патологии женской репродуктивной системы НИИ морфологии человека РАМН.

Телефон: 8 (499) 129-2501.

Материал поступил в редакцию 23 августа 2012 года.

24-й ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС ПАТОЛОГОВ

8–12 сентября 2012 года в Праге состоялся 24-й Европейский конгресс патологов. В этом масштабном мероприятии приняли участие патологи из европейских стран, а также специалисты с других континентов. Отрадно, что делегация патологоанатомов из России была представительной и насчитывала более 30 человек. В их числе были Г.А. Франк, И.А. Казанцева, А.М. Ковригина, А.Г. Талалаев, О.Д. Мишнев, Е.А. Коган, Е.Л. Туманова, В.П. Туманов, А.И. Щеголев, Ф.Г. Забозлаев, Л.В. Кактурский, Ю.Ю. Андреева, О.В. Паклина (Москва), В.А. Цинзерлинг (Санкт-Петербург), А.Э. Мационис, Г.Л. Резникова (Ростов-на-Дону), С.В. Петров (Казань), Т.В. Павлова (Белгород), А.Е. Доросевич (Смоленск), С.В. Сазонов (Екатеринбург), М.З. Горелик (Владивосток) и другие.

Программа конгресса была очень насыщенной и включала в себя доклады по 19 направлениям: патология молочной железы, цитопатология, дерматопатология, патология пищеварительного тракта, электронная микроскопия, эндокринная патология, патология головы и шеи, история патологии, патологическая анатомия инфекционных заболеваний, молекулярная патология, нефропатология, педиатрическая и перинатальная патология, патология легких, патология мягких тканей костей, патология тимуса и средостения, уропатология, применение высоких технологий в патологии, состояние патологической анатомии, цитологии и новых технологий в развивающихся странах. Каждый участник конгресса имел возможность выбрать и получить необходимую информацию по своим профес-



сиональным интересам. Конечно, охватить весь спектр научных выступлений не представлялось возможным. Работа конгресса протекала в разных формах: доклады на пленарных заседаниях, выступления на секциях, стендовые доклады, слайд-семинары, мастер-классы.

Привлекли к себе внимание стенды ряда фирм, обслуживающих нужды патологической анатомии, а также книжные выставки-продажи. Среди известных фирм были, в частности, представлены Ventana, Leica, Roche, Daco, Carl Zeiss, 3D Histech. Большой интерес участников конгресса вызвали экспонируемые фирмами новые цифровые технологические разработки,

касающиеся, в частности, новых практических возможностей полного сканирования микроскопических препаратов и передачи цифровой информации через интернет. Это чрезвычайно важно для развития диагностической телепатологии, особенно для такой огромной страны как Россия.

Материалы конгресса опубликованы в специальном приложении Вирховского архива (Virchows Archiv. 2012. Vol. 461. Suppl.1).

*Л.В. Кактурский,
член-корреспондент РАМН*



IV СЪЕЗД РОССИЙСКОГО ОБЩЕСТВА ПАТОЛОГОАНАТОМОВ

4–7 июня 2013 года в Белгороде на базе Национального исследовательского университета «Белгородский государственный университет» состоится IV съезд Российского общества патологоанатомов.

Оргкомитет съезда

Сопредседатели:

- профессор О.Н. Полухин – исполняющий обязанности ректора НИУ «БелГУ»
- кандидат медицинских наук Н.И. Белоусов – начальник Департамента здравоохранения и социальной защиты населения Белгородской области
- член-корреспондент РАМН Л.В. Кактурский – президент РОП
- академик РАМН Г.А. Франк – главный патологоанатом Минздрава России

Заместители председателя:

- доцент Т.В. Балабанова – исполняющая обязанности первого проректора НИУ «БелГУ»
- профессор Т.В. Павлова – заведующая кафедрой патологии НИУ «БелГУ»

Члены оргкомитета:

- доктор медицинских наук Ю.Ю. Андреева (Москва)
- член-корреспондент РАМН Н.М. Аничков (Санкт-Петербург)
- профессор Л.М. Гринберг (Екатеринбург)
- профессор И.С. Дерижанова (Ростов-на-Дону)
- профессор А.Е. Доросевич (Смоленск)
- профессор О.В. Зайратьянц (Москва)
- профессор И.А. Казанцева (Москва)
- кандидат медицинских наук Е.И. Келли (Москва)
- член-корреспондент РАМН В.Л. Коваленко (Челябинск)
- профессор Г.Б. Ковальский (Санкт-Петербург)
- профессор А.В. Кононов (Омск)
- профессор О.В. Макарова (Москва)
- доктор медицинских наук П.Г. Мальков (Москва)
- академик РАЕН А.Э. Мационис (Ростов-на-Дону)
- профессор Л.М. Михалева (Москва)
- профессор О.Д. Мишнев (Москва)
- кандидат медицинских наук В.А. Нагорный (Белгород)
- доктор медицинских наук О.В. Паклина (Москва)
- профессор Ю.Г. Пархоменко (Москва)
- профессор В.С. Пауков (Москва)
- профессор С.В. Петров (Казань)
- профессор К.М. Пожариский (Санкт-Петербург)
- профессор М.Г. Рыбакова (Санкт-Петербург)
- профессор А.Г. Талалаев (Москва)
- профессор Т.А. Федорина (Самара)
- профессор Н.М. Хмельницкая (Санкт-Петербург)
- профессор А.Л. Черняев (Москва)

- профессор А.И. Щеголев (Москва)
- академик РАМН В.А. Шкурупий (Новосибирск)

Ответственный секретарь:

- кандидат биологических наук В.А. Марковская (Белгород)

Программа съезда

- I. Проблемы воспаления, иммунопатологии, инфекций
- II. Инновационные технологии в морфологической диагностике заболеваний
- III. Актуальные вопросы преподавания патологической анатомии в высшей школе
- IV. Актуальные вопросы организации патологоанатомической службы
- V. Заседание Российского отделения Международной академии патологии
- VI. Отчет редколлегии журнала «Архив патологии»
- VII. Организационные вопросы
 - Отчет о работе президиума РОП
 - Отчет ревизионной комиссии
 - Выборы руководящих органов РОП

Материалы докладов объемом до 3 страниц с регистрационной формой следует выслать до **28 февраля 2013 года** по электронной почте: 4.congress.materials@gmail.com с указанием номера раздела программы съезда.

Формат бумаги А4 (29,7 × 21 см), 1,5 интервала, шрифт Times New Roman, размер 12 пунктов, поля со всех сторон по 2,5 см, выравнивание текста по левому и правому краю.

Образец оформления:

Иванов А.П., Петров Н.В.
ЭКСПРЕССИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ
В ЭПИТЕЛИИ БРОНХОВ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ БРОНХИТЕ
НИИ морфологии человека РАМН, Москва

Текст доклада

.....

Литература

1. Liu G., Wang Q., Liu N. et al. Infectious bronchitis virus nucleoprotein specific CTL response is generated prior to serum IgG // Vet. Immunol. Immunopathol. 2012. Vol.148. N 3–4. P. 353–358.

Ссылки в тексте на номера литературных источников даются в квадратных скобках (в порядке цитирования). Число источников минимальное (не более 5). Статьи цитируются с полным названием. Допускаются

таблицы и штриховые черно-белые рисунки в пределах указанного объема страниц. Полутоновые рисунки не принимаются.

Тематика докладов должна соответствовать программным вопросам съезда.

К тексту докладов на отдельном листе прилагается регистрационная форма (отдельная для каждого (со) автора, участника съезда).

Оргкомитет оставляет за собой право отклонения докладов, их сокращения и редактирования.

Регистрация

Регистрация участников съезда осуществляется через интернет в режиме online на сайте <http://www.4-cong-patholog.ru/registraciya>.

Организационный взнос

Организационный взнос участника съезда, внесенный до 28 февраля 2013 года, составляет 3000 рублей, внесенный после 28 февраля – 5000 рублей. Для аспирантов и ординаторов оргвзнос составляет 1000 рублей. При публикации материалов без участия в работе съезда оргвзнос составляет 1500 рублей.

Организационный взнос высылается через Сбербанк на банковскую карту Сбербанка РФ № 4276 8070 1104 4507. Отсканированная квитанция об оплате оргвзноса высылается электронным письмом по адресу

4.congress.payment@gmail.com или факсом 8 4722 30 14 12.

При отсутствии оплаченного оргвзноса доклады исключаются из программы съезда и не публикуются.

Оргвзнос дает следующие права:

1. Публикация материалов в трудах съезда.
2. Включение доклада в программу съезда.
3. Участие в заседаниях и выставках.
4. Получение папки участника с материалами съезда.
5. Трансфер по прибытии и отъезде.
6. Кофе-брейки, обеды, фуршет.

Дополнительная культурная программа оплачивается отдельно.

Спонсорская помощь

С предложениями спонсорской помощи обращаться к профессору Павловой Татьяне Васильевне по телефону 8 4722 30 14 12 или по электронному адресу pavlova@bsu.edu.ru.

Контактные телефоны и электронный адрес оргкомитета: 8 4722 30 13 29
belgorod.bsu@yandex.ru.

Информация о съезде размещена на сайте www.patolog.ru.

К СВЕДЕНИЮ АВТОРОВ

Журнал издается Научно-исследовательским институтом морфологии человека РАНН.

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 пристатейным 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. 560 с.

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)