

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ  
При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 8 | № 4 | 2019

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

**«Клиническая  
и экспериментальная  
морфология»**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ  
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Периодичность 4 раза в год

Основан в 2011 году

Включен в перечень ВАК

Журнал представлен  
в информационной базе  
данных РИНЦ  
(Российский индекс  
научного цитирования)

## Учредитель

ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт  
морфологии человека»

117418, Москва,  
ул. Цюрупы, д. 3

## Адрес редакции

117418, Москва, ул. Цюрупы,  
д. 3

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

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

www.morfolhum.ru

Тираж 500 экземпляров

Издательство  
«Группа МДВ»  
www.mdv-group.ru

## Подписные индексы:

**70045** по каталогу агентства  
«Роспечать»

**70045** по каталогу «Урал-Пресс»

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

© ФГБНУ «Научно-  
исследовательский институт  
морфологии человека»

## Главный редактор

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

## Заместители главного редактора

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

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

## Ответственный секретарь

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

## Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Кушлинский Н.Е., академик РАН, доктор  
мед. наук, профессор, Москва, Россия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции.  
Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

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

# CLINICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

With the support of the Russian Society of Pathology

Volume 8 | № 4 | 2019

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

## «Clinical and Experimental Morphology»

SCIENTIFIC AND PRACTICAL  
PEER-REVIEWED JOURNAL

Frequency: 4 issues per year

Founded in 2011

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

### Journal founder

FSBSI «Research Institute  
of Human Morphology»

117418, Tsyurupy st., 3,  
Moscow, Russia

### Editorial office address

117418, Tsyurupy st., 3,  
Moscow, Russia

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

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

www.morfolhum.ru

Edition of 500 copies

### Publisher

«Gruppa MDV»

www.mdv-group.ru

### Subscription index:

**70045** according to the  
«Rospechat» Agency catalog

**70045** according to the  
«Ural-Press» catalog

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

### Editor-in-chief

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

### Deputies editor-in-chief

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

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

### Executive secretary

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

### Editorial board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Editorial Review Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

*В.С. Пауков, Ю.А. Кириллов,  
И.А. Чернов, Е.В. Штемплевская*  
Современный взгляд на тельца Мэллори

**5** *V.S. Paukov, Yu.A. Kirillov,  
I.A. Chernov, E.V. Shtemplevskaya*  
A modern view on Mallory bodies

*А.А. Тимакова, Б.Б. Салтыков*  
Латентный аутоиммунный сахарный диабет  
взрослых

**13** *A.A. Timakova, B.B. Saltykov*  
Latent autoimmune diabetes in adults

*Т.Н. Чекишева*  
Наноматериалы и их роль в регенерации  
костной ткани

**19** *T.N. Chekisheva*  
Nanomaterials and their role in bone tissue  
regeneration

*А.М. Маркин, Ю.В. Маркина, В.Н. Сухоруков,  
А.М. Хайлов, А.Н. Орехов*  
Роль физических нагрузок в развитии  
атеросклеротических поражений сосудистой  
стенки

**25** *A.M. Markin, Yu.V. Markina, V.N. Sukhorukov,  
A.M. Khaylov, A.N. Orekhov*  
The role of physical activity in the development  
of atherosclerotic lesions of the vascular wall

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCHES

*Д.Н. Воронков, А.А. Лыжин, М.Р. Капкаева,  
Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспекоев*  
Выявление альфа-синуклеина в обонятельных  
луковицах мыши в онтогенезе *in vivo*  
и в органотипической культуре

**32** *D.N. Voronkov, A.A. Lyzhin, M.R. Kapkaeva,  
R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov*  
Alpha-synuclein detection in olfactory mouse bulbs  
in ontogenesis *in vivo* and in the organotypic culture

*К.Д. Топчу, Е.М. Пономарчук, А.В. Кунтурова,  
П.Б. Росницкий, Т.Д. Хохлова, Я.Н. Ванг,  
В.А. Хохлова, С.В. Буравков*  
Изменение морфологических характеристик  
клеток цельной человеческой крови и сгустков  
свиной крови при различных способах  
ее хранения

**42** *K.D. Topchu, E.M. Ponomarchuk, A.V. Kunturova,  
P.B. Rosnitsky, T.D. Khokhlova, Y.-N. Wang,  
V.A. Khokhlova, S.V. Buravkov*  
Changes of morphological characteristics of whole  
human blood and porcine coagulated blood cells  
depending on a storage method

О.М. Арлашкина, Г.Ю. Стручко,  
Л.М. Меркулова, М.Н. Михайлова  
Изменения белой пульпы селезенки  
у потомства спленэктомированных крыс  
различных возрастных периодов  
после введения 1,2-диметилгидразина

**49** O.M. Arlashkina, G.Yu. Struchko,  
L.M. Merkulova, M.N. Mikhailova  
Changes in the spleen white pulp in the offspring  
of splenectomized rats of various ages exposed  
to 1,2-dimethylhydrazine

## КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

А.Л. Черняев, К.А. Куликов, П.В. Хроленко,  
О.А. Васюкова, М.В. Самсонова  
Гетеротопия легкого в брюшную полость  
у новорожденной девочки

**59** A.L. Cherniaev, K.A. Kulikov, P.V. Khrolenko,  
O.A. Vasyukova, M.V. Samsonova  
Intra-abdominal heterotopic lung tissue in the  
newborn girl

## МЕТОДЫ TECHNICAL NOTES

З.В. Гюева, К. Рёкен  
Получение поликлональных антител  
к AL-каппа легкой цепи амилоидного белка

**63** Z.V. Gioeva, C. Röcken  
Generation of polyclonal antibodies directed against  
AL-kappa light chain amyloid protein

## РЕЦЕНЗИИ BOOK REVIEWS

Рецензия на книгу «Морфологическая диагностика  
заболеваний щитовидной железы: цветной атлас» /  
Абросимов А.Ю., Казанцева И.А., Лушников Е.Ф.  
(Москва: ООО «МК», 2019. – 240 с., ил.)

**69**

## ЮБИЛЕИ ANNIVERSARIES

Любовь Федоровна Курило  
(к 80-летию со дня рождения)

**70**

## ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ HISTORY MATTERS

Алексей Александрович Жаворонков  
(1929–1998)  
К 90-летию со дня рождения

**72**

Ювеналий Васильевич Постнов  
(1929–2010)  
К 90-летию со дня рождения

**74**

## Современный взгляд на тельца Мэллори

**В.С. Пауков<sup>1</sup>, Ю.А. Кириллов<sup>2</sup>, И.А. Чернов<sup>3</sup>, Е.В. Штемплевская<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, Тюмень, Россия

Обзор литературы посвящен химическому составу, структуре, функции и значению в патологии телец Мэллори. Рассматриваются механизмы образования и разновидности гиалина в тельцах Мэллори, а также методики его выявления.

Тельца Мэллори (алкогольный гиалин) относят к одному из морфологических маркеров злоупотребления этанолом. Тем не менее они выявляются и при некоторых других заболеваниях. Образования, похожие на тельца Мэллори, получены в ряде экспериментов. Детальные исследования телец Мэллори показывают, что гиалин в них при разных заболеваниях и при различных воздействиях имеет неодинаковую структуру. В работе рассматриваются химический состав телец Мэллори, механизмы образования и разновидности гиалина в них, а также методики его выявления при определенных болезнях и в экспериментальных моделях.

Вместе с тем до настоящего времени нет единого взгляда на значение алкогольного гиалина в патологии и морфогенезе алкогольной болезни и других заболеваний. В обзоре литературы раскрывается понятие алкогольной болезни, имеющей стадийное течение, показаны особенности алкогольного гиалина, появляющегося в печени в стадиях пьянства и алкоголизма. Из анализа данных литературы следует, что алкогольный гиалин является аутоантигеном. В связи с этим авторы предполагают, что в ответ на его появление в органах, прежде всего в печени, развивается аутоиммунная воспалительная реакция, не поддающаяся излечению, что является одной из причин неэффективности терапии болезней, при которых наблюдаются тельца Мэллори. С этих позиций рассматривается значение телец Мэллори в патогенезе алкогольной болезни и объясняется бесперспективность лечения алкоголизма, для которого характерно наличие алкогольного гиалина.

**Ключевые слова:** тельца Мэллори, алкогольный гиалин, морфология, алкогольная болезнь.

**Для корреспонденции:** Юрий Александрович Кириллов. E-mail: youri\_kirillov@mail.ru

**Для цитирования:** Пауков В.С., Кириллов Ю.А., Чернов И.А., Штемплевская Е.В. Современный взгляд на тельца Мэллори. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):5–12. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.5-12

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 09.09.2019. Получена после рецензирования 17.10.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## A modern view on Mallory bodies

**V.S. Paukov<sup>1</sup>, Yu.A. Kirillov<sup>2</sup>, I.A. Chernov<sup>3</sup>, E.V. Shtemplevskaya<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Tyumen State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tyumen, Russia

The paper reviews chemical composition, structure, function and importance of Mallory bodies in pathology. The mechanisms of formation and variations in hyaline of Mallory bodies, as well as the methods of its detection in certain diseases and in experimental models are considered.

Mallory bodies (alcoholic hyaline) are among the morphological markers of ethanol abuse. Nevertheless, they are detected in some other diseases. Formations similar to Mallory bodies were obtained in a number of experiments. Detailed studies of Mallory bodies show that the structure of hyaline varies in different diseases and different impacts. However, there is no single point of view now on the value of alcoholic hyaline in the pathogenesis and morphogenesis of alcohol disease and other disorders. The literature review defines the alcoholic disease with a stage course and shows the features of alcoholic hyaline that appear in the liver tissue at the stages of hard drinking and alcoholism. Analysis of literature data reveals its autoantigenic nature. In this regard, the authors



suggest that an incurable autoimmune inflammatory reaction develops in response to the appearance of alcohol hyaline in organs, especially in the liver, which is one of the reasons for the ineffectiveness of the treatment of diseases with the Mallory body formation. The importance of Mallory bodies in the pathogenesis of alcoholic disease is considered from this point of view. The futility of treatment for alcoholism featured by the presence of alcoholic hyaline is thus explained.

**Keywords:** Mallory bodies, alcoholic hyaline, morphology, alcoholic disease.

**Corresponding author:** Yuri A. Kirillov, E-mail: youri\_kirillov@mail.ru

**For citation:** Paukov T.S., Kirillov Yu.A., Chernov I.A., Shtemplevskaya E.V. A modern view of Mallory bodies. Clin. exp. morphology. 2019; 8(4):5–12. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.5-12

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

**Received** 09.09.2019. **Received in the revised form** 17.10.2019. **Accepted** 19.11.2019.

Образование телец Мэллори в печени связывают с хронической алкогольной интоксикацией, которая остается одной из актуальных медицинских и социальных проблем современного общества [1]. Злоупотребление алкоголем в России также весьма значительно и официально достигает 14,5 литра крепких напитков в год на душу населения [2]. По данным А.В. Немцова, в стране зарегистрировано более 2 млн человек, страдающих алкоголизмом, но реальное их число не менее около 7,5 млн человек, то есть 5% населения. Потери от алкоголизма составляют 426 тыс. человек в год. Причем эта смертность в значительной степени определяется гибелью людей в результате травм и несчастных случаев в состоянии алкогольного опьянения (более 22,1 человека на 100 000 населения), а также от заболеваний, связанных с хронической алкогольной интоксикацией (ХАИ), в первую очередь поражения сердечно-сосудистой системы и печени (более 13,7 человека на 100 000 населения) [3, 4].

В качестве одного из морфологических маркеров злоупотребления этанолом принято рассматривать образование алкогольного гиалина. Приоритетной в этом отношении является работа F. Mallory, который в 1911 году описал эозинофильные включения в гепатоцитах, впоследствии получившие название телец Мэллори, при алкоголизме [5].

При светооптическом исследовании тельца Мэллори имеют вид гомогенных масс разной формы, которые определяются в цитоплазме гепатоцитов, обычно вблизи ядра. В динамике образования алкогольного гиалина проходит несколько «стадий зрелости» [6]. После гибели гепатоцита он может выявляться внеклеточно. При окраске основным фуксином алкогольный гиалин приобретает коричневый цвет. При окраске анилиновым синим по Мэллори его цвет изменяется в зависимости от «стадий зрелости» от розово-красного до фиолетового. При электронномикроскопическом исследовании тельца Мэллори выявляются в виде фибриллярного или гранулярного материала без ограничивающей мембраны [7, 8]. Фибриллы имеют диаметр от 10 до 20 нм и среднюю толщину 14 нм, что соответствует так называемым промежуточным филаментам гепатоцитов.

Yokoo H. et al. описали несколько типов алкогольного гиалина [8]. Фибриллы гиалина I типа имеют парал-

лельную ориентацию, обладают невысокой электронной плотностью, их причудливые изгибы напоминают отпечатки пальцев. На поперечных срезах параллельные фибриллы имеют вид темных точек. Гиалин II типа характеризуется беспорядочной ориентацией фибрилл, которые обладают равномерной электронной плотностью и имеют трубчатый вид. Скопления гиалина III типа выглядят как мелкие (мелкогранулярный гиалин) либо крупные (крупногранулярный или кляксоподобный гиалин) зерна. Установлено, что в начальном периоде алкогольной интоксикации тельца Мэллори имеют фибриллярный вид, а при прогрессировании заболевания начинают приобретать гранулярное строение [6].

Следует отметить, что алкогольный гиалин выявляется не у всех больных, длительно злоупотреблявших алкоголем. Так, по данным анализа публикации в базе Medline [9], средняя частота выявления телец Мэллори при алкогольном гепатите составила 65%, при алкогольном циррозе печени 51%. Кроме того, установлено, что образование телец Мэллори возможно и при ряде заболеваний печени неалкогольной этиологии, например при индийском детском циррозе, болезни Вильсона–Коновалова, первичном билиарном циррозе, идиопатическом медном токсикозе и гепатоцеллюлярной карциноме. Частота выявления гиалина Мэллори при этих заболеваниях колеблется в пределах от 6% до 73% [9]. Аналогичные включения были выявлены в печени при сахарном диабете, почечно-клеточном раке, в пневмоцитах при асбестозе, после операций наложения кишечного анастомоза по поводу ожирения [10, 11]. К образованию телец Мэллори может приводить длительный прием лекарственных препаратов – амиодарона, глюкокортикоидов, диэтилстильбестрола, нифедипина, тамоксифена, 4-диэтиламиноэтоксигексестрола [7, 12].

Увеличение показателей заболеваний, при которых описано образование телец Мэллори, поставило перед исследователями вопрос об идентичности химического состава алкогольного гиалина и гиалина при других заболеваниях. Для ответа на него был разработан ряд экспериментальных моделей. Наибольшее распространение получили две из них. В 1975 году группе ученых, возглавляемых Н. Denk, удалось добиться формирования телец Мэллори у подопытных мышей

в течение 145–194 суток путем включения в диету животных 2,5% раствора гризеофульвина [13]. Это исследование показало, что алкогольный гиалин может образоваться независимо от употребления алкоголя. Н. Yokoo et al. (1982) для образования у мышей телец Мэллори применили диету, содержащую 2,5% раствор 3,5-дизтоксикарбонил-1,4-дигидроколлина (DDC). Формирование телец Мэллори происходило на 40-е сутки эксперимента [14].

Примечательно, что после прекращения введения гризеофульвина или DDC в течение 4 недель отмечалось почти полное исчезновение телец Мэллори. Повторное введение гризеофульвина или DDC вызывало их реиндукцию в течение 2–3 дней [15, 16]. Очевидно, образование гиалина в тельцах Мэллори в экспериментальных моделях связано с тем, что гризеофульвин и DDC так же, как и ряд других веществ, таких как этанол, желчные кислоты, галактозамин, колхицин, ингибитор протеасом PS-341, тиацетамид, обладают токсическим действием на гепатоциты, подавляют ферментативные системы печени и тем самым способствуют формированию внутриклеточных белковых агрегатов, сходных с тельцами Мэллори [13, 16]. Их реиндукция, по мнению K. Zatloukal et al., связана с развитием так называемой токсической памяти [11].

Следует заметить, что реиндукция телец Мэллори происходила только в гепатоцитах с сохранившимися промежуточными филаментами, что было выявлено гибридизацией *in situ* в сочетании с иммуногистохимическими исследованиями [17].

Тем не менее вопрос, является алкогольный гиалин лишь маркером ХАИ или играет какую-то роль в патогенезе алкогольной болезни, остается нерешенным, поэтому интерес исследователей к тельцам Мэллори не снижается. Детальные исследования алкогольного гиалина при разных заболеваниях, а также в экспериментах позволили изучить состав телец Мэллори и их свойства.

Установлено, что они состоят из нескольких классов белков (табл. 1).

Как следует из таблицы, обязательными компонентами алкогольного гиалина телец Мэллори являются кератины, убиквитин и протеин p62. Однако строго специфичны из них только кератины K8 и K18, в то время как убиквитин и p62 выявлены в составе белковых агрегатов при ряде других заболеваний. Исходя из этого, для иммуногистохимического выявления алкогольного гиалина обязательно определять кератины K8 и K18 в тельцах Мэллори [10]. Формирование алкогольного гиалина связано в первую очередь с деградацией

Таблица 1

Белковые компоненты телец Мэллори [11]

Класс протеинов	Наименования белков
Кератины	<b>K8, K18</b> ; K7, K19, K20; высокомолекулярные кератины; гиперфосфорилированные кератины; убиквитинированные кератины
Шапероны	Hsp70; Hsp90 семейство; Hsp25 семейство; $\alpha$ -B кристаллин
Фосфоэпитопы/киназы	MPM-2 Ab (перекрестно реагирующие с p62), SMI31 Ab (перекрестно реагирующие с p62), фосфотреонин, фосфо-p38 митогенактивированная протеинкиназа
Ферменты, вызывающие деградацию белков	<b>Убиквитин</b> , UBB (+1), <b>p62</b> (секвестосома 1), валосинсодержащий белок и NEDD8; протеасомные субъединицы $\beta$ 5, P25, Tbp7
Другие	Трансглютаминаза 2, тубулин

Жирным шрифтом выделены постоянные компоненты телец Мэллори.

Table 1

Mallory bodies protein components [11]

Class of proteins	Name of protein
Keratins	<b>K8, K18</b> ; K7, K19, K20; high molecular weight keratins; hyperphosphorylated keratins; ubiquitinated keratins
Chaperones	Hsp70; Hsp90 family; Hsp25 family; $\alpha$ -B crystallin
Phosphoepitopes/kinases	MPM-2 Ab (cross-reacts with p62), SMI31 Ab (cross-reacts with p62), phosphothreonine, phospho-p38 mitogen activated protein kinase
Protein degradation machinery	<b>Ubiquitin</b> , UBB (+1), <b>p62</b> (sequestosome 1), valosin-containing protein and NEDD8; proteasome subunit $\beta$ 5, P25, Tbp7
Others	Transglutaminase 2; tubulin

The permanent components of Mallory bodies are in bold italics.

протеинов гепатоцитов. В этом процессе решающее значение имеют кератины. В норме кератины K8 и K18 составляют основу промежуточных филаментов гепатоцитов и находятся в них в соотношении 1:1. В тельцах Мэллори кератины K8 преобладают над K18 [16, 18]. Факультативными компонентами алкогольного гиалина могут быть кератины K7, K19 и K20, которые в норме определяются в эпителии билиарного тракта [19]. Кератины в тельцах Мэллори подвергаются различным посттрансляционным модификациям. Так, кератины K8 и K18 являются гиперфосфорилированными и подвергаются убиквитинированию с образованием высокомолекулярных комплексов [20]. Наряду с кератинами в тельцах Мэллори были идентифицированы шапероны – белки теплового шока Hsp70, Hsp25 и Hsp90 [21, 22].

Из белков, определяющих деградацию протеинов, в образовании телец Мэллори участвуют убиквитин и p62 [11]. Убиквитин представляет собой белок с небольшой молекулярной массой (8,5 кДа), который связывается с боковыми аминогруппами белков-мишеней, в том числе кератинов, для их последующей протеолитической деградации [23]. Протеин p62 – цитоплазматический белок, который связывается с убиквитинированными кератинами при его активации в различных стрессовых ситуациях, в том числе, вероятно, и при алкогольном эксцессе [17]. Он связывает полиубиквитинированные белки через свой домен UBA (ассоциированный с убиквитином), превращает их в секвестомы, которые переносит для дальнейшего разрушения в протеасомы или в аутофагосомы [24, 25].

В составе телец Мэллори выявлены фосфоэпитопы и киназы. Одно из таких веществ представлено компонентом с высокой молекулярной массой, который распознается антителом M<sub>M</sub> 120-1. Этот компонент обнаруживается исключительно в тельцах Мэллори человека и подопытных животных и является их специфическим маркером [16]. Показано, что образование M<sub>M</sub> 120-1 может индуцироваться различными стрессовыми воздействиями [26]. Одним из свойств M<sub>M</sub> 120-1 является его способность перекрестно реагировать с p62 [17].

Благодаря использованию иммуногистохимических методов исследования появилась возможность дифференцировать «истинный» алкогольный гиалин Мэллори, содержащий K8, K18, убиквитин и p62, от гиалиноподобных веществ, похожих на алкогольный гиалин, но имеющих иной состав. В связи с этим в зарубежной литературе чаще стали использовать другие термины – «гиалин Мэллори», «тельца Мэллори–Денка» (Mallory–Denkbodies) [27, 28]. Вместе с тем следует заметить, что «истинные» тельца Мэллори, содержащие постоянные компоненты алкогольного гиалина, но в различных соотношениях, образуются и в патогенезе тех заболеваний, в которых так же, как и в патогенезе алкогольной болезни, значительную роль играет хроническая интоксикация, хотя и разной этиологии.

Экспериментальные модели позволили изучить пато- и морфогенез образования телец Мэллори. Было установлено, что под влиянием токсических факторов начинается избыточное накопление кератинов K8 и K18 в клетках печени [29]. Здесь они подвергаются посттрансляционной модификации путем ковалентного соединения с высокомолекулярным белком M<sub>M</sub> 120-1 [22, 30], гиперфосфорилирования [21], трансклутаминирования и образования альдегидных соединений [28, 30].

Другой механизм, способствующий формированию алкогольного гиалина, – образование альдегидных соединений, что приводит к конформационному переходу кератинов к β-структуре [28, 31]. Это отличает кератины телец Мэллори от кератинов промежуточных элементов, имеющих преимущественно α-спиральную структуру [31]. В результате посттрансляционных изменений кератинов в цитоплазме гепатоцитов образуется гиалин, имеющий фибриллярное строение, состоящий из кератинов K8 и K18 и белка M<sub>M</sub> 120-1.

При усилении агрегации белков в клетке важное значение приобретает функциональное состояние системы деградации протеинов. За растворение убиквитинированных и растворимых белков отвечает протеасомная система клетки, за деградацию более крупных структур, таких как белковые агрегаты или органеллы, – аутофагоцитоз [24, 25]. В последние годы выявлен и ряд других механизмов, ответственных за элиминацию структурно измененных белков [9]. В результате влияния токсических факторов ферментативные системы гепатоцитов, ответственные за деградацию белков, оказываются в угнетенном состоянии, вследствие чего образующиеся тельца Мэллори не подвергаются разрушению и происходит их дальнейшее накопление в клетках печени [27, 32]. Таким образом, формирование телец Мэллори происходит только в тех случаях, когда возможности протеасомной системы или других механизмов деградации белков оказываются исчерпанными либо испытывают чрезмерное напряжение вследствие накопления большого количества склонных к агрегации субстратов [11, 26].

Образовавшийся алкогольный гиалин по существу представляет собой новый белок, который закономерно вызывает соответствующую реакцию иммунной системы. В настоящее время получены доказательства антигенных свойств алкогольного гиалина. Его образование вызывает лейкотаксис полиморфноядерных лейкоцитов [33, 34], ослабляет пиноцитоз [35], повышает активность системы комплемента [36]. При алкогольном гепатите число телец Мэллори находится в положительной корреляционной связи с экспрессией компонентов инфламмасом (ASC, MAVS), усиливающих выработку каспаз, цитокинов IL-1β и IL-18 и инициирующих развитие воспалительной реакции [37].

В цитоплазме гепатоцитов, имеющих тельца Мэллори, и в самих тельцах Мэллори выявлена повышенная экспрессия IL-8, который стимулирует митогенактивируемую протеинкиназу и способствует развитию



воспалительной реакции [27, 32]. Указанные факты свидетельствуют о том, что тельца Мэллори являются аутоантигеном и их образование вызывает аутоиммунную воспалительную реакцию [7, 38]. Вместе с тем известно, что аутоиммунные реакции необратимы и их развитие способствует неуклонному прогрессированию поражения печени и других органов. В связи с этим встает вопрос о значении телец Мэллори в патологии. Являются ли они только маркерами тяжелых изменений в печени и, возможно, других органов или могут играть определенную роль в патогенезе тех заболеваний, при которых образуются?

Образование телец Мэллори при алкогольной болезни (АБ) имеет определенные закономерности. С точки зрения В.С. Паукова [39], АБ – это заболевание, при котором длительная повторяющаяся интоксикация этанолом приводит к возникновению морфологических изменений в органах и системах организма, начиная от минимальных поражений сосудов микроциркуляторного русла до полиорганной патологии, характерной для алкоголизма, с соответствующей клинической, в том числе психопатологической, симптоматикой.

Патогенез АБ складывается из трех стадий.

1-я стадия – стадия повторных острых алкогольных интоксикаций. Характеризуется эпизодическим употреблением спиртных напитков в относительно умеренных дозах, незначительно превышающих базальный метаболизм печени. Образование алкогольного гиалина не происходит.

2-я стадия алкогольной болезни – пьянство. Характеризуется ХАИ без появления зависимости от алкоголя. В этой стадии нарастают морфологические изменения во всех органах, особенно в печени, почках, сердце, головном в мозге [40]. При прекращении употребления алкоголя или употреблении его в пределах базального метаболизма печени изменения в органах и системах претерпевают обратное развитие или хорошо компенсируются. В этой стадии тельца Мэллори определяются лишь эпизодически и, очевидно, указывают на переход стадии пьянства в стадию алкоголизма [41]. Алкогольный гиалин вначале имеет фибриллярное, а в последующем гранулярное строение.

3-я стадия – стадия алкоголизма и его осложнений. Характеризуется формированием зависимости от алкоголя и осложнений алкоголизма, развитием необратимых морфологических изменений в органах и системах больных, истощением их компенсаторных возможностей. Важно заметить, что в этой стадии наряду с появлением в печени алкогольного гиалина структуры, очень похожие на тельца Мэллори, часто выявляются в легких (так называемые глобулы), головном мозге и миокарде («палочковидные структуры») [42]. Очевидно, именно в этой стадии проявляются аутоантигенные свойства телец Мэллори, что вызывает Т-клеточный иммунный ответ. При этом нарастает активность Т-супрессоров, увеличивается секреция В-клетками IgA, IgG и IgM, повышается продукция

провоспалительных цитокинов – TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  IL-8 [7, 27, 33, 43]. Прогрессируют алкогольный гепатит, алкогольная кардиомиопатия, алкогольная энцефалопатия, что утяжеляет течение алкогольной болезни. Возникновение хронической аутоиммунной воспалительной реакции в важнейших органах делает стадию алкоголизма необратимой.

Очевидно, что исследователи не связывают наличие или отсутствие алкогольного гиалина со стадией АБ и изучают лишь морфологию умерших от алкоголизма. Тем не менее известно, что алкогольный гепатит далеко не всегда возникает при злоупотреблении алкоголем, что порождает дискуссию о том, характерен ли вообще алкогольный гепатит для ХАИ, особенно учитывая тот факт, что этанол в норме метаболизируется в печени. Вместе с тем Ю.А. Ерохин, который исследовал 1118 трупов пациентов, страдавших при жизни алкогольной болезнью, выявил алкогольный гиалин у 0,8% умерших в стадии пьянства и у 10,4% в стадии алкоголизма [41]. Эти цифры помогают понять, почему у злоупотребляющих спиртными напитками в стадии пьянства редко развиваются гепатит и цирроз печени. У подавляющего большинства пациентов в этой стадии АБ еще нет алкогольного гиалина, нет аутоиммунной воспалительной реакции, поэтому нет гепатита, и именно поэтому стадия пьянства при определенных условиях излечима. Очевидно, 0,8% телец Мэллори, выявленных Ю.А. Ерохиным в стадии пьянства в печени, отражают переход данной стадии в стадию алкоголизма. Этот период, к сожалению, никто не изучал, и нет ни клинических, ни морфологических его критериев. В стадии алкоголизма содержание телец Мэллори в печени увеличивается почти в 10 раз, и также в несколько раз чаще у этих больных Ю.А. Ерохин выявлял гепатит и цирроз печени. Данные же базы Medline [9] отражают содержание телец Мэллори лишь при алкоголизме, когда алкогольный гепатит выявляется у подавляющего большинства страдающих ХАИ. При развивающемся вследствие этого циррозе печени, когда резко уменьшается ее функциональная ткань, телец Мэллори хотя и много, но становится несколько меньше, чем при алкогольном гепатите.

Указанные факты согласуются с клиническими данными, в соответствии с которыми при прекращении употребления алкоголя либо его приеме в пределах базального метаболизма в стадии пьянства при отсутствии телец Мэллори морфологические изменения в органах и тканях претерпевают обратное развитие [42]. Это еще раз подчеркивает, что пьянство является излечимой стадией алкогольной болезни и перенос усилий на лечение страдающих ею именно в эту стадию открывает широкие перспективы для борьбы с ХАИ.

## Заключение

Анализ литературы показал, что образование телец Мэллори характерно как для алкогольной болезни, так и для ряда заболеваний, не связанных с употреблени-

ем алкоголя, и что их формирования можно достичь в экспериментальных моделях. Они могут содержать алкогольный гиалин, возникающий при хронической алкогольной интоксикации и имеющий характерную структуру, а также похожий на алкогольный гиалин, но имеющий другой химический состав или другое строение. Вместе с тем все тельца Мэллори образуются, вероятно, в результате хронических токсических воздействий, однако при ряде заболеваний и в экспериментальных исследованиях при прекращении действия повреждающих факторов тельца Мэллори могут редуцироваться, чего не происходит при хронической алкогольной интоксикации.

В настоящее время хроническая алкогольная интоксикация трактуется в литературе как алкогольная болезнь, состоящая из трех стадий. В 1-й из них, стадии эпизодических алкогольных интоксикаций, тельца Мэллори не образуются, признаки гепатита отсутствуют; во 2-й – стадии пьянства – они появляются лишь иногда на этапе перехода пьянства в алкоголизм и сопровождаются признаками гепатита; в 3-й стадии – при алкоголизме – тельца Мэллори выявляются у большинства больных, и их наличие сочетается с выраженным гепатитом и циррозом печени.

Детальное исследование телец Мэллори при хронической алкогольной интоксикации и ряде болезней, имеющих в своем патогенезе аутоиммунный компонент, показало, что алкогольный гиалин является аутоантигеном. Он образуется, очевидно, тогда, когда при длительном токсическом воздействии снижается и извращается функция иммунной системы и в ответ на его появление развивается аутоиммунная воспалительная реакция. Она проявляется прежде всего в развитии хронического гепатита, трансформирующегося в цирроз печени. Возможно обнаружение признаков аутоиммунного воспаления и в других органах (легкие, миокард). Это объясняет неэффективность лечения алкоголизма.

Таким образом, «истинные» тельца Мэллори, содержащие алкогольный гиалин, не только представляют собой маркеры алкогольной болезни, но и, очевидно, играют решающую роль на определенном этапе ее патогенеза, являясь причиной включения в процесс аутоиммунных воспалительных реакций организма, которые не поддаются терапии, чем объясняется неэффективность лечения алкоголизма.

## Литература/References

1. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization, 2018. P. 38–48.
2. Немцов А.В., Терехин А.Т. Размеры и диагностический состав алкогольной смертности в России. Наркология. 2007;12:29–36. Nemtsov AV, Terekhin AT. Dimension and diagnostic structure of alcohol mortality in Russia. Narcology. 2007;12:29–36 (In Russ.).
3. Немцов А.В. Алкоголизм в России: история вопроса, современные тенденции. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2007;107(S1):3–7.
4. Ерохин Ю.А., Пауков В.С., Кириллов Ю.А. Причины смерти больных при пьянстве и алкоголизме. Архив патологии. 2012;74(3):33–36. Erokhin YuA, Paukov VS, Kirillov YuA. Causes of the people death from drunkenness and alcoholism. Arkhiv patologii. 2012;74(3):33–36 (In Russ.).
5. Mallory FB. Cirrhosis of the liver. Five different types of lesions from which it may arise. Bull. Johns Hop. 1911;22:69–75.
6. Серов В.В., Лебедев С.П., Мухин А.С., Виноградова Л.Г. Эволюция алкогольного гепатита. Вестник академии медицинских наук СССР. 1980;6:22–27. Serov VV, Lebedev SP, Mulin AS, Vinogradova LG. Evolution of alcoholic hepatitis. Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR. 1980;6:22–27 (In Russ.).
7. Серов В.В., Лануш К. Морфологическая диагностика заболеваний печени. Москва: Медицина, 1989, 336 с. Serov VV, Lapish K. Morphological diagnosis of diseases of the liver. Moscow: Meditsina, 1989, 336 p. (In Russ.).
8. Yokoo H, Minick OT, Battl F, Kent G. Morphologic variants of alcoholic hyaline. Am J Pathol. 1972;69(1):25–40.
9. Jensen K, Gluud C. The Mallory body: morphological, clinical and experimental studies (Part 1 of a literature survey). Hepatology. 1994;20(4 Pt 1):1061–77.
10. Denk H, Stumptner C, Fuchsichler A, Müller T, Farr G, Müller W et al. Are the Mallory bodies and intracellular hyaline bodies in neoplastic and non-neoplastic hepatocytes related? J Pathol. 2006;208(5):653–61. DOI: 10.1002/path.1946.
11. Zatloukal K, French SW, Stumptner C, Strnad P, Harada M, Toivola DM et al. From Mallory to Mallory-Denk bodies: what, how and why? Exp Cell Res. 2007;313(10):2033–49. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.04.024.
12. Boyer TD, Manns MP, Sanyal AJ. Zakim and Boyer's hepatology: a textbook of liver disease. 6th ed. Saunders, 2012.
13. Denk H, Gschnait F, Wolff K. Hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in long term griseofulvin-treated mice: a new experimental model for the study of hyalin formation. Lab Invest. 1975;32(6):773–6.
14. Yokoo H, Harwood TR, Racker D, Arak S. Experimental production of Mallory bodies in mice by diet containing 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine. Gastroenterology. 1982;83(1Pt1):109–13.
15. Denk H, Eckerstorfer R, Gschnait F, Konrad K, Wolff K. Experimental induction of hepatocellular hyalin (Mallory bodies) in mice by griseofulvin treatment. I. Light microscopic observations. Lab Invest. 1976;35(4):377–82.
16. Zatloukal K, Spurej G, Rainer I, Lackinger E, Denk H. Fate of Mallory body-containing hepatocytes: disappearance of Mallory bodies and restoration of the hepatocytic intermediate filament cytoskeleton after drug withdrawal in the griseofulvin-treated mouse. Hepatology. 1990;11(4):652–61.
17. Stumptner C, Fuchsichler A, Zatloukal K, Denk H. In vitro production of Mallory bodies and intracellular hyaline bodies: the central role of sequestosome 1/p62. Hepatology. 2007;46(3):851–60. DOI: 10.1002/hep.21744.

18. Zatloukal K, Böck G, Rainer I, Denk H, Weber K. High molecular weight components are main constituents of Mallory bodies isolated with a fluorescence activated cell sorter. *Lab Invest.* 1991;64(2):200–6.
19. Pei RJ, Danbara N, Tsujita-Kyutoku M, Yuri T, Tsubura A. Immunohistochemical profiles of Mallory body by a panel of anti-cytokeratin antibodies. *Med Electron Microsc.* 2004;37(2):114–8. DOI: 10.1007/s00795-003-0240-1.
20. Strnad P, Zatloukal K, Stumptner C, Kulaksiz H, Denk H. Mallory-Denk-bodies: lessons from keratin-containing hepatic inclusion bodies. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(12):764–74. DOI:10.1016/j.bbadis.2008.08.008.
21. Omary MB, Ku NO. Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and function. *Hepatology.* 1997;25(5):1043–8.
22. Zatloukal K, Fesus L, Denk H, Tarcsa E, Spurej G, Böck G. High amount of epsilon-(gamma-glutamyl) lysine cross-links in Mallory bodies. *Lab Invest.* 1992;66(6):774–7.
23. Weissman AM. Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunol Today.* 1997;18(4):189–98.
24. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007;282(33):24131–45.
25. Moscat J, Diaz-Meco MT. To aggregate or not to aggregate? A new role for p62. *EMBO Rep.* 2009;10(8):804. DOI:10.1038/embor.2009.172.
26. Stumptner C, Fuchsbichler A, Lehner M, Zatloukal K, Denk H. Sequence of events in the assembly of Mallory body components in mouse liver: clues to the pathogenesis and significance of Mallory body formation. *J Hepatol.* 2001;34(5):665–75. DOI: 10.1016/s0168-8278(00)00099-4.
27. Liu H, French BA, Nelson TJ, Li J, Tillman B, French SW. IL-8 signaling is up-regulated in alcoholic hepatitis and DDC fed mice with Mallory Denk Bodies (MDBs) present. *Exp Mol Pathol.* 2015;99(2):320–5. DOI:10.1016/j.yexmp.2015.08.002.
28. Mahajan V, Klingstedt T, Simon R, Nilsson KP, Thueringer A, Kashofer K et al. Cross  $\beta$ -sheet conformation of keratin 8 is a specific feature of Mallory-Denk bodies compared with other hepatocyte inclusions. *Gastroenterology.* 2011;141(3):1080–90. e1–7. DOI:10.1053/j.gastro.2011.05.039.
29. Lahiri P, Schmidt V, Smole C, Kufferath I, Denk H, Strnad P et al. p62/Sequestosome-1 Is Indispensable for Maturation and Stabilization of Mallory-Denk Bodies. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161083. DOI:10.1371/journal.pone.0161083.
30. Cadrin M, Marceau N, French SW. Cytokeratin of apparent high molecular weight in livers from griseofulvin-fed mice. *J Hepatol.* 1992;14(2–3):226–31.
31. Cadrin M, French SW, Wong PT. Alteration in molecular structure of cytoskeleton proteins in griseofulvin-treated mouse liver: a pressure tuning infrared spectroscopy study. *Exp Mol Pathol.* 1991;55(2):170–9.
32. French SW, Masouminia M, Samadzadeh S, Tillman BC, Mendoza A, French BA. Role of Protein Quality Control Failure in Alcoholic Hepatitis Pathogenesis. *Biomolecules.* 2017;7(1). DOI:10.3390/biom7010011.
33. Kanagasundaram N, Kakumu S, Chen T, Leevy CM. Alcoholic hyalin antigen (AHAg) and antibody (AHAb) in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology.* 1977;73(6):1368–73.
34. Luisada-Opper AV, Kanagasundaram N, Leevy CM. Chemical nature of alcoholic hyaline. *Gastroenterology.* 1977;73(6):1374–6.
35. French SW, Mendoza AS, Peng Y. The mechanisms of Mallory-Denk body formation are similar to the formation of aggresomes in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Exp Mol Pathol.* 2016;100(3):426–33. DOI:10.1016/j.yexmp.2016.03.010.
36. Shen H, French BA, Liu H, Tillman BC, French SW. Increased activity of the complement system in the liver of patients with alcoholic hepatitis. *Exp Mol Pathol.* 2014;97(3):338–44. DOI:10.1016/j.yexmp.2014.09.004.
37. Peng Y, French BA, Tillman B, Morgan TR, French SW. The inflammasome in alcoholic hepatitis: it's relationship with Mallory-Denk body formation. *Exp Mol Pathol.* 2014;97(2):305–13. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.08.006.
38. Пауков В.С., Воронина Т.М., Кириллов Ю.А., Малышева Е.М. Структурно-функциональные основы алкогольной болезни. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2018;28(5):7–17.
39. Пауков В.С., Воронина Т.М., Кириллов Ю.А., Малышева Е.М. Структурно-функциональные основы алкогольной болезни. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2018;28(5):7–17 (In Russ.). DOI:10.22416/1382-4376-2018-28-5-7-17.
40. Пауков В.С., Ерохин Ю.А. Структурно-функциональная концепция алкогольной болезни. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2007;107(S1):8–11.
41. Пауков В.С., Ерохин Ю.А. Структурно-функциональная концепция алкогольной болезни. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2007;107(S1):8–11 (In Russ.).
42. Пауков В.С., Ерохин Ю.А. Патологическая анатомия пьянства и алкоголизма. *Архив патологии.* 2004;66(4):3–9.
43. Пауков В.С., Ерохин Ю.А. Патологическая анатомия пьянства и алкоголизма. *Архив патологии.* 2004;66(4):3–9 (In Russ.).
44. Ерохин Ю.А. Патологическая анатомия алкогольной болезни: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Москва, 2009, 58 с.
45. Ерохин Ю.А. Патологическая анатомия алкогольной болезни: Автореф. Дис. (Med. Sci.). Moscow, 2009, 58 p. (In Russ.).
46. Пауков В.С., Беляева Н.Ю. Палочковидные включения в сердце и головном мозге при экспериментальной алкоголизации крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1985;100(7):100–103.
47. Пауков В.С., Беляева Н.Ю. Палочковидные включения в сердце и головном мозге при экспериментальной алкоголизации крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1985;100(7):100–103 (In Russ.).
48. Бувеев А.О. Алкогольная болезнь печени. В кн.: В.Т. Ивашкин (ред.). *Болезни печени и желчевыводящих путей.* Москва: Издательский дом «М-Вести», 2002. С. 111–126.
49. Бувеев А.О. Алкогольная болезнь печени. В кн.: В.Т. Ивашкин (ред.). *Болезни печени и желчевыводящих путей.* Москва: Издательский дом «М-Вести», 2002. С. 111–126 (In Russ.).

**Информация об авторах**

Вячеслав Семенович Пауков – доктор медицинских наук, профессор, почетный заведующий кафедрой патологической анатомии им. А.М. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Юрий Александрович Кириллов – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека; профессор кафедры патологической анатомии и судебной медицины Тюменского ГМУ.

Игорь Алексеевич Чернов – кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины Тюменского ГМУ.

Евгения Вадимовна Штемплевская – ординатор НИИ морфологии человека.

**Author information**

Vyacheslav S. Paukov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Honorary Head of the A.M. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0002-2646-911X>

Yuri A. Kirillov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology; Professor of Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Tyumen State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0001-7291-9663>

Igor A. Chernov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Tyumen State Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-6475-5731>

Evgeniya V. Shtemplevskaya – Resident, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0001-9776-272X>



## Латентный аутоиммунный сахарный диабет взрослых

*А.А. Тимакова, Б.Б. Салтыков*

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

Сахарный диабет в последнее время стал медико-социальной проблемой. Это связано с его широким распространением и постоянно растущей заболеваемостью. Среди выявленных новых форм болезни особое место занимает латентный аутоиммунный диабет взрослых (latent autoimmune diabetes in adults, LADA) на долю которого приходится до 10% всех случаев. При манифестации LADA, происходящей, как правило, в возрасте до 35 лет, у пациентов отмечают клинические проявления сахарного диабета 2-го типа в сочетании с аутоантительной деструкцией  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, характерной для сахарного диабета 1-го типа. Генетическая предрасположенность, связанная с антигенами гистосовместимости HLA DR4-DQ8, DR3-DQ2 и другими, в сочетании с разрешающими факторами способствует аутоиммунному поражению  $\beta$ -клеток. Для LADA в отличие от сахарного диабета 1-го типа характерна постоянная циркуляция в крови антител против цитоплазматических структур  $\beta$ -клеток (наиболее часто к глутаматдекарбоксилазе – glutamatdecarboxylase, GAD), к инсулину, тиреопероксидазе. Развивающийся инсулит сочетается с интактными и компенсаторно гипертрофированными островками. В последующем в поджелудочной железе возникают атрофия и склероз островков Лангерганса, разрастание стромы. Диагноз «латентный аутоиммунный диабет взрослых» в его дебюте основан на молодом возрасте пациента, нормальной массе тела (индекс массы тела до 25 кг/м<sup>2</sup>), низком уровне инсулина С-пептида в крови и наличии аутоантител к  $\beta$ -клеткам. Лечение LADA (с ранним назначением препаратов инсулина даже при клинически компенсированном течении заболевания) направлено на сохранение собственной секреции инсулина. В результате снижается функциональная нагрузка на  $\beta$ -клетки и ослабляется их аутоиммунное поражение.

**Ключевые слова:** LADA, этиология, факторы риска, патогенез, морфология.

**Для корреспонденции:** Анна Алексеевна Тимакова, E-mail: atimakova96@gmail.com, Борис Борисович Салтыков, E-mail: prof.saltykov@mma.ru

**Для цитирования:** Тимакова А.А., Салтыков Б.Б.. Латентный аутоиммунный сахарный диабет взрослых. Клин. эксп. морфология. 2019; 8(4):13–18. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.13-18

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), комплексной научной темы «Морфология и молекулярные механизмы основных заболеваний человека» (№ 01200110559).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 16.09.2019. Получена после рецензирования 05.11.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## Latent autoimmune diabetes in adults

*A.A. Timakova, B.B. Saltykov*

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

Recently, diabetes has become a medical and social problem due to its widespread ever-increasing incidence. The latent autoimmune diabetes in adults (LADA) accounts for up to 10% of all cases and stands high among the new identified forms of the disease. With the manifestation of LADA, which occurs, as a rule, before the age of 35 years, patients show clinical symptoms of type 2 diabetes in combination with autoantibody destruction of beta-cells of the pancreas, which is characteristic for type 1 diabetes. Genetic predisposition associated with histocompatibility antigens HLA DR4-DQ8, DR3-DQ2 and others, in combination with resolving factors contributes to autoimmune  $\beta$ -cell damage. Unlike type 1 diabetes, LADA is featured by constant blood circulation of antibodies against cytoplasmic structures of  $\beta$ -cells (most often to glutamatdecarboxylase – GAD), insulin and thyroperoxidase. The developing insulinitis is combined with intact and compensatory hypertrophied islets. Subsequently, atrophy and sclerosis of the Langerhans islets as well as stromal proliferation are identified in pancreatic tissue. The debute of LADA is diagnosed in the young age of the patient with normal body weight



(body mass index up to 25 kg/m<sup>2</sup>) by low blood level of insulin C-peptide and presence of anti-  $\beta$ -cell autoantibodies. The treatment of LADA (with early administration of insulin drugs even in clinically compensated patients) aims to maintain their own secretion of insulin. As a result, the functional load on  $\beta$ -cells is decreased and their autoimmune damage is diminished.

**Keywords:** LADA, etiology, risk factors, pathogenesis, morphology.

**Corresponding author:** Anna A. Timakova, E-mail: atimakova96@gmail.com, Boris B. Saltykov, E-mail: prof.saltykov@mma.ru

**For citation:** Timakova A.A., Saltykov B.B. Latent autoimmune diabetes mellitus of adults. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):13–18. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.13-18

**Funding.** The work was carried out within the framework of the state task of the First MSMU named after I.M. Sechenov of Ministry of Health of Russia (Sechenov University), complex scientific topic «Morphology and molecular mechanisms of major human diseases» (№ 01200110559).

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

**Received** 16.09.2019. **Received in the revised form** 05.11.2019. **Accepted** 19.11.2019.

В последние годы заболеваемость сахарным диабетом (СД) приобрела характер неинфекционной эпидемии. Так, по данным Всемирной организации здравоохранения, в 2016 году общее число только зарегистрированных больных во всем мире достигло 422 млн, а если учитывать скрытые, невыявленные формы СД, то эту цифру необходимо увеличить в 2–3 раза [1, 2]. В Российской Федерации СД зарегистрирован у 4,5 млн пациентов, а в некоторых регионах их 5% от численности всего населения [3]. В настоящее время СД, приводящий к сокращению продолжительности жизни в среднем на 5–12%, наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими болезнями является наиболее частой причиной смерти и инвалидизации больных [1, 4]. Медико-социальная проблема СД обусловлена огромными, постоянно растущими материальными затратами на лечение, реабилитацию пациентов, пособиями в связи с утратой трудоспособности и более ранними пенсиями.

Попытка выяснить, почему у одних пациентов с СД 2-го типа потребность в инсулинотерапии наступает спустя десятилетия, а у других (с той же клинической картиной) через несколько лет или даже месяцев, привела к выделению в 1993 году особой формы заболевания – латентного аутоиммунного диабета взрослых (latent autoimmune diabetes in adults, LADA), на долю которого, по статистике разных стран, приходится от 1 до 10% всех больных СД [5–7]. Например, в Индии, это число составляет 6,5% [8]. В 1999 году P. Zimmet et al. дали следующее определение заболевания: «Аутоиммунный диабет, развивающийся у взрослых, может клинически не отличаться от СД 2-го типа и проявляться медленным ухудшением метаболического контроля с последующим развитием инсулинорезистентности» [9]. Как правило, LADA манифестирует в 30–35 лет, хотя в некоторых случаях заболевание дебютирует у 70-летних людей и даже у детей [4]. Первоначально характерны стабильное течение (в ряде случаев без медикаментозного лечения), относительная недостаточность инсулина, инсулинорезистентность, что обычно приводит к постановке диагноза СД 2-го

типа и неправильному ведению пациентов. Следует отметить, что довольно часто у близких родственников наблюдаются какие-либо аутоиммунные патологии (системная красная волчанка, ревматоидный артрит, тиреоидит Хашимото и т.д.) [6, 10].

Этиология болезни в настоящее время точно не изучена, но известны некоторые факторы риска развития данной патологии: женский пол, определенная наследственность [11], низкая масса тела при рождении и последующая полнота во взрослом возрасте, ожирение [12, 13], курение, усиливающее инсулинорезистентность [14, 15], избыточное употребление сладких и искусственно подслащенных напитков (соки, нектары, шипучие газированные напитки по типу колы и т.п.) [16], перенесенные вирусные инфекции, психоэмоциональный стресс [17, 18], низкая физическая активность и злоупотребление кофе [10, 19]. Данные факторы риска характерны для множества патологий, но в контексте LADA имеются свои особенности. Так, никотин, содержащийся в сигаретах, обладает противовоспалительным эффектом и уменьшает аутоиммунную деструкцию  $\beta$ -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы по сравнению с пациентами, употребляющими снюс – «бездымный табак» [20]. Очевидно, что какие-то другие компоненты табачного дыма способствуют развитию и нарастанию инсулинорезистентности [15]. В ряде случаев у определенных лиц к развитию LADA приводит вирус Коксаки В, протеин Р2-С капсида которого гомологичен пептиду 18 аминокислоты человеческой глутаматдекарбоксилазы (glutamatdecarboxylase, GAD). Возникает феномен антигенной мимикрии и аутоиммунной реакции на собственную GAD [21]. Как ни странно, умеренное употребление алкоголя снижает риск развития LADA и СД 2-го типа, но при этом избыточное потребление этанола не влияет на вероятность возникновения СД [22, 23].

LADA – генетически обусловленное заболевание. Существуют предрасполагающие и протективные генетические комбинации, специфичные и неспецифичные сочетания генов. Так, антигены системы гистосовме-

стимости HLA DR4-DQ8, DR3-DQ2 и DR9, а также сочетания DRB1-DQA1-DQB1, DRB1\*0405-DQA1\*03-DQB1\*0401 и DRB1\*0901-DQA1\*03-DQB1\*0303 способствуют развитию болезни, тогда как комбинации генов DR2-DQ6 являются протективными [3, 4]. Ген TCF7L2 (транскрипционный фактор 7, влияющий на процессы пролиферации, дифференцировки и активности  $\beta$ -клеток), характерный для LADA, встречается также при СД 2-го типа [4, 24]. Наличие в генотипе как протективных, так и высокорасполагающих комбинаций объясняет возраст возникновения LADA и степень агрессивности его течения [25]. Кроме того, предрасполагающими локусами являются полиморфный маркер гена 23HphIINS, встречающийся одновременно при СД 1-го типа и при LADA, и полиморфный маркер R620W гена PTPN22, отвечающего за регуляцию передачи сигналов от рецепторов Т-лимфоцитов, но встречающийся реже [6]. Генетические факторы риска развития LADA доказывают, что по своей сути это гибридная, полутворная форма СД, то есть так называемый диабет 1,5 типа [2, 6, 19].

Аутоиммунная деструкция обусловлена снижением супрессии регуляторных Т-лимфоцитов (T-reg), чья функциональная активность кодируется геном FoxP3 (fork head box protein 3), при интенсивной экспрессии которого велика супрессорная активность Т-лимфоцитов и, соответственно, ниже риск развития аутоиммунизации [25, 26]. Экспрессия самого FoxP3, в свою очередь, кодируется рядом транскрипционных факторов: STAT3, HDAC3, HDAC5, SIRT1, DNMT1 и DNMT3b. Чем выше их экспрессия, тем ниже экспрессия FoxP3 и выше риск развития аутоиммунного процесса [26, 27]. Известно, что для LADA, в отличие от СД 1-го типа, характерны волнообразные колебания указанного гена: на ранних стадиях заболевания уровень экспрессии гена снижается, но недостаток супрессорной функции компенсируется увеличенным количеством регуляторных Т-лимфоцитов, которое затем нормализуется, но снова изменяется уровень экспрессии FoxP3. Другая причина снижения иммунологической толерантности – нарушение элиминации аутореактивных клонов, в норме подвергающихся апоптозу посредством системы Fas-FasL. Т-лимфоциты, которые распознали аутоантигены, экспрессируют на своей поверхности молекулу CD95L (FasL) и далее элиминируются при взаимодействии с рецептором запрограммированной клеточной смерти CD95 (Fas) [2, 6]. К аутоиммунной реакции против  $\beta$ -клеток приводит также снижение метилирования гистона H3-лизина 9 в CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, что связано с подавлением метилтрансферазы SUV39H2 и повышением регуляции деметилазы KDM4C. В крови больных происходит нарастание числа аутореактивных В-лимфоцитов и, соответственно, титра специфических антител [6, 28].

В сыворотке циркулируют антитела против одной или нескольких структур  $\beta$ -клеток, причем их титр не снижается с течением времени, как при СД 1-го типа.

Наиболее часто выявляют антитела к GAD (85–95% пациентов), фосфаттирозинфосфатазе (65–80% пациентов), цитоплазматическим антигенам (55–70% пациентов). Существенно реже отмечают антитела к инсулину, а также имеющих большое значение для его синтеза тиреопероксидазе, тирозинфосфатподобному протеину, белку – транспортеру цинка [2, 6].

Патогенез LADA представлен на схеме. Генетическая предрасположенность, различные разрешающие факторы обуславливают повреждение  $\beta$ -клеток островков поджелудочной железы, развитие инсулита. Происходит активация макрофагов, Т-лимфоцитов (прежде всего CD8, CD4), нарастает число естественных киллеров (NK-клетки). Наблюдается взаимодействие их с молекулами антигенов системы гистосовместимости, расположенных на поверхности  $\beta$ -клеток, формируются антигенпредставляющие клетки. Начинают возникать аутоантитела против  $\beta$ -клеток, происходит повреждение последних путем непосредственного контакта с макрофагами и Т-лимфоцитами или опосредованно – через свободные радикалы и цитокины (интерлейкины 1 $\beta$ , 6, фактор некроза опухолей  $\alpha$ ,  $\gamma$ -интерферон). Интерлейкины активируют NO-синтазу, стимулируют синтез макрофагами оксида азота, обладающего цитотоксическим и цитостатическим действием, влияющим на структуру ДНК, способствуют провоспалительному эффекту простагландинов. Наблюдается активация Fas-рецепторов и Fas-лигандов, расположенных на клеточных мембранах и являющихся индукторами апоптоза [4, 29, 30]. Экспрессия Fas-рецепторов у пациентов с LADA существенно снижена, что приводит к замедлению элиминации активированных Т-лимфоцитов и, следовательно, стимулирует нарастание аутоиммунных процессов, тем более что при этом нарушается соотношение хелперов и супрессоров. Формируется относительная недостаточность инсулина, лежащая в основе клинической симптоматики LADA [2, 6].

Морфологическая картина LADA в значительной мере идентична таковой при СД 1-го типа. Первоначально развивается инсулит – воспаление островков Лангерганса, сопровождающееся деструкцией, апоптозом  $\beta$ -клеток, лимфоцитоцитарной инфильтрацией долек поджелудочной железы и стромы, переходящей на соседние участки [2, 23]. С течением времени островки подвергаются склерозу и атрофии с некоторым уменьшением макроскопических размеров поджелудочной железы [31]. Характерной микроскопической особенностью LADA (особенно в первое время) является выраженная мозаичность: соседство воспаленных островков с интактными или даже компенсаторно гипертрофированными [2, 29]. Такая гистологическая гетерогенность позволяет объяснить медленное (в отличие от классического аутоиммунного СД 1-го типа) начало и стабильное течение LADA.

Диагностика заболевания при клинике СД 2-го типа в дебюте основана на следующих критериях: 1) циркулирующие антитела к структурам  $\beta$ -клеток (прежде

всего к GAD), по титру которых также можно рассчитать прогноз потребности в инсулине; 2) индекс массы тела до 25 кг/м<sup>2</sup>; 3) низкая концентрация инсулина и С-пептида в крови. Отличить LADA от СД 2-го типа также помогут низкие уровни растворимого рецептора к фактору некроза опухолей  $\alpha$ , интерлейкинов 1 $\beta$  и 6, высокочувствительного С-реактивного белка; индекс инсулинорезистентности, равный 3,7 (при СД 1-го типа – 1,2, а при СД 2-го типа – 7,2) [21, 32].

Лечение LADA направлено на сохранение собственной секреции инсулина [6, 33]. Раннее назначение препаратов инсулина (даже при клинически компенсированном течении заболевания) снижает функциональную нагрузку на  $\beta$ -клетки, ослабляет их

аутоиммунное поражение, способствует сохранению клеточной структуры более длительное время. Применение пероральных глюкозоснижающих препаратов, стимулирующих синтез инсулина (например, сульфонилмочевины), традиционно назначаемых при лечении СД 2-го типа, строго противопоказано, так как истощает запасы эндогенного инсулина, увеличивает аутоиммунную деструкцию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и способствует быстрому прогрессированию LADA. При этом в течение 1–2 лет формируется не относительная, а абсолютная инсулиновая недостаточность [4, 34].

Таким образом, LADA обладает рядом принципиальных отличий от других вариантов СД, поэтому

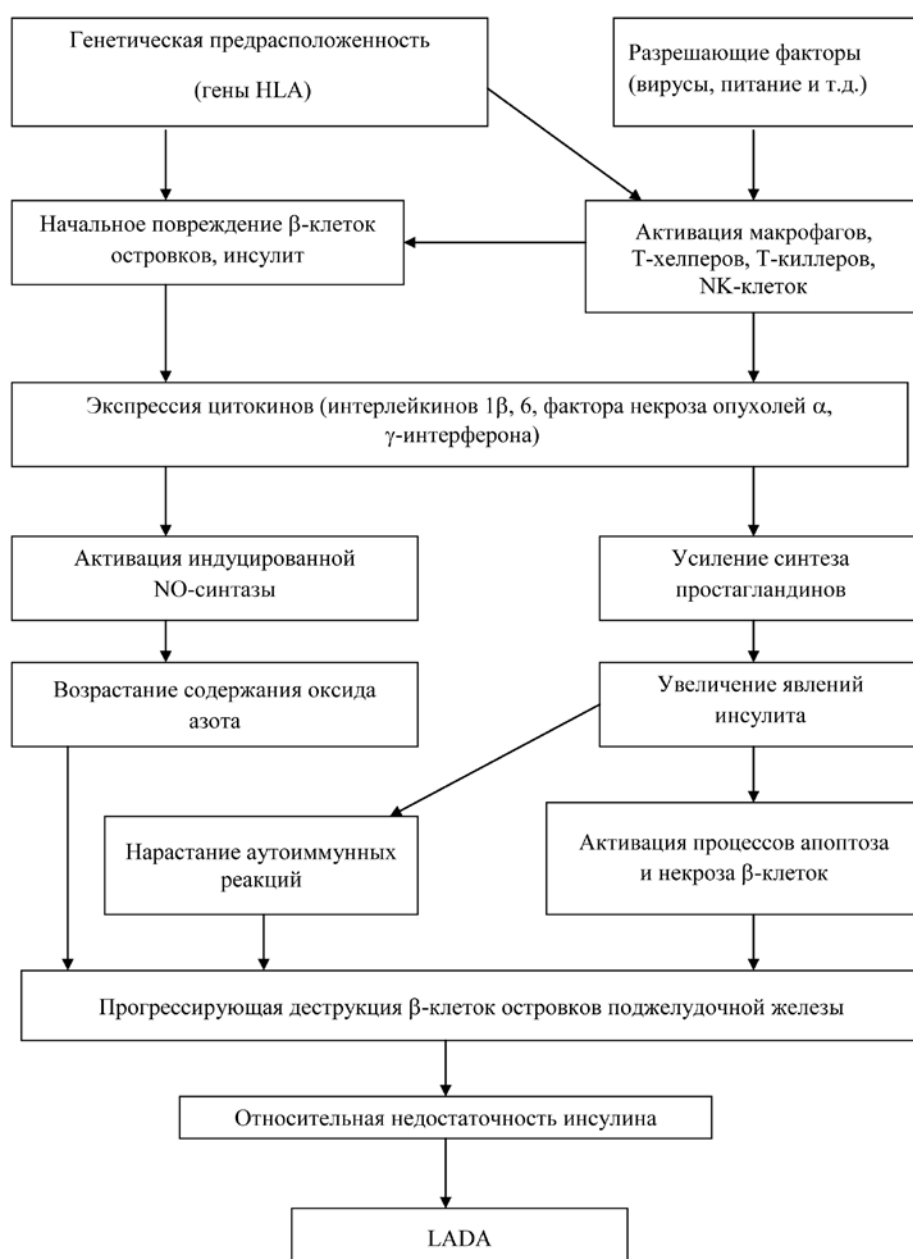


Схема. Патогенез латентного аутоиммунного диабета взрослых

Scheme. Pathogenesis of the Latent autoimmune diabetes mellitus in adults

каждый пациент в возрасте 25–40 лет с предварительным диагнозом «сахарный диабет 2-го типа» нуждается в дополнительном обследовании и последующем специфическом лечении.

## Литература/References

1. Аметов А.С. Сахарный диабет 2-го типа: Проблемы и решения. Т. 9. 3-е изд. Москва: Геотар-медиа, 2018, 320 с. ISBN 978-5-9704-46-38-6.  
*Ametov AS. Sakharный diabet 2 tipa: Problemy i resheniya. Vol. 9. 3<sup>rd</sup> ed. Moscow: Geotar-media. 2018, 320 p. (In Russ.).*
2. Пауков В.С. (ред.). Клиническая патология: Руководство для врачей. Москва: Литтерра, 2018, 768 с. ISBN 978-5-4235-0261-4.  
*Paukov VS (ed.). Klinicheskaya patologiya: Rukovodstvo dlya vrachey. Moscow: Litterra, 2018, 768 p (In Russ.).*
3. Анциферов М.Б. (ред.). Современные аспекты фармакотерапии эндокринных заболеваний. Москва: Бионика Медиа, 2018, 208 с. ISBN 978-5-906444-03-5.  
*Antsiferov MB (ed.). Sovremennyye aspekty farmakoterapii endokrinnykh zabolevaniy. Moscow: Bionika Media, 2018, 208 p. (In Russ.).*
4. Дедов И.И., Шестакова М.В., Кураева Т.Л., Титович Е.В., Никонова Т.В. Нозологическая гетерогенность, молекулярная генетика и иммунология аутоиммунного сахарного диабета. Вестник Российской академии медицинских наук. 2015;70(2):132–138.  
*Dedov II, Shestakova MV, Kuraeva TL, Titovich EV, Nikonova TV. Nozological Heterogeneity, Molecular Genetics and Immunology of Autoimmune Diabetes Mellitus. Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk. 2015;70(2):132–138 (In Russ.). DOI:10.15690/vramn.v70i2/1305.*
5. Кроненберг Г.М., Мелмед Ш., Полонски Е.С., Ларсен П.Р. Сахарный диабет и нарушения углеводного обмена (пер. с англ.). Москва: Рид Элсивер, 2010. 448 с. ISBN 978-5-91713-030-9.  
*Kronenberg GM, Melmed Sh, Polonski ES., Larsen PR. Sakharный diabet i narusheniya uglevodnogo obmena (translated from English). Moscow: Rid Elsevier. 2010. 448 p. (In Russ.).*
6. Дедов И.И., Шестакова М.В. (ред.). Сахарный диабет: многообразие клинических форм. Москва: Медицинское информационное агентство, 2016, 224 с. ISBN 978-5-9986-0250-4.  
*Dedov II, Shestakova MV (eds.). Diabetes mellitus: a variety of clinical forms. Moscow: Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo, 2016, 224 p. (In Russ.).*
7. Luo S, Lin J, Xie Z, Xiang Y, Zheng P, Huang G et al. HLA Genetic Discrepancy Between Latent Autoimmune Diabetes in Adults and Type 1 Diabetes: LADA China Study No. 6. The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism. 2016;101(4):1693–700. DOI:10.1210/jc.2015-3771.
8. Kumar A, De Leiva A. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA): the prevalent form of adult-onset autoimmune diabetes in a region of India. Journal of Endocrinology and Diabetes. 2017;4(3):1–6. DOI:10.15226/2374680/4/3/00180.
9. Zimmet P, Turner R, McCarty D, Rowley M, Mackay I. Type 2 diabetes or slow type 1 diabetes. Diabetes Care. 1999;22 Suppl 2:B59-64.
10. Carlsson S. Environmental (lifestyle) risk factors for LADA. Curr Diabetes Rev. 2019;15(3):178–87. DOI:10.2174/1573399814666180716150253.
11. Hjort R, Alfredsson L, Andersson T, Carlsson PO, Grill V, Groop L et al. Family history of type 1 and type 2 diabetes and risk of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). Diabetes & Metabolism. 2017;43(6):536–42. DOI:10.1016/j.diabet.2017.05.010.
12. Hjort R, Alfredsson L, Carlsson PO, Groop L, Martinell M, Storm P et al. Low birthweight is associated with an increased risk of LADA and type 2 diabetes: results from a Swedish case-control study. Diabetologia. 2015;58(11):2525–32. DOI:10.1007/s00125-015-3711-8.
13. Hjort R, Ahlqvist E, Carlsson PO, Grill V, Groop L, Martinell M et al. Overweight, obesity and the risk of LADA: results from a Swedish case-control study and the Norwegian HUNT study. Diabetologia. 2018;61(6):1333–43. DOI:10.1007/s00125-018-4596-0.
14. Rasouli B, Grill V, Midthjell K, Ahlbom A, Andersson T, Carlsson S. Smoking is Associated With Reduced Risk of Autoimmune Diabetes in Adults Contrasting With Increased Risk in Overweight Men With Type 2 Diabetes: A 22-year follow-up of the HUNT study. Diabetes Care. 2012;36(3):604–10. DOI:10.2337/dc12-0913.
15. Rasouli B, Andersson T, Carlsson PO, Grill V, Groop L, Martinell M et al. Smoking and the Risk of LADA: Results From a Swedish Population-Based Case-Control Study. Diabetes Care. 2016;39(5):794–800. DOI:10.2337/dc15-2348.
16. Löfvenborg JE, Andersson T, Carlsson PO, Dorkhan M, Groop L, Martinell M et al. Sweetened beverage intake and risk of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and type 2 diabetes. European Journal of Endocrinology. 2016;175(6):605–14. DOI:10.1530/EJE-16-0376.
17. Chen YL, Qiao YC, Song XN, Ling W, Zhao HL, Zhang XX. Emotional exhaustion-induced latent autoimmune diabetes in adults in a young lady. Medicine (Baltimore). 2017;96(20):e6915. DOI:10.1097/MD.00000000000006915.
18. Rasouli B, Andersson T, Carlsson PO, Hjort R, Löfvenborg JE, Martinell M et al. Serious life events and the risk of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and Type 2 diabetes. Diabetic Medicine. 2017;34(9):1259–63. DOI:10.1111/dme.13410.
19. Rasouli B, Ahlqvist E, Alfredsson L, Andersson T, Carlsson PO, Groop L et al. Coffee consumption, genetic susceptibility and risk of latent autoimmune diabetes in adults: A population-based case-control study. Diabetes & Metabolism. 2018;44(4):354–60. DOI:10.1016/j.diabet.2018.05.002.
20. Rasouli B, Andersson T, Carlsson PO, Grill V, Groop L, Martinell M et al. Use of Swedish smokeless tobacco (snus) and the risk of Type 2 diabetes and latent autoimmune diabetes of adulthood (LADA). Diabetic Medicine. 2016;34(4):514–21. DOI:10.1111/dme.13179.
21. Hakethal V. LADA: Time to update diabetes classification? Diabetes. January 5, 2017. Accessed August 31, 2018. Available from: <https://www.endocrinologynetwork.com/diabetes/lada-time-update-diabetes-classification>.
22. Rasouli B, Andersson T, Carlsson PO, Dorkhan M, Grill V, Groop L et al. Alcohol and the risk for latent autoimmune diabetes in adults: results based on Swedish ESTRID study. European



- Journal of Endocrinology. 2014;171(5):535–43. DOI:10.1530/EJE-14-0403.
23. *Rasouli B.* Alcohol, tobacco and the risk of LADA-latent autoimmune diabetes in adults. Thesis for Doctoral Degree (Ph.D.) Stockholm: Karolinska Institutet; 2016, 68 p.
  24. *Zhang N, Huang W, Dong F, Liu Y, Zhang B, Jing L et al.* Insulin gene VNTR polymorphisms –2221MspI and –23HphI are associated with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: a meta-analysis. *Acta Diabetologica*. 2015;52(6):1143–55. DOI:10.1007/s00592-015-0805-1.
  25. *Силко Ю.В., Никонова Т.В., Иванова О.Н., Степанова С.М., Шестакова М.В., Дедов И.И.* Ассоциация полиморфизма rs7903146 гена TCF7L2 с низкими концентрациями аутоантител при латентном аутоиммунном диабете взрослых (LADA). *Сахарный диабет*. 2016;19(3):199–203.  
*Silko YuV, Nikonova TV, Ivanova ON, Stepanova SM, Shestakova MV, Dedov II.* Association of polymorphism rs7903146 gene TCF7L2 with low concentrations of autoantibodies in latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Diabetes mellitus*. 2016;19(3):199–203 (In Russ.). DOI:10.14341/DM2003418-21.
  26. *Hou C, Zhong Y, Wang Z, Ming Z, Huang G, Ouyang L et al.* STAT3-mediated epigenetic silencing of FOXP3 in LADA T-cells is regulated through HDAC5 and DNMT1. *Clinical Immunology*. 2018;191:116–25. DOI:10.1016/j.clim.2017.12.001.
  27. *Pes GM, Delitala AP, Errigo A, Delitala G, Dore MP.* Clustering of immunological, metabolic and genetic features in latent autoimmune diabetes in adults: evidence from principal component analysis. *Intern Emergency Medicine*. 2016;11(4):561–7. DOI:10.1007/s11739-015-1352-z.
  28. *Deng C, Xiang Y, Tan T, Ren Z, Cao C, Huang G et al.* Altered peripheral B-lymphocyte subsets in type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care*. 2016;39(3):434–40. DOI:10.2337/dc15-1765.
  29. *Пекарева Е.В., Никонова Т.В., Горелышева В.А., Прокофьев С.А., Зверева Я.С., Степанова С.М., Смирнова О.М.* Маркеры апоптоза у больных сахарным диабетом 1-го типа в дебюте заболевания. *Сахарный диабет*. 2009;4:86–89.  
*Pekareva EV, Nikonova TV, Gorelysheva VA, Prokofyev SA, Zvereva YaS, Stepanova SM, Smirnova OM.* Markers of apoptosis in patients with type 1 diabetes mellitus at the onset of the disease. *Diabetes Mellitus*. 2009;4:86–89 (In Russ.).
  30. *Yau M, Maclaren NK, Sperling M.* Etiology and pathogenesis of diabetes mellitus in children and adolescents. *Endotext*. February 13, 2018. Accessed August 31, 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK498653/>.
  31. *Lu J, Hou X, Pang C, Zhang L, Hu C, Zhao J et al.* Pancreatic volume is reduced in patients with latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*. 2016;32(8):858–66. DOI:<https://doi.org/10.1002/dmrr.2806>.
  32. *Castelblanco E, Hernández M, Castelblanco A, Gratacòs M, Esquerda A, Molló Á et al.* Low-grade inflammatory marker profile may help to differentiate patients with LADA, classic adult-onset type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2018;41(4):862–8. DOI:10.2337/dc17-1662.
  33. *Towns R, Pietropaolo M.* GAD65 autoantibodies and its role as biomarker of Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Drugs Future*. 2011;36(11):847. DOI: 10.1358/dof.2011.036.11.1710754.
  34. *Силко Ю.В., Никонова Т.В., Шестакова М.В.* Латентный аутоиммунный диабет взрослых: роль инкретинов в патогенезе, возможность комбинированной терапии агонистами глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и инсулином. *Ожирение и метаболизм*. 2016;13(2):3–6.  
*Silko YuV, Nikonova TV, Shestakova MV.* Latent autoimmune diabetes of adults: the role of incretins in the pathogenesis and glucagon-like peptide-1 for treatment. *Obesity and metabolism*. 2016;13(2):3–6 (In Russ.). DOI: 10.14341/OMET201623-6.

## Информация об авторах

Тимакова Анна Алексеевна – студентка Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Салтыков Борис Борисович – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии им. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

## Author information

Anna A. Timakova – Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0003-0269-4969>

Boris B. Saltykov – Dr. Sci. (Med.), Professor, A.M. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0002-1154-9483>



© Чекишева Т.Н., 2019

DOI:10.31088/CEM2019.8.4.19-24

УДК 616.71-018-003.93:620.3

## Наноматериалы и их роль в регенерации костной ткани

**Т.Н. Чекишева**

ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого  
Минздрава России, Красноярск, Россия

Статья посвящена обзору и анализу научной литературы по вопросам морфологических преобразований костной ткани при применении наноматериалов в процессах репаративной регенерации. Дана характеристика небиodeградируемых и биodeградируемых материалов с учетом их преимуществ и недостатков для дальнейшего практического применения. Для снижения риска осложнений и времени восстановления костной ткани все чаще исследуются и применяются наноматериалы с биodeградируемыми свойствами в сочетании с донорскими клетками, биоактивными веществами или специализированные наночастицы для доставки лекарств и маркировки клеток. Намечена тенденция к замене литых имплантационных материалов на пористые трехмерные (3D) матрицы. Наличие пор определенного размера обеспечивает остеоconductivность материала, что является обязательным свойством для роста сосудов и проникновения остеопрогениторных клеток внутрь имплантата. Наноструктурированные материалы способствуют равномерному распределению остеобластов вокруг костных трабекул при их формировании, тем самым увеличивая объем восстанавливаемой костной ткани.

**Ключевые слова:** наноматериалы, наночастицы, кости, костная ткань, регенерация.

**Для корреспонденции:** Татьяна Николаевна Чекишева. E-mail: maks726@mail.ru

**Для цитирования:** Чекишева Т.Н. Наноматериалы и их роль в регенерации костной ткани. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):19–24. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.19-24

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 27.09.2019. Получена после рецензирования 05.11.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## Nanomaterials and their role in bone tissue regeneration

**T.N. Chekisheva**

V.F. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University of Ministry of Health of Russia, Krasnoyarsk, Russia

The paper reviews the literature on the morphology of bone tissue when using nanomaterials for the purposes of reparative regeneration. Non-biodegradable and biodegradable materials are characterized regarding their benefits and drawbacks in further practical application. Biodegradable nanomaterials reducing the risk of complications as well as bone repair time are currently studied and used in combination with donor cells, bioactive substances, or specialized nanoparticles for drug delivery and cell labeling. The trend is scheduled to replace the cast implant materials on the porous three-dimensional (3D) matrices. Pores of a certain size provide osteoconductivity of the material, which is mandatory for vascular growth and ingrowth of osteogenic cells inside the implant. Nanostructured materials contribute to the uniform distribution of osteoblasts around developing bone trabeculae thereby increasing the volume of restoring bone tissue.

**Keywords:** nanomaterials, nanoparticles, bones, bone tissue, regeneration.

**Corresponding author:** Tatyana N. Chekisheva, E-mail: maks726@mail.ru

**For citation:** Chekisheva T.N. Nanomaterials and their role in bone tissue regeneration. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):19–24 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.19-24

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

Received 27.09.2019. Received in revised form 05.11.2019. Accepted 19.11.2019.

Разработка и экспериментально-клинические исследования имплантационных технологий с целью восстановления костной ткани в области дефекта основаны на понимании процессов, происходящих при взаимодействии между клетками и материалом имплантата. Контакт

осуществляется через слой белков, которые практически мгновенно абсорбируются имплантом после его введения. От того, насколько прочно будут фиксированы элементы имплантационной конструкции к живой ткани, зависит надежность всей интеграции [1, 2].

Известно, что на протяжении всей жизни костная ткань подвергается постоянным перестройкам. Архитектоника определяет механические свойства костной ткани, устойчивость к деформации, которая варьирует в зависимости от анатомического местоположения и отличается у разных индивидуумов [3, 4]. Скорость обмена костной ткани скелета составляет около 10% за год, при этом перестройка компактного вещества пластинчатой костной ткани (85% общей массы) происходит несколько медленнее – 4% за год, а трабекулярной (15% общей массы) значительно быстрее – 28% за год [5]. Перестройкой костной ткани управляют два механизма: моделирование и ремоделирование. Моделирование формирует микроструктуру кости во время ее роста [6] или восстановления после повреждения, этот процесс регулируется посредством ряда метаболических и механических факторов [7, 8] и включает в себя координацию резорбции и остеогенеза, протекающих одновременно в разных участках ткани. Ремоделирование заключается в резорбции локальных участков и заполнении образовавшихся дефектов новообразованной костной тканью. Ремоделирование позволяет изменить объем, форму и плотность кости, максимально адаптируя к действующим нагрузкам, корректируя и обновляя микроархитектонику ткани [9].

Тем не менее в клинической практике регенерация костной ткани требуется в большом количестве, например для реконструкции крупных дефектов костей скелета, вызванных травмой, инфекцией, удалением опухоли или скелетных аномалий, а также случаев, в которых регенеративный процесс находится под угрозой.

Репаративная регенерация кости включает следующие стадии: повреждение, последствия первичной деструкции, рост грануляционной ткани, образование первичного ретикулофиброзного регенерата, ремоделирование регенерата. Последняя стадия морфологически может длиться от нескольких месяцев до нескольких лет в зависимости от начальных условий [10]. Но все-таки вероятность несращения кости колеблется в пределах 10–15% [11].

Создание конструкций, по своим биологическим свойствам приближающихся к нативной костной ткани, весьма востребовано в травматологии и ортопедии. В последнее десятилетие ученые существенно усовершенствовали материалы, применяемые для изготовления имплантов, придавая им определенные наноразмерные свойства, к которым можно отнести компактность вещества, приводящую к ускорению взаимодействия между наноматериалами и средой, в которую они помещены, большую поверхность, позволяющую разместить значительное количество функциональных наноустройств на единицу площади, способность повлиять на их физико-механические свойства благодаря уменьшению размера структурного элемента [12, 13]. Разрабатываются наноструктурные каркасы, имеющие достаточный коэффициент прочности и биосовместимости для ускорения процессов

восстановления костной ткани. Доказано, что правильная геометрическая форма, гладкая и симметричная структура импланта воспринимаются чужеродными для организма, и в связи с этим появилась необходимость нанесения на поверхность матрикса биоактивных покрытий, имеющих пористое строение, схожее с костной тканью [14].

Наноматериалы подразделяются на следующие категории: наноматериалы в виде наноизделий (наноразмерные частицы (нанопорошки), нанопроволоки и нановолокна, очень тонкие пленки (толщина менее 100 нм), нанотрубки и т.п.); наноматериалы в виде микроизделий (проволоки, ленты, фольги – диапазон от 1 мкм до 1 мм); наноматериалы в виде однофазных (стекла, гели, пересыщенные твердые растворы), многофазных материалов (сложные металлические сплавы – диапазон больше нескольких миллиметров) и композиционные наноматериалы (компоненты из наноизделий и микроизделий) [12].

Наиболее подходящим нерезорбируемым материалом для имплантатов по биологическим свойствам является титан: интрамедуллярные фиксаторы с покрытием нитридами титана и гафния [15], нетканый титановый материал со сквозной пористостью [16], гранецентрированные кубические решетки кристаллов титановых имплантатов [17].

После наноструктурирования кристаллической решетки титана методом интенсивной пластической деформации повышается его прочность, достигаются высокая химическая стабильность, превосходная биосовместимость и низкая токсичность, что повышает интерес к нему для биомедицинского применения [18–21]. Ученые из Башкирского государственного медицинского университета провели исследование по сравнению титановых сплавов с разным пределом прочности: наноструктурированного (CP Ti Grade 2 с ультрамелкозернистой наноструктурой) и стандартных сплавов (CP Ti Grade 2 со стандартной крупнозернистой структурой, Ti-6Al-4V со стандартной структурой), традиционно использующихся в травматологии. Результаты, полученные во время эксперимента, подтверждают превосходство титана с наноструктурированным строением. Морфологические признаки регенерации кости проявляются уже в конце первого месяца с имплантированием стержней из чистого титана как со стандартной, так и с ультрамелкозернистой наноструктурой. На месте разрушающейся хрящевой ткани формируются костные трабекулы. Активные остеобласты группируются по обе стороны новообразующейся трабекулы, формируются новые пластинки. Уже к 6 месяцам определяется картина формирующегося костного блока. К 12 месяцам у 33 из 34 обследованных (97%) костный блок формировался полностью. В группах с использованием стандартных сплавов к 12 месяцам костный блок формировался полностью у 27 из 35 обследованных пациентов (77%) и у 4 из 34 (11,4%), соответственно [22].

Используются титановые имплантаты с покрытием из гидроксиапатита и трехмерные матрицы из полимолочной кислоты совместно с гидроксиапатитами, полученными методом 3D печати для улучшения адгезии клеточных структур [23–27]. Ученые из Китая установили, что материалы, изготовленные из одного гидроксиапатита, не обладают ни биологическими свойствами кости, ни функциями стимулирования васкуляризации и ингибирования иммунного отторжения. Для устранения этих недостатков были подготовлены композиционные каркасы и изучена возможность их применения в инженерии костной ткани. Через 6 недель после имплантации результаты морфологии показали, что в хирургических дефектах формируется новообразующая костная ткань [28].

К биорезорбируемым материалам относятся различные барьерные мембраны: пропитанные нанорастворами наночастиц золота, серебра и меди, на основе альгината натрия и октакальциевого фосфата, резорбируемые коллагеновые мембраны. Барьерные мембраны необходимы для изоляции костного дефекта от прорастания фиброзной ткани. Плюсом биорезорбируемой мембраны, пропитанной нанорастворами наночастиц золота, серебра и меди, является образование костной ткани по типу прямого остеогенеза из грануляционной соединительной ткани, а не путем отрастания от краев кости в области дефекта [29]. Мембраны с коллагеном обеспечивают высочайшую регенерационную эффективность для заживления костных дефектов, наблюдается активное деление остеобластов, ускорение процессов формирования трабекул и васкуляризации [31]. А.Н. Гурин с соавторами во время исследования установили, что положительной стороной альгинатных мембран с гранулами октакальциевого фосфата (ОКФ) является остеоиндукционная потенция. Через 30 суток мембрана плотно прилегает к краям костного дефекта. Гранулы ОКФ равномерно распределены в костном дефекте. В основном они окружены формирующейся рыхлой волокнистой соединительной тканью с фибробластоподобными клетками. В центре дефекта, вокруг гранул (несколько или одной) детектируется новообразованная костная ткань с признаками пластинчатого строения. Внутренняя поверхность кости повторяет изрезанный рельеф гранулы; между ними нет каких-либо тканевых прослоек, а также визуализированных клеточных элементов. Через 90 суток эксперимента мембрана по-прежнему сохранена, полностью перекрывает костный дефект. Гранулы ОКФ при этом остаются «замурованными» в новообразованном костном регенерате, предопределяя его ячеечное строение. Среди свойств, которые могут в дальнейшем ограничить практическое применение альгинатных мембран, следует указать их относительно медленную резорбцию [30].

Также для восстановления поврежденной костной ткани применяют биорезорбируемые пластичные костные цементы на основе фосфорнокислого кальция или биокерамические цементы. Данные материалы спо-

собны заполнить пустоты и отверстия разной природы в кости, следовательно, предоставляют организму строительный материал и матрицу для регенерирующей костной ткани. Скорость регенерации и восстановления целостности дефекта в случае применения цемента для замещения костной ткани может оказаться выше примерно в 3–4 раза [32, 33].

Несмотря на разработку большого количества имплантатов из искусственных материалов, включая резорбируемые, тканевые имплантаты остаются предпочтительными. Это аутогенная, аллогенная и ксеногенная костная ткань; трехмерные хондротрансплантаты с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками. Каждый имеет свои преимущества и недостатки. Аутогенная костная ткань характеризуется минимальным риском отторжения импланта, но требует дополнительных хирургических манипуляций и нуждается в постоянном притоке крови к импланту [34–36]. Аллогенная и ксеногенная костная ткань отличаются наличием остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств, но не обладают остеогенными свойствами аутокости [37, 38]. Выявлено, что трансплантация аллогенных клеток костного мозга на пористом инкубаторе пролонгирует и усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действие по сравнению с инъекционным введением клеток. Это связано с обеспечением оптимальных условий сохранения жизнеспособности и функционирования донорских клеток в пористо-проницаемой структуре инкубатора и маскирующем эффекте от воздействия иммунной системы хозяина [39]. Преимущество хондротрансплантата перед другими пластическими материалами заключается в отсутствии антигенной активности и осуществляется путем эволюционно закрепленного механизма энхондрального остеогенеза. В.В. Рерих с другими исследователями в ходе эксперимента обнаружили, что на 90-е сутки в области перелома краниоventрального угла тела позвонка формируется костная ткань балочного строения, элементы аллогенного остеотрансплантата (созданного путем прямой трансдифференцировки из трехмерного хондротрансплантата) внешне не изменены, наблюдается сплошной переход костных балок и сосудов от тела позвонка к месту дефекта. Трабекулы формируют петлистую сеть с тенденцией к продольной направленности. Вокруг костных балок равномерно располагаются остеобласты, что свидетельствует о формировании органоспецифической костной ткани в зоне бывшего перелома [35].

М.В. Столяров с соавторами в своем исследовании сравнили ряд материалов и доказали, что наибольшая вероятность полноценного восстановления дефекта костной ткани возможна при применении аутогенной костной стружки. Они пришли к выводам, что для стимулирования процессов остеогенеза важно создать в костном дефекте депо из остеотропного материала и стабилизировать в нем кровяной сгусток. С помощью иммуногистохимического исследования подтвердили, что костеобразующие материалы тормозят активность

остеокластов, следовательно, уменьшают резорбцию костной ткани. Так, на 90-й день после операции это происходит в дефекте костной ткани с применением аутогенной костной стружки (то есть сокращение срока новообразования костной ткани более чем в 2 раза) [40].

Другая группа ученых провела исследование технологии, основанной на трансплантации трехмерного тканеинженерного живого эквивалента кости (3D ТИЭК). В современной модификации 3D ТИЭК состоит из обработанного бесклеточного аллогенного костного блока необходимых размера и формы (для циркулярных дефектов) либо костных чипов или крошки (для тангенциальных дефектов). Заселяя матрикс мультипотентными мезенхимными стромальными клетками, ученые отмечали полное покрытие поверхности материала носителя к 18-му дню. На ультратонких срезах регистрировалось плотное прилегание клеток к поверхности, клетки демонстрировали признаки активных биосинтетических процессов. На 30-е сутки костно-хрящевой регенерат состоял из различных тканей: новообразованной ретикулофиброзной костной ткани, гиалиновой хрящевой ткани, соединительной волокнистой ткани. Материал носителя практически полностью был резорбирован, заменен новообразованной костной тканью, трабекулы которой непосредственно продолжали балки деминерализованного костного матрикса [41].

По мере накопления и анализа данных остается много вопросов, связанных с выбором и оценкой предлагаемых наноконструкций. В первую очередь это касается матриц-носителей, так как необходимы их максимальная биосовместимость с костной тканью и отсутствие токсического воздействия, высокий регенераторный потенциал и формирование органоспецифической ткани в зоне трансплантации. При обзоре литературы отрицательное воздействие наноматериалов на костную ткань выявлено не было, но проведение дальнейших экспериментальных доклинических и клинических подтверждений эффективности наноконструкций необходимо. Теперь наноинженерные системы могут более точно имитировать структуры костной ткани, поэтому разрабатывается возможность объединить несколько подходов, таких как доставка лекарств и маркирование клеток, в рамках одной системы. Часть исследователей проявляет интерес к использованию разных форм нанокристаллов. Одним из материалов этой группы являются нанокристаллы детонационного взрывного синтеза. Нами на данный момент ведется работа по изучению влияния модифицированных нанокристаллов на костную ткань. Ранее было установлено, что их можно использовать как систему адресной доставки биологически активных веществ [42] и биохимической диагностики физиологически важных соединений [43].

Подводя итоги обзора, можно сделать следующие выводы. Естественным биологическим процессом для костной ткани является обновление костных структур в организме, связанное с постоянной физиологической перестройкой, но в случае репаративной регенерации

требуется дополнительная стимуляция процессов восстановления. Для этого могут быть использованы различные остеобразующие материалы, способные стимулировать васкуляризацию, гематопоз и остеогенез. Использование тканеинженерных имплантов должно быть четко аргументировано в зависимости от характера, типа и локализации повреждения. Это приведет к снижению осложнений в клинической практике, так как наноструктурированные материалы становятся успешной альтернативой известным титановым пластинам и конструкциям из производных акриловых смол, широко применяемым в настоящее время в челюстно-лицевой хирургии.

## Литература/References

1. Mondal S, Ghosh R. Bone remodelling around the tibia due to total ankle replacement: effects of implant material and implant-bone interfacial conditions. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2019;9:1–11. DOI: 10.1080/10255842.2019.1661385.
2. Son J, Kim J, Lee K, Hwang J, Choi Y, Seo Y et al. DNA aptamer immobilized hydroxyapatite for enhancing angiogenesis and boneregeneration. *Acta Biomater.* 2019;19:30612–9. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.08.047.
3. Аврунин А.С., Докторов А.А. Зависимость остеогенного эффекта от характеристик механических нагрузок костных структур. *Травматология и ортопедия России.* 2016;22(2):88–100. Avrunin AS, Doktorov AA. Dependency of osteogenic effects on characteristics of mechanical load applied to osseous structures. *Traumatology and orthopedics of Russia.* 2016;22(2):88–100 (In Russ.). DOI: 10.21823/2311-2905-2016-0-2-88-100.
4. Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, Yaedü RYF, Sant'Ana E, da Silva Corrêa D et al. Morphometric evaluation of bone regeneration in segmental mandibular bone defects filled with bovine bone xenografts in a split-mouth rabbit model. *Int J Implant Dent.* 2019;5(1):32. DOI:10.1186/s40729-019-0187-1.
5. Машейко И.В. Биохимические маркеры в оценке процессов ремоделирования костной ткани при остеопении и остеопорозе. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета.* 2017;2:149–156. Masheiko IV. Biochemical markers for the evaluation of bone tissue remodeling in osteopenia and osteoporosis. *Journal of the Grodno state medical university.* 2017;2:149–156 (In Russ.).
6. Hunziker EB. Elongation of the Long Bones in Humans by the Growth Plates. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* 2018;89:13–23. DOI: 10.1159/000486489.
7. Белохвостикова Т.С., Михалевич И.М. Иммунологическое прогнозирование нарушений регенерации костной ткани. *Сибирское медицинское обозрение.* 2018;3:98–104. Belokhvostikova TS, Mikhalevich IM. Immunological forecasting of bone tissue regeneration disturbance. *Siberian medical review.* 2018;3:98–104 (In Russ.). DOI: 10.20333/2500136-2018-3-98-104.
8. Выхованец Е.П., Долганова Т.И., Лулева С.Н., Борзунов Д.Ю. Вазодилаторный эффект сосудистых факторов роста (VEGF) в условиях формирования костной ткани методом дискретной фракции при врожденной сегментарной патологии. *Гений ортопедии.* 2018;24(2):209–215.



- Vykhovanets EP, Dolganova TI, Luneva SN, Borzunov DYU.* Vasodilator effect of vascular endothelial growth factors (VEGF) in the conditions of bone tissue formation by the method of discrete traction in congenital segmental pathology. *Genij ortopedii.* 2018;24(2):209–215 (In Russ.). DOI: 10.18019/1028-4427-2018-24-2-209-215.
9. *Paiva KBS, Granjeiro JM.* Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption, Remodeling, and Repair. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;148:203–303. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.05.001.
  10. *Siddiqui JA, Partridge NC.* Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(3):233–45. DOI: 10.1152/physiol.00061.2014.
  11. *Шапкин Ю.Г., Селиверстов П.А.* Факторы риска несращения переломов костей при политравме. *Кубанский научный медицинский вестник.* 2017;24(6):168–176.  
*Shapkin YuG, Seliverstov PA.* Risk factors of fracture nonunion in polytrauma. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik.* 2017;24(6):168–176 (In Russ.). DOI: 10.25207/1608-6228-2017-24-6-168-176.
  12. *Gleiter H.* Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Materialia.* 2000;48(1):1–29. DOI: 10.1016/S1359-6454(99)00285-2.
  13. *Vieira S, Vial S, Reis RL, Oliveira JM.* Nanoparticles for bone tissue engineering. *Biotechnol Prog.* 2017;33(3):590–611. DOI: 10.1002/btpr.2469.
  14. *Марков А.А., Сергеев К.С., Бычков В.Г., Машкин А.М., Соколюк А.А.* Результаты изучения влияния синтетического биоактивного кальций-фосфатного покрытия титановых имплантатов на репаративную регенерацию костной ткани. *Современная наука и инновации.* 2017;4(20):189–194.  
*Markov AA, Ponomarev AA, Zavatsky MD, Kurchatova AN, Sergeev KS, Sokolyuk AA.* The synthetic bioactive calcium-phosphate mineral coating influence on the periimplant zone bone tissue. *Sovremennaa nauka i innovacii.* 2017;4(20):189–194 (In Russ.).
  15. *Изосимова А.Э.* Морфологические изменения костной ткани в условиях репаративной регенерации при применении интрамедуллярных фиксаторов с покрытием нитридами титана и гафния. *Известия Оренбургского государственного аграрного университета.* 2016;1(57):59–61.  
*Izosimova AE.* Morphological in bone tissues in the process of reparative regeneration as result of applying intramedullary fixators with titanium and hafnium nitrides coating. *Izvestia Orenburg state agrarian university.* 2016;1(57):59–61 (In Russ.).
  16. *Байриков И.М., Волова Л.Т., Щербовских А.Е., Долгушкин Д.А.* Особенности остеоинтеграции нетканого титанового материала со сквозной пористостью (экспериментальное исследование). *Современные проблемы науки и образования.* 2016;6:249.  
*Bayrikov IM, Volova LT, Scherbovskikh AE, Dolgushkin DA.* Features of osseointegration of titanium non-woven material with continuous porosity (experimental study). *Modern problems of science and education.* 2016;6:249 (In Russ.).
  17. *Васильюк В.П., Штраубе Г.И., Четвертных В.А.* Морфология костной ткани в условиях гранецентрированных кубических решеток кристалла титановых имплантатов в эксперименте. *Современные проблемы науки и образования.* 2018;4:159.  
*Vasilyuk VP, Shtraube GI, Chetvertnykh VA.* The morphology of bone tissue in conditions of face-centered cubic lattices of a crystal of titanium implants in the experiment. *Modern problems of science and education.* 2018;4:159 (In Russ.).
  18. *Tsukamoto I, Akagi M.* The Development of a Novel Bone Filler, Titanium Wire Ball. *Acta Med Okayama.* 2017;71(1):19–24. DOI: 10.18926/AMO/54821.
  19. *Тихилов Р.М., Шубняков И.И., Денисов А.О., Конев В.А., Гофман И.В., Михайлова П.М. и др.* Костная и мягкотканная интеграция пористых титановых имплантатов (экспериментальное исследование). *Травматология и ортопедия России.* 2018;24(2):95–107.  
*Tikhilov RM, Shubnyakov II, Denisov AO, Konev VA, Gofman IV, Mikhailova PM et al.* Bone and soft tissues integration in porous titanium implants (experimental research). *Traumatology and orthopedics of Russia.* 2018;24(2):95–107 (In Russ.). DOI: 10.21823/2311-2905-2018-24-2-95-107.
  20. *Almansoori AA, Choung HW, Kim B, Park JY, Kim SM, Lee JH.* Fracture of Standard Titanium Mandibular Reconstruction Plates and Preliminary Study of Three-Dimensional Printed Reconstruction Plates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2019;19:30940–1. DOI: 10.1016/j.joms.2019.07.016.
  21. *Augustine A, Augustine R, Hasan A, Raghuvveeran V, Rouxel D, Kalarikkal N et al.* Development of titanium dioxide nanowire incorporated poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) scaffolds for bone tissue engineering applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(8):96. DOI: 10.1007/s10856-019-6300-4.
  22. *Вагапова В.Ш., Мухаметов У.Ф., Рыбалко Д.Ю.* Сравнительная характеристика результатов применения имплантов из титановых сплавов различной модификации в травматологии и ортопедии. *Медицинский вестник Башкортостана.* 2012;7(5):68–71.  
*Vagapova VSh, Mukhametov UF, Rybalko DYU.* Comparative description of differently modified titanium alloys implants and their use in traumatology and orthopedy. *Bashkortostan medical journal.* 2012;7(5):68–71 (In Russ.).
  23. *Cruz MAE, Ramos AP.* Bioactive CaCO<sub>3</sub>/poly(acrylic acid)/chitosan hybrid coatings deposited on titanium. *Surface and Coatings Technology.* 2016;294:145–52. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2016.03.084
  24. *Cruz MAE, Ruiz GCM, Faria AN, Ramos A, Ciancaglini P, Zancanela D et al.* Calcium carbonate hybrid coating promotes the formation of biomimetic hydroxyapatite on titanium surfaces. *Applied Surface Science.* 2016;370:459–68. DOI: 10.1016/J.APSUSC.2015.12.250.
  25. *van Dijk IA, Beker AF, Jellema W, Nazmi K, Wu G, Wismeijer D et al.* Histatin 1 enhances cell adhesion to titanium in an implant integration model. *J Dent Res.* 2017;96(4):430–6. DOI: 10.1177/0022034516681761.
  26. *Geivelis MM, Lingen MW, Takemura A.* Evaluation of In Situ Hardening  $\beta$ -Tricalcium Phosphate/Poly(lactic-co-glycolide) Bone Substitute Used in Edentulous Ridge Preservation for Late Implant Placement: Case Series. *Clin Adv Periodontics.* 2019;9(2):55–8. DOI: 10.1002/cap.10050.
  27. *Oltean-Dan D, Dogaru GB, Tomoaia-Cotisel M, Apostu D, Mester A, Benea HR et al.* Enhancement of bone consolidation using high-frequency pulsed electromagnetic short-waves and titanium



- implants coated with biomimetic composite embedded into PLA matrix: in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:5799–816. DOI: 10.2147/IJN.S205880.
28. Weijie Zhang Icon, Lei Zhao, Jianzhong Ma, Chenguang Yang, Xiaochun Wang, Xiuying Pu. A kind of injectable Angelica sinensis polysaccharide(ASP)/hydroxyapatite (HAp) material for bone tissue engineering promoting vascularization, hematopoiesis, and osteogenesis in mice. *Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2018; 67(4):205–11.
  29. Vieira S, Vial S, Reis RL, Oliveira JM. Nanoparticles for bone tissue engineering. *Biotechnol Prog*. 2017;33(3):590–611. DOI: 10.1002/btpr.2469.
  30. Гурин А.Н., Федотов А.Ю., Деев Р.В., Комлев В.С. Направленная регенерация костной ткани с использованием барьерной мембраны на основе альгината натрия и октакальциевого фосфата. *Гены & Клетки*. 2013;VIII(4):70–77. Gurin AN, Fedotov AY, Deev RV, Komlev VS. Sodium alginate bioresorbable membrane and octacalcium phosphate biomaterial for guided bone regeneration. *Genes&Cells*. 2013;VIII(4):70–77 (In Russ.).
  31. Pilloni A, Nardo F, Rojas MA. Surgical Treatment of a Cemental Tear-Associated Bony Defect Using Hyaluronic Acid and a Resorbable Collagen Membrane: A 2-Year Follow-Up. *Clin Adv Periodontics*. 2019;9(2):64–9. DOI: 10.1002/cap.10053.
  32. Дружинина Т.В., Трофимов К.В., Найданов В.Ф., Ростовцев А.В., Бурков Д.В., Жулябин А.В. и др. Применение биодеградируемого материала для замещения костной ткани в травматологии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2014;13(5):209–215. Druzhinina TV, Trofimov KV, Naydanov VF, Rostovtzev AV, Burkov DV, Zhulyabin AV et al. Application of a biodegradable material for bone replacement in traumatology. *Bulletin of siberian medicine*, 2014;13(5):209–215 (In Russ.).
  33. Zerbinatti CC, Veiga DF, Oliveira MAB, Mundim FGL, Pereira RM, Azevedo F et al. Biceramic cement in the filling of bone defects in rats. *Acta Cir Bras*. 2019;34(6):e201900601. DOI: 10.1590/s0102-865020190060000001.
  34. Предеин Ю.А., Рерих В.В. Костные и клеточные имплантаты для замещения дефектов кости. Современные проблемы науки и образования. 2016;6:132. Predein YA, Rerikh VV. Bone and cellular implants for replacement bone defects. *Modern problems of science and education*. 2016;6:132 (In Russ.).
  35. Рерих В.В., Предеин Ю.А., Зайдман А.М., Ластевский А.Д., Батаев В.А., Никулина А.А. Экспериментальное обоснование применения остеотрансплантата при травматических дефектах позвоночника. *Хирургия позвоночника*. 2018;15(4):41–51. Rerikh VV, Predein YuA, Zaidman AM, Lastevsky AD, Bataev VA, Nikulina AA. Experimental substantiation of osteotransplant application in traumatic vertebral defects. *Hir. Pozvonoc*. 2018;15(4):41–51 (In Russ.). DOI: 10.14531/ss2018.4.41-51.
  36. Soares MQS, Van Dessel J, Jacobs R, Yaedú RYF, Sant'Ana E, da Silva Corrêa D et al. Morphometric evaluation of bone regeneration in segmental mandibular bone defects filled with bovine bone xenografts in a split-mouth rabbit model. *Int J Implant Dent*. 2019;5(1):32. DOI:10.1186/s40729-019-0187-1.
  37. Yamada M, Egusa H. Current bone substitutes for implant dentistry. *J Prosthodont Res*. 2018;62:152–61. DOI:10.1016/J.JPOR.2017.08.010.
  38. Стогов М.В., Смоленцев Д.В., Науменко З.С., Годовых Н.В., Гурин М.В., Киреева Е.А. и др. In vitro оценка антимикробной активности модифицированных костных ксеноматериалов. *Гений ортопедии*. 2019;25(2): 226–231. Stogov MV, Smolentsev DV, Naumenko ZS, Godovykh NV, Gurin MV, Kireeva EA et al. In vitro assessment of antimicrobial activity of modified bone xenomaterials. *Genij ortopedii*. 2019;25(2):226–231 (In Russ.). DOI: 10.18019/1028-4427-2019-25-2-226-231.
  39. Serrano Mendez CA, Lang NP, Caneva M, Ramirez Lemus G, Mora Solano G, Botticelli D. Comparison of allografts and xenografts used for alveolar ridge preservation. A clinical and histomorphometric RCT in humans. *Clinical implant dentistry and related research*. 2017;19:608–15. DOI:10.1111/CID.12490.
  40. Столяров М.В., Любовева Л.А., Московский А.В., Кандейкина Н.В. Иммуногистохимическое исследование дефекта челюстной костной ткани после проведения зубосохраняющих операций. *Вестник Мордовского университета*. 2016;26(4):533–547. Stolyarov MV, Lyubovtseva LA, Moskovskiy AV, Kandeykina NV. Immunohistochemical exploration of jaw bone tissue defect after toothprotecting operations. *Mordovia university bulletin*. 2016;26(4):533–547 (In Russ.).
  41. Деев Р.В., Цупкина Н.В., Бозо И.Я., Калигин М.С., Гребнев А.Р., Исаев А.А. и др. Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2011;VI(1):62–67. Deev RV, Tsupkina NV, Bozo IJ, Kaligin MS, Grebnev AR, Isaev AA et al. The tissue engineering bone: a methodological basis and biological properties. *Cell transplantology and tissue engineering*. 2011;VI(1):62–67 (In Russ.).
  42. Medvedeva NN, Zhukov EL, Inzhevatkin EV, Bezzabotnov VE. Antitumor Properties of Modified Detonation Nanodiamonds and Sorbed Doxorubicin on the Model of Ehrlich Ascites Carcinoma. *Bull Exp Biol Med*. 2016;160(3):372–5. DOI: 10.1007/s10517-016-3174-z.
  43. Ronzhin NO, Baron AV, Bondar VS, Gitelson II. Designing a reusable system based on nanodiamonds for biochemical determination of urea. *Dokl Biochem Biophys*. 2015;465:428–31. DOI: 10.1134/S1607672915060216.

#### Информация об авторе

Татьяна Николаевна Чекишева – ассистент кафедры анатомии и гистологии человека КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

#### Author information

Tatyana N. Chekisheva – Assistant, Department of Human Anatomy and Histology, V.F. Voino-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-6905-980X>

## Роль физических нагрузок в развитии атеросклеротических поражений сосудистой стенки

*А.М. Маркин<sup>1</sup>, Ю.В. Маркина<sup>1</sup>, В.Н. Сухоруков<sup>1,2,3</sup>, А.М. Хайлов<sup>1</sup>, А.Н. Орехов<sup>1,3,4</sup>*

<sup>1</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия

<sup>4</sup> Институт исследований атеросклероза, Сколковский инновационный центр, Москва, Россия

В обзоре рассматриваются основные механизмы повреждающего действия чрезмерных физических нагрузок на клеточные структуры эндотелия сосудов и развития связанных с этим процессом системных патологических состояний. Общепринятое мнение о пользе физической активности для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний не подвергается сомнению. Тем не менее сегодня широкое распространение получили различные тренировочные программы с дискуссионным соотношением пользы и вреда. Отличительными чертами такого типа физической активности являются высокая степень интенсивности физической нагрузки и большие тренировочные объемы. Нарушение режимов тренировки и отдыха при таком подходе к тренировкам часто приводит к развитию синдрома перетренированности. Понимание причин развития данного состояния на молекулярном и клеточном уровне позволит повысить эффективность планирования тренировочного процесса у соревнующихся атлетов и продлить спортивное долголетие пожилым спортсменам и любителям спорта.

**Ключевые слова:** атеросклероз, воспаление, чрезмерные физические нагрузки, артериальная ригидность.

**Для корреспонденции:** Александр Михайлович Маркин. E-mail: alexander.markin.34@gmail.com

**Для цитирования:** Маркин А.М., Маркина Ю.В., Сухоруков В.Н., Хайлов А.М., Орехов А.Н. Роль физических нагрузок в развитии атеросклеротических поражений сосудистой стенки. Клин. эксп. морфология. 2019;8(4):25–31. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.25-31

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-15-00010).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 24.10.2019. Получена после рецензирования 06.11.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## The role of physical activity in the development of atherosclerotic lesions of the vascular wall

*A.M. Markin<sup>1</sup>, Yu.V. Markina<sup>1</sup>, V.N. Sukhorukov<sup>1,2,3</sup>, A.M. Khaylov<sup>1</sup>, A.N. Orekhov<sup>1,3,4</sup>*

<sup>1</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center, Moscow, Russia

The main mechanisms of the damaging effect of excessive physical exertion on the cellular structures of the vascular endothelium and the development of systemic pathological conditions associated with this process are covered in this paper. The generally accepted view on the benefits of physical activity for the prevention of cardiovascular disease is not in doubt. However, today various training programs of debatable benefits and risks ratio are widely used. High intensity high volume training is the distinctive feature of this type of physical activity. Violation of the training and rest schedules in this approach often leads to the overtraining syndrome. Understanding the causes of this condition at the molecular and cellular levels may increase the efficiency of training planning for competing athletes and prolong sport participation of the elderly athletes and sports enthusiasts.

**Keywords:** atherosclerosis, inflammation, excessive exercise, arterial stiffness.

**Corresponding author:** Alexander M. Markin. Email: alexander.markin.34@gmail.com

**For citation:** Markin A.M., Markina Yu.V., Sukhorukov V.N., Khaylov A.M., Orekhov A.N. The role of physical activity in the development of atherosclerotic lesions of the vascular wall. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):25–31. (in Russ.) DOI:10.31088/CEM2019.8.4.25-31

**Funding.** This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No.19-15-00010).

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

Received 24.10.2019. Received in revised form 06.11.2019. Accepted 19.11.2019.

## Введение

Исследования последнего времени показывают высокий процент распространения коронарного атеросклероза среди спортсменов. Как оказалось, у этой группы более высокий показатель кальцификации коронарных артерий и атеросклеротических бляшек по сравнению с людьми, ведущими малоподвижный образ жизни. Установлено, что тяжесть данных поражений зависит от тренировочных объемов, выполняемых атлетом на протяжении всей жизни. Так, высокоинтенсивные тренировки приводят к увеличению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [1]. В большинстве случаев атеросклеротические поражения артерий длительно тренирующихся атлетов представляют собой кальцифицированные бляшки: относительно стабильные поражения с низким риском разрыва. Механизм, ответственный за образование подобных дефектов, на данный момент неизвестен. По всей видимости, существует зависимость риска развития ССЗ от вида дисциплины тренирующегося спортсмена. По данным V. Aengevaeren et al. [2], распространенность атеросклеротических поражений среди велосипедистов ниже по сравнению с занимающимися бегом атлетами. Причины таких различий неизвестны, особенно учитывая сходный тип физической нагрузки. Это говорит о сложности однозначной интерпретации влияния той или иной физической активности на процессы атерогенеза и развития связанных с ним заболеваний. В связи с этим для оценки вероятности развития атеросклероза у спортсменов необходим комплексный подход к диагностике, основанный на современных теориях развития атеросклероза.

*Эпидемиология и патогенез ССЗ.* Сердечно-сосудистые заболевания занимают ведущее место в статистике смертности населения развитых стран [3, 4]. В Российской Федерации это наиболее частая причина госпитализации, потери трудоспособности и смерти. Основными способами борьбы с развитием заболеваний данной группы и вызываемых ими осложнений являются антиатеросклеротическая терапия, направленная на снижение уровня холестерина в крови, и немедикаментозные методы профилактики, основанные на предупреждении развития заболевания путем изменения образа жизни [5]. Тем не менее в многочисленных исследованиях показано, что уровень холестерина не всегда четко коррелирует с развитием атеросклероза и риском развития осложнений и смерти [6, 7]. Именно поэтому во всем мире помимо широко используемых стратегий коррекции нарушений липидного обмена ведется разработка методов, основанных на противодействии развитию воспалительных процессов в стенке сосуда на клеточном уровне. О состоятельности такого метода свидетельствует теория локального воспаления, согласно которой старт развития атеросклеротического поражения начинается в интиме артерий крупного и среднего калибра, особенно в местах бифуркаций. Стенки сосудов в таких областях испытывают по-

вышенное напряжение вследствие турбулентного воздействия тока крови. Это вызывает повреждение эндотелиального слоя интимы, что сопровождается повреждением эндотелиальных клеток (ЭК), которые посредством продукции молекул адгезии привлекают в очаг повреждения лимфоциты и моноциты [8]. В то же время подвергшиеся модификации липопротеины низкой плотности (ЛПНП), например десиалированные ЛПНП [9, 10], способны проникать и накапливаться в субэндотелиальном слое артериальной стенки, где они дополнительно могут подвергаться окислению, превращаясь в окисленные ЛПНП (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL). Привлеченные эндотелиальными клетками моноциты в интимальном пространстве дифференцируются в макрофаги и поглощают oxLDL. Однако в случае нарушения метаболизма холестерина макрофаги трансформируются в пенистые клетки [11, 12].

При развитии атеросклеротической бляшки клетки, задействованные в патологическом процессе, высвобождают цитокины, хемокины, биологически активные липидные соединения и молекулы адгезии. Все это поддерживает и усиливает местное воспаление в стенке сосуда и провоцирует прогрессирование атеросклеротических поражений. Маркеры воспаления, принимающие участие в этом процессе, могут быть использованы в диагностике и прогнозировании развития ССЗ. По данным последних исследований, наиболее значимыми показателями являются значения С-реактивного белка (СРБ), TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-18, моноцитарного хемотаксического белка (MCP-1), CD40L, миелопероксидазы и ряд других белков и ферментов, участвующих в воспалении [13–16]. Согласно современной концепции, центральную роль в образовании и прогрессировании атеросклеротической бляшки играет активация каскадов иммунных и воспалительных реакций. В попытке оказать влияние на эти процессы в последнее время появилось множество новых стратегий лечения атеросклероза, основанных на проведении противовоспалительной терапии, как дополнение к общепринятым методам лечения, базирующимся на применении гиполипидемических и антигипертензивных препаратов [17, 18].

Запуск процесса развития атеросклеротической бляшки начинается с повреждения эндотелия стенки артерии от воздействия различных факторов: гидродинамического удара, повышенного уровня глюкозы и ЛПНП в крови, курения, гипертонии, медиаторов воспаления – цитокинов и хемокинов. Подобные влияния приводят к развитию эндотелиальной дисфункции, которая через цепь последовательных изменений ведет к развитию атеросклеротической бляшки [19].

*Риск развития атеросклероза и физическая активность.* Среди факторов риска развития атеросклероза, согласно Европейскому руководству по предотвращению сердечно-сосудистых заболеваний (European Guidelines on Cardiovascular Disease Prevention), находятся курение (наиболее опасный фактор), гиперлипид-

протеинемия (общий холестерин  $>5$  ммоль/л, ЛПНП  $>3$  ммоль/л, ЛП(а)  $>50$  мг/дл), артериальная гипертензия (систолическое АД  $>140$  мм рт. ст., диастолическое АД  $>90$  мм рт. ст.), сахарный диабет, ожирение, малоподвижный образ жизни (гиподинамия), эмоциональное перенапряжение, наследственная предрасположенность, гиперфибриногенемия, гомоцистеинурия и гомоцистеинемия. При этом кроме общеизвестных групп риска, подверженных развитию ССЗ, существует еще одна группа – профессиональные спортсмены и любители спорта.

Без сомнения, адекватные и дозированные физические нагрузки полезны для здоровья человека и состояния сердечно-сосудистой системы. Физическая активность уменьшает окислительный стресс в сосудах, модифицирует липидный профиль, ингибирует выработку макрофагами и моноцитами провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  [20, 21]. Активная пропаганда здорового образа жизни, а главное – доходность сектора фитнес-услуг способствуют увеличению числа лиц, посещающих тренажерные залы и фитнес-клубы [22].

С другой стороны, начиная с 1960-х годов и до сегодняшнего дня ведутся активные споры о взаимосвязи уровня и типа физической активности и сердечно-сосудистых заболеваний. Активно звучат предположения, что большие объемы упражнений способны ускорять развитие дисфункции эндотелия и провоцировать атеросклероз и ССЗ. Наибольшее количество исследований на эту тему посвящено оценкам уровня риска ССЗ у спортсменов подросткового возраста, атлетов высокого профессионального уровня и длительно тренирующихся людей среднего возраста [23–26], причем тяжелые тренировки можно наблюдать в любой группе атлетов вне зависимости от профессиональных навыков и тренировочного стажа. Отсутствие контроля со стороны квалифицированного тренера, специалиста по спортивной медицине и несоблюдение объемов тренировочных нагрузок часто приводят к развитию синдрома перетренированности.

В этой ситуации в крови происходит повышение уровня провоспалительных цитокинов: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-8 и IL-12p40 [27]. Обычно в течение двух недель их количество снижается до нормального, но при наличии дисбаланса между нагрузкой и восстановлением продолжает нарастать. Показано, что увеличение концентрации провоспалительных цитокинов, в частности IL-6, приводит к стрессу эндоплазматического ретикулаума клеток скелетных мышц, что, в свою очередь, может привести к запуску процесса апоптоза [28]. Индуцируемое цитокинами воспаление нарушает нормальные процессы функционирования митохондрий, их синтеза и митофагии [29], что также ведет к апоптозу. Перечисленные эффекты способствуют длительной циркуляции провоспалительных агентов в сосудистом русле, что может дополнительно стимулировать запуск каскада воспалительных реакций в месте повреждения эндотелия сосудов. Сосудистый

эндотелий выполняет роль клеточного барьера между интимой сосудов и различными веществами и клетками крови. Поддержание этой функции осуществляется путем синтеза ряда биологически активных соединений. Это вазодилататоры, вазоконстрикторы, а также гепарин, активаторы плазминогена, тромбомодулин, брадикинин, факторы роста и т.д. Перечисленные вещества регулируют транспорт растворенных веществ в клетки сосудистой стенки и рост этих клеток; участвуют в формировании внеклеточного матрикса, осуществляют защиту сосудов от неблагоприятного действия циркулирующих клеток и субстанций, регулируют хемотаксические, воспалительные и репаративные процессы в ответ на локальное повреждение [30].

Процесс повреждения сосудов связывают с предшествующим развитием эндотелиальной дисфункции, начинающейся с нарушения равновесия эндогенных вазодилататоров (NO, натрийуретический пептид типа C) и вазоконстрикторов (эндотелин-1, простагландин F $_{2\alpha}$ ). Среди перечисленных веществ наиболее интересен оксид азота (NO), обладающий помимо дилатирующих свойств противовоспалительной активностью. NO способен ингибировать синтез и экспрессию цитокинов и молекул адгезии, привлекающих моноциты к эндотелиальной поверхности и облегчающих их проникновение в сосудистую стенку, инициируя в нем атеросклеротический процесс [31, 32].

Нарушение гомеостаза в сосудистом эндотелии сопровождается выделением различных воспалительных и апоптотических факторов, синтезируемых иммунными клетками, активированными по воспалительному пути. Так, например, высокая концентрация TNF $\alpha$  может запустить процесс апоптоза клеток эндотелия сосудов посредством нарушения баланса между активностью эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и индуцируемой NO-синтазы (iNOS). Такое разобщение нормального функционирования данных ферментных комплексов приводит к появлению проапоптотической активности NO. В этом случае происходят образование избытка NO и его реакция с супероксид-анионом с последующим образованием пероксинитрита (ONOO). ONOO провоцирует дальнейшее развитие сосудистого окислительного стресса при спортивных нагрузках, который может являться дополнительным патогенетическим механизмом развития эндотелиальной дисфункции.

В крови атлетов обнаружена значительно более высокая концентрация активных форм кислорода и азота (ROS и NOS), а также 3-нитротирозина, TNF $\alpha$ , других провоспалительных цитокинов, окисленных липопротеинов низкой плотности (oxLDL) [33, 34]. Накопление этих продуктов приводит к повреждению эндотелия сосудов из-за запуска каскада свободнорадикальных реакций на мембранах клеток, что, в свою очередь, угнетает функцию эндотелиальных клеток, регуляцию внутриклеточной передачи сигналов и экспрессию генов [35].



Существует гипотеза, что развитие эндотелиальной дисфункции при физическом перенапряжении способно запускать реакцию запрограммированной гибели клеток путем дестабилизации физиологических процессов в интиме сосудов и активации пролиферативных процессов в эндотелии [36]. Маркером такого острого повреждения эндотелиального слоя сосудистой стенки и предиктором дальнейшего развития патологических изменений является циркулирующая в крови внеклеточная ДНК (вкДНК). вкДНК высвобождается в плазму при апоптозе эндотелиальных клеток и циркулирующих эндотелиальных клеток-предшественников (EPCs), а также при нетозе иммунных клеток. Тем не менее исследования, посвященные роли вкДНК в оценке состояния клеток сосудистой стенки, противоречивы. Сегодня сложно делать точные выводы о влиянии различных тренировочных режимов на механизм высвобождения вкДНК. Дискуссионным остается вопрос о влиянии воспалительных процессов на накопление вкДНК. Возможно, высвобождение вкДНК происходит как иммунная реакция на воспаление [37]. По всей видимости, существует два механизма: первый – резкое высвобождение большого количества вкДНК из нейтрофильных внеклеточных ловушек, экзосом, микровезикул и фрагментов ДНК с поверхности клеток как реакция на острый стресс, вызванный чрезмерной физической нагрузкой; второй – медленное постоянное высвобождение ДНК из-за апоптоза и некроза при хроническом стрессе. Подобное состояние наблюдается также при онкологических и аутоиммунных заболеваниях [38].

Анализ циркулирующей ДНК в плазме крови здоровых испытуемых показал, что ее количество не должно превышать 3,6–5,0 нг/мл, а состоит она из фрагментов средней длины ~180 пар нуклеотидов (п. н.). В таком виде вкДНК представлена в составе апоптотических телец, сформированных из клеток, подвергшихся апоптозу в физиологических условиях. Фрагменты ДНК размером более ~10 000 п.н. наблюдаются при разрушении клеток при некрозе [39, 40].

Определение уровня перечисленных молекул может служить эффективным индикатором воспаления, вызванного перетренированностью. Длительное существование подобных нарушений вызывает развитие дегенеративных процессов, затрагивающих главным образом внеклеточный матрикс эластических артерий и приводящих к изменению артериальной ригидности. Дальнейшее изменение соотношения белков внеклеточного матрикса – эластина и коллагена приводит к изменению механических свойств стенки сосуда, что запускает ряд каскадных механизмов воспалительного, протеазного и оксидативного сдвига и замыкает порочный круг. Последующие изменения приводят к развитию различных патологий, в том числе атеросклероза [41, 42].

*Оценка риска развития осложнений течения атеросклероза у атлетов.* Перечисленные выше показа-

тели можно использовать для оценки состояния атлета в попытке избежать развития угрожающих жизни состояний, вызванных чрезмерной нагрузкой. Среди них важной проблемой профессионального и любительского спорта является развитие синдрома внезапной смерти. Истинные причины во многих случаях остаются неизвестными, но ретроспективные исследования показывают определенную закономерность. В возрасте до 35 лет чаще всего причиной внезапной смерти становятся гипертрофическая кардиомиопатия и врожденные пороки сердца, у лиц старше 35 лет наиболее частая причина смерти – атеросклероз [43–45].

Предотвратить развитие угрожающих жизни осложнений у профессиональных спортсменов и любителей в возрасте после 35 лет позволит проведение качественного и многостороннего медицинского обследования. Так, в дополнение к сбору анамнеза и физикальному осмотру необходимо проведение инструментальных исследований с применением ЭКГ и эхокардиографии в покое, а также стресс-тестами (стресс-ЭКГ или стресс-эхокардиография). В зависимости от клинических потребностей возможно использование дополнительных тестов, таких как спироэргометрия, суточная ЭКГ, КТ, а для оценки наличия и степени атеросклеротических поражений – дуплексное сканирование магистральных артерий или компьютерная томография коронарных сосудов (кардио-КТ). Обязательны общий и биохимический анализ крови для определения уровня маркеров воспаления: количество лейкоцитов, С-реактивный белок, креатинин, креатинкиназа, аланинаминотрансфераза (АлТ), аспартатаминотрансфераза (АсТ), гамма-глутамилтрансфераза, лактатдегидрогеназа, отношение ЛПНП/ЛПВП, триглицериды, глюкоза, сывороточное железо, ферритин, кортизол, тиреотропный гормон (ТТГ), провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-8 и IL-12p40), вкДНК. Только комплексный подход позволит своевременно обнаружить ранние признаки патологических изменений, сохранить здоровье и продлить спортивное долголетие.

## Заключение

Увеличение показателя сердечно-сосудистых заболеваний среди разных групп населения остается одной из основных проблем для систем здравоохранения во всем мире. Последовательное развитие представлений о механизме атерогенеза позволяет применять новые методы диагностики, лечения и прогнозирования развития заболевания. Результаты инновационных исследований находят применение и в спортивной медицине. Повышенный уровень стрессовых воздействий на организм атлета и нарушение периодизации нагрузок и отдыха приводят к развитию синдрома перетренированности (overtraining syndrome). Это состояние вызвано локальным механическим и метаболическим повреждением мышц, воспалительной активацией лейкоцитов. На начальных этапах воспаление локализовано

на ограниченном участке мышечной ткани, но с течением времени при постоянном воздействии чрезмерной нагрузки острый процесс переходит в локальное хроническое воспаление. Следующим этапом становится запуск системного воспалительного процесса, который может провоцировать развитие различных патологических состояний, в частности атеросклероз. Таким образом, измерение уровня воспалительных медиаторов и маркеров повреждения эндотелиальных клеток позволит проводить качественную оценку риска развития атеросклероза у спортсменов и обеспечит комплексный подход к диагностике данного заболевания и предупреждению развития осложнений.

### Литература/References

1. *McHugh C, Hind K, Davey D, Wilson F.* Cardiovascular Health of Retired Field-Based Athletes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Orthop J Sports Med.* 2019;7(8):2325967119862750. DOI:10.1177/2325967119862750.
2. *Aengevaeren VL, Mosterd A, Sharma S, Braber TL, Thompson PD, Velthuis BK et al.* Coronary Atherosclerosis in Athletes: Exploring the Role of Sporting Discipline. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2019;12(8 Pt 1):1587–9. DOI:10.1016/j.jcmg.2019.01.002.
3. Атеросклероз. Современные представления и принципы лечения. Рекомендации ВНОК. Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2009;12(67). Atherosclerosis. Modern concepts and principles of treatment. GFCF recommendations. Scientific reports of BelSU. Series: Medicine. Pharmacy. 2009;12(67) (In Russ).
4. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации. V пересмотр. Российский кардиологический журнал. 2012;(4s1):4–32. Diagnostics and correction of lipid metabolism disorders in prevention and management of atherosclerosis. Russian recommendations. V revision. Russian journal of cardiology. 2012;(4s1):4–32 (In Russ.) DOI:10.15829/1560-4071-2012-4s1-4-32
5. *Жмеренецкий К.В., Ловрикова М.А.* Атеросклероз: Современные представления, принципы диагностики, подходы к лечению дислипидемий. Здравоохранение Дальнего Востока. 2015;2(64):90–97. *Zhmerenetsky KV, Lovrikova MA.* Atherosclerosis: Modern concepts, principles of diagnosis, approaches to the treatment of dyslipidemia. Healthcare in the Far East. 2015;2(64):90–97 (In Russ).
6. *Orekhov AN, Ivanova EA.* Introduction of the special issue Atherosclerosis and Related. Diseases. *Vessel Plus* 2017;1:163–5. DOI:10.20517/2574-1209.2017.33.
7. *Grechko AV, Sobenin IA.* Potential use of buccal epithelium for genetic diagnosis of atherosclerosis using mtDNA mutations. *Vessel Plus* 2017;1:145–50. DOI: 10.20517/2574-1209.2016.04.
8. *Koch M, Zerneck A.* The hemostatic system as a regulator of inflammation in atherosclerosis. *IUBMB Life.* 2014;66:735–44. DOI: 10.1002/iub.1333.
9. *Nikifirov NG, Zakiev ER, Elizova NV, Sukhorukov VN, Orekhov AN.* Multiple-modified low-density lipoprotein as atherogenic factor of patients' blood: Development of therapeutic approaches to reduce blood atherogenicity (Review). *Current Pharmaceutical Design.* 2017;23(6):932–6. DOI: 10.2174/1381612823666170124112918.
10. *Alipov VI, Sukhorukov VN, Karagodin VP, Grechko AV, Orekhov AN.* Chemical composition of circulating native and desialylated low density lipoprotein: what is the difference? *Vessel Plus.* 2017;1:107–15. DOI: 10.20517/2574-1209.2017.20.
11. *Pirillo A, Norata GD, Catapano AL.* LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:152786. DOI: 10.1155/2013/152786.
12. *Tabas I, Lichtman AH.* Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis. *Immunity.* 2017;47:621–34. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.09.008.
13. *Taleb S.* Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2016;109(12):708–15. DOI: 10.1016/j.acvd.2016.04.002.
14. *Zakynthinos E, Pappa NJ.* Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *Cardiol.* 2009;53(3):317–33. DOI: 10.1016/j.jjcc.2008.12.007.
15. *Chistiakov DA, Melnichenko AA, Grechko AV, Myasoedova VA, Orekhov AN.* Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol.* 2018;104(2):114–24. DOI: 10.1016/j.yexmp.2018.01.008.
16. *Gowdar S, Syal S, Chhabra L.* Probable protective role of diabetes mellitus in takotsubo cardiomyopathy: a review. *Vessel Plus.* 2017;1:129–36. DOI: 10.20517/2574-1209.2017.12.
17. *Li B, Li W, Li X, Zhou H.* Inflammation: A Novel Therapeutic Target/Direction in Atherosclerosis. *Curr Pharm Des.* 2017;23(8):1216–27. DOI:10.2174/1381612822666161230142931.
18. *Chistiakov DA, Grechko AV, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Orekhov AN.* The role of monocytosis and neutrophilia in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1366–82. DOI:10.1111/jcmm.13462.
19. *Koenig W.* Inflammation and coronary heart disease: an overview. *Cardiol Rev.* 2001;9(1):31–5. DOI: 10.1097/00045415-200101000-00007.
20. *Ribeiro F, Alves AJ, Duarte JA, Oliveira J.* Is exercise training an effective therapy targeting endothelial dysfunction and vascular wall inflammation? *International Journal of Cardiology.* 2010;141:214–21. DOI: 10.1016/j.ijcard.2009.09.548.
21. *Urschel K, Cicha I.* TNFα in the cardiology system: From physiology to therapy. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research.* 2015;7:9–25. DOI:10.2147/IJICMR.S64894.
22. *Ефремова М.В., Чкалова О.В., Бошман Т.К.* Анализ российского рынка фитнес-услуг. Экономический анализ: теория и практика. 2015;21(420):25–37. *Efremova MV, Chkalova OV, Bosman TK.* Analysis of the Russian market of fitness services. Economic analysis: theory and practice. 2015;21(420):25–37 (In Russ.).
23. *Spain DM, Bradess VA.* Occupational physical activity and the degree of coronary atherosclerosis in “normal” men. A post-mortem study. *Circulation.* 1960;22:239–42. DOI:10.1161/01.cir.22.2.239.
24. *Aengevaeren VL, Mosterd A, Braber TL, Prakken NHJ, Doevendans PA, Grobbee DE et al.* Relationship Between Lifelong

- Exercise Volume and Coronary Atherosclerosis in Athletes. *Circulation*. 2017;136(2):138–48. DOI: 10.1161/circulationaha.117.027834.
25. Nystoriak MA, Bhatnagar A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:135. DOI:10.3389/fcvm.2018.00135.
  26. Demirel A, Baykara M, Koca TT, Berk E, Gençay ÖA. Comparison of vascular arterial stiffness parameters of adolescent wrestlers with healthy subjects: Is heavy training harmful for wrestlers? *J Back Musculoskelet Rehabil*. 2019;32(1):155–60. DOI: 10.3233/BMR-171083.
  27. Lee EC, Fragala MS, Kavouras SA, Queen RM, Pryor JL, Casa DJ. Biomarkers in Sports and Exercise: Tracking Health, Performance, and Recovery in Athletes. *J Strength Cond Res*. 2017;31(10):2920–37. DOI:10.1519/JSC.0000000000002122.
  28. Pinto AP, da Rocha AL, Kohama EB, Gaspar R, Simabuco F, Frantz F et al. Exhaustive acute exercise-induced ER stress is attenuated in IL-6 knockout mice. *J. Endocrinol*. 2019;240(2):181–93. DOI: 10.1530/JOE-18-0404.
  29. da Rocha AL, Pinto AP, Kohama EB, Pauli JR, de Moura LP, Cintra DE et al. The proinflammatory effects of chronic excessive exercise. *Cytokine*. 2019;119:57–61. DOI:10.1016/j.cyt.2019.02.016.
  30. Green DJ, Hopman MT, Padilla J, Laughlin MH, Thijssen DH. Vascular Adaptation to Exercise in Humans: Role of Hemodynamic Stimuli. *Physiol Rev*. 2017;97(2):495–528. DOI:10.1152/physrev.00014.2016.
  31. Попова А.А., Березикова Е.Н., Маянская С.Д. Эндотелиальная дисфункция и механизмы ее формирования. *Сибирское медицинское обозрение*. 2010;64(4):7–11.  
Popova AA, Berezikova EN, Mayanskaya SD. Mechanism of endothelial dysfunction development. *Siberian medical review*. 2010;64(4):7–11 (In Russ.).
  32. Дорофиевко Н.Н. Роль сосудистого эндотелия в организме и универсальные механизмы изменения его активности (обзор литературы). *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2018;68:107–116.  
Dorofienko NN. The role of vascular endothelium in the organism and the universal mechanisms of changing its activity (review). *Bulletin physiology and pathology of respiration*. 2018;68:107–116 (In Russ.). DOI: 10.12737/article\_5b1a0351210298.18315210.
  33. Borges GF, Rama L, Pedreiro S, Alves F, Santos A, Massart A et al. Differences in plasma cytokine levels between elite kayakers and nonathletes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:370354. DOI:10.1155/2013/370354.
  34. Zembron-Lacny A, Tylutka A, Zeromska A, Kasperska A, Wolny-Rokicka E. Does High Volume of Exercise Training Increase Aseptic Vascular Inflammation in Male Athletes? *Am J Mens Health*. 2019;13(3):1557988319858838. DOI:10.1177/1557988319858838.
  35. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1591–619. DOI:10.1111/bph.13517.
  36. Лопатин З.В., Василенко В.С., Карповская Е.Б. Роль повреждающих эндотелий факторов в патогенезе кардиомиопатии перенапряжения у спортсменов игровых видов спорта. *Педиатр*. 2018;9(6):57–62.  
Lopatin ZV, Vasilenko VS, Karpovskaya EB. Role of endothelium damage factors in the pathogenesis of cardiomyopathy surge in athletes sports. *Pediatrician*. 2018;9(6):57–62 (In Russ.). DOI: 10.17816/PED9657-62.
  37. Оттева Э.Н., Клинова Е.В., Гарбузова О.Г., Исакова В.Н., Бандурко Е.В. Артериальная ригидность — маркер развития сердечно-сосудистых заболеваний. *Клиническая медицина*. 2012;90(1):4–12.  
Otteva EN, Klinkova EV, Garbuzova OG, Isakova VN, Bandurko EV. Arterial stiffness is a marker for the development of cardiovascular disease. *Clinical medicine*. 2012;90(1):4–12 (In Russ.).
  38. Palombo C, Kozakova M. Arterial stiffness, atherosclerosis and cardiovascular risk: Pathophysiologic mechanisms and emerging clinical indications. *Vascular Pharmacology*. 2016;77:1–7. DOI:10.1016/j.vph.2015.11.083.
  39. Fatouros IG, Jamurtas AZ. Insights into the molecular etiology of exercise-induced inflammation: opportunities for optimizing performance. *J Inflamm Res*. 2016;9:175–86. DOI:10.2147/JIR.S114635.
  40. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating Cell-Free DNA. *Sports Medicine*. 2012;42(7):565–86. DOI:10.2165/11631380-000000000-00000.
  41. Pokrywka A, Zembron-Lacny A, Baldy-Chudzik K, Orysiak J, Sitkowski D, Banach M. The influence of hypoxic physical activity on cfDNA as a new marker of vascular inflammation. *Arch Med Sci*. 2015;11(6):1156–63. DOI:10.5114/aoms.2015.56341.
  42. Vittori LN, Tarozzi A, Latessa PM. Circulating Cell-Free DNA in Physical Activities. *Methods in Molecular Biology*. 2019;1909:183–97. DOI:10.1007/978-1-4939-8973-7\_14.
  43. Amsterdam EA. Sudden Death during Exercise. *Cardiology*. 1990;77(5):411–7. DOI:10.1159/000174630.
  44. Suárez-Mier MP, Aguilera B, Mosquera RM, Sánchez-de-León MS. Pathology of sudden death during recreational sports in Spain. *Forensic Sci Int*. 2013;226(1–3):188–96. DOI:10.1016/j.forsciint.2013.01.016.
  45. Bohm P, Scharhag J, Meyer T. Data from a nationwide registry on sports-related sudden cardiac deaths in Germany. *Eur J Prev Cardiol*. 2016;23(6):649–56. DOI:10.1177/2047487315594087.

### Информация об авторах

Александр Михайлович Маркин – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микробиологии НИИ морфологии человека.

Юлия Владимировна Маркина – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микробиологии НИИ морфологии человека.

Василий Николаевич Сухоруков – младший научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микроэкологии НИИ морфологии человека; научный сотрудник лаборатории медицинской генетики НМИЦ кардиологии; младший научный сотрудник НИИ общей патологии и патофизиологии.

Антон Михайлович Хайлов – младший научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микроэкологии НИИ морфологии человека.

Александр Николаевич Орехов – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории инфекционной патологии и молекулярной микроэкологии НИИ морфологии человека; директор института исследований атеросклероза, Сколковский инновационный центр; заведующий лабораторией ангиопатологии НИИ общей патологии и патофизиологии.

#### Author information

Alexander M. Markin – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Infectious Pathology and Molecular Microecology, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-6649-7924>

Yulia V. Markina – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Infectious Pathology and Molecular Microecology, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-3781-6340>

Vasily N. Sukhorukov – Junior Researcher, Laboratory of Infectious Pathology and Molecular Microecology, Research Institute of Human Morphology; Junior Researcher, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology; Researcher, Laboratory of Medical Genetics, National Medical Research Center of Cardiology.

<https://orcid.org/0000-0002-0312-3773>

Anton M. Khaylov – Junior Researcher, Laboratory of Infectious Pathology and Molecular Microecology, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0001-5465-2563>

Alexander N. Orekhov – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Senior Researcher, Laboratory of Infectious Pathology and Molecular Microecology, Research Institute of Human Morphology; Director of the Institute for Atherosclerosis Research, Skolkovo Innovative Center; Head of the Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology.

<https://orcid.org/0000-0002-6495-1628>



## Выявление альфа-синуклеина в обонятельных луковицах мыши в онтогенезе *in vivo* и в органотипической культуре

Д.Н. Воронков, А.А. Лыжин, М.Р. Капкаева, Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспеков

ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

**Введение.** Агрегация альфа-синуклеина (a-Syn) считается причиной нейродегенерации при болезни Паркинсона. Накопление и агрегация a-Syn в обонятельных луковицах (ОЛ) предположительно приводят к нарушениям обоняния при паркинсонизме. Вместе с тем функция a-Syn и его локализация в ОЛ в норме требуют уточнения.

**Цель исследования** – охарактеризовать распределение a-Syn в онтогенезе ОЛ и оценить адекватность культивирования эксплантатов ОЛ как модельной системы для изучения патогенеза болезни Паркинсона.

**Материалы и методы.** Исследовали обонятельные луковицы эмбрионов беспородных мышей на 17-й и 19-й день внутриутробного развития и у новорожденных мышей в возрасте 2 и 7 дней. Экспланты ОЛ мышей 17-го эмбрионального дня и 2-го постнатального дня культивировали 24 часа в роллерной установке. Иммуногистохимическим методом исследовали локализацию a-Syn, синаптофизина и тирозингидроксилазы в обонятельных луковицах.

**Результаты.** Экспрессия a-Syn, синаптофизина и тирозингидроксилазы обнаруживалась в периферических слоях обонятельных луковиц и менялась по мере их созревания, однако локализация этих белков совпадала лишь частично. На 2-й день постнатального развития a-Syn выявляли в телах и отростках нейронов митрального слоя и в обонятельных клубочках. К 7-му дню a-Syn выявлялся преимущественно в пресинаптических окончаниях в обонятельных клубочках. В органотипической культуре организация ОЛ соответствовала их нативной структуре.

**Выводы.** Экспрессия a-Syn в развивающихся ОЛ связана с формированием обонятельных клубочков и созреванием клеток митрального слоя, а его распределение в норме согласуется с особенностями вовлечения обонятельных структур в нейродегенеративный процесс при болезни Паркинсона. Полученные данные демонстрируют возможность использования органотипических культур ОЛ для моделирования патологических процессов при болезни Паркинсона.

**Ключевые слова:** альфа-синуклеин, обонятельные луковицы, онтогенез, органотипическая культура.

**Для корреспонденции:** Дмитрий Николаевич Воронков. E-mail: voronkov@neurology.ru

**Для цитирования:** Воронков Д.Н., Лыжин А.А., Капкаева М.Р., Худоевков Р.М., Хаспеков Л.Г. Выявление альфа-синуклеина в обонятельных луковицах мыши в онтогенезе *in vivo* и в органотипической культуре. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):32–41. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.32-41

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Научного центра неврологии. Номер госрегистрации АААА-А17-117030910135-3.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 09.09.2019. Получена после рецензирования 15.10.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## Alpha-synuclein detection in olfactory mouse bulbs in ontogenesis *in vivo* and in the organotypic culture

D.N. Voronkov, A.A. Lyzhin, M.R. Kapkaeva, R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

**Introduction.** Alpha-synuclein (a-Syn) aggregation is considered as a cause of neurodegeneration in Parkinson's disease. Accumulation and aggregation of a-Syn in olfactory bulbs (OB) presumably leads to olfactory impairment in parkinsonism. However, the function of a-Syn and its localization in intact OB require more detailed research. The aim of the study was to characterize distribution of a-Syn in developing OB, and to assess the adequacy of OB explants cultivation as a model system for studying the pathogenesis of Parkinson disease.

**Materials and methods.** Mice OB were studied on 17 and 19 embryonic days and in postnatal 2 and 7 days. Explants of OB on 17-th embryonic day and 2nd postnatal day were cultured for 24 hours in roller culture.

apparatus. Localization of  $\alpha$ -Syn, synaptophysin and tyrosine hydroxylase were studied by immunohistochemical method.

**Results.** Expression of  $\alpha$ -Syn, synaptophysin and tyrosine hydroxylase was found in the peripheral layers of olfactory bulbs and changed under development, however, the localization of these proteins coincided only partially. On day 2 of postnatal development,  $\alpha$ -Syn was detected in the bodies and processes of neurons in the mitral layer and in the olfactory glomeruli. At day 7,  $\alpha$ -Syn was detected predominantly in the presynaptic endings in the olfactory glomeruli. In organotypic culture, the organization of OB corresponded to their native structure. **Conclusions.** In the developing OB  $\alpha$ -Syn expression is associated with the formation of olfactory glomeruli and maturation of mitral layer cells. Distribution of  $\alpha$ -Syn in intact OB consistent with the pattern of olfactory structures involvement in the neurodegenerative progression in Parkinson's disease. Moreover we demonstrate the possibility of using organotypic OB cultures for modeling pathological processes in Parkinson disease.

**Key words:** alpha-synuclein, olfactory bulbs, ontogenesis, organotypic culture.

**Corresponding author:** Dmitry N. Voronkov. E-mail: voronkov@neurology.ru

**For citation:** D.N. Voronkov, A.A. Lyzhin, M.R. Kapkaeva, R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov. Alpha-synuclein detection in olfactory mouse bulbs in ontogenesis in vivo and in the organotypic culture. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):32–41. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.32-41

**Funding.** The work was performed within the framework of the state assignment of Research center of neurology No. AAAA-A17-117030910135-3.

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

**Received** 09.09.2019. **Received in revised form** 15.10.2019. **Accepted** 19.11.2019.

## Введение

Белок  $\alpha$ -синуклеин ( $\alpha$ -Syn), состоящий из 140 аминокислот, относится к белкам неглобулярной конформации и не имеет выраженной вторичной структуры. Подобные белки участвуют в белок-белковых взаимодействиях, вследствие чего становятся структурированными при связи с другими белками. В норме в центральной нервной системе  $\alpha$ -Syn обнаруживается в нервных окончаниях и составляет около 1% общего белка головного мозга [1]. Вероятно, что в нейронах  $\alpha$ -Syn связан с мембраной синаптических везикул, участвует в контроле их транспорта и вовлечен в регуляцию синаптической передачи, а также в синаптогенез и развитие сенсорных систем [2, 3]. Показана экспрессия  $\alpha$ -Syn разными популяциями нейронов, в том числе дофаминергическими, – наиболее уязвимыми при болезни Паркинсона (БП). Высокая экспрессия синуклеина обнаруживается в содержащих тирозингидроксилазу нейронах дорсального моторного ядра вагуса, черной субстанции, обонятельных лукович (ОЛ) [4–6].

Общепризнано, что одним из основных звеньев патогенетического процесса при БП является накопление и агрегация в нейронах токсических фибриллярных форм  $\alpha$ -Syn. Предполагают, что этот процесс инициируется в периферических отделах нервной системы, в частности в структурах обонятельного анализатора, в том числе ОЛ, что может быть причиной нарушений обоняния, которые опережают появление двигательных симптомов у пациентов с БП и могут служить одним из ранних признаков заболевания [7].

Известно, что ОЛ наряду с черной субстанцией содержат дофаминергические нейроны, однако данные об их роли в патогенезе обонятельных нарушений неоднозначны [8, 9]. Так, при аутопсийных исследованиях

в ОЛ пациентов с БП обнаружены синуклеинпозитивные патологические агрегаты и уменьшение размеров обонятельных клубочков (гломерул) [10, 11]. В эксперименте интраназальное введение нейротоксических индукторов паркинсонизма вызывало накопление  $\alpha$ -Syn, деструкцию и дисфункцию перигломерулярных дофаминовых нейронов в ОЛ и повреждение черной субстанции [12, 13]. В то же время разрушение черной субстанции у животных, согласно ряду авторов, приводит к нарушению миграции дофаминовых нейронов, а их количество в ОЛ увеличивается [14, 15]. По другим данным, обонятельный дефицит при повреждении черной субстанции связан с повреждением нигро-олифакторных проекций и проявлением дисфункции митральных нейронов [16]. Имеются сообщения и об отсутствии обонятельных нарушений в эксперименте, в том числе на генетических моделях БП [17].

Таким образом, участие перигломерулярных дофаминергических нейронов и роль агрегации  $\alpha$ -Syn в патогенезе обонятельных нарушений при БП остаются неясными. Кроме того, локализация  $\alpha$ -Syn в обонятельных структурах и его функциональные свойства детально не исследованы. Следовательно, для дальнейшего выяснения механизмов патогенеза БП, опосредуемых агрегацией  $\alpha$ -Syn, необходимо расширение представлений о его распределении в центральной нервной системе, а также о роли в онтогенезе и формировании синапсов. В связи с этим актуальна разработка новых экспериментальных моделей, одной из которых может быть органотипическая культура ткани ОЛ, позволяющая в контролируемых условиях и в сопоставлении с данными *in vivo* исследовать отдельные популяции нейронов, используя преимущества тканевой культуры как модельной системы. Несмотря на то, что разные

варианты органотипических культур эмбриональных и постнатальных ОЛ были описаны ранее и продемонстрированы их морфологические, электрофизиологические и ультраструктурные особенности [18–20], мы не обнаружили данных об экспрессии  $\alpha$ -Syn и развитии дофаминергических перигломерулярных нейронов в органотипических культурах ОЛ.

Целью настоящей работы было охарактеризовать распределение  $\alpha$ -Syn в структурах развивающихся ОЛ, а также оценить адекватность использования культивированных эксплантатов ОЛ для изучения патогенеза БП.

### Материалы и методы

Для морфологического исследования ОЛ *in vivo* использовали эмбрионы беспородных мышей, на 17-й (E17) и 19-й (E19) день внутриутробного развития ( $n=5$  для каждого срока) и новорожденных мышей в возрасте 2 и 7 дней (P2,  $n=5$  и P7,  $n=3$ ). Полученные ОЛ фиксировали погружением в смесь формалина, этанола и уксусной кислоты (2:7:1) и переносили в 70% этанол, затем обезживали в растворах этанола восходящей концентрации и абсолютизированным изопропанолом, после чего проводили через хлороформ и пропитывали парафином. Тотальные парафиновые срезы ОЛ толщиной 12 мкм готовили на санном микротоме Leica SR2000 (Германия), используя нож для твердых образцов. Для морфологического исследования животных выводили из эксперимента декапитацией. Манипуляции проводили в соответствии с регламентирующими документами (Принципы надлежащей лабораторной практики 2009, ГОСТ Р 53434-200 и рекомендации EC Euthanasia of experimental animals, 1997, ISBN 92-827-9694-9) решением локального этического комитета № 2-5/19 от 20 февраля 2019 года.

Для культивирования ОЛ от E17 ( $n=5$ ) и P2 ( $n=5$ ) помещали во флаконы с питательной средой и инкубировали в термостатируемой роллерной установке [21] целиком, в оболочке, чтобы воспрепятствовать распаду ОЛ. Питательная среда содержала 90% минимальной среды Игла на солях Эрла, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамина и 10 mM буфера HEPES, pH 7,2–7,4. В каждый флакон помещали по 3–5 ОЛ и культивировали при температуре +35°C в течение 24 часов. Затем эксплантаты обрабатывали для морфологического исследования так же, как и нативные ОЛ, и готовили из них срезы толщиной 5–7 мкм.

Иммуногистохимическое исследование срезов ОЛ проводили с применением мышинных моноклональных антител к синаптофизину (Dako, Дания), кроличьих поликлональных антител к тирозингидроксилазе (TH, Sigma, Германия), мышинных моноклональных антител к глиофибрилярному белку (GFAP, Sigma, Германия), конъюгированных с флуорохромом Cy3, кроличьих моноклональных антител к  $\alpha$ -Syn (Sigma, Германия) и мышинных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток (PCNA, Abcam, Великобритания).

Связывание антител выявляли с помощью соответствующих вторичных антител (F(ab')<sub>2</sub> фрагментов IgG), меченных флуорохромами CF488 или CF555 (Sigma, Германия). Часть срезов для выявления TH окрашивали иммунопероксидазным методом, используя набор EXTRA3 KIT (Sigma, Германия). Перед инкубацией первичных антител проводили тепловую обработку срезов в цитратном буфере (0,1M, pH 6,0, 90–95°C) в течение 10 минут в микроволновой печи, контролируя температуру между повторными включениями. Иммунофлуоресцентное окрашивание осуществляли по рекомендациям производителя антител, негативный контроль окрашивания проводили без использования первичных антител. Срезы заключали в среду EverBright (Biotium, США) и исследовали под микроскопом Nikon Eclipse Ni-u (Япония). Микрофотографии получали при помощи цифровой камеры Nikon DS-Qi.

Измерения интенсивности окрашивания на  $\alpha$ -Syn в гломерулярном слое проводили на 5–7 срезах от трех животных из каждой исследованной группы, с помощью программы NIS Elements с коррекцией фонового окрашивания, выделяя при помощи графического планшета область интереса на изображениях, полученных при одинаковых настройках микроскопа. Статистический анализ результатов проводили в программе StatSoft Statistica 7.0, используя непараметрический тест Краскелла–Уоллиса ANOVA, в связи с отклонением выборки от нормального распределения.

### Результаты

На 17-й день эмбрионального развития ОЛ содержали формирующиеся гранулярный, митральный и редкоклеточный плексиформный слои. Сходная картина наблюдалась и у ОЛ от E19. Обонятельные клубочки отчетливо выявлялись к сроку P2 (рис. 1). Дофаминергические TH-позитивные нейроны в ОЛ у эмбрионов E17 располагались по периферии обонятельных лукович, однако гломерулярный слой еще не был сформирован. У мышей к сроку P2 перигломерулярные TH-позитивные нейроны локализовались вокруг клубочков и формировали своими отростками сеть внутри гломерул (рис. 2).

Синаптофизин в ОЛ эмбрионов E17 преимущественно выявлялся в нейропиле развивающихся слоев – плексиформном, гломерулярном и в нервных окончаниях вокруг клеток митрального слоя, тогда как у мышей P2 наибольшая его экспрессия наблюдалась в обонятельных клубочках (рис. 2).

Экспрессия  $\alpha$ -Syn, как и синаптофизина, обнаруживалась в периферических слоях ОЛ и менялась по мере их созревания, однако локализация этих белков совпадала лишь частично, так как  $\alpha$ -Syn в отличие от синаптофизина обнаруживался и в перикарионе нейронов развивающихся ОЛ. Помимо этого антитела к  $\alpha$ -Syn связывались с клетками обонятельного эпителия.

По мере формирования ОЛ наблюдался пик экспрессии  $\alpha$ -Syn в раннем постнатальном периоде. Ин-



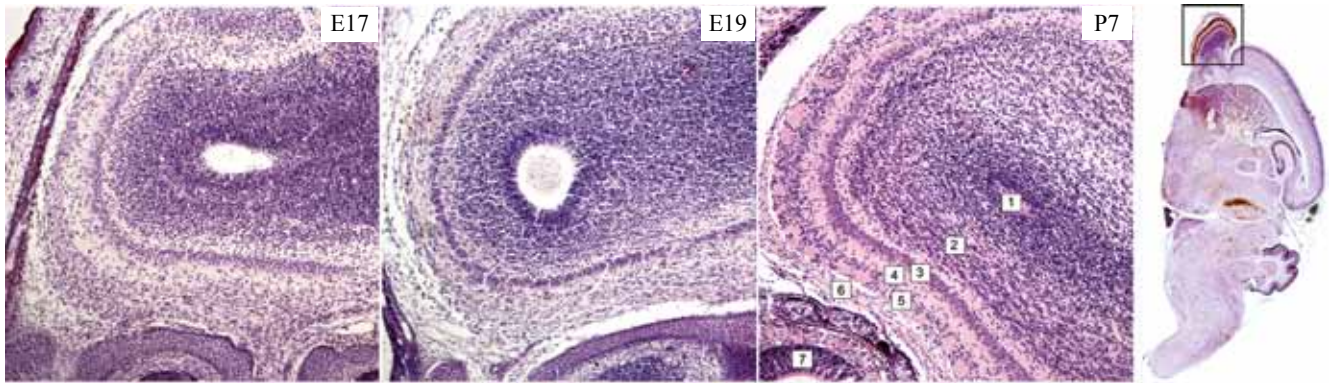


Рис. 1. Развитие слоев обонятельных луковиц мыши в эмбриональном и постнатальном периоде. E17, E19 – 17-й и 19-й день эмбрионального развития, соответственно, P7 – 7-й постнатальный день. Окрашивание гематоксилином и эозином, объектив  $\times 10$ . На малом увеличении (объектив  $\times 0,75$ ) показан мозг мыши 2-го постнатального дня (иммунопероксидазная реакция на тирозингидроксилазу – коричневый). Обонятельная луковица обведена квадратом. Обозначения: 1 – обонятельный желудочек, 2 – гранулярные слои, 3 – митральный слой, 4 – плексиформный слой, 5 – гломерулярный слой, 6 – обонятельный нерв, 7 – обонятельный эпителий

Fig. 1. Developing of the olfactory bulbs layers in embryonic and postnatal period. E17, E19 – embryonic days, P7 – 7th postnatal day. Haematoxylin-eosine staining.  $\times 10$  lens magnification. At low magnification ( $\times 0,75$  lens) the 2nd postnatal brain is shown (IHC anti-tyrosine hydroxylase staining, brown). Olfactory bulb outlined by square. Legend: 1 – olfactory ventricle, 2 – granular layers, 3 – mitral cell layer, 4 – plexiform layer, 5 – glomerular layer, 6 – olfactory nerve, 7 – olfactory epithelium

тенсивность иммунофлуоресцентного окрашивания на  $\alpha$ -Syn в гломерулярном слое значимо увеличивалась (на 38,2%, K-W ANOVA  $H(2, N=85)=7,69$ ;  $p=0,02$ ) ко 2-му постнатальному дню по сравнению с E17. На 7-й постнатальный день интенсивность окрашивания на  $\alpha$ -Syn вновь снижалась и была выше лишь на 11,6% по сравнению с E17. Наряду с усилением экспрессии  $\alpha$ -Syn изменялась и его внутриклеточная локализация. На 2-й день постнатального развития интенсивно окрашивались тела и отростки нейронов в митральном слое, а также в обонятельных клубочках (рис. 2), тогда как к 7-му дню окрашивание тел нейронов снижалось и  $\alpha$ -Syn выявлялся преимущественно в обонятельных клубочках. Следовательно, пик экспрессии  $\alpha$ -Syn в ОЛ и его наибольшее содержание в цитоплазме митральных нейронов приходится на этап формирования гломерулярного слоя, а по мере их дифференцировки цитоплазматическая локализация сменяется пресинаптической.

При органотипическом культивировании клеточная организация ОЛ соответствовала их нативной структуре. В эксплантатах, полученных от E17, после 24 часов *in vitro* можно было выделить соответствующие слои, характеризующиеся высокой экспрессией синаптофизина (рис. 3), хотя в центральной части эксплантатов, соответствующей гранулярному и митральным слоям, клетки были разрежены. Нейроны, содержащие PCNA, были синуклеиннегативными и обнаруживались в периферических слоях эксплантатов, тогда как в нативных ОЛ их значительное количество сосредоточено в области рострального миграционного потока и вблизи обонятельного желудочка, в центральной части ОЛ. Локализация GFAP соответствовала выявленным сло-

ям: во внутренней части эксплантатов астроциты формировали радиальные отростки, а в наружной части располагался поверхностный, пиальный слой астроглии. У дофаминергических нейронов прослеживалось радиальное направление отростков, что было нехарактерно для нативных ОЛ.

Структура эксплантатов, полученных от P2, после 24 часов культивирования в целом сохранялась (рис. 4), а перигломерулярные дофаминергические нейроны и глиальные клетки не отличались от нативных. Гломерулярный слой интенсивно окрашивался на  $\alpha$ -Syn и синаптофизин, однако отмечалась инволюция обонятельных клубочков, то есть снижение их размеров и разрежение слоя.  $\alpha$ -Syn был локализован преимущественно пресинаптически, а его цитоплазматическая локализация в митральных клетках была существенно менее выражена по сравнению с нативными ОЛ на том же сроке развития.

## Обсуждение

Полученные результаты демонстрируют, что локализация  $\alpha$ -Syn в развивающихся ОЛ тесно связана с формированием синаптических структур в гломерулах, что подтверждается совместным выявлением синаптофизина, локализация которого отражает динамику формирования синаптических контактов. Аналогичная закономерность ранее была обнаружена при развитии неокортекса [2, 22]. Выявленные нами изменения внутриклеточной локализации  $\alpha$ -Syn согласуются с данными, полученными на культурах клеток гиппокампа [23], где по мере дифференцировки нейронов этот белок вначале локализовался в их телах, а затем накапливался в пресинаптических окончаниях.



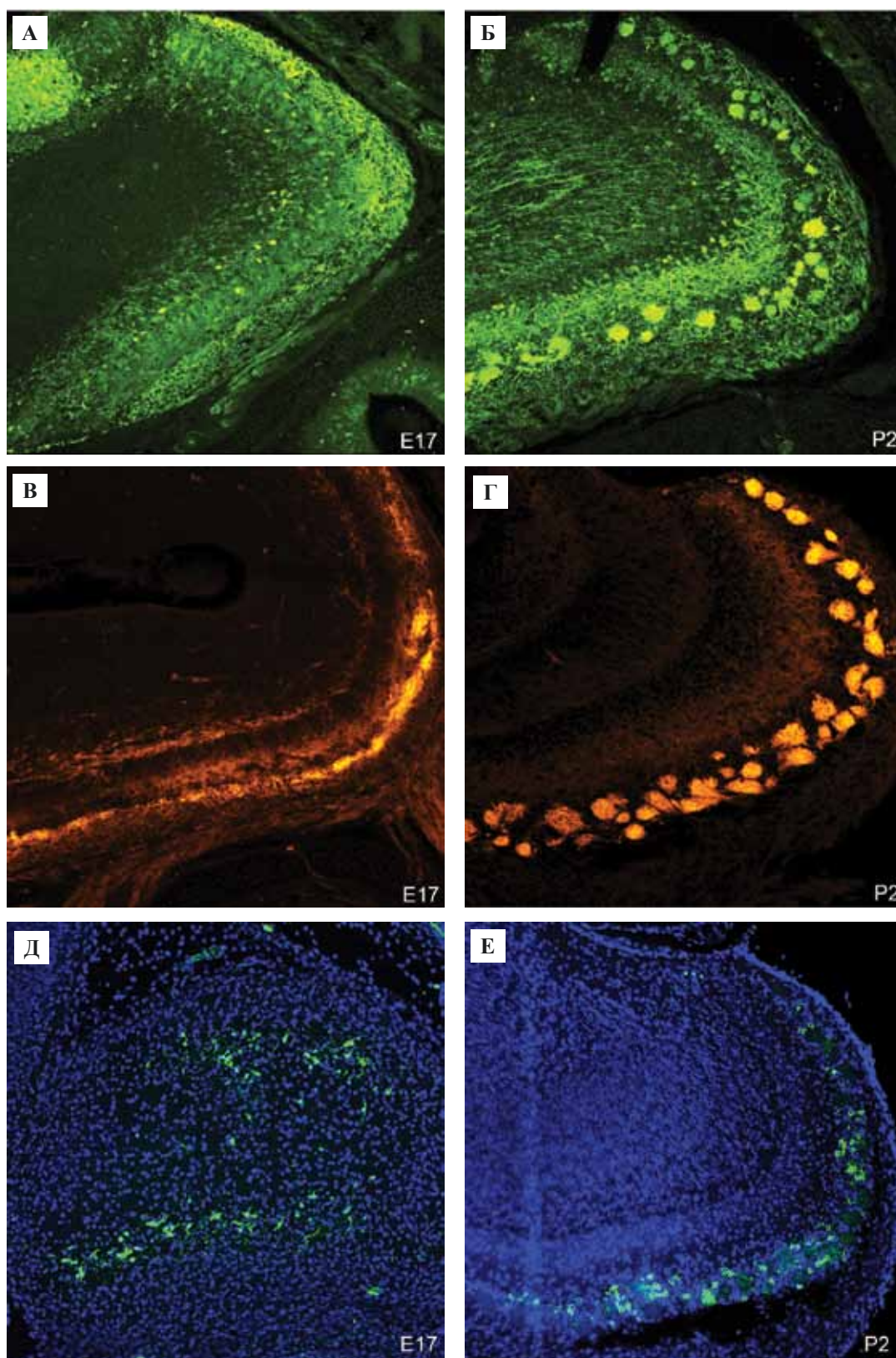


Рис. 2. Обонятельные луковицы мыши в эмбриональном (E17) и раннем постнатальном (P2) периоде, сагиттальные срезы.

А, Б – иммунофлуоресцентное выявление альфа-синуклеина, объектив×10, В, Г – выявление синаптофизина, объектив×10, Д, Е – выявление тирозингидроксилазы, ядра клеток окрашены DAPI, объектив ×10

Fig. 2. Embryonic (E17) and early postnatal (P2) mouse olfactory bulbs, sagittal sections. А, Б – immunofluorescence  $\alpha$ -synuclein detection, В, Г – synaptophysin detection, Д, Е – tyrosine hydroxylase detection, nuclear counterstain – DAPI.  $\times 10$  lens

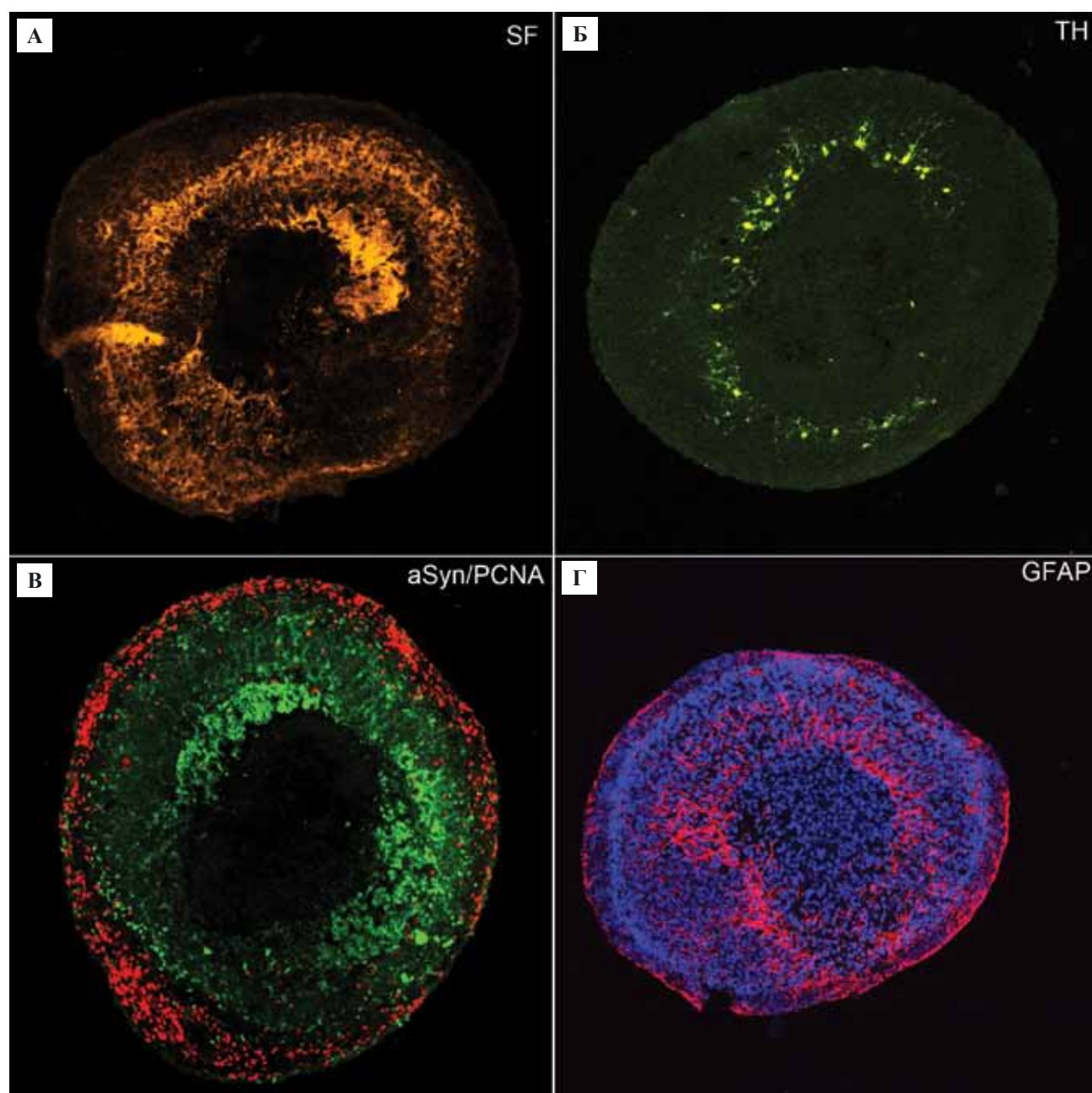


Рис. 3. Эксплантаты обонятельных луковиц мыши, взятых на 17-й эмбриональный день, 24 часа *in vitro*.

Иммунофлуоресцентное выявление.

А – синаптофизин (SF), Б – тирозингидроксилаза (TH), В – альфа-синуклеин (зеленым) и PCNA – красным, Г – глиофибриллярный белок (GFAP), ядра клеток окрашены DAPI. объектив  $\times 10$

Fig. 3. Explants of mouse olfactory bulb, 17-th postnatal day, 24 hours *in vitro*. Immunofluorescence detection  
А – synaptophysin (SF), Б – tyrosine hydroxylase (TH), В –  $\alpha$ -synuclein (aSyn, in green) and PCNA (in red),  
Г – gliofibrillar protein (GFAP, in red), nuclear counterstain – DAPI.  
А, Б, В, Г –  $\times 10$  lens



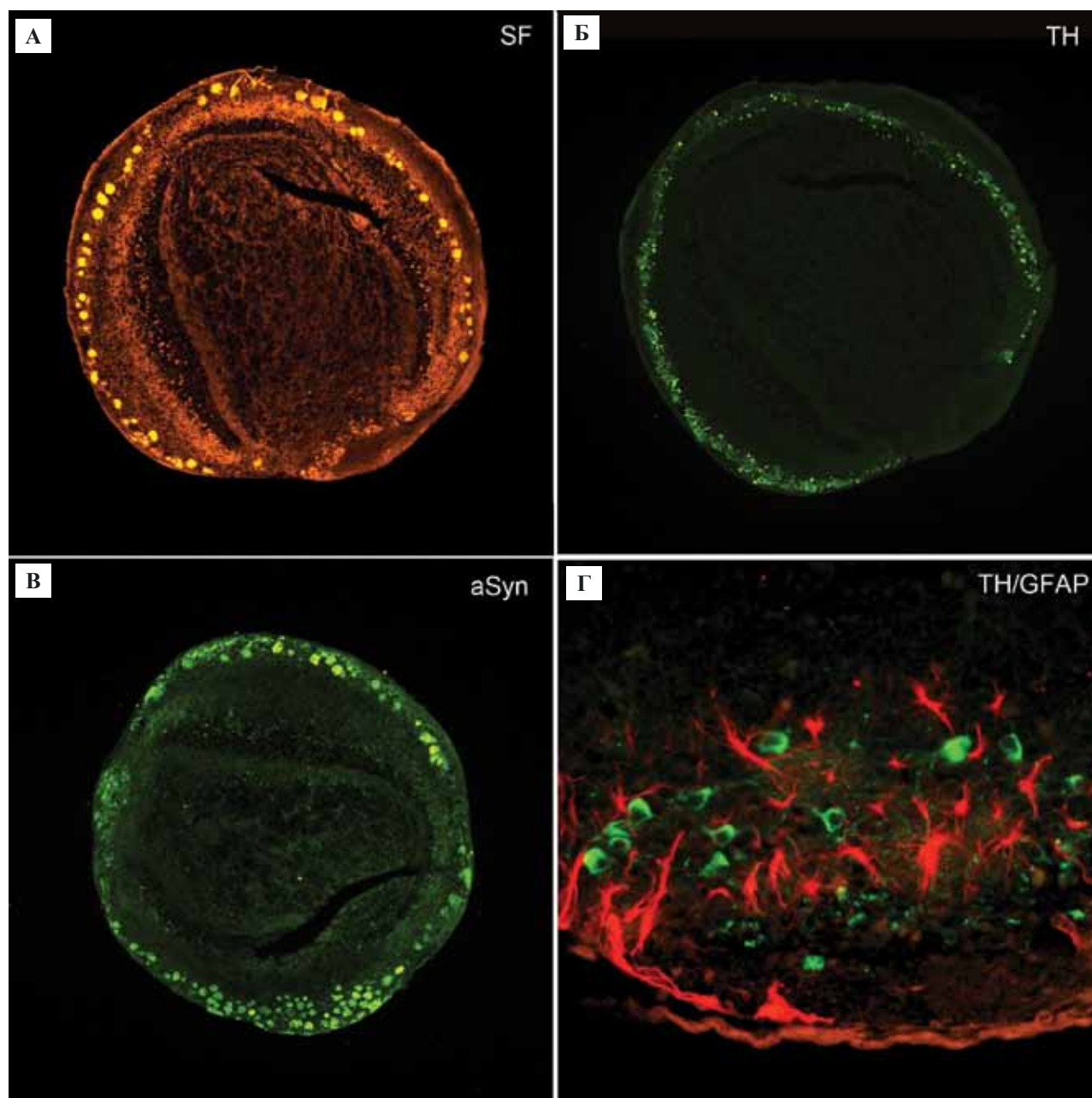


Рис. 4. Эксплантаты обонятельных луковиц мыши, взятых на 2-й постнатальный день, 24 часа *in vitro*.

Иммунофлуоресцентное выявление.

А – синаптофизин (SF), Б – тирозингидроксилаза (TH), В – альфа-синуклеин (a-Syn), Г – тирозингидроксилаза (TH, зеленым) и глиофибрилярный белок (GFAP, красным) в перигломерулярном слое.

А, Б, В – объектив  $\times 4$ , Г – объектив  $\times 40$

Fig. 4. Explants of mouse olfactory bulb, 2-nd postnatal day, 24 hours *in vitro*. Immunofluorescence detection.

А – synaptophysin (SF), Б – tyrosine hydroxylase (TH), В –  $\alpha$ -synuclein (aSyn), Г – localization of tyrosine hydroxylase (TH, in green) and gliofibrillar protein (GFAP, in red) in the periglomerular layer.

А, Б, В –  $\times 4$  lens, Г –  $\times 40$  lens

Показано, что  $\alpha$ -Syn взаимодействует с белками везикулярного комплекса, но предполагают, что его участие в синаптогенезе незначительно, поскольку  $\alpha$ -Syn – один из последних белков, обнаруживаемых при созревании синаптических окончаний [3, 23, 24]. Вместе с тем у нокаутных по гену  $\alpha$ -Syn мышей нарушаются рабочая память и пространственное обучение [25], а также развитие нейронов черной субстанции [26, 27]. Наши результаты согласуются с предположением, что основной пул  $\alpha$ -Syn в ОЛ принадлежит окончаниям митральных, перигломерулярных и, возможно, обонятельных сенсорных нейронов, то есть тех типов клеток, которые вовлечены в патогенез обонятельных нарушений при БП [28]. Отростки обонятельных нейронов образуют в гломерулах контакты с дендритами митральных клеток, аксоны которых, в свою очередь, формируют прямые проекции в переднее обонятельное ядро, моносинаптически связанное с областями древней, старой и новой коры [28]. Таким образом, нормальное распределение  $\alpha$ -Syn согласуется с гипотезой «обонятельного пути» распространения его патологических агрегатов [29–31].

Проведенный нами анализ структуры эксплантатов ОЛ в эмбриональном и постнатальном периоде показывает, что жизнеспособность клеток и основные характеристики структуры нативных ОЛ после 24 часов культивирования сохраняются. Использование альтернативных моделей, связанных с культивированием мезенцефальных дофаминергических нейронов, осложняется тем, что ввиду сложности выделения, высокой уязвимости и плохой выживаемости лишь 0,5–1% клеток в первичной культуре оказываются дофаминергическими [32]. Важное преимущество культивирования ОЛ состоит в возможности относительно простого получения и исследования популяции перигломерулярных дофаминергических нейронов в своем нормальном микроокружении и митральных нейронов, предположительно служащих основным звеном в транспорте патологических форм  $\alpha$ -Syn в передний мозг [28]. Эксплантаты ОЛ могут быть пригодны и для исследования патологической агрегации  $\alpha$ -Syn при аппликации известных токсинов, используемых для моделирования БП, биодоступность которых при интраназальном введении может быть ограничена [8].

## Заключение

Экспрессия  $\alpha$ -Syn в развивающихся обонятельных луковицах связана с формированием обонятельных клубочков и созреванием клеток митрального слоя, а его распределение в норме согласуется с особенностями вовлечения обонятельных структур в нейродегенеративный процесс при болезни Паркинсона. Полученные данные демонстрируют возможность использования органотипических культур обонятельных луковиц для моделирования патологических процессов при болезни Паркинсона.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.Н. Воронков, А.А. Лыжин, Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспеков.

Сбор и обработка материала – Д.Н. Воронков, М.Р. Капкаева, А.А. Лыжин.

Написание текста – Д.Н. Воронков, М.Р. Капкаева, Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспеков.

Редактирование – Р.М. Худоевков, Л.Г. Хаспеков.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – D.N. Voronkov, A.A. Lyzhin, R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov.

Collected the data and performed the analysis – D.N. Voronkov, M.R. Kapkaeva, A.A. Lyzhin.

Wrote the paper – D.N. Voronkov, M.R. Kapkaeva, R.M. Khudoerkov.

Edited the manuscript – R.M. Khudoerkov, L.G. Khaspekov.

## Литература/References

1. Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2011;5(4):46–51.  
*Pchelina SN*. Alpha-synuclein as a biomarker of Parkinson's disease. *Annaly klinicheskoy i experimental'noy neurologii*. 2011;5(4):46–51 (In Russ.). URL: <http://annaly-nevrologii.com/wp-content/uploads/2016/08/Tom-5-4-2011.pdf>
2. Zhong S, Luo X, Chen X. *et al*. Expression and Subcellular Location of Alpha-Synuclein During Mouse-Embryonic Development. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(3):469–82. DOI:10.1007/s10571-009-9473-4.
3. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of  $\alpha$ -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(3):a024091. doi:10.1101/cshperspect.a024091.
4. Voronkov DN, Khudoerkov RM, Sal'nikova OV, Sobolev VB. Localization of  $\alpha$ -Synuclein in the Rat Brain and Its Relationship with Dopaminergic Structures. *Neurosci Behav Physiol*. 2017;47(9):1147–52. DOI: 10.1007/s11055-017-0522-z
5. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Brain region-dependent differential expression of alpha-synuclein. *J Comp Neurol*. 2016;524(6):1236–58. DOI: 10.1002/cne.23901.
6. Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tanaka M. Expression of  $\alpha$ -synuclein is regulated in a neuronal cell type-dependent manner. *Anat Sci Int*. 2019;94(1):11–22. DOI: 10.1007/s12565-018-0464-8.
7. Fullard ME, Morley JF, Duda JE. Olfactory dysfunction as an early biomarker in Parkinson's disease. *Neurosci Bull*. 2017;33(5):515–25. DOI: 10.1007/s12264-017-0170-x.
8. Rojo AI, Cavada C, de Sagarra MR, Cuadrado A. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats. *Exp Neurol*. 2007;208(1):120–6. DOI:10.1016/j.expneurol.2007.07.022.
9. Cave JW, Fujiwara N, Weibman AR, Baker H. Cytoarchitectural changes in the olfactory bulb of Parkinson's disease patients. *npj Park Dis*. 2016;2(1):16011. DOI:10.1038/npjparkd.2016.11.
10. Beach TG, White CL, Hladik CL *et al*. Olfactory bulb  $\alpha$ -synucleinopathy has high specificity and sensitivity for Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*. 2009;117(2):169–74. DOI:10.1007/s00401-008-0450-7.



11. Zapiec B, Dieriks BV, Tan S, Faull RLM, Mombaerts P, Curtis MA. A ventral glomerular deficit in Parkinson's disease revealed by whole olfactory bulb reconstruction. *Brain*. 2017;140(10):2722–36. DOI:10.1093/brain/awx208.
12. Sasajima H, Miyazono S, Noguchi T, Kashiwayanagi M. Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. *Neurotoxicology*. 2015;51:106–15. DOI:10.1016/j.neuro.2015.10.006.
13. Ekimova IV, Simonova VV, Guzeev MA, Lapshina KV, Chernyshev MV, Pastukhov YF. Changes in sleep characteristics of rat preclinical model of Parkinson's disease based on attenuation of the ubiquitin—proteasome system activity in the brain. *J Evol Biochem Physiol*. 2016;52(6):463–74. DOI:10.1134/S1234567816060057.
14. Ilkiw JL, Kmita LC, Targa ADS et al. Dopaminergic Lesion in the Olfactory Bulb Restores Olfaction and Induces Depressive-Like Behaviors in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*. 2019;56(2):1082–95. DOI:10.1007/s12035-018-1134-5.
15. Pifl C, Reither H, del Rey NLG, Cavada C, Obeso JA, Blesa J. Early Paradoxical Increase of Dopamine: A Neurochemical Study of Olfactory Bulb in Asymptomatic and Symptomatic MPTP Treated Monkeys. *Front Neuroanat*. 2017;11:46. DOI:10.3389/fnana.2017.00046.
16. Zhang W, Sun C, Shao Y, Zhou Z, Hou Y, Li A. Partial depletion of dopaminergic neurons in the substantia nigra impairs olfaction and alters neural activity in the olfactory bulb. *Sci Rep*. 2019;9(1):254. DOI:10.1038/s41598-018-36538-2.
17. Kurtenbach S, Wewering S, Hatt H., Neuhaus E.M., Lübbert H. Olfaction in Three Genetic and Two MPTP-Induced Parkinson's Disease Mouse Models. Whitworth AJ, ed. *PLoS One*. 2013;8(10):e77509. DOI:10.1371/journal.pone.0077509.
18. Viktorov IV, Sharonova IN. Formation of functional synaptic connections between heterogeneous brain formations in organotypic nerve tissue culture. *Neurophysiology*. 1981;12(5):311–7. DOI:10.1007/BF01066077.
19. Chuah MI, Farbman AI. Mitral cell differentiation and synaptogenesis of rat presumptive olfactory bulb in organ culture. *Cell Tissue Res*. 1986;243(2). DOI:10.1007/BF00251052.
20. Werther GA, Cheesman H, Russo V. Olfactory bulb organ culture is supported by combined insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor. *Brain Res*. 1993;617(2):339–42. DOI:10.1016/0006-8993(93)91102-x
21. Viktorov IV, Lyzhin AA, Shashkova NA. Cultivation of reaggregated brain cells in rapidly rotating mini-rollers. *Bull Eksp Biol Med*. 1985;99(5):632–4. PMID: 3890982 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3890982>.
22. Hsu LJ, Mallory M, Xia Y et al. Expression Pattern of Synucleins (Non-A $\beta$  Component of Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein/ $\alpha$ -Synuclein) During Murine Brain Development. *J Neurochem*. 2002;71(1):338–44. DOI:10.1046/j.1471-4159.1998.71010338.x.
23. Withers GS, George JM, Banker GA, Clayton DF. Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Dev Brain Res*. 1997;99(1):87–94. DOI:10.1016/S0165-3806(96)00210-6.
24. Murphy DD, Rueter SM, Trojanowski JQ, Lee VMY. Synucleins Are Developmentally Expressed, and  $\alpha$ -Synuclein Regulates the Size of the Presynaptic Vesicular Pool in Primary Hippocampal Neurons. *J Neurosci*. 2000;20(9):3214–20. DOI:10.1523/JNEUROSCI.20-09-03214.2000.
25. Kokhan VS, Afanasyeva MA, Van'kin GI.  $\alpha$ -Synuclein knock-out mice have cognitive impairments. *Behav Brain Res*. 2012;231(1):226–30. DOI:10.1016/j.bbr.2012.03.026.
26. Garcia-Reitboeck P, Anichtchik O, Dalley JW et al. Endogenous alpha-synuclein influences the number of dopaminergic neurons in mouse substantia nigra. *Exp Neurol*. 2013;248:541–5. DOI:10.1016/j.expneurol.2013.07.015.
27. Tarasova TV, Lytkina OA, Goloborshcheva VV et al. Genetic inactivation of alpha-synuclein affects embryonic development of dopaminergic neurons of the substantia nigra, but not the ventral tegmental area, in mouse brain. *PeerJ*. 2018;6:e4779. DOI:10.7717/peerj.4779.
28. Ubeda-Bañon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, Martinez-Marcos A.  $\alpha$ -Synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: role of neural connections on spreading pathology. *Brain Struct Funct*. 2014;219(5):1513–26. DOI:10.1007/s00429-013-0651-2.
29. Cersosimo MG. Propagation of alpha-synuclein pathology from the olfactory bulb: possible role in the pathogenesis of dementia with Lewy bodies. *Cell Tissue Res*. 2018;373(1):233–43. DOI:10.1007/s00441-017-2733-6.
30. Niu H, Shen L, Li T, Ren C et al. Alpha-synuclein overexpression in the olfactory bulb initiates prodromal symptoms and pathology of Parkinson's disease. *Translat. Neurodegener*. 2018;7:25 DOI:10.1186/s40035-018-0128-6
31. Rey NL, George S, Steiner JA, Madaj Z et al. Spread of aggregates after olfactory bulb injection of  $\alpha$ -synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta Neuropathol*. 2018;135(1):65–83. DOI:10.1007/s00401-017-1792-9.
32. Weinert M, Selvakumar T, Tierney TS, Alavian KN. Isolation, Culture and Long-Term Maintenance of Primary Mesencephalic Dopaminergic Neurons From Embryonic Rodent Brains. *J Vis Exp*. 2015;(96):52475. DOI:10.3791/52475.

## Информация об авторах

Дмитрий Николаевич Воронков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Анатолий Александрович Лыжин – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейробиологии Научного центра неврологии.

Марина Рафаиловна Капкаева – аспирант лаборатории экспериментальной нейробиологии Научного центра неврологии.

Рудольф Михайлович Худоерков – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Леонид Георгиевич Хаспеков – доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной нейроцитологии Научного центра неврологии.

#### Information about authors

Dmitry N. Voronkov – Cand. Sci. (Med.), Senior researcher, Laboratory of neuromorphology, Research center of neurology.

E-mail: voronkovdm@gmail.com, voronkov@neurology.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

Anatoly A. Lyzhin – Cand. Sci. (Med.), Senior researcher, Laboratory of experimental neurocytology, Research center of neurology.

E-mail: lyzhin53@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-2247-7291>

Marina R. Kapkaeva – Doctoral student, Laboratory of experimental neurocytology, Research center of neurology.

E-mail: mareenqa@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2833-2897>

Rudolf M. Khudoerkov – Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Laboratory of neuromorphology, Research center of neurology.

E-mail: rolfbraint@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6951-3918>

Leonid G. Khaspekov – Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of experimental neurocytology, Research center of neurology.

E-mail: khaspekleon@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6652-9412>

## Изменение морфологических характеристик клеток цельной человеческой крови и сгустков свиной крови при различных способах ее хранения

К.Д. Топчу<sup>1</sup>, Е.М. Пономарчук<sup>1</sup>, А.В. Кунтурова<sup>1</sup>, П.Б. Росницкий<sup>1</sup>,  
Т.Д. Хохлова<sup>2</sup>, Я.Н. Ванг<sup>3</sup>, В.А. Хохлова<sup>1,3</sup>, С.В. Буравков<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup> Департамент гастроэнтерологии медицинской школы Университета штата Вашингтон, Сиэтл, США

<sup>3</sup> Центр промышленного и медицинского ультразвука при лаборатории прикладной физики Университета штата Вашингтон, Сиэтл, США

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

**Введение.** Для отсроченного проведения исследований по акустическому воздействию на образцы коагулированной крови как модели внутренних гематом человека необходимо определение способа ее хранения, минимизирующего изменения ее морфологических характеристик.

**Цель работы** – сравнение различных способов и оценка допустимого времени хранения жидкой и коагулированной цельной крови с использованием методов ультраструктурного анализа.

**Материалы и методы.** В качестве образцов жидкой крови использовали цельную человеческую кровь, хранившуюся в течение 7 суток с антикоагулянтом цитрат–фосфат–декстроза (ЦФД) и в течение 9 суток с добавлением солевого раствора аденин–глюкоза–маннит (САГМ). Для моделирования гематом применяли свиную кровь, коагулированную естественным образом сразу после забора и затем хранившуюся в течение 2 суток в полиакриламидном геле, физиологическом растворе и геле из агара. Каждые сутки осуществляли забор содержимого образцов, его подготовку и анализ с помощью сканирующей электронной микроскопии. При хранении цельной крови с антикоагулянтом также каждый день проверяли возможность и скорость ее коагуляции путем добавления 25 ммоль раствора CaCl<sub>2</sub>.

**Результаты.** Было показано, что в течение 5 суток хранения цельной крови в ЦФД изменения морфологических свойств эритроцитов проявляются незначительно вне зависимости от присутствия САГМ. К 7-м суткам заметно растет степень эхиноцитоза и агрегации эритроцитов, что несколько сдерживается добавлением САГМ. Время свертывания крови с помощью раствора не изменялось в течение срока хранения и находилось в пределах 10–12 минут при температуре +37°C. Также выявлено, что при хранении коагулированной крови в геле из агара морфология клеток сохраняется. Хранение в физиологическом растворе приводит к уменьшению видимой части фибриновых волокон, а в полиакриламидном геле – к заметному гемолизу уже спустя сутки хранения.

**Заключение.** С целью отсроченного использования сгустков цельной крови при сохранении ее морфологических характеристик предпочтительны либо хранение цельной крови в некоагулированном состоянии и коагуляция непосредственно перед исследованием, либо хранение сгустков крови в контейнере из агарового геля.

**Ключевые слова:** хранение крови, антикоагулянт, цитрат–фосфат–декстроза, солевой раствор аденин–глюкоза–маннит, гематома, сканирующая электронная микроскопия, гистотрипсия.

**Для корреспонденции:** Ксения Дмитриевна Топчу. E-mail: topchu.kd17@physics.msu.ru

**Для цитирования:** Топчу К.Д., Пономарчук Е.М., Кунтурова А.В., Росницкий П.Б., Хохлова Т.Д., Ванг Я.Н., Хохлова В.А., Буравков С.В. Изменение морфологических характеристик клеток цельной человеческой крови и сгустков свиной крови при различных способах ее хранения. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):42–48. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.42-48

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-ОНКО № 17-54-33034 Фонда развития теоретической физики и математики «БАЗИС» № 18-2-6-163-1 и Focused Ultrasound Foundation (FUSF) Global Internship Program.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 23.09.2019. Получена после рецензирования 08.11.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## Changes of morphological characteristics of whole human blood and porcine coagulated blood cells depending on a storage method

K.D. Topchu<sup>1</sup>, E.M. Ponomarchuk<sup>1</sup>, A.V. Kunturova<sup>1</sup>, P.B. Rosnitsky<sup>1</sup>,  
T.D. Khokhlova<sup>2</sup>, Y.N. Wang<sup>3</sup>, V.A. Khokhlova<sup>1,3</sup>, S.V. Buravkov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Physics, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Department of Medicine, Division of Gastroenterology, Seattle, USA

<sup>3</sup> Center for Industrial and Medical Ultrasound, University of Washington, Seattle, USA

<sup>4</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow, Russia

**Introduction.** For delayed studies on the acoustic exposure of coagulated blood samples as a model of human internal hematomas, it is necessary to find a method for storing blood that minimizes changes of its morphological characteristics. The aim of the study was to compare various methods and assess the possible storage time of uncoagulated and coagulated whole blood by means of the ultrastructural analysis.

**Materials and methods.** Whole human blood was used as a sample of uncoagulated blood, stored for seven days with the anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose (CPD), and nine days with the Saline Adenine Glucose Mannitol Solution (SAGM). Porcine blood was used as hematoma model, coagulated naturally immediately after collection and then stored for two days in a polyacrylamide gel, saline and agar gel. Daily, the contents of the samples was collected, processed and analyzed by means of the scanning electron microscopy. Upon whole blood storage with an anticoagulant, the possibility and rate of its coagulation was also controlled every day by adding 25 mmol CaCl<sub>2</sub> solution.

**Results.** Morphological characteristics of red blood cells have changed slightly regardless of the presence of SAGM within five days of whole blood storage in the CPD. By the 7th day of storage, degree of echinocytosis and aggregation of erythrocytes has considerably increased, which is slightly constrained by the addition of SAGM. The coagulation time with CaCl<sub>2</sub> solution has not changed during the storage period and was within 10–12 minutes at a temperature of +37°C. It was also shown that coagulated blood storage in agar gel preserved morphological properties of the cells. Storage in saline leads to the loss of fibrin fibers, and in polyacrylamide gel – to considerable hemolysis after a day of storage.

**Conclusion.** For the purpose of delayed use of whole blood clots with maintained morphological characteristics of the cells, it is preferable to store the whole blood uncoagulated and coagulate it right before the study, or to store blood clots in an agar gel container.

**Keywords:** blood storage, anticoagulant, citrate phosphate dextrose, saline adenine glucose mannitol solution, hematoma, scanning electron microscopy, histotripsy.

**Corresponding author:** Kseniya D. Topchu. E-mail: topchu.kd17@physics.msu.ru

**For citation:** K.D. Topchu, E.M. Ponomarchuk, A.V. Kunturova, P.B. Rosnitsky, T.D. Khokhlova, Y.N. Wang, V.A. Khokhlova, S.V. Buravkov. Changes of morphological characteristics of whole human blood and porcine coagulated blood cells depending on a storage method. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):42–48. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.42-48

**Funding.** This study was supported by RFBR-ONCO grant No.17-54-33034, Foundation for the Advancement of Theoretical Physics and Mathematics «BASIS» grant No.18-2-6-163-1, and Focused Ultrasound Foundation (FUSF) Global Internship Program.

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

**Received 23.09.2019. Received in revised form 08.11.2019. Accepted 19.11.2019.**

В настоящее время активно ведутся исследования, направленные на изучение свойств и характеристик крови [1, 2]. При этом интерес представляет изучение свойств крови не только в жидком, но и в коагулированном состоянии. Одним из примеров таких исследований в области медицинской акустики является возможность неинвазивного разрушения внутренних гематом человека мощным фокусированным ультразвуком (в англоязычной литературе – high intensity focused ultrasound, HIFU) [3]. Предлагаемый способ направлен на расширение используемых сегодня хирургических методов удаления крупных гематом с целью ускорения лечения и восстановительного периода, а также предотвращения послеоперационных осложнений.

Метод механического разрушения биологической ткани с помощью мощного фокусированного ультразвука (гистотрипсия) уже используется в течение последних двух десятилетий для различных клинических приложений [4]. Суть метода состоит в импульсном воздействии на ткань, при котором взаимодействие каждого из импульсов с образующейся в фокальной области ультразвукового излучателя парогазовой полостью либо кавитационным облаком приводит к раздроблению ткани на мелкие фрагменты субклеточных размеров (рис. 1 А). При разрушении гематомы полученная суспензия разжиженной ткани впоследствии может быть удалена путем аспирации тонкой иглой (рис. 1 Б), тем самым снижая боль и уменьшая отсро-



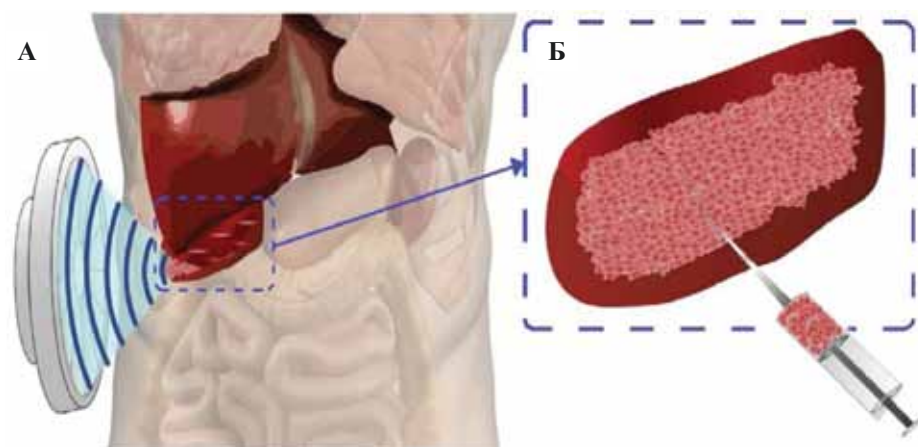


Рис. 1. Иллюстрация идеи применения мощного фокусированного ультразвука для разжижения и аспирации внутренних гематом на примере гематомы печени

Fig. 1. Illustration of the idea of using high-intensity focused ultrasound for liquefaction and aspiration of internal hematomas through the liver hematoma example

ченные эффекты инвазивного вмешательства. Помимо прямого клинического приложения модель гематомы также является наиболее простым фантомом биологической ткани, ее использование в акустическом эксперименте позволяет тестировать ультразвуковые установки HIFU и оптимизировать протоколы облучения иных видов тканей [3, 5].

Хранение клеток крови в растворе, проявляющем антикоагулянтное или консервационное действие, может повлиять на их морфологические характеристики. Например, ранее были предоставлены косвенные доказательства, что при хранении клеток крови с антикоагулянтом ЦФД (цитрат–фосфат–декстроза) и добавочным консервационным раствором САГМ (солевой раствор аденин–глюкоза–маннит), питающим клетки крови и поддерживающим ее функции, они претерпевают повреждения в меньшей степени, чем при хранении в ЦФДА (цитрат–фосфат–декстроза–аденин) [6]. Также высказывалось предположение, что хранение эритроцитов в ЦФД–САГМ может быть схожим с процессом старения клеток крови *in vivo* в отличие от других способов хранения. Наряду с этим отмечалось, что при хранении цельной крови присутствие консервантов сдерживает метаболические изменения эритроцитов, в частности, приводящие к их агрегации [7].

В соответствии с руководством ВОЗ [8] клетки крови, помещенные в среду гемоконсерванта, рекомендуется хранить до 30–35 дней. При этом их морфологические и физиологические характеристики могут изменяться в течение этого периода, однако восстанавливаться после переливания. При подготовке образцов гематом для акустического эксперимента по облучению сгустков крови критичным является сохранение морфологических характеристик клеток крови именно в момент коагуляции. Кроме того, при нарушении герметичности упаковки, содержащей кровь, что связано с периодическим забором биологического материала, изменения могут проявляться на более ранних сроках.

Результаты исследования свойств клеток крови при хранении эритроцитарной массы отдельно от плазмы свидетельствуют об обратимости изменений, проис-

ходящих при хранении эритроцитов в течение первых двух недель [9, 10]. К ним относится, например, ранняя стадия эхиноцитоза [7, 11]. Повреждения, наступающие после 4 недель хранения (снижение эластичности стенки эритроцита, изменение его диаметра, появление выростов на его поверхности, образование везикул), как правило, необратимы [10]. В исследованиях по ультразвуковому воздействию на сгустки крови критичными могут оказаться и обратимые изменения эритроцитов, если они влияют на гемореологические свойства крови: вязкость, упругость мембраны клеток, индекс деформируемости и т.д., поскольку отклик облучаемого сгустка на воздействие ультразвуком определяется его акустическими (то есть упругими) свойствами. В литературе представлены данные по изменениям преимущественно физиологических свойств эритроцитов при их хранении [11, 12]. Исследование же упругих параметров крови показало, что при хранении эритроцитарной массы в физиологическом растворе аденина изменения формы клеток, а также серьезные гемореологические нарушения, в том числе снижение деформируемости эритроцитов вследствие аномалий формы, ацидоз и снижение свертываемости крови, начинаются уже на 2-й неделе хранения [9]. Кроме того, при хранении эритроцитсодержащей смеси при стандартных температурных условиях с добавлением CPDA-1 наблюдалось увеличение средних значений модуля Юнга эритроцитов, что свидетельствует о снижении эластичности клеточной мембраны [13].

Таким образом, для проведения акустических экспериментов по облучению сгустков крови важно исследовать изменение параметров, связанных с морфологическими характеристиками клеток крови при различных способах ее хранения, и определить наиболее щадящий, то есть не изменяющий первоначальные свойства, способ хранения либо цельной, либо коагулированной крови.

Целью работы являлись сравнительный анализ различных способов и оценка допустимого времени хранения клеток крови для приготовления модели гематомы. С помощью методов ультраструктурного анализа исследовано изменение морфологических характеристик

цельной человеческой крови под действием антикоагулянта и консервационного раствора, а также влияние различных способов хранения сгустков свиной крови: в 10% полиакриламидном геле (ПАА), в физиологическом растворе (фосфатно-буферном растворе) и в 6% геле из агара.

### Материалы и методы

При проведении экспериментов в качестве образцов жидкой крови использовалась цельная человеческая кровь, хранившаяся в течение 7 суток при температуре +5°C с антикоагулянтом ЦФД, а также в течение 9 суток с добавлением к нему консервационного раствора САГМ (рис. 2 А).

В качестве образцов гематом использовалась свежая свиная кровь, полученная с бойни и коагулированная естественным образом сразу после забора, с последующим хранением полученных сгустков в течение 2 суток в полиакриламидном геле (акриламид и персульфат аммония (PANREAC AppliChem, Германия), ТМЭДА и бисакриламид (Sigma-Aldrich, США), физиологическом растворе (ООО «ПанЭко», Россия) и геле из пищевого агара (Kotanyi) (рис. 2 Б–Г).

Раз в сутки на протяжении всего времени хранения образцов цельной крови и гематом осуществлялись забор содержимого и его подготовка к сканирующей электронной микроскопии (СЭМ): нанесенный на клейкую ленту образец фиксировался в 2,5% растворе глютаральдегида (DC Panreac, США), обезжизнялся в этиловых спиртах восходящей концентрации, пропитывался в гексаметилдисилазане (Sigma-Aldrich, США), высушивался на воздухе, и далее готовая лен-

та с образцом монтировалась на предметный столик и напылялась золотом [14]. Забор содержимого гематом осуществлялся из середины объема образца. Исследование полученных образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380LA Analytical Scanning Electron Microscope (Япония) биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

При хранении цельной крови с антикоагулянтом также каждый день проверялись возможность и скорость ее коагуляции путем добавления 25 ммоль раствора  $\text{CaCl}_2$ .

### Результаты и обсуждение

#### *Изменение морфологических характеристик клеток цельной крови при хранении с антикоагулянтом*

На рисунке 3 А представлен обзорный снимок контрольного образца сразу после забора крови. Видно, что все пространство изображения заполнено дискоцитами. На 5-е сутки хранения в ЦФД с добавлением либо без добавления САГМ (рис. 3 Б, В) в обоих образцах количество эритроцитов мало, а влияние добавления консервационного раствора на изменения формы клеток незначительно по сравнению с контрольным образцом (рис. 3 А).

К 7-м суткам (рис. 3 Г, Д) заметно возрастает число эритроцитов, а некоторые эритроциты агрегируют в «монетные столбики». В присутствии САГМ степень агрегации несколько ниже, что согласуется с данными литературы: добавление аденин- и маннитолсодержащего раствора поддерживает гемореологические свойства крови [7, 12]. Тем не менее стоит отметить, что биофизика, лежащая в основе образования подобных структур эритроцитов, на данный момент остается недостаточно изученной.

При исследовании процесса приготовления модели гематомы было выявлено, что время свертывания крови при добавлении 25 ммоль раствора не изменялось в течение недели хранения и находилось в пределах 10–12 минут при температуре +37°C.

#### *Изменение свойств гематомы с течением времени в зависимости от способа ее хранения*

В контрольных образцах свиных гематом, полученных сразу после свертывания крови, можно видеть, что все эритроциты подверглись эхиноцитозу (рис. 4 А, Г, Ж). Вероятно, это связано с использованием электрического шока при умерщвлении животного перед взятием крови. Ранее было показано, что форма эритроцитов человека может изменяться при наложении электрического поля, а степень трансформации клеток напрямую зависит от силы и длительности электрических импульсов [15].

Хранение в полиакриламидном геле (ПАА) привело к изменениям в структуре сгустка свиной крови уже спустя сутки после погружения в гель (рис. 4 Б). Фор-

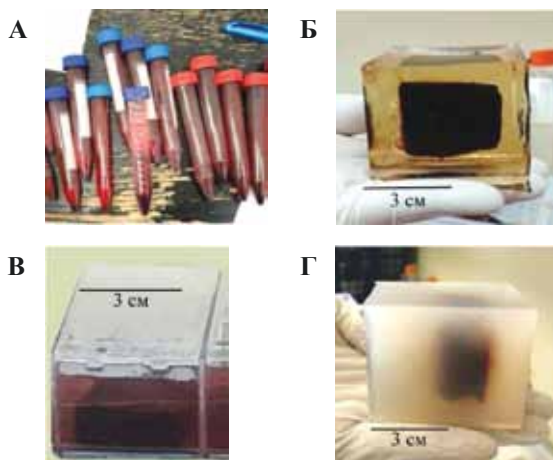


Рис. 2. Способы хранения крови для акустического эксперимента.

А – цельная человеческая кровь с антикоагулянтом;  
Б–Г – свиная кровь в коагулированном виде:  
Б) в полиакриламидном геле, В) в физиологическом растворе, Г) в геле из агара

Fig. 2. Blood storage methods for acoustic experiment.

А – whole human blood with anticoagulant;  
Б–Г – coagulated porcine blood: Б) in polyacrylamide gel, В) in saline solution, Г) in agar gel



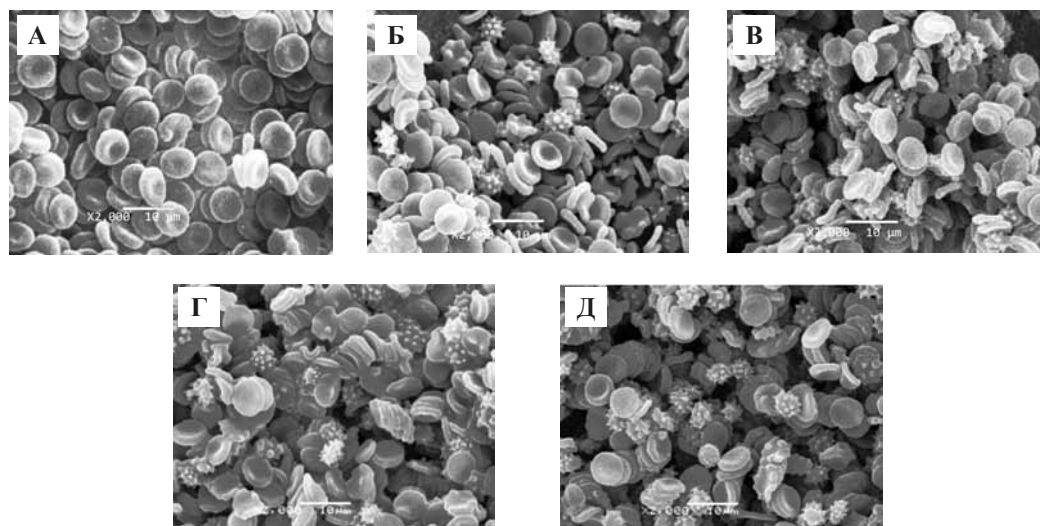


Рис. 3. СЭМ цельной крови при хранении с антикоагулянт ЦФД.

А – в течение 0 суток, Б – 5 суток, В – 5 суток с добавлением САГМ, Г – 7 суток, Д – 7 суток с добавлением САГМ. Масштабные линии: 10 мкм

Fig. 3. SEM images of whole blood stored with CPD anticoagulant.

А – 0 days, Б – 5 days, В – 5 days with SAGM, Г – 7 days, Д – 7 days with SAGM. Scale bar: 10 microns

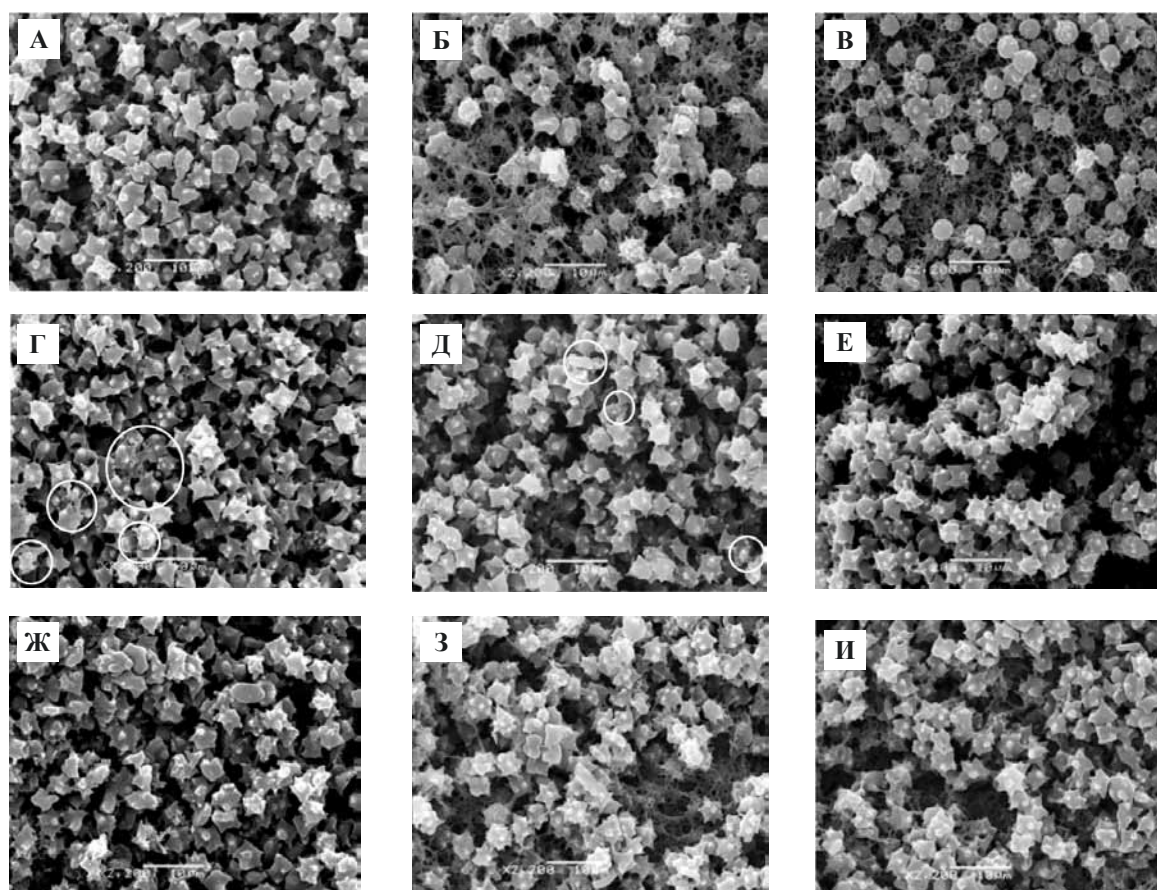


Рис. 4. СЭМ содержимого гематом при различном хранении с течением времени.

А, Г, Ж – контрольные снимки в день погружения; Б, Д, З – через сутки; В, Е, И – через 2 суток. А, Б, В – в ПАА; Г, Д, Е – в физиологическом растворе; Ж, З, И – в агаре. Маркерные линии: 10 мкм. Фибриновые волокна при хранении в физиологическом растворе выделены кружками

Fig. 4. SEM images of hematoma contents for different storage methods over time. А, Г, Ж – control samples on the immersion day;

Б, Д, З – after 1 day storage; В, Е, И – after 2 days storage; А, Б, В – in polyacrylamide gel; Г, Д, Е – in saline; Ж, З, И – in agar gel. Scale bars: 10 microns. Fibrin fibres during storage in saline solution are circled

ма эхиноцитов изменилась на более округлую, клетки выглядят «набухшими», что, по-видимому, может быть вызвано разностью осмотического давления в ПАА и внутри клеток крови. Количество открытых участков фибриновых волокон, связывающих клетки в сгусток, увеличилось (рис. 4 В, Г), что, вероятно всего, обусловлено гемолизом части эритроцитов при их «набухании».

*Хранение в физиологическом растворе* в течение 2 суток не вызвало значительных изменений, за исключением небольшого уменьшения с течением времени количества фибриновых волокон (рис. 4 Г, Д) (выделены кружками), предположительно из-за усиления фибринолиза или вымывания физиологическим раствором.

*Хранение в геле из агара* в течение 2 суток существенно не повлияло на состояние гематомы: количество видимых фибриновых волокон, соединяющих клетки, выглядит неизменным, форма клеток и плотность их распределения остались прежними (рис. 4 Ж–И).

## Заключение

В работе исследовано влияние различных способов хранения цельной крови в жидком и в коагулированном состоянии на изменение ее морфологических характеристик с течением времени при подготовке моделей гематомы для акустического эксперимента по их неинвазивному разжижению мощным фокусированным ультразвуковым пучком.

С помощью сканирующей электронной микроскопии было показано, что в течение 5 суток хранения цельной человеческой крови в антикоагулянте ЦФД наблюдаемые изменения морфологических свойств эритроцитов проявляются в незначительной степени вне зависимости от присутствия САГМ. К 7-м суткам заметно растет степень эхиноцитоза, а также агрегации эритроцитов в «монетные столбики», что может быть связано с присутствием белков плазмы при хранении цельной крови [7]. Добавление к антикоагулянту раствора САГМ в некоторой степени сдерживает агрегацию эритроцитов, что согласуется с данными литературы [7, 12]. В течение 7 суток хранения цельной человеческой крови с антикоагулянтом не отмечалось заметного гемолиза эритроцитов; время свертывания крови с помощью раствора не изменялось и находилось в пределах 10–12 минут при температуре +37°C.

Методом СЭМ было показано, что в течение по крайней мере 2 суток наиболее подходящим контейнером для хранения свиных гематом является гель из агара – он не оказывает токсического действия и таким образом сохраняет их первоначальные морфологические свойства. Физиологический раствор, по-видимому, усиливает фибринолиз или вымывает небольшую часть фибриновых волокон, а ПАА гель приводит к заметному гемолизу уже через сутки после погружения в него.

Таким образом, при подготовке моделей гематомы для последующего акустического эксперимента пред-

почтительны хранение цельной крови в некоагулированном состоянии в течение времени до 5 суток и ее коагуляция непосредственно перед экспериментом либо хранение сгустков крови в контейнере из агарового геля в течение до 2 суток.

## Благодарность

Авторы выражают благодарность лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за возможность работы на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380LA Analytical Scanning Electron Microscope.

## Acknowledgments

The authors are grateful to the Laboratory of Electron Microscopy, Faculty of Biology, Moscow State University M.V. Lomonosov for the opportunity to work on a JEOL JSM-6380LA Analytical Scanning Electron Microscope.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.В. Буравков, П.Б. Росницкий, В.А. Хохлова.

Сбор и обработка материала – К.Д. Топчу, Е.М. Пономарчук, А.В. Кунтурова.

Написание текста – К.Д. Топчу, Е.М. Пономарчук.

Редактирование – П.Б. Росницкий, Т.Д. Хохлова, Я.Н. Ванг, В.А. Хохлова, С.В. Буравков.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.V. Buravkov, P.B. Rosnitsky, V.A. Khokhlova.

Collected the data and performed the analysis – K.D. Topchu, E.M. Ponomarchuk, A.V. Kunturova.

Wrote the paper: K.D. Topchu, E.M. Ponomarchuk.

Edited the manuscript – P.B. Rosnitsky, T.D. Khokhlova, Y.N. Wang, V.A. Khokhlova, S.V. Buravkov.

## Литература/References

1. Craddock N, Hurles ME, Cardin N, Pearson RD, Plagnol V, Robson S et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2010;464:713–20. DOI: 10.1038/nature08979.
2. Пантелеев М.А., Синауридзе Е.И., Атауллаханов Ф.И. Свертывание крови: современные проблемы (часть 3). Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2008;1(3):259–265. Panteleev MA, Sinauridze EI, Ataullakhanov FI. Blood coagulation: current problems (part 3). *Clinical oncohematology. Basic research and clinical practice*. 2008;1(3):259–265 (In Russ.).
3. Khokhlova TD, Monsky WL, Haider YA, Maxwell AD, Wang YN, Matula TJ. Histotripsy liquefaction of large hematomas. *Ultrasound in Med. & Biol.* 2016;42(7):1491–8. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.01.020.
4. Khokhlova VA, Fowlkes JB, Roberts WW, Schade GR, Xu Z, Khokhlova TD et al. Histotripsy methods in mechanical disintegration of tissue: Towards clinical applications. *Int J Hyperthermia*. 2015;31(2):145–62. DOI: 10.3109/02656736.2015.1007538.



5. Ponomarchuk EM, Buravkov SV, Rosnitskiy PB, Tsysar SA, Karzova MM, Kunturova AV et al. Cytological and ultrastructural analysis of mechanically liquefied lesions generated using boiling histotripsy in a porcine model of hematoma ex vivo. Abstract book of the 19th International Symposium of ISTU. 5th European Symposium of EUFUS; 2019 June 13–15; Barcelona, Spain, 2019; p. 51.
6. Antonelou MH, Kriebardis AG, Stamoulis KE, Economou-Petersen E, Margaritis LH, Papassideri IS. Red blood cell aging markers during storage in citrate-phosphate-dextrose-saline-adenine-glucose-mannitol. *Transfusion*. 2010;50(2):376–89. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02449.x.
7. Шереметьев Ю.А., Поповичева А.Н., Rogozin M.M., Левин Г.Я. Агрегация метаболически истощенных эритроцитов человека. *Цитология*. 2016;58(1):30–4. Sheremet'ev YuA, Popovicheva AN, Rogozin MM, Levin GYa. Aggregation of metabolically depleted human erythrocytes. *Cytology*. 2016;58(1):30–34 (In Russ.).
8. World Health Organization. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. 2005. Available from: [https://www.who.int/bloodsafety/Manual\\_on\\_Management,Maintenance\\_and\\_Use\\_of\\_Blood\\_Cold\\_Chain\\_Equipment.pdf](https://www.who.int/bloodsafety/Manual_on_Management,Maintenance_and_Use_of_Blood_Cold_Chain_Equipment.pdf).
9. Berezina T, Zaets SB, Morgan C, Spillert CR, Kamiyama M, Spolarics Z et al. Influence of storage on red blood cell rheological properties. *Journal of Surgical Research*. 2002;102:6–12. DOI: 10.1006/jsre.2001.6306.
10. Barshtein G, Arbell D, Livshits L, Gural A. Is It Possible to Reverse the Storage-Induced Lesion of Red Blood Cells? *Front Physiol*. 2018 Jul 24;9:914. DOI: 10.3389/fphys.2018.00914.
11. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2012;8(1):52–60. Moroz VV, Golubev AM, Afanasyev AV, Kuzovlev AN, Sergunova VA, Gudkova OE, Chernysh AM. The Structure and Function of a Red Blood Cell in Health and Critical Conditions. *General reanimatology*. 2012;8(1):52–60 (In Russ.). DOI: 10.15360/1813-9779-2012-1-52.
12. Gevi F, D'Alessandro A, Rinalducci S, Zolla L. Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM. *Journal of Proteomics*. 2012;76:168–80. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.03.012.
13. Ламзин И.М., Харуллин Р.М. Исследование изменений биофизических свойств эритроцитов при хранении в эритроцитсодержащих средах с помощью атомно-силовой микроскопии. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2014;10(1):44–8. Lamzin IM, Khayrullin RM. The study of changes of biophysical properties of red blood cells in storage in erythrocyte-containing solutions using atomic force microscopy. *Saratov Journal of medical scientific research*. 2014;10(1):44–8 (In Russ.).
14. Buravkov SV, Chernikov VP, Buravkova LB. Simple Method of Specimen Preparation for Scanning Electron Microscopy. *Bull Exp Biol Med*. 2011; Jul;151(3):378–82. DOI: 10.1007/s10517-011-1335-7.
15. Henszen MM, Weske M, Schwarz S, Haest CW, Deuticke B. Electric field pulses induce reversible shape transformation of human erythrocytes. *Mol Membr Biol*. 1997;14(4):195–204. PMID: 9491371.

## Информация об авторах

Ксения Дмитриевна Топчу – студентка физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Екатерина Максимовна Пономарчук – студентка физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Анна Владимировна Кунтурова – студентка физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Павел Борисович Росницкий – аспирант физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Татьяна Дмитриевна Хохлова – кандидат физико-математических наук, ассистент департамента гастроэнтерологии, Университет штата Вашингтон, Сиэтл, США.

Як-Нам Ванг – PhD, старший научный сотрудник Центра промышленного и медицинского ультразвука, Университет штата Вашингтон, Сиэтл, США.

Вера Александровна Хохлова – доктор физико-математических наук, доцент кафедры акустики физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Сергей Валентинович Буравков – доктор медицинских наук, профессор факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

## Author information

Kseniya D. Topchu – B.Sc. student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0003-4106-3596>

Ekaterina M. Ponomarchuk – M.Sc. student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0002-6486-2895>

Anna V. Kunturova – B.Sc. student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0003-2806-4359>

Pavel B. Rosnitskiy – Graduate student, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0001-6423-3506>

Tatiana D. Khokhlova – PhD, Assistant, Division of Gastroenterology, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, USA.

Yak-Nam Wang – PhD, Senior Researcher, Center for Industrial and Medical Ultrasound, University of Washington, Seattle, USA.

Vera A. Khokhlova – D.Sc. in Acoustics, Associate professor, Department of Acoustics, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0002-2585-8228>

Sergey V. Buravkov – Dr.Sci.(Med.), professor, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University. <https://orcid.org/0000-0002-1461-464X>

## Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс различных возрастных периодов после введения 1,2-диметилгидразина

**О.М. Арлашкина, Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, М.Н. Михайлова**

ФГБОУ ВО Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

**Введение.** Онкозаболеваемость остается одной из самых актуальных проблем человечества. На запуск малигнизации клеток в организме могут влиять канцерогены разной природы. Установлено, что канцероген 1,2-диметилгидразин вызывает акцидентальную инволюцию тимуса, удаление селезенки у самок крыс до наступления беременности приводит к преждевременной инволюции тимуса у их потомства, а 1,2-диметилгидразининдуцированные опухоли у таких животных развиваются чаще. Тем не менее работы, посвященные изучению селезенки на фоне 1,2-диметилгидразининдуцированной опухоли у потомства спленэктомированных крыс, единичны. Цель исследования – изучение влияния 1,2-диметилгидразина на морфофункциональные изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс в разных возрастных периодах.

**Материалы и методы.** Гистологическими и морфометрическими методами исследована селезенка 150 белых нелинейных крыс-самцов в возрасте 3 и 6 месяцев. Животные были разделены на четыре группы: 1-я группа – интактные животные; 2-я группа – животные, которым вводили 1,2-диметилгидразин, вызывающий рак толстой кишки. 3-я группа – потомство спленэктомированных самок; 4-я группа – потомство спленэктомированных самок, которым вводили 1,2-диметилгидразин.

**Результаты.** Установлено, что у потомства спленэктомированных крыс размеры лимфоидных узелков, герминативных центров и маргинальной зоны меньше, чем у интактных животных. Введение 1,2-диметилгидразина привело к более выраженной дезорганизации морфологии селезенки у потомства спленэктомированных крыс. Это характеризовалось вдвое меньшей, чем у потомства интактных крыс, площадью лимфоидных узелков, резким уменьшением числа крупных лимфоидных узелков, значительным сокращением площади и диаметра герминативных центров, ширины маргинальной зоны и периартериальных лимфоидных муфт.

**Заключение.** Канцероген 1,2-диметилгидразин у потомства спленэктомированных крыс оказывает более выраженное негативное воздействие на селезенку, чем у потомства интактных крыс, и влияние это тем сильнее, чем больше времени прошло от момента окончания курса инъекций.

**Ключевые слова:** селезенка, белая пульпа, 1,2-диметилгидразин, канцерогенез.

**Для корреспонденции:** Ольга Михайловна Арлашкина. E-mail: olgaruz1202@mail.ru

**Для цитирования:** Арлашкина О.М., Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Михайлова М.Н. Изменения белой пульпы селезенки у потомства спленэктомированных крыс разных возрастных периодов после введения 1,2-диметилгидразина. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):49–58. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.49–58

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 28.08.2019. Получена после рецензирования 30.10.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## Changes in the spleen white pulp in the offspring of splenectomized rats of various ages exposed to 1,2-dimethylhydrazine

**O.M. Arlashkina, G.Yu. Struchko, L.M. Merkulova, M.N. Mikhailova**

I.N. Ulyanov Chuvash State University, Cheboksary, Russia

**Introduction.** Oncological morbidity remains one of the most pressing problems of mankind. Carcinogens of a different nature can influence the triggering of malignancy of cells in the body. 1,2-dimethylhydrazine is known to cause the accidental thymus involution. It has been also established that spleen removal in female rats before pregnancy leads to premature thymus involution in their offspring, and 1,2-dimethylhydrazine-induced tumors

develop more often in such animals. However, the papers describing spleen morphology in the offspring of splenectomized rats with 1,2-dimethylhydrazine-induced tumors are rare. The aim of the work was to study the effect of 1,2-dimethylhydrazine on morphological and functional changes in the white pulp of the spleen in the offspring of splenectomized rats at different ages.

**Materials and methods.** The spleen of 150 white outbred male rats aged 3 and 6 months was studied histologically and morphometrically. Animals were divided into 4 groups. The 1st group consisted of the intact animals. Rats of the 2nd group were injected with 1,2-dimethylhydrazine, which caused colon cancer. 3rd group was represented by the offspring of splenectomized rats without exposure to carcinogen. The offspring of splenectomized rats that were injected with 1,2-dimethylhydrazine comprised group 4.

**Results.** It was found that in the offspring of splenectomized rats, lymphoid nodules, germinal centers and marginal zone were smaller than in intact animals. The introduction of 1,2-dimethylhydrazine resulted in more pronounced disorganization of the spleen morphology in the offspring of splenectomized rats. This was characterized by half the area of lymphoid nodules than in the offspring of intact rats, sharp decrease in the number of large lymphoid nodules, significant reduction of the area and the diameter of germinal centers, the width of the marginal zone and periarterial lymphoid sheaths.

**Conclusion.** Thus, 1,2-dimethylhydrazine has a more pronounced negative effect on the spleen in the progeny of splenectomized rats than in the offspring of intact rats. The effect is the stronger, the more time has passed from the end of the injection course.

**Keywords:** spleen, white pulp, 1,2-dimethylhydrazine, carcinogenesis.

**For correspondence:** Olga M. Arlashkina. E-mail: olgaruz1202@mail.ru

**For citation:** Arlashkina O.M., Struchko G. Yu., Merkulova L.M., Mikhailova M.N. Changes in white pulp of the spleen in the offspring of splenectomized rats of different age periods after administration of 1,2-dimethylhydrazine. Clin. exp morphol. 2019;8(4):00-00 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.49–58

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

**Received 28.08.2019. Received in revised form 30.10.2019. Accepted 19.11.2019.**

## Введение

Проблема онкозаболеваемости остается одной из самых актуальных для всего человечества. По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР/IARS, Лион, Франция), в 2018 году во всем мире зафиксировано рекордное число случаев онкологических заболеваний – более 18 млн. В Российской Федерации число заболевших, выявленных впервые, также продолжает увеличиваться. Так, с 2000 по 2017 год оно увеличилось с 1 млн 226 тыс. до 1 млн 674 тыс., что составило 36% роста [1]. Помимо ухудшающейся экологии, хронического стресса, гормональных сдвигов и наследственности на запуск малигнизации клеток могут влиять продукты питания с химическими красителями и консервантами, а также канцерогены химической, физической или биологической природы [2]. Канцероген 1,2-диметилгидразин дигидрохлорид (ДМГ) – производное гидразина – относится к группе веществ, потенциально канцерогенных для человека. Его используют для моделирования рака толстой кишки у лабораторных животных [3, 4]. Эта модель достаточно изучена [5–7], она в отличие от клеточных культур позволяет воспроизводить опухолевый ангиогенез и метастазирование [8]. Известно, что опухоль, растущая под действием ДМГ, приводит к развитию акцидентальной инволюции тимуса [9], а также к морфологическим изменениям в органах эндокринной системы [10]. Имеются единичные сведения о некоторых морфологических изменениях в селезенке под действием ДМГ [11].

Селезенка является периферическим органом иммуногенеза, который играет важную роль в поддержании антигенного гомеостаза и противоопухолевой резистентности [12, 13]. Показано, что у пациентов, которым по вынужденным причинам была удалена селезенка, развивается постспленэктомический гипоспленизм [14, 15]. Это характеризуется общими проявлениями вторичного иммунодефицита, в том числе низкой пролиферативной активностью популяции периферических иммунокомпетентных клеток [16]. Известно, что у пациентов с иммунодефицитом значительно выше риск развития злокачественных опухолей, так же, как у тех, кто получает иммуносупрессивную терапию или перенес трансплантацию какого-либо органа [17, 18].

Имеются данные, что активация иммунной системы у матери во время беременности приводит к нарушению противоопухолевого иммунного ответа у потомства [19]. Известно, что удаление селезенки у самок крыс до наступления беременности приводит к преждевременной инволюции тимуса [20], а опухоли под действием ДМГ у таких животных развиваются в 1,5 раза чаще [21]. В связи с этим более углубленное изучение морфологии селезенки у потомства спленэктомизированных самок после введения канцерогена с использованием гистологических и морфометрических методов является весьма актуальным.

Целью исследования было изучение морфологических изменений в структуре белой пульпы селезенки на фоне развития 1,2-диметилгидразининдуцированной

опухоли толстой кишки у потомства спленэктомированных крыс.

## Материалы и методы

Исследования выполнены на 150 белых нелинейных крысах-самцах. Животные содержались в виварии, уход за ними осуществляли по нормам и правилам проведения работ с лабораторными животными согласно Европейской конвенции по защите позвоночных животных и действующему ГОСТ 33216-2014 [22]. Работа выполнена на базе медицинского факультета Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Потомство было получено путем спаривания 4-месячных самок крыс с самцами того же возраста. Спаривание спленэктомированных самок проводилось через месяц после операции по удалению селезенки. Операцию выполняли под местной анестезией с соблюдением всех правил асептики и антисептики через разрез по белой линии живота. Для создания экспериментальной модели рака толстой кишки в качестве канцерогена использован ДМГ производства компании Acros organics (Бельгия). Животные были разделены на четыре группы: 1-я – потомство здоровых самок (n=30); 2-я – потомство здоровых самок с постнатальным введением ДМГ (n=40); 3-я – потомство спленэктомированных самок (n=40); 4-я – потомство спленэктомированных самок с постнатальным введением канцерогена (n=40). Инъекции ДМГ осуществляли внутривентрально 1 раз в неделю в дозе 20 мг/кг в течение одного месяца согласно модели R.F. Jacoby et al. (1991). С целью исключения влияния стрессового фактора от инъекций канцерогена на результаты исследования контрольным животным (n=10) внутривентрально вводили изотонический раствор хлорида натрия в дозе 0,5 мл 1 раз в неделю в течение одного месяца. Было выявлено, что инъекции изотонического раствора контрольным животным не оказывали никакого влияния на исследуемые структуры селезенки по сравнению с потомством здоровых крыс в используемых в данной работе сроках. Выведение из эксперимента осуществляли через 3 и 6 месяцев после рождения путем декапитации. Исследовали селезенку только тех крыс, у которых патоморфологически была подтверждена аденокарцинома толстой кишки.

В работе применяли следующие методы.

1. Окраска гематоксилином и эозином для исследования морфологии селезенки и проведения морфометрических измерений. Ткань селезенки фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов, промывали проточной водой, затем выполняли стандартную проводку в тканевом гистопроцессоре Leica ASP 200 (Leica, Германия). После проводки кусочки селезенки заливали в парафин и готовили парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм переносили на отрицательно заряженные стекла Mentzel Glasses super frost (Германия)

и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

2. Компьютерная морфометрия. Цифровые снимки микропрепаратов получены с применением системы архивирования на базе микроскопа Leica DM4000B с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC 425 и персонального компьютера с набором прикладных программ Leica Application Suite 3.6.0 (Leica, Германия). Микрофотографии для проведения морфометрических измерений получены при  $\times 100$  и  $\times 400$ . Количественные морфометрические измерения выполнены с применением лицензионной программы «Микро-Анализ» (ООО «ТелеМедТехника», Санкт-Петербург, Россия). Для каждого среза выполнены измерения не менее чем в 10 интересующих полях зрения.

3. Определение индексов, характеризующих морфофункциональное состояние изучаемых структур белой пульпы селезенки [23]:

а) ГФИ (герминативно-фолликулярный индекс) – для определения степени развития герминативных центров:

$$\text{ГФИ} = \frac{D_{\text{ГЦ}}}{D_{\text{ЛФ}}},$$

где  $D_{\text{ГЦ}}$  – диаметр герминативных центров,  $D_{\text{ЛФ}}$  – диаметр лимфоидных узелков.

б) ИК (индекс Керногана) – для определения пропускной способности микрососудов селезенки:

$$\text{ИК} = \frac{2 \times L}{D},$$

где  $L$  – толщина стенки центральной артериолы,  $D$  – внутренний диаметр центральной артериолы;

в) ЛК (лимфоидный коэффициент) – для определения соотношения Т- и В-зависимых зон:

$$\text{ЛК} = \frac{D_{\text{ЛФ}}}{L_{\text{ПМ}}},$$

где  $D_{\text{ЛФ}}$  – диаметр лимфоидных узелков,  $L_{\text{ПМ}}$  – ширина периаптериальных лимфоидных муфт.

4. Статистическая обработка цифровых данных проводилась с использованием лицензионного пакета Microsoft Office 2003 (Word и Excel) и программы STATISTICA, достоверность определяли критерием Стьюдента (t). В работе приводятся следующие показатели:  $M$  – средняя арифметическая величина;  $m$  – средняя ошибка средней арифметической величины. Достоверными считались отличия при  $p < 0,05$  [24].

## Результаты и обсуждение

В работе использованы крысы двух возрастных групп – 3 и 6 месяцев. Интактные животные в возрасте 3 месяцев имели массу 150–200 граммов, а крысы в возрасте 6 месяцев – 250–400 граммов. В ходе исследования выявлено, что ДМГ приводит к уменьшению массы животных. Наиболее выраженное сокращение массы



отмечалось у потомства спленэктомированных крыс без воздействия в возрасте 3 месяцев – на 16% ( $p < 0,01$ ) и у потомства спленэктомированных крыс с введением канцерогена в возрасте 6 месяцев – на 25% ( $p < 0,001$ ). В других группах статистически значимое уменьшение массы крыс не наблюдалось. Изменения таких антропометрических данных как длина тела, хвоста, ушей имеют недостоверный характер. Стоит отметить, что абсолютная масса селезенки также имела тенденцию к уменьшению. Так, статистически значимое уменьшение массы селезенки отмечается у потомства спленэктомированных крыс 3 месяцев как без воздействия (на 28%), так и с введением канцерогена (на 20%). У крыс в возрасте 6 месяцев уменьшение массы селезенки достоверно лишь у потомства спленэктомированных крыс с введением ДМГ и составляет 25% ( $p < 0,01$ ).

При гистологическом исследовании селезенка 3-месячного потомства здоровых самок имеет типичное строение – как отмечают многие ученые, наиболее сложное среди периферических органов иммунитета [25]. Паренхима органа представлена красной и белой пульпой. Красная пульпа составляет 75–85% от массы органа, включая в себя пульпарные тяжи и синусоиды. Белая пульпа представлена лимфоидными узелками и периартериальными лимфоидными муфтами (ПАЛМ). Среди лимфоидных узелков встречаются первичные без герминативных центров и вторичные с центрами размножения, которые появились в них после антигенной стимуляции. Соотношение между первичными и вторичными лимфоидными узелками составляет 1:2,6. Лимфоидные узелки имеют четкое зональное строение, в каждом из которых определяется эксцентрично расположенная центральная артерия, периартериальная Т-зависимая зона, герминативный центр (В-зависимая зона), мантийная и маргинальная зоны (рис. 1). Селезенка intactных животных в возрасте 6 месяцев не имеет существенных отличий от селезенки 3-месячных крыс. Присутствует красная и белая пульпа, границы между ними по-прежнему четкие, однако соотношение между первичными и вторичными лимфоидными узелками составляет 1:1,3.

Удаление селезенки у самок до наступления беременности приводит к морфологическим изменениям паренхимы этого органа как у 3-месячного, так и у 6-месячного потомства. В 3 месяца при сохраняющейся площади и диаметре лимфоидных узелков уменьшаются размеры их герминативных центров – площадь на 28% и диаметр на 17%, маргинальная зона сокращается на 19% (табл. 1). Сокращается число крупных лимфоидных узелков (более 500 мкм в диаметре) – на 10% (рис. 2), а также доля лимфоидных узелков с герминативными центрами, поскольку их отношение к лимфоидным узелкам без центров размножения составляет 1:0,26, что свидетельствует о снижении В-клеточной иммунореактивности. Увеличение размеров ПАЛМ носит недостоверный характер. У крыс в возрасте 6 месяцев статистически значимо уменьшаются размеры

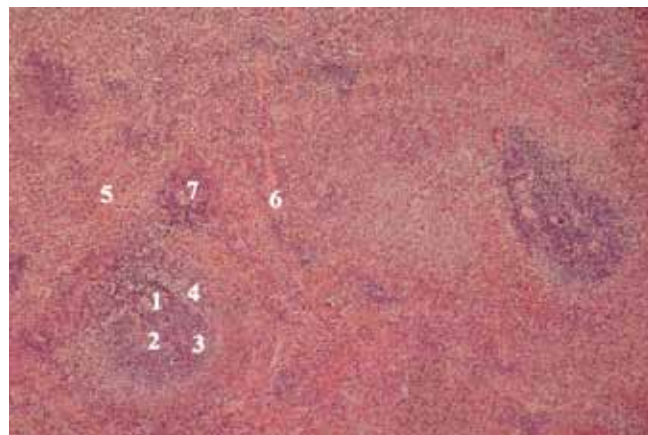


Рис. 1. Селезенка потомства intactных крыс в возрасте 3 месяцев.

1 – центральная артерия в периартериальной зоне лимфоидного узелка, 2 – герминативный центр, 3 – мантийная зона, 4 – маргинальная зона, 5 – красная пульпа, 6 – соединительнотканые трабекулы, 7 – периартериальная лимфоидная муфта. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$

Fig. 1. Spleen in offspring of intact rats at the age of 3 months. 1 – central artery in the periarterial zone of the lymphoid nodule, 2 – germinal center, 3 – mantle zone, 4 – marginal zone, 5 – red pulp, 6 – connective tissue trabeculae, 7 – periarterial lymphoid coupling. H&E.  $\times 100$

площади лимфоидных узелков и их диаметра – на 22%. Значительно сокращается число крупных лимфоидных узелков при увеличении числа мелких (менее 300 мкм) (рис. 2), а на один первичный лимфоидный узелок приходится всего 0,6 вторичного (соотношение 1:0,6). Герминативно-фолликулярный индекс, оценивающий степень развития В-клеточного звена иммунитета, сокращается у крыс в возрасте 3 месяцев на 2,39 условной единицы (у.е.), а у крыс в возрасте 6 месяцев, напротив, возрастает на 5,53 у.е. (табл. 1). Соотношение численности между популяциями В- и Т-лимфоцитов отражает лимфоидный коэффициент. Медленное уменьшение его значений у потомства спленэктомированных крыс, ассоциированное с возрастом (табл. 1), свидетельствует об определенном преобладании темпов сокращения именно В-клеточного пула лимфоцитов [23]. Другими словами, популяция Т-лимфоцитов селезенки потомства оказывается достаточно устойчивой к влиянию спленэктомии у матери, поэтому ПАЛМ в меньшей степени подвержены данному влиянию по сравнению с лимфоидными узелками. Это, вероятно, связано с компенсаторной реакцией Т-зависимых зон селезенки в ответ на запуск преждевременной инволюции тимуса [26].

У потомства intactных крыс с введением ДМГ в возрасте 3 месяцев белая пульпа селезенки сохраняет зональное строение, однако контуры лимфоидных узелков и ПАЛМ становятся менее отчетливыми. Соотношение между первичными и вторичными лимфо-

Таблица 1 / Table 1

**Морфометрические параметры белой пульпы селезенки: 1 – потомства intactных крыс, 2 – потомства спленэктомизированных крыс, 3 – потомства intactных крыс с постнатальным введением канцерогена, 4 – потомства спленэктомизированных крыс с постнатальным введением канцерогена**

**Morphometric parameters of the white pulp of the spleen: 1 – offspring of intact rats, 2 – offspring of splenectomized rats, 3 – offspring of intact rats with postnatal exposure to carcinogen, 4 – offspring of splenectomized rats with postnatal exposure to carcinogen**

	3 месяца 3 months				6 месяцев 6 months			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Диаметр ЛУ, мкм LN diameter, $\mu\text{m}$	620,85 $\pm$ 23	550,45 $\pm$ 15 **	502,33 $\pm$ 18 ***	466,86 $\pm$ 19 ***	561,87 $\pm$ 22	435,8 $\pm$ 10 ***	437,71 $\pm$ 14 ***	390,06 $\pm$ 14 ***
Площадь ЛУ, $\times 10^3$ мкм LN area, $\times 10^3 \mu\text{m}$	470,214 $\pm$ 20	424,280 $\pm$ 17	402,776 $\pm$ 14 **	235,967 $\pm$ 18 ***	530,303 $\pm$ 31	316,648 $\pm$ 26 ***	394,218 $\pm$ 30 **	212,308 $\pm$ 17 ***
Диаметр ГЦ ЛУ, мкм GC diameter in LN, $\mu\text{m}$	218,53 $\pm$ 8,5	180,08 $\pm$ 3,7 **	191,59 $\pm$ 8,3 *	138,47 $\pm$ 6,1 ***	202,025 $\pm$ 9,2	180,45 $\pm$ 4,3 *	171,78 $\pm$ 5,9 **	148,34 $\pm$ 5,5 ***
Площадь ГЦ ЛУ, $\times 10^3$ мкм GC area in LN, $\times 10^3 \mu\text{m}$	49,317 $\pm$ 3,3	35,199 $\pm$ 1,5 *	38,901 $\pm$ 1,9 **	20,479 $\pm$ 1,9 *	60,765 $\pm$ 3,5	47,64 $\pm$ 3 **	49,453 $\pm$ 4,1 *	39,649 $\pm$ 3 **
Ширина МЗ, мкм MZ width, $\mu\text{m}$	121,365 $\pm$ 6	98,69 $\pm$ 0,2 **	118,352 $\pm$ 2,2	88,495 $\pm$ 3,5 ***	122,856 $\pm$ 2,7	111,95 $\pm$ 1,8 **	109,737 $\pm$ 2,1 ***	90,642 $\pm$ 1,3 ***
Ширина ПАЛМ, мкм PALC width, $\mu\text{m}$	118,317 $\pm$ 4,8	120,87 $\pm$ 7,2	125,06 $\pm$ 4,8	100,01 $\pm$ 4,6 **	119,33 $\pm$ 3,3	123,89 $\pm$ 2,01	111,11 $\pm$ 3,9	87,94 $\pm$ 2,4 ***
Внутренний диаметр ЦА, мкм CA inner diameter, $\mu\text{m}$	21,61 $\pm$ 1,2	20,78 $\pm$ 0,5	18,98 $\pm$ 1,3	11,48 $\pm$ 0,6 ***	16,47 $\pm$ 1,4	17,07 $\pm$ 1,8	13,28 $\pm$ 0,7 *	12,66 $\pm$ 0,5 **
Толщина стенки ЦА, мкм CA wall thickness, $\mu\text{m}$	15,90 $\pm$ 0,7	17,09 $\pm$ 0,55 *	17,82 $\pm$ 0,51 *	13,31 $\pm$ 0,5 **	20,78 $\pm$ 1,5	19,88 $\pm$ 2,3	15,06 $\pm$ 0,4 ***	16,05 $\pm$ 0,59 ***
ГФИ GFI	35,19	32,71	38,14	29,65	35,95	41,48	39,24	38,03
ЛК LC	5,24	4,5	4,01	4,66	4,7	3,5	3,93	4,43
ИК KI	1,47	1,6	1,87	2,31	2,52	2,3	2,83	3,54

ЛУ – лимфоидный узелок, ГЦ – герминативный центр, МЗ – маргинальная зона, ПАЛМ – периартериальная лимфоидная муфта, ЦА – центральная артерия, ГФИ – герминативно-фолликулярный индекс, ЛК – лимфоидный коэффициент, ИК – индекс Керногана

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с intactными животными

LN – lymphoid nodule, GC – germinal center, MZ – marginal zone, PALC – periarterial lymphoid coupling, CA – central artery, GFI – germinative follicular index, LC – lymphoid coefficient, KI – Kernogan index

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  compared with intact animals

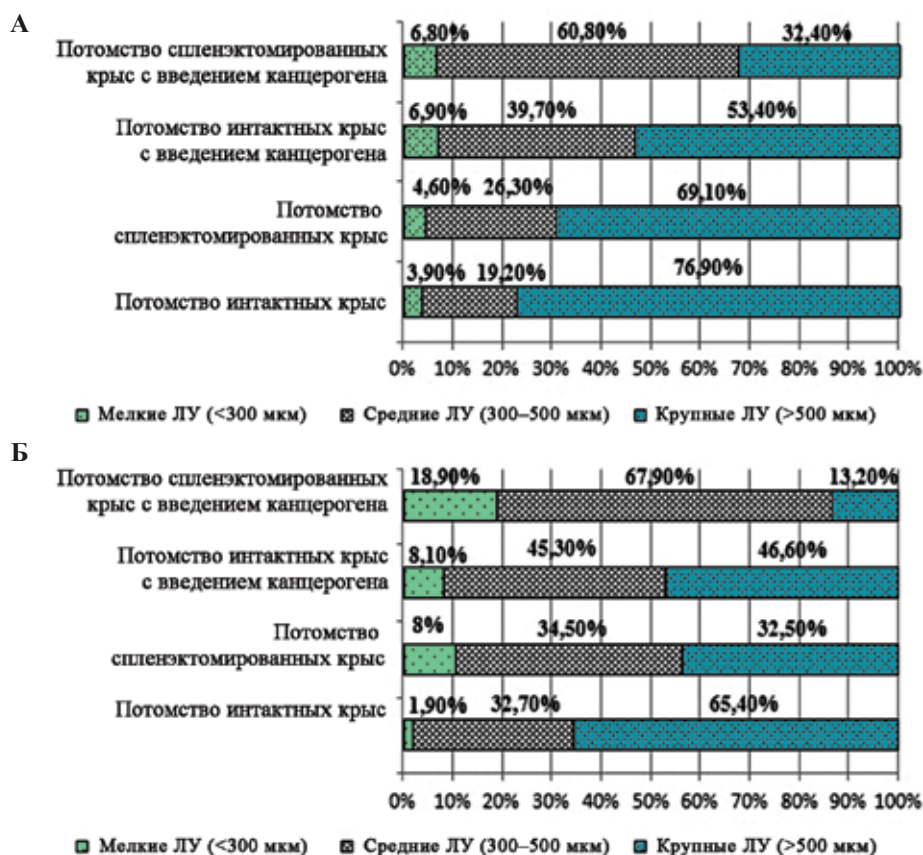


Рис. 2. Процентное соотношение числа лимфоидных узелков разного диаметра в селезенке крыс.

А – у крыс в возрасте 3 месяца, Б – у крыс в возрасте 6 месяцев

Figure 2. Percentage ratio of the number of lymphoid nodules that have various diameters in the rat spleen.

А – in rats aged 3 months, Б – in rats aged 6 months

идными узелками у крыс в 3 месяца составляет 1:1,9, а в 6 месяцев – 1:1,5. Введение канцерогена приводит к относительному увеличению числа мелких и средних (от 300 до 500 мкм в диаметре) лимфоидных узелков при относительном уменьшении числа крупных (рис. 2). При этом незначительно сокращаются площадь лимфоидных узелков (на 14%) и их диаметр – на 19%. Площадь герминативных центров уменьшается более значительно – на 21%, а диаметр – всего на 12%. Замечено, что у крыс в 6 месяцев наиболее выражено в сравнении с 3-месячными сокращаются площадь и диаметр лимфоидных узелков – на 25% и 22%, соответственно. ГФИ у 3-месячных крыс увеличивается на 3,04 у.е., а у 6-месячных – на 3,29 у.е. (табл. 1). Показатели ГФИ выше, чем у intactных животных, и значительно выше, чем у потомства спленэктомизированных крыс, которым также вводили ДМГ. Это свидетельствует о том, что в ответ на введенный канцероген В-зависимая зона оказалась более устойчива, нежели Т-зависимая [23]. Несмотря на то, что изменения ширины ПАЛМ носят недостоверный характер, показатель лимфоидного коэффициента у 3-месячных крыс уменьшается на 1,23 у.е. и у 6-месячных на 0,77 у.е., что отражает напряженность клеточного звена иммунитета и может быть обусловлено преждевременной ин-

волюцией тимуса при химическом канцерогенезе [10]. Значительно увеличиваются диаметр центральной артерии и толщина ее стенки (табл. 1). Это приводит к увеличению индекса Керногана, свидетельствующему о снижении пропускной способности центральной артерии [23].

Моделирование опухоли толстой кишки путем инъекций ДМГ у потомства спленэктомизированных крыс вызвало еще большие морфологические изменения в селезенке. При увеличении общего числа крупных лимфоидных узелков (рис. 3) их количество существенно уменьшается (рис. 2). Соотношение первичных к вторичным лимфоидным узелкам составляет у крыс в 3 месяца 1:0,44, а в 6 месяцев – 1:1,3. Границы между зонами стерты, лимфоидные узелки трудноотличимы от ПАЛМ (рис. 3). Капсула рыхлая, трабекулы утолщены. Значительно сокращается площадь лимфоидных узелков: в 3 месяца в 2 раза, в 6 месяцев – в 2,5 раза, их диаметр, соответственно, – на 24% и 30%. Значимо уменьшается диаметр герминативных центров в лимфоидных узелках (табл. 1). Их площадь у 3-месячных крыс в 2,5 раза меньше, чем у intactных животных, а у 6-месячных – в 1,5 (табл. 1). Выраженное снижение герминативно-фолликулярного индекса у потомства крыс в возрасте 3 месяцев свидетельствует о резко выражен-



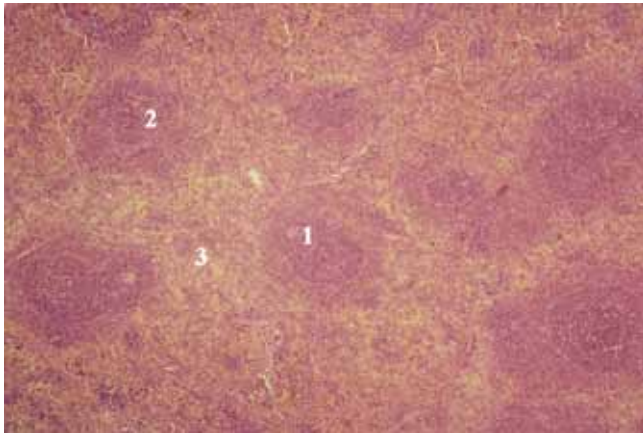


Рис. 3. Селезенка потомства спленэктомированных крыс в возрасте 6 месяцев.

1 – лимфоидный узелок, 2 – периартериальная лимфоидная муфта, 3 – красная пульпа. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$

Fig. 3. Spleen of the offspring of splenectomized rats aged 6 months. Hematoxylin and eosin stain.

1 – lymphoid nodule, 2 – periarterial lymphoid coupling, 3 – red pulp. H&E.  $\times 100$

ной гипоплазии иммунокомпетентных В-зависимых зон белой пульпы селезенки. У спленэктомированного потомства инъекции канцерогена привели к самому выраженному уменьшению ширины ПАЛМ среди всех исследуемых групп: в 3 месяца это сокращение составило 15%, а в 6 месяцев – 26% (табл. 1). Лимфоидный коэффициент при этом изменяется незначительно, что свидетельствует о том, что Т-зависимые зоны селезенки оказались более устойчивы к действию канцерогена у этих животных. Нарастание индекса Керногана с возрастом, как показано в таблице 1, свидетельствует о недостаточном кровоснабжении белой пульпы ввиду снижения пропускной способности центральной артерии [23]. Таким образом, у потомства спленэктомированных крыс, которым после рождения не вводили ДМГ, были выявлены некоторые морфологические признаки незрелости лимфоидной ткани. Наиболее значимо произошло сокращение размеров лимфоидных узелков и их В-зависимых герминативных центров. Изменение размеров ПАЛМ, вероятно, связано с компенсаторной реакцией Т-зависимых зон на преждевременную инволюцию тимуса [27]. Введение ДМГ в дозе, достаточной для развития аденокарциномы толстой кишки, привело к выраженным нарушениям морфологического состояния всех структурных компонентов селезенки с разной степенью выраженности у исследуемых групп. Последствия введения канцерогена потомству интактных крыс в большей степени проявились у животных 6-месячного возраста и характеризовались уменьшением параметров белой пульпы и сосудистыми изменениями. Вероятно, эти изменения во второй возрастной группе связаны с усугублением действия канцерогенного фактора на фоне возрастной

гипоплазии органа. Наиболее выраженная гипоплазия селезенки была выявлена при введении ДМГ потомству спленэктомированных крыс в возрасте 6 месяцев. Очевидно, усиление эффекта канцерогена в данной группе обусловлено не только возрастной инволюцией органа, но может быть связано с угнетением противоопухолевого иммунитета потомства из-за снижения цитотоксической активности лимфоцитов селезенки вследствие активации иммунной системы матери во время беременности [19] и акцидентальной инволюции тимуса [27]. Обнаруженные нами изменения могут объяснить возможное ускользание опухоли от иммунного надзора, поскольку все морфологические изменения, выявленные нами, приводят в конечном счете к нарушению взаимодействия иммунокомпетентных клеток с антигенами. Это ведет к нарушению дифференцировки В- и Т-лимфоцитов и, следовательно, снижению интенсивности гуморального и клеточного звеньев противоопухолевого иммунного ответа. Возможно, именно поэтому у потомства спленэктомированных крыс, как было показано в предыдущих исследованиях нашего научного коллектива [20], опухоли формируются чаще и имеют более агрессивный фенотип.

## Выводы

В селезенке потомства спленэктомированных самок выявлены морфологические признаки гипоплазии лимфоидной ткани, проявляющиеся в сокращении размеров лимфоидных узелков и их В-зависимых герминативных центров: уменьшении площади лимфоидных узелков в 6 месяцев на 40%, центров размножения – на 28% и 24% в 3- и 6-месячном возрасте, соответственно; ширина маргинальной зоны наиболее значимо сократилась у 3-месячного потомства (19%).

У 6-месячного потомства спленэктомированных крыс отмечается наименьшее число вторичных лимфоидных узелков, приходящихся на один первичный лимфоидный узелок. Сокращение числа крупных лимфоидных узелков на 10% у 3-месячных крыс и в 2 раза у 6-месячных животных, а также выраженное изменение соотношения первичных к вторичным узелкам подтверждают недостаточную готовность иммунореактивных зон селезенки к антигенной стимуляции.

Введение ДМГ потомству интактных крыс привело к дезорганизации лимфоидных структур селезенки: число мелких лимфоидных узелков у 3-месячных крыс увеличилось в 2 раза, у 6-месячных – в 4 раза, число крупных, напротив, сократилось на 30% у животных обеих возрастных групп. Соотношение первичных и вторичных лимфоидных узелков значимо не изменилось. У крыс в возрасте 6 месяцев по сравнению с 3-месячными развитие индуцированной ДМГ опухоли привело к более выраженному уменьшению морфологических параметров белой пульпы и сосудистым изменениям: диаметр и площадь лимфоидных узелков сократились на 22% и 25%, площадь герминативных центров – на 19%, диаметр и ширина стенки централь-



ной артерии – на 19% и 28%, соответственно. Герминативно-фолликулярный индекс превышал таковой у интактных животных и был значительно больше, чем у потомства спленэктомированных крыс, которым вводили ДМГ. Лимфоидный коэффициент у 3-месячных крыс этой группы был самым низким среди показателей всех исследуемых групп.

При индукции ДМГ аденокарциномы толстой кишки морфологические изменения в селезенке потомства спленэктомированных самок наиболее выражены по сравнению с таковыми в предыдущих моделях. У 6-месячного потомства отмечается статистически более значимое, чем у 3-месячных крыс, сокращение площади и диаметра лимфоидных узелков (в 1,4 и 2,5 раза, соответственно), диаметра и площади герминативных центров на 26% и 35%, ширины маргинальной зоны и периартериальных лимфоидных муфт на 26%, а также уменьшение диаметра просвета и толщины стенки центральной артерии на 22% и 23%. У животных данной группы кроме перечисленных выше морфологических изменений отмечается также самый высокий индекс Керногана.

## Заключение

Спленэктомия у самок до наступления беременности приводит к нарушению развития селезенки у потомства. Введение ДМГ потомству спленэктомированных крыс оказывает более выраженное отрицательное влияние на селезенку, чем у потомства интактных животных. Чем больше времени проходит от момента окончания курса инъекций канцерогена, тем к более выраженным морфофункциональным изменениям селезенки приводит его воздействие.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова.

Сбор и обработка материала – О.М. Арлашкина, М.Н. Михайлова.

Статистическая обработка – О.М. Арлашкина.

Написание текста – О.М. Арлашкина.

Редактирование – Г.Ю. Стручко, Л.М. Меркулова, М.Н. Михайлова.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – G. Yu. Struchko, L. M. Merkulova.

Collected and processed the material – O. M. Arlashkina, M. N. Mikhailova.

Performed the statistical analysis – O. M. Arlashkina.

Wrote the paper – O. M. Arlashkina.

Edited the manuscript – G. Yu. Struchko, L. M. Merkulova, M. N. Mikhailova.

## Литература/References

1. Заболеваемость населения по основным классам болезней. Федеральная служба государственной политики (Росстат). Москва, 2018. Доступно по адресу: <http://www.gks.ru>

The population incidence according to the main classes of diseases. Federal State Policy Service (Rosstat). Moscow, 2018. Available from: <http://www.gks.ru> (In Russ.).

2. Денишев Р.Р., Чирин А.С. Современное представление о факторах развития рака желудка, формирование групп риска данной онкопатологии. Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2016;6(5):1073.  
*Denishev RR, Chirin AS.* A modern view on the development factors of gastric cancer, the formation of risk groups for this oncopathology. Bulletin of medical internet conferences. 2016;6(5):1073 (In Russ.).
3. Пожарицкий К.М. Успехи современной онкологии и проблемы изучения морфогенеза опухолей. Архив патологии. 1975;(4):82–92.  
*Pozharitskii KM.* Advances in modern oncology and the problems of tumor morphogenesis research. Archive of pathology. 1975;(4):82–92 (In Russ.).
4. Gershbein LL, Amir-Mokri E, Rezai VK, Brown ME. Tumors produced in rats with a single dosage of 1,2-dimethylhydrazine. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1993;80(2):175–86.
5. Keisuke I, Otsuka E, Furuya K. Carcinogenicity of 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. Tokushima J. Exp. Med. 1980;(27):5–13.
6. Ohyama W. Markedly enhanced micronucleus induction by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in colonic cells of rats with bacterial colonization in the intestine. Mutat Res. 2019;(838):1–8. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2018.11.007.
7. Shree A, Hasan SK, Islam J, Vafa A, Afzal SM, Barnwal P et al. Colono-protective Potentiality of Methanolic Bark Extract of Acacia catechu: A Medicinal Plant against 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Toxicity in Wistar Rats. J. Environ Pathol Toxicol Oncol. 2018;37(4):273–89. DOI: 10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2018026923.
8. DE-Souza ASC, Costa-Casagrande TA. Animal models for colorectal cancer. Arq Bras Cir Dig. 2018;31(2):1369. DOI: 10.1590/0102-672020180001e1369.
9. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичев Е.В. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика тимуса при химическом канцерогенезе, вызванном введением 1,2-диметилгидразина. Морфология. 2014;146(5):35–39.  
*Struchko GYu, Merkulova LM, Moskvichev EV.* Morphological and immunohistochemical characteristics of the thymus during chemical carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine administration. Morphology. 2014;146(5):35–39 (In Russ.).
10. Стручко Г.Ю., Меркулова М.Н., Москвичев Е.В., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Драндрова Е.Г., Мухаммад З. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика опухолей желудочно-кишечного тракта на фоне иммунной недостаточности. Вестник Чувашского университета. 2011;(3):450–456.  
*Struchko GYu, Merkulova MN, Moskvichev EV, Kostrova OYu, Mikhailova MN, Drandrova EG, Mukhammad Z.* Morphological and immunohistochemical characteristics of gastrointestinal tract tumors in secondary immunodeficiency. Vestnik Chuvashskogo universiteta. 2011;3:450–456 (In Russ.).

11. *Lisnychuk N, Soroka Y, Andrijchuk I, Nebesna Z, Volkov K.* Histological changes in spleen under condition of toxic carcinogenesis. *Georgian Med News.* 2018;(280–281):160–4.
12. *Бойчук Н.В., Исламов Р.Р., Кузнецов С.Л., Улумбеков Э.Г., Чельшев Ю.А.* Гистология: Учебник для вузов. Москва: ГЭ-ОТАР-Медиа, 2001. 672 с.  
*Boychuk NV, Islamov RR, Kuznetsov SL, Ulumbekov EG, Chelyshev YuA.* Histology. Textbook. Moscow: GEOTAR-Media, 2001. 672 p. (In Russ.).
13. *Holness CL.* Macrosialin, a mouse macrophage – restricted glycoprotein, is a member of the lamp/Igp.family. *J. Biol. Chem.* 1993;(268):9661–2.
14. *Апарцин К.А.* Аутоотрансплантация ткани селезенки при вынужденной спленэктомии в условиях хирургической инфекции живота. Хирургия тяжелых гнойных процессов. Новосибирск: Наука, 2000. С. 193–209.  
*Apartsin KA.* Spleen tissue autotransplantation during forced splenectomy in conditions of abdominal surgical infection. *Surgery of severe purulent processes.* Novosibirsk: Nauka, 2000. P. 193–209 (In Russ.).
15. *Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Сергеева В.Е., Стоменская И.С.* Реакция биоаминсодержащих структур тимуса у крыс на экспериментальное удаление селезенки. Иммунология. 2000;21(2):13–17.  
*Struchko GYu, Merkulova LM, Sergeeva VE, Stomenskaya IS.* The response of bioamine-containing structures of the thymus in rats to experimental removal of the spleen. *Immunology.* 2000;21(2):13–17 (In Russ.).
16. *Павлова И.Е.* Особенности функционирования иммунной системы после спленэктомии у пациентов с заболеваниями системы крови и травмами селезенки: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. Санкт-Петербург, 2007. 42 с.  
*Pavlova IE.* Features of the immune system function after splenectomy in patients with hematological diseases and spleen injuries: Avtoref. Dr. Diss. (Med. Sci.). Sankt-Peterburg, 2007. 42 p. (In Russ.).
17. *Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF Jr, Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ et al.* Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA.* 2011;306(17):1891–901. DOI: 10.1001/jama.2011.1592.
18. *Rezaei N, Hedayat M, Aghamohammadi A, Nichols KE.* Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(6):1329–41. DOI: 0.1016/j.jaci.2011.02.047
19. *Обернихин С.С.* Влияние активации иммунной системы материнского организма в ранние сроки беременности на состояние противоопухолевого иммунитета потомства. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013;156(7):78.  
*Obernikhin SS.* The effect of immune system activation in maternal organism in early pregnancy on the state of antitumor immunity in the offspring. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2013;156(7):78 (In Russ.).
20. *Драндрова Е.Г., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н.* Влияние иммунодефицитной беременности на противоопухолевый иммунитет потомства. Успехи современного естествознания. 2013;(3):84–86.  
*Drandrova EG, Struchko GYu, Mikhailova MN.* The effect of immunodeficiency pregnancy on the antitumor immunity in the offspring. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2013;(3):84–86 (In Russ.).
21. *Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Стручко Г.Ю., Бессонова К.В., Драндрова Е.Г., Стромеская И.С.* Акцидентальная инволюция тимуса крыс на фоне развития аденокарциномы толстой кишки, индуцируемой 1,2-диметилгидразином на фоне удаления селезенки. Вестник Чувашского университета. 2012;(3):416–423.  
*Kostrova OYu, Mikhailova MN, Struchko GYu, Bessonova KV, Drandrova EG, Stromenskaya IS.* Accidental involution of the thymus in rats with colon adenocarcinoma induced by 1,2-dimethylhydrazine on the background of spleen removal. *Vestnik Chuvashskogo universiteta.* 2012;(3):416–423 (In Russ.).
22. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными грызунами и кроликами: ГОСТ 33216-2014. Введен 2016.07.01. Москва. Доступно по адресу: <http://docs.cntd.ru>  
Guidelines for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits: State All-Union standard (GOST) 33216-2014. From 2016.07.01. Moscow. Available from: <http://docs.cntd.ru> (In Russ.).
23. *Волков В.П.* Новый алгоритм морфометрической оценки функциональной иммуноморфологии селезенки. Медицина и фармакология: электронный научный журнал. 2015;(18):5–6.  
*Volkov VP.* New algorithm of the morphometric assessment of functional immunomorphology of the spleen. *Meditina i farmakologiya: elektronnyi nauchnyi zhurnal.* 2015;(18):5–6 (In Russ.).
24. *Реброва О.Ю.* Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: Media Sfera, 2002. 312 с.  
*Rebrova OYu.* Statistical analysis of medical data. Application of the STATISTICA package. Moscow: Media Sfera, 2002. 312 p. (In Russ.).
25. *Auerbach A.* Diagnostic Pathology: Spleen. Lippincott Williams & Wilkins, 2014. 536 p.
26. *Москвичев Е.В., Меркулова Л.М., Стручко Г.Ю., Михайлова М.Н., Кострова О.Ю.* Иммуногистохимическая характеристика акцидентальной инволюции тимуса после спленэктомии. Вестник Национального медико-хирургического центра Н.И. Пирогова. 2012;7(2):4–43.  
*Moskvichev EV, Merkulova LM, Struchko GYu, Mikhailova MN, Kostrova OYu.* Immunohistochemical characterization of accidental involution of the thymus after splenectomy. *Bulletin of Pirogov national medical & surgical center.* 2012;7(2):4–43 (In Russ.).
27. *Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Драндрова Е.Г., Арлашкина О.М.* Морфофункциональные изменения селезенки и тимуса крысят, родившихся от спленэктомированных крыс-самок. Успехи современного естествознания. 2014;(9):70–72.  
*Struchko GYu, Merkulova LM, Kostrova OYu, Mikhaylova MN, Drandrova EG, Arlashkina OM.* Morphofunctional changes of the spleen and thymus rats born to female rats after removal of the spleen. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya.* 2014;(9):70–72 (In Russ.).

**Информация об авторах**

Ольга Михайловна Арлашкина – аспирант кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Глеб Юрьевич Стручко – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Лариса Михайловна Меркулова – доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

Марина Николаевна Михайлова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова.

**Author information**

Olga M. Arlashkina – Post-graduate student, Department of normal and topographic anatomy with operative surgery, I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0001-7686-5914>

Gleb Yu. Struchko – Dr. Sci. (Med.), professor, head of the Department of normal and topographic anatomy with operative surgery, I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0002-0549-5116>

Larisa M. Merkulova – Dr. Sci. (Med.), professor, Department of normal and topographic anatomy with operative surgery, I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0001-7460-6791>

Marina N. Mikhailova – Cand. Sci. (Med.), associate professor, Department of normal and topographic anatomy with operative surgery, I.N. Ulyanov Chuvash State University.  
<http://orcid.org/0000-0001-6957-940X>

## Гетеротопия легкого в брюшную полость у новорожденной девочки

*А.Л. Черняев<sup>1,2</sup>, К.А. Куликов<sup>3</sup>, П.В. Хроленко<sup>3</sup>, О.А. Васюкова<sup>2</sup>, М.В. Самсонова<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup> ФГБУ Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей Минздрава России, Москва, Россия

<sup>4</sup> ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Гетеротопия – изменение места закладки и развития органа в процессе его индивидуального развития. В литературе описаны редкие случаи обнаружения экстралобарной секвестрации легких в мягкие ткани шеи, в грудную стенку, в эндокард левого желудочка сердца, в кожу, в прямую кишку, в орбиту глаза и в субретинальное пространство.

В данной работе представлено клиническое наблюдение редкой формы гетеротопии легких в брюшной полости у девочки, диагностированной через 6 дней после рождения. Ребенок от доношенной, но осложненной беременности, родоразрешение путем кесарева сечения, при рождении масса тела 3680 г, рост 50 см, 7/8 баллов по шкале Апгар, состояние тяжелое. На 3-и сутки после рождения зафиксирован приступ тахикардии до 205 ударов в минут и падения артериального давления, который был купирован в течение 15 минут; на 6-е сутки в отделении хирургии и реанимации новорожденных НМИЦ здоровья детей при ультразвуковом исследовании выявлено экзогенное неоднородное опухолевидное образование размерами 22×28×20 мм с множественными анеэхогенными полостями диаметром до 6 мм, которое было удалено лапароскопически на 10-е сутки после рождения ребенка. При патологоанатомическом исследовании операционного материала обнаружено, что образование представлено тканью легкого. Девочка была выписана в удовлетворительном состоянии в ясном сознании.

Вероятно, такая гетеротопия могла развиваться в онтогенезе во время осложненной беременности в I и III триместрах (в I триместре диагностирован порок развития плода, без уточнений, а в III — угроза прерывания беременности, повышение АД, отеки беременной).

**Ключевые слова:** гетеротопия легких, осложненная беременность.

**Для корреспонденции:** Самсонова Мария Викторовна. E.mail: samary@mail.ru

**Для цитирования:** Черняев А.Л., Куликов К.А., Хроленко П.В., Васюкова О.А., Самсонова М.В. Гетеротопия легкого в брюшную полость у новорожденной девочки. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):59–62. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.59-62

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (№ ААА-А17-117013050044-8).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 11.10.2019. Получена после рецензирования 11.11.2019. Принята в печать 19.11.2019.

## Intra-abdominal heterotopic lung tissue in the newborn girl

*A.L. Cherniaev<sup>1,2</sup>, K.A. Kulikov<sup>3</sup>, P.V. Khrolenko<sup>3</sup>, O.A. Vasyukova<sup>2</sup>, M.V. Samsonova<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup> Research Institute of Pulmonology, Federal Medical and Biological Agency of Russian Federation, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Scientific Center of Children Health, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

Heterotopia is the spatial displacement of an organ during prenatal development. The literature data describe rare cases of the extralobar sequestration of the lung in different locations, such as neck soft tissues, chest wall, endocardium of the left ventricle, skin, rectum, eye orbit as well as the subretinal space.

The paper presents a clinical case of the rare lung heterotopia in the abdominal cavity diagnosed 6 days after birth in a girl. The baby was born after a full-term complicated pregnancy by Caesarean section. Body weight at birth was 3680 g, height 50 cm, 7/8 points on the Apgar scale. The condition of the newborn was severe. On



the third day after delivery, an attack of tachycardia up to 205 beats per minute and a drop in blood pressure was recorded and stopped within 15 minutes. On the 6th day after birth, an ultrasound revealed an echogenic inhomogeneous tumor-like formation  $22 \times 28 \times 20$  mm in size with multiple anechogenic cavities with a diameter of up to 6 mm, which was removed laparoscopically on the 10th postpartum day in the neonatal surgery department of the Scientific Center of Children Health of the Ministry of Health of the Russian Federation. Pathological examination of the surgical material revealed that the formation was represented by lung tissue. The girl was discharged in satisfactory condition and fully conscious.

This heterotopia could probably appear due to complications of pregnancy in the first and third trimesters, since a fetal malformation, not otherwise specified, was diagnosed in the first trimester, and the threatened miscarriage, increased blood pressure and edema were recorded in the third trimester.

**Keywords:** heterotopia of the lung, high-risk pregnancy.

**Corresponding author:** Maria V. Samsonova. E-mail: samary@mail.ru

**For citation:** Cherniaev A.L., Kulikov K.A., Khrolenko P.V., Vasyukova O.A., Samsonova M.V. Heterotopy of the lung in abdomen in a newborn girl. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):59–62. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2019.8.4.59-62

**Funding.** The work is performed in the framework of the state assignment of FSBI Research Institute of Human Morphology (No. AAA-A17-117013050044-8).

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

**Received** 11.10.2019 **Received in revised form** 11.11.2019. **Accepted** 19.11.2019.

Гетеротопия – это возникновение в процессе эмбриогенеза той или иной тканевой структуры (органа, ткани) на необычном месте. Гетеротопии одних тканей в другие – довольно редкое явление в патологии. Чаще всего описывают гетеротопии тканей надпочечников, поджелудочной [1] и щитовидной железы, печени, почки [2], поперечно-полосатых мышц, глиальной ткани, в легких [3, 4]. Описывают экстралобарную секвестрацию легких в мягкие ткани шеи, в грудную стенку, в эндокард левого желудочка сердца [5], в кожу [6], в прямую кишку [7], в орбиту глаза [8], в субретинальное пространство [9]. Такая гетеротопия довольно часто сочетается с диафрагмальной грыжей и скелетными аномалиями. P. Bassi et al. [10] описали на аутопсии наличие хористомы с легочной тканью у новорожденного, умершего через несколько часов после рождения, в дорсальной ретроперитонеальной жировой клетчатке между диафрагмой и левой почкой. Было описано наличие в брюшной полости бронхогенных кист легких [11].

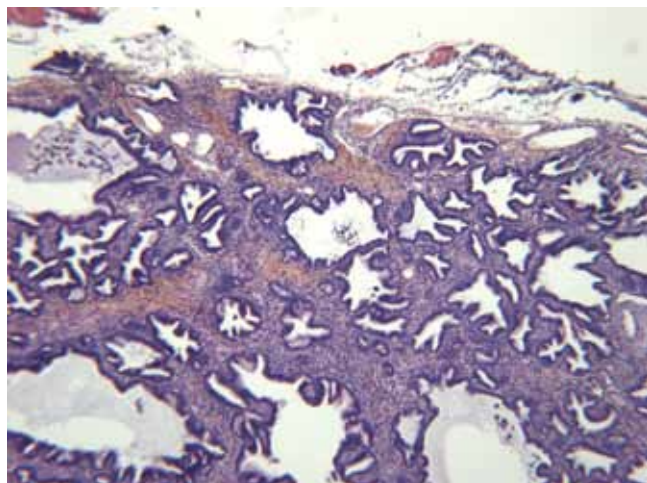
Приводим собственное клиническое наблюдение.

Девочка родилась от четвертой беременности, третьи роды, на 39-й неделе беременности при головном предлежании, родоразрешение было проведено путем кесарева сечения. В I триместре (19–20-я недели) диагностирован порок развития плода, однако не указано, какой, в III триместре были угроза прерывания беременности, повышение АД, отеки беременной. Рост ребенка при рождении составил 50 см, масса тела 3680 г. Оценка состояния новорожденной по шкале Апгар 7/8 баллов. Состояние после рождения тяжелое за счет снижения уровня церебральной и двигательной активности, умеренно выраженных нарушений микроциркуляции. На 3-и сутки после рождения возникли тахикардия до 205 ударов в минуту, мраморность кожных покровов, АД 73/38 мм рт. ст., ребенок был в сознании. В течение 15 минут это со-

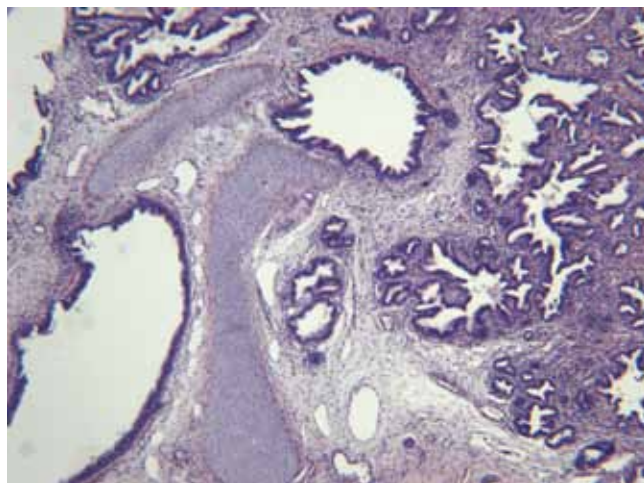
стояние было купировано. На фоне проведенной терапии увеличился уровень церебральной и двигательной активности, девочка самостоятельно сосала, прибавила в весе. На 6-е сутки после рождения девочка поступила в отделение хирургии и реанимации новорожденных НИИЦ здоровья детей в тяжелом состоянии. При УЗИ брюшной полости в поддиафрагмальном пространстве слева в брюшной полости было обнаружено экзогенное неоднородное опухолевидное образование размерами  $22 \times 28 \times 20$  мм с множественными анехогенными полостями диаметром до 6 мм. На 10-е сутки после поступления выполнено лапароскопическое удаление опухолевидного образования брюшной полости. После операции ребенок находился на искусственной вентиляции легких. На 7-е сутки после операции были сняты швы. На 9-е сутки после операции девочка выписана в удовлетворительном состоянии, в ясном сознании, движение во всех конечностях было активное, мышечный тонус достаточный, рефлексы новорожденных (хватательный, сосательный, Моро) вызывались, но быстро истощались. Температура тела нормальная.  $SpO_2$  99–100%, без дотации кислорода. Продолжено грудное вскармливание.

В патологоанатомическое отделение было доставлено опухолевидное образование округлой формы диаметром 2,7 см серовато-красноватого цвета с поверхности, на разрезе: сероватая ткань с тонкостенными полостями диаметром до 0,3 см.

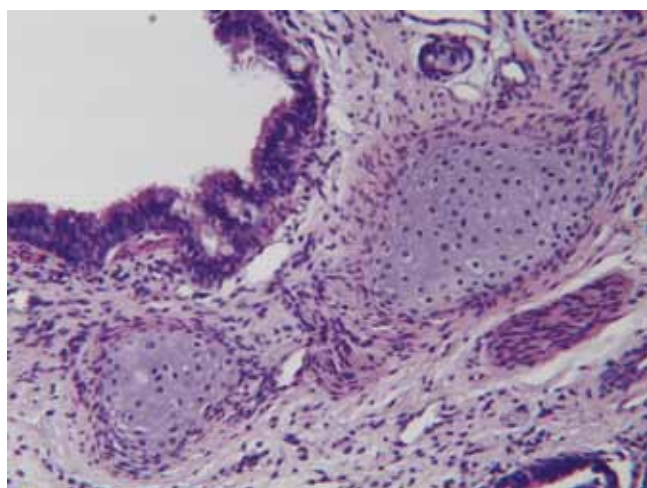
При гистологическом исследовании: опухолевидное образование представлено тканью легкого (рис. 1) в виде сформированных бронхов с мышечной оболочкой и хрящевыми пластинками (рис. 2, 3), встречаются терминальные бронхиолы с эмбриональными альвеолами, содержащими макрофаги (рис. 4). Опухолевое образование окружено соединительной тканью без мезотелиальной выстилки.



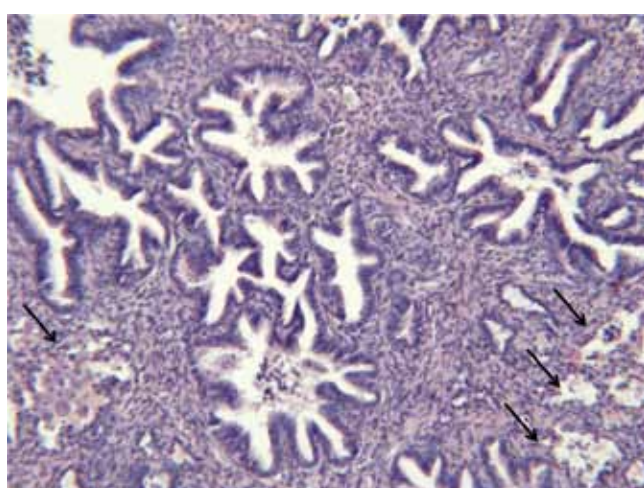
*Рис. 1.* Ткань легкого, покрытая серозным листком.  
Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 40$   
*Fig. 1.* Lung tissue, covered with serosa. H&E,  $\times 40$



*Рис. 2.* Ткань легкого с наличием хрящевых бронхов  
и терминальных бронхиол.  
Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 40$   
*Fig. 2.* Lung tissue with cartilaginous bronchi and terminal  
bronchioles. H&E,  $\times 40$ .



*Рис. 3.* Стенка хрящевого бронха, выстланная респираторным  
реснитчатым эпителием.  
Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$   
*Fig. 3.* Large bronchus mucosa lined with respiratory ciliated  
epithelium. H&E,  $\times 100$



*Рис. 4.* Ткань легкого с наличием терминальных бронхиол  
и единичных примитивных альвеол.  
Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 100$   
*Fig. 4.* Lung tissue with terminal bronchioles and few immature  
alveoli. H&E,  $\times 40$

В литературе мы нашли описания гетеротопии легкого в брюшной полости. Данный вариант следует дифференцировать с экстраторакальной секвестрацией, при которой ткань легкого, не связанная с бронхиальным деревом, должна быть окружена плевральным листком с мезотелиальной выстилкой. В нашем наблюдении мезотелиальная выстилка нами не обнаружена. В работе G.W. Jeon et al. приведено наблюдение гетеротопии легочной ткани в коже у новорожденной, гистологическая картина которой была аналогичной описанной нами выше [6].

### Заключение

Описана редкая форма гетеротопии легких в брюшной полости у девочки, диагностированная через 6 дней

после рождения. Вероятно, такая гетеротопия могла возникнуть в онтогенезе во время осложненной беременности в I и III триместрах.

### Литература/References

1. De Krijger RR, Albers MJ, Bogers AJ, Mooi WJ. Heterotopic pancreatic tissue presenting as a solid and cystic lung lesion: a very unusual bronchopulmonary foregut malformation. *Pediatr Dev Pathol.* 2004;7(2):204–9. DOI: 10.1007/s10024-002-8093-5.
2. Di Guardo G, Marruchella G, Affronte M, Zappulli V, Benazzi C. Heterotopic kidney tissue in the lung of a free-living common dolphin (*Delphinus delphis*). *Vet Pathol.* 2005;42(2):213–4. DOI: 10.1354/vp.42-2-213.
3. Okeda R. Heterotopic brain tissue in the submandibular region and lung. Report of two cases and comments about pathogenesis.

- Acta Neuropathol. 1978; 43(3):217–20. DOI: 10.1007/bf00691581.
4. Rademaker MV, Bakker PM, Bots GT, Endtz LJ. Heterotopic nervous tissue in the lungs. Neuropediatrics. 1980;11(3):284–90. DOI: 10.1055/s-2008-1071397.
  5. Schindler CU, Scharfenberger M, Müller-Hermelink HK, Dämmrich J. Bronchial cyst in the endocardium of the left heart. Case report with review of cardiac heterotopic tissues. Pathologe. 1993;14(3):175–7 (In German). PMID: 8516275.
  6. Jeon GW, Han SW, Jung JM, Kang MS, Sin JB. The first Korean case of cutaneous lung tissue heterotopy. J Korean Med Sci. 2010;25(9):1387–9. DOI: 10.3346/jkms.2010.25.9.1387.
  7. Kawahara K, Mishima H, Nakamura S. Heterotopic respiratory mucosa in the rectum: a first case report. Virchows Arch. 2007;451(5):977–80. DOI: 10.1007/s00428-007-0510-8.
  8. Thanos A, Jakobiec FA, Mendoza PR, Hatton MP. Ectopic (choristomatous) orbital respiratory cyst: histopathology and immunohistochemistry. Surv Ophthalmol. 2014 May-Jun;59(3):328–33. DOI: 10.1016/j.survophthal.2013.07.001. Epub 2013 Dec 18.
  9. Zhang T, Lin H, Zhou Z, Tong N, Li Y, Zhang Y et al. Subretinal heterotopic respiratory epithelium: a case report and literature review. Diagn Pathol. 2015;10:180. DOI: 10.1186/s13000-015-0416-8.
  10. Bassi P, Gentile A, Militerno G. Retroperitoneal pulmonary choristoma in a newborn calf. J Vet Diagn Invest. 2010; 22(6):1008–10. DOI: 10.1177/104063871002200631.
  11. Kim KH, Kim JI, Ahn CH, Kim JS, Ku YM, Shin OR et al. The first case of intraperitoneal bronchogenic cyst in Korea mimicking a gallbladder tumor. J Korean Med Sci. 2004;19(3):470–3. DOI: 10.3346/jkms.2004.19.3.470.

### Информация об авторах

Черняев Андрей Львович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом фундаментальной пульмонологии Научно-исследовательского института пульмонологии, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека.

Куликов Кирилл Алексеевич – заведующий патологоанатомической лабораторией НМИЦ здоровья детей.

Хроленко Полина Владимировна – врач, детский хирург НМИЦ здоровья детей.

Васюкова Олеся Александровна – младший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека.

Самсонова Мария Викторовна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологической анатомии НИИ пульмонологии, старший научный сотрудник Московского клинического научно-практического Центра имени А.С. Логинова.

### Author information

Andrey L. Cherniaev – Dr. Sci. (Med.), professor, Head of the Fundamental Pulmonology Department, Pulmonology Scientific Research Institute of FMBA of Russia; Leading Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0003-0973-9250>

Kirill A. Kulikov – Head of the Pathology Department, Scientific Center of Children Health, Moscow Healthcare Department. <https://orcid.org/0000-0002-1107-8693>

Polina V. Khrolenko – pediatric surgeon, Scientific Center of Children Health, Moscow Healthcare Department. <https://orcid.org/0000-0001-9814-6275>

Olesya A. Vasyukova – Junior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0001-6068-7009>

Maria V. Samsonova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, Pulmonology Scientific Research Institute of FMBA of Russia, Senior Researcher, Pathomorphology Department, Loginov Moscow Clinical Scientific Center. <https://orcid.org/0000-0001-8170-1260>



## Получение поликлональных антител к AL-каппа легкой цепи амилоидного белка

З.В. Гюева<sup>1</sup>, К. Рёкен<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, Владикавказ, Россия

<sup>2</sup> Институт патологии университета имени Кристиана Альбрехта, Киль, Германия

**Введение.** Классификация амилоидозов основана на белке-предшественнике, который образует амилоидные фибриллы, и распределении амилоидного отложения – системном или локализованном. Наиболее частой формой системного амилоидоза является AL-амилоидоз, при котором амилоидогенный белок состоит из полноразмерных лямбда или каппа легких цепей иммуноглобулина либо их фрагментов. В отличие от других типов амилоидоза AL-амилоидоз трудно классифицировать иммуногистохимическим методом, так как каждый пациент с этим заболеванием обладает индивидуальной последовательностью аминокислот в варибельном регионе легких цепей и использование стандартного набора антител не всегда дает достоверный результат. Цель работы – получение поликлональных антител к пептидным эпитопам варибельного и константного регионов каппа легких цепей амилоидного белка.

**Материалы и методы.** Информационный поиск и анализ пяти субклассов амилоидогенных каппа легких цепей иммуноглобулина был проведен с использованием базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) и сведений литературы. Найденные аминокислотные последовательности обрабатывали в программе Tcoffe Regular. Вторичную структуру белка анализировали по методу J.M. Parker et al. (1986) с использованием программного обеспечения Peptide Companion software (CoshiSoft/PeptiSearch, США). После выбора аминокислотных последовательностей проводили синтез двух полипептидов и их очистку методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Для получения поликлональных пептидных антител кроликов новозеландской породы иммунизировали синтетическими пептидами по стандартизированному протоколу (Pineda Antibody-Service, Германия). Сыворотку крови для исследования брали на 60-й и 100-й дни после начала иммунизации, ее эффективность тестировали методом дот-блоттинга. Фракцию IgG выделяли методом аффинной хроматографии на колонке Hi Trap Protein G HP (Amersham Biosciences AB, Германия).

**Результаты.** Анализ 112 аминокислотных последовательностей каппа легких цепей показал, что самым распространенным является субкласс I (87 наблюдений), использованный для составления гипотетической аминокислотной цепи. Первый антигенный эпитоп был выбран из наиболее часто встречающихся аминокислотных остатков варибельного региона гипотетической цепи и соответствовал аминокислотным позициям 3–17 (QMTQSPSSLSASVGD). Константный регион у всех пяти субклассов был одинаковым, и в качестве второго эпитопа использовали участок, соответствующий аминокислотным позициям 116–130 (FIFPPSDEQLKSGTA). Синтезированные пептиды NH<sub>2</sub>-CQMTQSPSSLSASVGD-CONH<sub>2</sub> и NH<sub>2</sub>-CFIFPPSDEQLKSGTA-CONH<sub>2</sub> были очищены методом HPLC (до 86% и 89%, соответственно) и применены для иммунизации. Успешность ее была доказана методом дот-блоттинга, с использованием синтезированных пептидов в качестве позитивного контроля. Выделенные из сыворотки крови IgG антитела давали положительную реакцию с амилоидом во всех случаях AL-каппа амилоидоза и отрицательную – при AL-лямбда, AA- и транстирретиновом амилоидозе.

**Заключение.** Нами получены четыре новых поликлональных антитела, направленных к полипептидам NH<sub>2</sub>-CQMTQSPSSLSASVGD-CONH<sub>2</sub> (AK1 и AK2) и NH<sub>2</sub>-CFIFPPSDEQLKSGTA-CONH<sub>2</sub> (AK3 и AK4) варибельного и константного регионов каппа легкой цепи иммуноглобулина. Данные антитела могут быть рекомендованы для иммуногистохимического типирования амилоидоза в разных органах и тканях с целью уточнения диагностики AL-каппа амилоидоза.

**Ключевые слова:** амилоидоз, AL-каппа амилоидоз, антитела, дот-блоттинг, иммуногистохимическое исследование.

**Для корреспонденции:** Зарина Владиславовна Гюева. E-mail: gioeva\_z@mail.ru

**Для цитирования:** Гюева З.В., Рёкен К. Получение поликлональных антител к AL-каппа легкой цепи амилоидного белка. Клини. эксп. морфология. 2019;8(4):63–68. DOI:10.31088/CEM2019.8.4.63-68

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках гранта Германской службы академических обменов (DAAD).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 10.10.2019. Получена после рецензирования 12.11.2019. Принята в печать 19.11.2019.



## Generation of polyclonal antibodies directed against AL-kappa light chain amyloid protein

Z.V. Gioeva<sup>1</sup>, C. Röcken<sup>2</sup>

<sup>1</sup> North Ossetian State Medical Academy of the Ministry of Health of the Russia, Vladikavkaz, Russia

<sup>2</sup> Institute of Pathology, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany

**Introduction.** Amyloidoses are classified based on the precursor protein that forms amyloid fibrils, and either systemic or localized distribution of amyloid deposition. Light chain (AL) amyloidosis, the most common form of systemic amyloidosis, comprises the full length of immunoglobulin fragments of light chains of kappa or lambda isotype. In contrast to other amyloid deposits, AL amyloidosis is considered as the most difficult one for classification by immunohistochemistry analysis, since every patient seems to have individual amino acid sites in the variable region. Thus, the use of standard antibody kits will not enable to obtain accurate results in all cases. The aim of this study was to obtain polyclonal antibodies to peptide epitopes of the variable and constant regions of kappa light chains of the amyloid protein.

**Material and methods.** Using the Database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and the data from scientific publications, we conducted a search and analysis of five classes of amyloidogenic kappa light chains. The Tcoffe Regular program was used for processing all amino acid chains. Protein secondary structure was determined according to the method described by Parker (1986), using the Peptide Companion software (CoshiSoft/PeptiSearch, USA). After the selection of amino acid sequences, two polypeptides were synthesized and isolated by high performance liquid chromatography (HPLC). To obtain polyclonal peptide antibodies, New Zealand rabbits were immunized with synthetic peptides according to a standardized protocol (Pineda Antibody-Service, Germany). Blood serum for the study was taken on day 60 and day 100 after the start of immunization. Immunization success was tested by dot-blotting method. The IgG fraction was isolated by affinity chromatography on a Hi Trap Protein G HP column (Amersham Biosciences AB, Germany).

**Results.** Analysis of the 112 amino acid sequences of kappa light chains showed the subclass I to be the most common finding (87 cases). Therefore, it was selected for composing a hypothetical amino acid chain.

The first antigenic epitope was selected from the most common amino acid residues of the variable region in the hypothetical chain and it corresponded to amino acid positions 3–17 (QMTQSPSSLSASVGD). The constant region in all five subclasses was the same. As the second epitope, a section of the constant region was selected which corresponded to amino acid positions 116–130 (FIFPPSDEQLKSGTA). The synthesized peptides NH<sub>2</sub>-CQMTQSPSSLSASVGD-CONH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub>-CFIFPPSDEQLKSGTA-CONH<sub>2</sub> were purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) technique with the achieved purity of 86% and 89%, respectively and used for immunization. Its success was tested by dot-blotting method using the synthesized peptides as a positive control.

IgG antibodies isolated from blood serum showed positive amyloid reaction in all cases of AL-kappa amyloidosis and negative, in AL-lambda, AA- and transthyretin amyloidosis.

**Conclusion.** As a result, we obtained four new polyclonal antibodies directed against NH<sub>2</sub>-CQMTQSPSSLSASVGD-CONH<sub>2</sub> (AK1 and AK2) and NH<sub>2</sub>-CFIFPPSDEQLKSGTA-CONH<sub>2</sub> (AK3 and AK4) polypeptides of the variable and constant regions of the immunoglobulin kappa light chain. These antibodies can be recommended for immunohistochemical typing of amyloidosis in different organs and tissues in order to clarify the diagnosis of AL-kappa amyloidosis.

**Keywords:** amyloidosis, AL-kappa amyloidosis, antibodies, dot-blotting, immunohistochemistry.

**Corresponding author:** Zarina V. Gioeva. E-mail: gioeva\_z@mail.ru

**For citation:** Gioeva Z.V., Röcken K. Generation of polyclonal antibodies directed against AL-kappa light chain amyloid protein. Clin. exp. morphology. 2019;8(4):63–68 (in Russ.) DOI:10.31088/CEM2019.8.4.63-68

**Funding.** This project was supported by grant of the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD).

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

**Received** 10.10.2019. **Received in revised forms** 12.11.2019. **Accepted** 19.11.2019.

## Введение

Амилоидоз легких цепей (AL-амилоидоз) является наиболее частой формой системного амилоидоза и относится к группе болезней отложения моноклонального иммуноглобулина. На долю AL-амилоидоза приходится около 70% всех случаев системного амилоидоза [1–3].

Классификация амилоидозов основана на белке-предшественнике, который образует амилоидные фиб-

риллы, и распределении амилоидного отложения – системном или локализованном. Каждая отдельная форма амилоидоза характеризуется химической идентичностью амилоидного белка, который откладывается во внеклеточных пространствах тканей и органов, в результате чего развиваются атрофия и склероз органов. К настоящему времени идентифицировано 36 белков амилоида [4]. Для точной диагностики форм амилои-

доза и выбора тактики лечения необходима идентификация амилоидного компонента [5].

Амилоидогенный белок при AL-амилоидозе представляет собой свободную полноразмерную легкую цепь IgG или ее фрагменты, которые синтезируются моноклональной популяцией плазматических клеток, тогда как в норме эти клетки продуцируют молекулы иммуноглобулина IgG, IgM или IgA.

Легкая цепь иммуноглобулина состоит из N-концевого переменного домена и C-концевого константного домена. Источником вариабельности аминокислотных последовательностей в молекулах иммуноглобулина является комбинаторика переменных генов (V) и генов соединения (J), что позволяет генерировать по меньшей мере 3000 разных последовательностей легких цепей. В формировании переменного домена легкой цепи участвуют 40 генов каппа и 33 гена лямбда, а также 5 генов соединения каппа (JK) и 4 гена соединения лямбда (JL), что увеличивает вариабельность белка. Кроме того, соматические мутации, повышающие сродство антитела к антигену, также вызывают изменения аминокислотных последовательностей. В норме плазматические клетки чаще продуцируют легкие цепи изотипа каппа, но при AL-амилоидозе преобладает продукция изотипа лямбда в соотношении лямбда/каппа 3:1 [6]. Преимущественно встречаются I и IV субклассы лямбда цепей и I, III, IV субклассы каппа цепей иммуноглобулинов, что позволяет считать их наиболее амилоидогенными.

Таким образом, каждый пациент с AL-амилоидозом обладает уникальной амилоидогенной белковой последовательностью, обусловленной комбинацией разных генов и различными соматическими мутациями белков и отдельных аминокислот, что чрезвычайно осложняет иммуногистохимическое типирование амилоидоза.

Ценными реагентами для распознавания пептидов и белков в биологических образцах являются пептидные антитела [7]. Они нашли широкое применение в разных областях клинической лабораторной диагностики различных заболеваний, включая AL-амилоидоз. Использование пептидных антител, направленных на уникальные последовательности легкой цепи, позволяет идентифицировать лямбда или каппа цепи с помощью иммуногистохимического исследования [8]. Получение диагностически значимых пептидных антител прежде всего зависит от адекватного выбора пептидов и скрининга антител. Объективные проблемы получения пептидных антител – невозможность предсказать, будут ли они распознавать нативный белок из-за конформационных/структурных различий между синтетическими пептидами и пептидными эпитопами в нативном белке и будет ли антитело распознавать свою мишень в образцах тканей после рутинной подготовки к морфологическому исследованию [7].

С целью улучшения иммуногистохимической диагностики AL-амилоидоза и предотвращения ошибок в его типировании целесообразно расширение панели

антител, направленных к вариабельному и константному регионам каппа легких цепей, которые могут быть получены с помощью использования синтетических полипептидов в качестве иммуногена.

Целью настоящего исследования было получение поликлональных антител к пептидным эпитопам вариабельного и константного регионов каппа легких цепей амилоидного белка.

## Материалы и методы

Выбор антигенных эпитопов основывался на анализе частоты встречаемости аминокислотных цепей по базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI, США) и сведений литературы, соответствующих критериям поиска «каппа легкие цепи» и «амилоид». Все найденные аминокислотные последовательности были обработаны в программе TCoffe Regular, для прогнозирования их антигенности, вторичную структуру полипептидов анализировали по методике Паркера [9] с использованием программного обеспечения Peptide Companion software (CoshiSoft/PeptiSearch, США). После выбора аминокислотных последовательностей проводили синтез полипептидов с последующей очисткой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для получения поликлональных пептидных антител использовали четырех кроликов новозеландской породы в возрасте 3–4 месяцев. Содержание и манипуляции с животными проводили с соблюдением требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или других научных целей» (Страсбург, 1986). Кроликов иммунизировали полипептидами по базовому протоколу компании Pineda Antibody-Service (Германия): преиммунизация внутривенным введением полного адьюванта Фрейнда, подкожное введение антигена на 20-й, 30-й, 40-й дни, бустерные инъекции на 61-й, 75-й, 91-й дни.

Забор крови из ушной вены проводили на 60-й и 100-й день после начала иммунизации.

Иммунный ответ на синтезированные полипептиды тестировали на 60-й день методом дот-блоттинга. На нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-ECL, Amersham Bioscience, Германия) наносили 5 мкг антигена, используемого для иммунизации кроликов, и высушивали при комнатной температуре 30 минут. Неспецифическое связывание блокировали 3% альбумином бычьей сыворотки в Трис-буфере в течение следующих 30 минут. Затем на нитроцеллюлозу наносили на 30 минут преиммунную сыворотку, сыворотку иммунизированных животных либо инкубировали без источника антител. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с щелочной фосфатазой козы антитела против иммуноглобулинов кролика (goat-anti-rabbit antibody, DAKO, Дания). Между этапами проводили промывание нитроцеллюлозы Трис-буфером. Иммунную реакцию визуализировали с помощью субстрата NBT/BCIP (p-nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-

chloro-3-indolyl phosphate Pierce Biotechnology, Германия). Фракцию IgG из сыворотки выделяли методом аффинной хроматографии на колонке Hi Trap Protein G HP (Amersham Biosciences AB, Германия).

## Результаты

Нами был проведен анализ 112 аминокислотных последовательностей у пациентов с AL-каппа амилоидозом. В базе данных NCBI они подразделены на пять субклассов. Субкласс I составил 87 аминокислотных цепей, субкласс II – три цепи, в субклассах III и IV найдено по 11 цепей, в субклассе V – лишь одна цепь. Для выбора участков антигенных эпитопов нами был выбран субкласс I, так как он является самым распространенным [10–16]. В дальнейшем все аминокислотные последовательности были обработаны в программе TCoffe Regular. На основании полученных данных из наиболее часто встречающихся аминокислотных остатков составлена гипотетическая аминокислотная последовательность, представленная в варибельном и константном регионах каппа легких цепей.

Первый антигенный эпитоп выбран из варибельного региона гипотетической цепи и соответствовал аминокислотным позициям 3–17 (QMTQSPSSLSASVGD). Проанализировав константный регион всех пяти субклассов аминокислотных цепей, мы обнаружили, что во всех 112 случаях он одинаков. В качестве второго эпитопа из данного региона был выбран участок, соответствующий аминокислотным позициям 116–130 (FIFPPSDEQLKSGTA).

После определения оптимальной последовательности проведен синтез пептидов (Pineda Antibody-Service, Германия) Peptid hkLKP-1 (аминокислотная последовательность варибельного региона) и Peptid hkLKP-4 (аминокислотная последовательность константного региона) с последующим выделением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии до чистоты 86% и 89%, соответственно.

Для получения поликлональных антител два кролика были иммунизированы полипептидом NH<sub>2</sub>-CQMTQSPSSLSASVGD-CONH<sub>2</sub>, а два других – полипептидом NH<sub>2</sub>-CFIFPPSDEQLKSGTA-CONH<sub>2</sub>.

Иммунный ответ оценивали методом дот-блоттинга, в качестве позитивного контроля использовали синтезированные пептиды Peptid hkLKP-1 (аминокислотная последовательность варибельного региона) и Peptid hkLKP-4 (аминокислотная последовательность константного региона).

Иммунную сыворотку наносили на нитроцеллюлозную мембрану в концентрациях 1:100, 1:500, 1:1000, а вторичное антитело – в концентрации 1:1000. Положительная иммунная реакция отмечалась в точках, где антиген был нанесен в сочетании с первичным и вторичным антителами. Отрицательная иммунная реакция выявлена при инкубировании антигена с преиммунной сывороткой, инкубировании первичного антитела в сочетании со вторичным антителом, нанесении только

первичного антитела и нанесении только вторичного антитела. В результате инкубирования антигена в сочетании со вторичным антителом также отмечена отрицательная реакция (рис. 1).

Интенсивность положительной реакции после 60-дневной иммунизации была недостаточно высокой, поэтому иммунизацию продолжили до 100 дней, после чего из каждой сыворотки выделили фракцию IgG. В результате мы получили четыре новых поликлональных антитела: два направленных к полипептиду NH<sub>2</sub>-CQMTQSPSSLSASVGD-CONH<sub>2</sub> (AK1

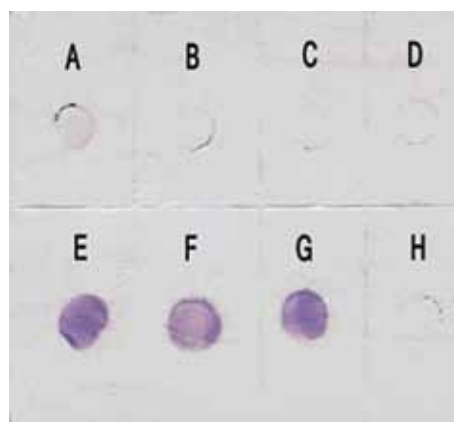


Рис. 1. Оценка эффективности иммунизации методом дот-блоттинга на примере антитела anti-AK3.

Положительная иммунная реакция отмечалась только в точках нанесения антигена в сочетании с первичным и вторичным антителами. А – инкубирование антигена с преиммунной сывороткой (1:100), В – инкубирование первичного антитела (1:100) в сочетании с вторичным антителом (1:1000), С – нанесение только первичного антитела (1:100), D – нанесение только вторичного антитела (1:1000), E – инкубирование антигена в сочетании с первичным антителом (1:100) и вторичным антителом (1:1000), F – инкубирование антигена в сочетании с первичным антителом (1:500) и вторичным антителом (1:1000), G – инкубирование антигена в сочетании с первичным антителом (1:1000) и вторичным антителом (1:1000), H – инкубирование антигена в сочетании с вторичным антителом (1:1000).

Fig. 1. Evaluation of the immunization efficiency by dot blot assay with anti-AK3 antibody (used for testing). Positive immune response was found only in the antigen application spots in combination with primary and secondary antibodies. A – antigen incubation with pre-immune serum (1:100), B – primary antibody incubation (1:100) in combination with secondary antibody (1:1000), C – application of a primary antibody only (1:100), D – application of a secondary antibody only (1:1000), E – antigen incubation in combination with primary antibody (1:100) and secondary antibody (1:1000), F – antigen incubation in combination with primary antibody (1:500) and secondary antibody (1:1000), G – antigen incubation in combination with primary antibody (1:1000) and secondary antibody (1:1000), H – antigen incubation in combination with secondary antibody (1:1000).

и АК2) и два направленных к полипептиду NH<sub>2</sub>-CFIFPPSDEQLKSGTA-CONH<sub>2</sub> (АК3 и АК4).

Иммуногистохимическое тестирование специфичности полученных антител было выполнено на биоптатах желудочно-кишечного тракта пациентов с AL-каппа, AL-лямбда, транстиретиновым и AA-амилоидозом при помощи LSAB Kit (Dako, Дания) и Super sensitive Link-Label IHC Detection System (BioGenex, США). Материал фиксировали 10% нейтральным формалином и заливали в парафин после рутинной гистологической обработки. Пептидные антитела давали положительную реакцию с амилоидом во всех случаях AL-каппа амилоидоза и отрицательную – при AL-лямбда, AA- и транстиретиновом амилоидозе [17]. Оптимальные разведения для антител: АК1 – 1:1500, АК2 – 1:1000, АК3 – 1:3000, АК4 – 1:1000.

### Заключение

На основании биоинформационного анализа нами была создана гипотетическая аминокислотная цепь из наиболее часто встречающихся аминокислотных последовательностей у пациентов с AL-каппа амилоидозом и выбраны оптимальные участки каппа легких цепей для получения антител. Синтезированы два пептида: Peptid hkLKP-1 (NH<sub>2</sub>-CQMTQSPSSLSASVGD-CONH<sub>2</sub> – аминокислотная последовательность переменного региона) и Peptid hkLKP-4 (NH<sub>2</sub>-CFIFPPSDEQLKSGTA-CONH<sub>2</sub> – аминокислотная последовательность константного региона), которые использовали как антигены для иммунизации кроликов. Успешность иммунизации подтверждена методом дот-блоттинга. Методом аффинной хроматографии из сывороток была выделена IgG фракция иммуноглобулинов. В результате нами получены четыре новых поликлональных пептидных антитела (АК1, АК2, АК3 и АК4), специфически реагирующих с амилоидным белком пациентов с AL-каппа амилоидозом. Данные антитела могут быть рекомендованы для улучшения иммуногистохимического типирования амилоидоза в разных органах и тканях, так как положительная иммунная реакция с несколькими антителами, направленными к каппа легким цепям амилоида, повышает вероятность точной диагностики AL-каппа амилоидоза.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – К. Рёкен.

Сбор и обработка материала – З.В. Гюева.

Написание текста – З.В. Гюева, К. Рёкен.

Редактирование – К. Рёкен.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – C. Röcken.

Collected the data and performed the analysis – Z.V. Goeva.

Wrote the paper – Z.V. Goeva, C. Röcken.

Edited the manuscript – C. Röcken.

### Литература/References

1. *Merlini G.* AL amyloidosis: from molecular mechanisms to targeted therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017;(1):1–12. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.1>.

2. *Milani P, Merlini G, Palladini G.* Light Chain Amyloidosis. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2018;10(1):e2018022. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2018.022>.
3. *Vaxman I, Gertz M.* Recent Advances in the Diagnosis, Risk Stratification, and Management of Systemic Light-Chain Amyloidosis. *Acta Haematol.* 2019;141(2):93–106. doi: 10.1159/000495455.
4. *Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y et al.* Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid.* 2019(Jan);7:1–5. <https://doi.org/10.1080/13506129.2018.1549825>.
5. *Muchtar E, Buadi FK, Dispenzieri A, Gertz MA.* Immunoglobulin light-chain amyloidosis: from basics to new developments in diagnosis, prognosis and therapy. *Acta Haematol.* 2016;135(3):172–90. doi: 10.1159/000443200.
6. *Ramirez-Alvarado M.* Amyloid Formation in Light Chain Amyloidosis. *Curr Top Med Chem.* 2012(Nov 1);12(22):2523–33. <https://doi.org/10.2174/1568026611212220007>
7. *Trier NH, Houen G.* Peptide Antibodies in Clinical Laboratory Diagnostics. *Adv Clin Chem.* 2017;81:43–96. doi: 10.1016/bs.acc.2017.01.002
8. *Hoshii Y, Kiyama M, Cui D, Kawano H, Ishihara T.* Immunohistochemical study of immunoglobulin light chain amyloidosis with antibodies to the immunoglobulin light chain variable region. *Pathol Int.* 2006;56(6):324–30. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2006.01953.x>.
9. *Parker JM, Guo D, Hodges RS.* New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry.* 1986;25:5425–32.
10. *Comenzo RL, Wally J, Kica G et al.* Clonal immunoglobulin light chain variable region germline gene use in AL amyloidosis: association with dominant amyloid-related organ involvement and survival after stem cell transplantation. *Brit J Haematol.* 1999;106:744–51.
11. *Liepnies JJ, Dwulet FE, Benson MD.* Amino acid sequence of a kappa I primary (AL) amyloid protein (AND). *Mol Immunol.* 1990;27:481–5.
12. *Vidal R, Goni F, Stevens F, Aucouturier P, Kumar A, Frangione B, et al.* Somatic mutations of the L12a gene in V-kappa(1) light chain deposition disease: potential effects on aberrant protein conformation and deposition. *Am J Pathol.* 1999;155:2009–17.
13. *Odani S, Komori Y, Gejyo F.* Structural analysis of the amyloidogenic kappa Bence Jones protein (FUR). *Amyloid.* 1999;6:77–88.
14. *Rocca A, Khamlichi AA, Aucouturier P, Noël LH, Denoroy L, Preud'homme JL et al.* Primary structure of a variable region of the V kappa I subgroup (ISE) in light chain deposition disease. *Clin Exp Immunol.* 1993;91:506–9.
15. *Wally J, Kica G, Zhang Y, Ericsson T, Connors LH, Benson MD et al.* Identification of a novel substitution in the constant region of a gene coding for an amyloidogenic kappa E(1) light chain. *Bba-Mol Cell Res.* 1999;1454:49–56.
16. *Prokaveva T, Spencer B, Kaut M, Ozonoff A, Doros G, Connors LH et al.* Soft tissue, joint, and bone manifestations of



AL amyloidosis: clinical presentation, molecular features, and survival. *Arthritis Rheum.* 2007;56:3858–68.

17. Гюева З.В., Михалева Л.М. Клинико-морфологические особенности амилоидоза желудка и двенадцатиперстной кишки. *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2019;8(1):39–43. <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-39-43>.

*Gioeva ZV, Mikhaleva LM.* Specific Clinical and Morphological characteristics of amyloidosis of the stomach and duodenum. 2019;8(1):39–43 (In Russ.). <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-39-43>

### Информация об авторах

Зарина Владиславовна Гюева – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии с судебной медициной СОГМА.

Кристоф Рёкен – доктор медицинских наук, профессор, директор Института патологии Университета им. Кристиана Альбрехта, Киль, Германия.

### Author information

Zarina V. Gioeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor of the Department of pathological anatomy of North Ossetian State Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0002-5456-8692>

Christoph Röcken – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of Institute of Pathology, Christian-Albrechts-University, Kiel, Germany. <https://orcid.org/0000-0002-6989-8002>



**Рецензия**  
**на книгу «Морфологическая диагностика**  
**заболеваний щитовидной железы:**  
**цветной атлас» / Абросимов А.Ю.,**  
**Казанцева И.А., Лушников Е.Ф.**  
**(Москва: ООО «МК», 2019. – 240 с., ил.)**

Вышло в свет второе, дополненное издание цветного атласа А.Ю. Абросимова, И.А.Казанцевой и Е.Ф. Лушникова «Морфологическая диагностика заболеваний щитовидной железы: цветной атлас». Теперь издание включает критерии дооперационной цитологической диагностики по системе Bethesda, а также критерии новых категорий опухолей щитовидной железы в соответствии с классификацией ВОЗ 2017 года.

В 2017 году Международное агентство по изучению рака (МАИР) опубликовало новую классификацию опухолей эндокринных органов ВОЗ, четвертое издание. В новой классификации, как и в предыдущем издании, значительное место уделено новообразованиям щитовидной железы.

Новые взгляды на злокачественный потенциал и прогноз ряда заболеваний, которые следует учитывать патологоанатомам в повседневной практике, нашли отражение во втором издании цветного атласа.

На страницах атласа в приложении отражены изменения, внесенные в международную TNM-классификацию злокачественных опухолей щитовидной железы (адаптированная версия 8-го пересмотра, 2017), а также коды заболеваний щитовидной железы, предлагаемые Международной классификацией болезней МКБ-10.

Атлас иллюстрирован 319 цветными микрофотографиями очень хорошего качества. Фотографии поми-

мо обычных окрасок (гематоксилин–эозин, конго-рот) включают окрашивание с помощью различных антител (иммуногистохимическое исследование).

Издание великолепно оформлено на высоком полиграфическом уровне.

Атлас предназначен для врачей – патологоанатомов, клинических цитологов, осуществляющих повседневную морфологическую диагностику патологии щитовидной железы.

В атласе сделан акцент на единство цитологического и гистологического методов при верификации патологического процесса. Большое внимание уделено иммуногистохимическому методу исследования, которое прочно вошло в практику патологоанатомических отделений.

Этот атлас стал последней монографией профессора, доктора медицинских наук, видного патологоанатома, онкоморфолога И.А. Казанцевой. Ирина Александровна вложила много сил и энергии в это издание.

Отечественные патологоанатомы получили блестящее руководство по тиреоидологии.

*Е.М. Непомнящая,  
 доктор медицинских наук, профессор  
 Ростов-на-Дону*

## Любовь Федоровна Курило (к 80-летию со дня рождения)

**Любовь Федоровна Курило – доктор биологических наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик РАЕН, главный научный сотрудник лаборатории генетики нарушений репродукции Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова.**

Л.Ф. Курило родилась 8 ноября 1939 года в Москве. В 1957 году с отличием окончила медицинское училище № 36 при АМН СССР, в 1964 году – биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова. В 1962–1972 годах работала в лаборатории цитологии НИИ морфологии человека АМН СССР. В 1971 году защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему «Изучение морфологии и механизмов возникновения трехгрупповых метафаз», посвященную нарушениям клеточного деления под воздействием эстрадиола и их роли в морфогенезе рака шейки матки, а в 1986 году – диссертацию на тему «Морфофункциональные характеристики оогенеза млекопитающих и человека», получив ученой степень доктора биологических наук по специальности «эмбриология и гистология». В 1992 году Л.Ф. Курило присвоено ученое звание профессора, в 2014-м – почетное звание Заслуженного деятеля науки Российской Федерации.

В 1987 году под руководством Л.Ф. Курило в НИИ медицинской генетики АМН СССР (сейчас – Медико-генетический научный центр) была создана группа по исследованию мейоза, а в 1992 году образована лаборатория генетики нарушений репродукции, которую она возглавляла в течение 25 лет. В настоящее время Л.Ф. Курило продолжает работу в лаборатории в должности главного научного сотрудника.

Любовь Федоровна Курило – один из ведущих специалистов России в области цитопатологии и генетики гаметогенеза, репродукции человека и млекопитающих животных. Областями ее научных интересов являются генетическая регуляция формирования и функционирования половых клеток и половых желез, исследование структуры и механизмов развития генетически обусловленной патологии органов женской и мужской половой системы человека, диагностика и профилактика заболеваний репродуктивной системы. Ею впервые охарактеризованы хронология и динамика гаметогенеза, последовательность структурных преобразований гамет в течении оогенеза и сперматогенеза во внутриутробном и постнатальном периодах у человека и других млекопитающих (корова, мышь, крыса, зеленая мартышка). Впервые в мире выявлены хронология и динамика прохождения мейоза через стадии прелептотенной конденсации прохромосом; для ооцитов челове-



ка, коровы, зеленой мартышки установлены хронология и факт формирования кариосферы вокруг ядрышка ооцитов из преовуляторных фолликулов. Впервые на трех видах млекопитающих по количественным критериям прослежено формирование фолликулов только вокруг ооцитов в диплотене, то есть после завершения конъюгации и кроссинговера в мейозе. Разработаны научные принципы оценки и критерии количественного тестирования гамето- и гонадотоксического эффекта *in vivo* и *in vitro* на половые клетки в процессе их развития, изучена роль хромосомных и генных мутаций в развитии мужского бесплодия, генезе нарушений развития и функционирования органов репродуктивной системы у пациентов разных возрастных групп.

Важнейшее направление деятельности Л.Ф. Курило – исследование морально-этических и правовых проблем репродуктологии и использования методов биомедицинских технологий. Она является соавтором законопроекта «О временном запрете клонирования человека», принятого Государственной думой в 2002 году и продленного бессрочно в 2011 году, экспертом рабочей группы по защите эмбриона и плода человека Руководящего комитета по биоэтике Совета Европы (1997–2003 годы), членом Комитета по биомедицинской этике при президиуме РАН, комиссии по клеточным технологиям РАН, участницей разработки Федерального закона «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

Любовь Федоровна вносит большой вклад в подготовку научных кадров и повышение квалификации специалистов в области генетики, клеточной биологии и цитологии, репродуктологии. Она читает лекции для студентов, ординаторов и аспирантов вузов (МГУ им. М.В. Ломоносова, МИФИ, МГМСУ), врачей-курсантов (РМАПО, МГМСУ, РУДН), осуществляет научно-методическое консультирование специалистов Москвы и других городов страны. Л.Ф. Курило – член диссертационных советов при Медико-генетическом

научном центре, НИИ морфологии человека, НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина, Центра стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья Минздрава России.

Л.Ф. Курило является автором и соавтором более 500 публикаций и трех патентов. Результаты исследований включены в руководства по цитологии, гистологии и эмбриологии. Под ее научным руководством и при консультировании успешно защищены четыре докторские и 27 кандидатских диссертаций.

Любовь Федоровна награждена медалями «Ветеран труда» (1990), «В честь 850-летия Москвы» (1997), серебряной медалью им. И.П. Павлова «За развитие медицины и здравоохранения» (2001), почетной медалью имени И.И. Мечникова «За практический вклад в укрепление здоровья нации» (2009), медалью имени

Грегора Менделя Европейской академии естественных наук (2014). В составе авторского коллектива получила премии имени С.Н. Давиденкова за лучшую научную работу в области медицинской генетики по циклу работ «Этические проблемы в медицинской генетике» (2004), международной академической издательской компании «Наука/Интерпериодика» за лучшую публикацию в журналах РАН (2006).

Л.Ф. Курило – глава большой и дружной семьи, у нее двое детей, пятеро внуков и трое правнуков.

Коллективы сотрудников Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова и Научно-исследовательского института морфологии человека сердечно поздравляют глубокоуважаемую Любовь Федоровну с юбилеем и от всей души желают ей крепкого здоровья, неиссякаемой энергии и новых творческих достижений.



## Алексей Александрович Жаворонков (1929–1998)

### К 90-летию со дня рождения

Есть замечательные личности, которые оставляют неизгладимый след в душах людей, общавшихся с ними. Такие личности особенно ценны среди тех, кто занимается творческой деятельностью. Именно таким человеком был Алексей Александрович Жаворонков.

Алексей Александрович родился 21 октября 1929 года в деревне Леоново Тверской области. После окончания в 1954 году Сталинабадского государственного медицинского института он поступил в ординатуру, а затем в аспирантуру по специальности «патологическая анатомия» на соответствующей кафедре этого института. После окончания аспирантуры Алексей Александрович Жаворонков защитил кандидатскую диссертацию по патологической анатомии токсемии, вызванной действием змеиного яда. В 1959–1960 годах он работал прозектором в объединенной городской комплексной больнице № 1 Ленинабада Таджикской ССР, а с 1960 по 1963 год исполнял обязанности заведующего патологоанатомическим отделением Республиканской клинической туберкулезной больницы Душанбе.

В 1963 году А.А. Жаворонков переехал в Москву и начал работать в НИИ морфологии человека АМН СССР (РАМН) старшим научным сотрудником, а с 1975 по 1998 год был заведующим лабораторией географической патологии. За время работы в НИИ морфологии человека Алексей Александрович защитил докторскую диссертацию по патологической анатомии экспериментального и эндемического флюороза, ему была присвоена степень доктора медицинских наук, а в последующем – звание профессора. В 1990 году он стал лауреатом премии им. И.В. Давыдовского АМН СССР, в 1994 году получил первую премию Москов-



А.А. Жаворонков за работой

ского общества испытателей природы. В 1995 году был избран академиком РАЕН.

А.А. Жаворонков являлся одним из интереснейших советских ученых, прямым и одним из самых любимых учеников академика АМН СССР директора НИИ морфологии человека Александра Павловича Авцына. В тесном сотрудничестве друг с другом ими была организована единственная в нашей стране лаборатория географической патологии, в которой успешно разрабатывались актуальные вопросы ряда малоизученных болезней, в частности эндемического флюороза и других микроэлементозов, иерсиниозов (особенно псевдотуберкулеза). В соавторстве с А.П. Авцыным были получены приоритетные результаты, имеющие фундаментальное и прикладное значение для медицины и здравоохранения, сформулированы основные положения патологии человека на севере и заложены основы патологии микроэлементозов, что заслужило мировое признание.

Хочется вспомнить бесценные личностные качества А.А. Жаворонкова. Алексей Александрович был очень чутким, заботливым, трудолюбивым, скрупулезным, ответственным за дело, которому он служил. Находясь у истоков развития перспективных научных направлений в НИИ морфологии человека и лаборатории географической патологии, он был руководителем диссертационных работ плеяды молодых ученых, ставших сегодня ведущими специалистами во многих вопросах патологической анатомии. А.А. Жаворонков всегда делился знаниями и богатым профессиональным



А.А. Жаворонков (в центре) с сотрудниками лаборатории географической патологии

опытом со своими учениками, патологоанатомами – морфологами и неизменно следовал известной заповеди: «Учитель, воспитай ученика, чтоб было у кого потом учиться». Хорошо известны его житейская мудрость, искренняя отзывчивость и человечность, умение и желание помочь всем. В жизни он был простым, доступным, доброжелательным человеком.

А.А. Жаворонков является соавтором важнейших и интереснейших монографий: «Патология человека на Севере» (1985), «Дыхательные пути и высокогорье» (1989), «Микроэлементозы человека» (1991), «Патология псевдотуберкулеза» (1994), а также патента на изобретение «Способ повышения работоспособности человека при гипоксии» (1975). А.А. Жаворонков не был кабинетным ученым – он участвовал в экспедициях НИИ морфологии человека в пустыню, высокогорье, на крайний север, Дальний Восток и неоднократно являлся их руководителем. Его заслугой было плодотворное сотрудничество с профильными специалистами

не только отечественных, но и зарубежных научных учреждений.

Светлая память об этом удивительном человеке, гражданине и ученом вечно жива в наших сердцах. Многочисленные ученики Алексея Александровича Жаворонкова активно продолжают его дело, пытаясь привить полученные от него качества уже своим ученикам.

*Ученики академика РАЕН,  
доктора медицинских наук,  
профессора А.А.Жаворонкова –*

*Л.М. Михалева,  
доктор медицинских наук, профессор,  
Л.М. Сомова,  
доктор медицинских наук, профессор,  
А.Л. Черняев,  
доктор медицинских наук, профессор*

## Ювеналий Васильевич Постнов (1929–2010)

### К 90-летию со дня рождения

Заслуженный деятель науки РСФСР, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, действительный член Российской академии естественных наук Ювеналий Васильевич Постнов – выдающийся российский патолог, научная деятельность которого была связана с фундаментальными исследованиями по выяснению молекулярно-клеточных основ патогенеза хронической артериальной гипертонии (гипертонической болезни).

Ювеналий Васильевич Постнов родился 17 июля 1929 года в Благовещенске в семье военного и крестьянки. После окончания школы в городе Зея поступил в Московский медицинский институт Минздрава РСФСР, который во время его обучения был переведен в Рязань и переименован в Рязанский медицинский институт имени академика И.П. Павлова. Ювеналий Постнов был в числе первых выпускников Рязанского медицинского института (1953), затем работал на кафедре патологической анатомии и закончил аспирантуру по специальности «патологическая анатомия» (1956). После защиты кандидатской диссертации переехал в Москву, где прошел путь от научного сотрудника Института терапии до главного патологоанатома 4-го Главного Управления Минздрава СССР. Именно там Ювеналий Васильевич создал уникальную лабораторию, включающую виварий, что позволяло проводить экспериментальные исследования с использованием методов морфологии, биохимии, биофизики, молекулярной биологии. В этой лаборатории и начались исследования, посвященные изучению содержания и транспорта катионов в клетках при экспериментальных формах артериальной гипертонии.

С 1961 по 1969 год Ювеналий Васильевич Постнов – старший научный сотрудник лаборатории патологической анатомии Института терапии АМН СССР, с 1969 по 1989 год – заведующий отделом патоморфологии Центральной научно-исследовательской лаборатории 4-го Главного Управления Минздрава СССР, с 1989 по 2010 год – руководитель отдела сердечно-сосудистой патологии Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ НМИЦ кардиологии. Он проходил стажировки в Институте экспериментальной медицины Монреальского университета (1963), в Монреальском институте клинических исследований



Научный сотрудник Института терапии  
(будущего Института кардиологии)



Ювеналий Постнов с отцом Василием Ивановичем  
Постновым. Город Свободный, 1933 год



Ю.В. Постнов – главный патологоанатом, руководитель  
отдела патоморфологии 4-го Главного Управления  
Минздрава СССР с супругой у служебного автомобиля



Вручение премии Международного общества по изучению гипертонии. 1 сентября 1986 года, Гейдельберг



V Европейский конгресс по гипертонии, Милан, 1995 год.  
Ю.В. Постнов председательствует на сессии

(1973), где изучал феномен тканевой кальцификации, экспериментальные формы артериальной гипертензии и ренин-ангиотензиновую систему.

Основные исследования, получившие международную известность и признание, были выполнены им в период с 1969 по 2010 год, сначала в 4-м Главном Управлении Минздрава СССР, а затем в Институте клинической кардиологии Минздрава России. Ю.В. Постнов с сотрудниками заложил фактологическую основу понимания патогенетического механизма хронической артериальной гипертензии. В конце жизни он исследовал нарушения энергообразующей функции митохондрий и роли недостаточности клеточного энергообразования в патогенезе артериальной гипертензии.

Ювеналий Васильевич был выдающимся патологом и ученым. Достаточно перечислить его учителей и коллег: профессор В.К. Белецкий, академики АМН СССР И.В. Давыдовский, А.Л. Мясников, Е.И. Чазов, член-корреспондент РАМН А.М. Вихерт, лауреат Нобелевской премии по медицине Ганс Селье (Канада). Ю.В. Постнов опубликовал более 300 работ в отечественных и зарубежных журналах и входил в число 100 наиболее цитируемых ученых нашей страны (Current contents, 1990;24:5–18). Ему были присужде-

ны премии Международного научного общества (1986, Гейдельберг) и Европейского научного общества (1995, Милан) по артериальной гипертензии. Его труды отмечены премией Н.С. Короткова и почетным знаком им. П.Л. Капицы «Автору научного открытия».

В течение многих лет Ю.В. Постнов был членом редколлегий журналов «Архив патологии», «Кардиология», «Hypertension» (США), «J. of Hypertension» (Великобритания), «High Blood Pressure» (Италия), «Blood Pressure» (Швеция), «J. of the Royal Society of Medicine» (Великобритания) и членом советов Международного и Европейского обществ по гипертензии.

Огромный опыт организации и проведения научной и практической работы позволял Ювеналию Васильевичу объективно оценивать состояние и значимость научных проблем, сосредоточить внимание на решении наиболее актуальных научных задач и создать научную школу по изучению молекулярно-клеточных основ формирования первичной гипертензии. Он был интеллектуалом в самом широком понимании этого слова, глубоко интересующимся вопросами философии и истории, русской литературы и искусства. Ювеналий Васильевич оставил яркий след в медицинской науке и сохраняет о себе добрую память в сердцах всех, знавших его.



# АВТОМАТЫ ОКРАСКИ ЭМКОСТЕЙНЕР

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ,  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

- Высококачественная однотипная окраска препаратов
- Открытая система (любые реагенты и методики)
- Высокая производительность
- Реализация сложных методик (окраска по Папаниколау, гистология)
- Безопасные условия труда
- Низкая себестоимость окраски
- Шесть приборов, 6-8-13-16 станций:  
АФОМК-6, АФОМК8-Г-01, АФОМК8-В-01, АФОМК-13-ПАП,  
АФОМК-16, АФОМК-16-25

129301, г. Москва, ул. Касаткина, д. 11, стр.1;  
тел. / факс: +7 (495) 287-81-00, 287-84-00;  
[www.emco.ru](http://www.emco.ru), [www.stainer.ru](http://www.stainer.ru), [emco@bk.ru](mailto:emco@bk.ru)

**ЭМКО** **МЛТ**  
ГРУППА КОМПАНИЙ ЭМКО

