



МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СОСУДИСТОГО КОМПОНЕНТА ОРГАНОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ

В РАЗНЫЕ СРОКИ МОДЕЛИРУЕМОЙ ГИПОКСИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹Наумов А.В., ²Никитюк Д.Б., ¹Овсянникова О.А., ¹Шишкина Т.А., ¹Наумова Л.И.

¹Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань; ²Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии, Москва, Россия, e-mail: naumov_histo@mail.ru

Для цитирования:

Наумов А.В., Никитюк Д.Б., Овсянникова О.А., Шишкина Т.А., Наумова Л.И. Морфофункциональное состояние сосудистого компонента органов кроветворения в разные сроки моделируемой гипоксии в эксперименте. Морфологические ведомости. 2022;30(4):747. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2022.30\(4\).747](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2022.30(4).747)

Резюме. В условиях гипоксии изменение морфофункционального состояния компонентов микроциркуляторного русла будет сопровождаться изменением адекватности и полноценности иммунного ответа и гемопоэза. Цель исследования - определение морфофункционального состояния сосудистого компонента красного костного мозга и селезенки в различные сроки моделируемой гипоксии и выявлении степени влияния на это состояние CD68-позитивных клеток. Хроническая гипоксия моделировалась на 246 белых беспородных крысах мужского пола с использованием специальных затравочных камер и природного газа Астраханского газового месторождения (Россия) в концентрации, не превышающей предельно допустимой. Эксперимент длился в течение 120 суток, ингаляция проводилась пять дней в неделю в течение четырех часов в день, выведение животных из эксперимента проводилось каждые 30 суток. Функциональную активность сосудистого компонента красного костного мозга определяли с помощью метода лазерной доплеровской флоуметрии. Иммуногистохимическим методом определяли степень экспрессии индуцибельной (iNOS) и эндотелиальной (eNOS) NO-синтаз и распределение CD68-позитивных клеток в структурах селезенки. Исследование показало, что по мере увеличения срока хронической моделируемой гипоксии происходит уменьшение показателя микроциркуляции, нарастание миогенного тонуса и показателя шунтирования, что, в совокупности, указывает на ухудшение перфузии органа и подтверждает формирование гипоксического состояния. Анализ функциональной активности, проведенный с помощью иммуногистохимического исследования экспрессии iNOS и eNOS в структурах селезенки, показал, что по мере увеличения срока эксперимента происходит снижение уровня эндотелиальной и нарастание уровня индуцибельной синтазы. Возможно, это связано с влиянием биологически активных веществ, выделяемых активированными при гипоксии макрофагами. Это подтверждается увеличением присутствия CD68-позитивных клеток в красной пульпе и по ходу соединительнотканых трабекул по мере увеличения экспериментального воздействия.

Ключевые слова: красный костный мозг; селезенка; гипоксия; микроокружение; кровеносные сосуды

Статья поступила в редакцию 15 июля 2021
Статья принята к публикации 15 ноября 2022

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATE OF THE VASCULAR COMPONENT OF HEMATOPOIESIS ORGANS IN DIFFERENT TIMES OF SIMULATED HYPOXIA IN THE EXPERIMENT

¹Naumov AV, ²Nikityuk DB, ¹Ovsyannikova OA, ¹Shishkina TA, ¹Naumova LI

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan; ²Federal Research Center for Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia, e-mail: naumov_histo@mail.ru

For the citation:

Naumov AV, Nikityuk DB, Ovsyannikova OA, Shishkina TA, Naumova LI. Morphological and functional state of the vascular component of hematopoiesis organs in different times of simulated hypoxia in the experiment. Morfologicheskie Vedomosti – Morphological newsletter. 2022;30(4):747. [https://doi.org/10.20340/mv-mn.2022.30\(4\).747](https://doi.org/10.20340/mv-mn.2022.30(4).747)

Summary. Under conditions of hypoxia, a change in the morphological and functional state of the components of the microvasculature bed will be accompanied by a change in the adequacy and usefulness of the immune response and hematopoiesis. The purpose of the study was to determine the morphofunctional state of the vascular component of the red bone marrow and spleen at various times of simulated hypoxia and to identify the degree of influence of CD68-positive cells on this state. Chronic hypoxia was modeled on 246 outbred male rats using special chambers containing natural gas from the Astrakhan gas field (Russia) at a concentration not exceeding the maximum allowable. The experiment was continued for 120 days, inhalation was carried out five days a week for four hours a day, the removal of animals from the experiment was carried out every 30 days. The functional activity of the vascular component of the red bone marrow was determined using the method of laser Doppler flowmetry. The degree of expression of inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) NO synthases and the distribution of CD68-positive cells in the spleen structures were determined by immunohistochemical method. The study showed that as the duration of chronic simulated hypoxia increases, there is a decrease in the microcirculation index, an increase in myogenic tone and shunting index, which, taken together, indicates a deterioration of organ perfusion and confirms the formation of a hypoxic state. An analysis of the functional activity, carried out using an immunohistochemical study of the expression of iNOS and eNOS in the structures of the spleen, showed that as the duration of the experiment increased, the level of endothelial synthase decreased and the level of inducible synthase increased. Perhaps this is due to the influence of biologically active substances secreted by macrophages activated during hypoxia. This is supported by an increase in the presence of CD68-positive cells in the red pulp and along the connective tissue trabeculae as the experimental exposure increases.

Key words: red bone marrow; spleen; hypoxia; microenvironment; blood vessels

Article received 15 July 2021
Article accepted 15 November 2022

Введение. Органы кроветворения, как центральные, так и периферические, играют важную роль в поддержании постоянства количественного и качественного состава в каждом клеточном звене системы крови, в том числе иммунном звене. При этом красный костный мозг является универсальным кроветворным органом, в котором происходит как процесс деления, так процесс частичной дифференцировки клеточных элементов, а периферические органы кроветворения осуществляют окончательную дифференцировку и модулируют условия для полноценного взаимодействия иммунокомпетентных клеток и антигенов с последующей элиминацией повреждающих факторов.

Основным связующим звеном между центральным и периферическим компонентами системы кроветворения является сосудистая система, представляющая одновременно сосудистый компонент гемопозиндуцирующего микроокружения для гемопозитических клеточных элементов [1-2]. От ее состояния зависит адекватность и полноценность реализуемых функций каждого конкретного кроветворного органа. Сосудистый компонент органов кроветворения представлен эндотелиальными клетками синусоидальных капилляров и периваскулярными стромальными элементами. Эндотелиальные клетки красного костного мозга могут поддерживать пролиферацию и дифференцировку гемопозитических и иммунокомпетентных клеток [3], а также контролировать их перемещение и выход в кровоток [4-6].

Среди периваскулярных стромальных элементов особое внимание стоит уделить макрофагам, которые в условиях гипоксии претерпевают значительные морфофункциональные изменения и способны, в свою очередь, оказывать влияние на функциональную активность сосудистого компонента [7-10]. Межклеточные взаимодействия в условиях формирующейся хронической гипоксии сопровождаются высвобождением значительного числа медиаторов эндогенной интоксикации, таких как продукты свободно-радикального окисления, цитокины,

острофазные белки, оказывающие отрицательные эффекты в т.ч. и на сосудистый компонент органов кроветворения и иммуногенеза [11-13].

Материалы и методы исследования. Экспериментальное моделирование гипоксии было проведено на 246 белых беспородных крысах-самцах, которые находились в условиях стандартного сертифицированного вивария в соответствии с нормами и правилами обращения с лабораторными животными. Манипуляции в ходе эксперимента были выполнены в соответствии со стандартами Хельсинской декларации и Правилами лабораторной практики в РФ (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 № 267), подтвержденные заключением локального этического комитета № 3 от 27.12.202 [14-15]. Моделировали гипоксию с помощью затравочных камер производства Московского института профзаболеваний и гигиены труда им. Ф.Ф. Эрисмана объемом 200 литров, в которых использовалась обедненная по кислороду воздушная смесь с добавлением природного газа Астраханского месторождения в концентрации 3 мг/м³. Изначально подаваемая воздушная смесь содержала 17,5% кислорода, что соответствует рО₂ – 133,2 мм. рт. ст. [16]. В качестве контролирующих приборов были использованы газоанализаторы фирмы «Анкат». Животные помещались в описанные условия четыре часа в день в течение пяти дней в неделю. Эксперимент длился четыре месяца, выведение животных осуществлялось кратностью один раз в месяц – через 30, 60, 90 и 120 суток. Также была выделена контрольная группа животных, которую помещали в камеру в аналогичном временном режиме, но с обычным составом воздуха.

Для оценки функционального состояния микроциркуляторного русла красного костного мозга использовался метод лазерной доплеровской флоуметрии [17-19]. Изучали функциональную активность сосудистого компонента красного костного мозга в условиях острого опыта. Внутривенно вводили раствора этанола натрия (4 мг на 100 г массы тела животного), после чего производился

доступ к проксимальному метафизу бедренной кости, которая щадяще фенестрировалась с формированием отверстия диаметром в 1,5 мм для оценки микроциркуляции костного мозга. Для получения данных о микроциркуляции использовалось оборудование НПП «Лазма» – ЛАКК-02 (Россия). Результаты лазерной доплеровской флоуметрии регистрировали в относительных единицах, которые отражали степень перфузии за единицу времени.

Морфологическую оценку сосудистого компонента проводили на срезах селезенки, окрашенных гематоксилином и эозином и по Ван-Гизон. Иммуногистохимический анализ проводили на парафиновых гистологических срезах, изготовленных на микротоме LEICA RM 2255 (Германия) толщиной 4 мкм и окрашенных с помощью иммуногистостейнера Leica Microsystems Bond™ (Германия). Применяли панели моноклональных антител: CD68 (Ready-to-Use, клон 514H12, Leica Biosystems Bond™, Германия), Anti-eNOS antibody (разведение 1:200, клон EPR19296, Abcam, Великобритания), Anti-iNOS antibody (разведение 1:200, Abcam, Великобритания). Была использована непрягая стрептавидин-биотиновая система детекции Leica BOND (Novocastra™, Германия). Исследование, визуализацию, фотографирование и последующий анализ препаратов проводили с использованием микроскопа Zeiss Axio Scope A1 (Германия) и цифрового сканера микропрепаратов Leica Aperio CS2 со специализированным программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Для оценки результатов производили подсчет индексов экспрессии CD68, iNOS и eNOS в процентах на 1000 клеток в 10 случайным образом отобранных полях зрения с учетом умеренного и выраженного иммуногистохимического окрашивания.

Результаты исследования и обсуждение. Исследование показателя микроциркуляции на фоне моделируемой гипоксии с использованием сероводородсодержащего газа дало следующие результаты. По сравнению с группой контроля, в которой было зарегистрировано

наибольшее значение, исследованный параметр уменьшается по мере увеличения срока эксперимента. Подобное изменение свидетельствует об уменьшении притока крови в исследуемую область. Для уточнения состояния различных звеньев микроциркуляции проводился анализ вейвлет-преобразования амплитудно-частотного спектра динамики перфузии. Были изучены активные механизмы регуляции просвета и тонуса сосудов - миогенный, нейрогенный и эндотелиальный. Миогенные колебания отображают локальную регуляцию мышечного тонуса, определяемую состоянием гладких миоцитов в составе средней оболочки прекапилляров [20-21]. Чем выше амплитуда миогенных движений по стенке сосуда, тем она более расслаблена и раздута, подобно парусу, и тем, соответственно, ниже миогенный тонус сосуда [22]. На фоне гипоксии, вызванной действием сероводородсодержащего газа, амплитуда миогенных колебаний статистически достоверно уменьшилась на всех сроках эксперимента, и, таким образом, миогенный тонус сосудов возрос. Амплитуда нейрогенных колебаний, также как и нейрогенный компонент тонуса, статистически достоверных изменений не продемонстрировала, что, возможно, связано с низким воздействием серосодержащего газа на симпатическую иннервацию сосудов.

Эндотелиальный компонент тонуса реализуется эндотелиоцитами, синтезирующими и выделяющими в кровь биологически активные вещества, способные влиять на тонус и диаметр сосудов, в частности NO [23-25]. Первые два месяца эксперимента достоверного изменения данного компонента тонуса выявлено не было, а к 90 и 120 суткам было выявлено снижение амплитуды и повышение тонуса, что свидетельствует об увеличении выделения эндотелиальными клетками оксида азота. Скорее всего, это связано с увеличением активности индуцибельной синтазы.

Совокупность всех флуксуаций (максимальных амплитуд колебаний кровотока) представляет такой параметр микроциркуляции, как показатель шунтирования, определяющий эффективность ка-

пиллярного кровотока [22]. Наименьший показатель шунтирования регистрировался в контрольной группе животных, что свидетельствует о максимальном поступлении крови в нутритивное звено. Максимальный показатель выявляется в группе животных, находившихся в условиях гипоксии в сочетании с ингаляцией природного газа в течение 120 суток. Это свидетельствует о значительном сбросе артериальной крови через шунты в венозную часть русла, минуя капилляры, что, в свою очередь, ведет к формированию смешанной гипоксии. Нарушения регуляции сосудистого тонуса мы подтвердили с помощью иммуногистохимических исследований, дополнительно исследовав роль макрофагов (CD68-позитивных) клеток. В качестве модели была выбрана селезенка тех же животных, находившихся в условиях ингаляции природного газа в течение 120 суток. Маркер CD68⁺ в структурах селезенки контрольной группы животных локализовался в красной пульпе, в белой пульпе CD68-позитивные клетки были выявлены в маргинальной зоне, в небольшом количестве в В-зависимых зонах лимфоидных узелков. В Т-зависимых участках CD68-позитивные клетки присутствовали единично. К 60 суткам экспериментального воздействия число CD68-позитивные клетки уменьшается в структурах белой пульпы, и они перемещаются в красную пульпу. К концу 90 суток эксперимента они отмечены в субкапсулярной зоне и

соединительнотканых трабекулах, где наблюдается их увеличение (рис. 1).

По результатам иммуногистохимического окрашивания максимальная экспрессия eNOS была обнаружена в контрольной группе животных (рис. 2-а), по мере увеличения срока эксперимента концентрация этого фермента прогрессивно снижалась. При этом пропорционально уменьшению eNOS происходило увеличение iNOS, достигая максимума к 120 суткам (рис 2-б). Активное перемещение CD68-позитивных клеток по ходу кровеносных сосудов связано с их стимуляцией продуктами распада клеток и другими антигенами в результате хронической гипоксии.

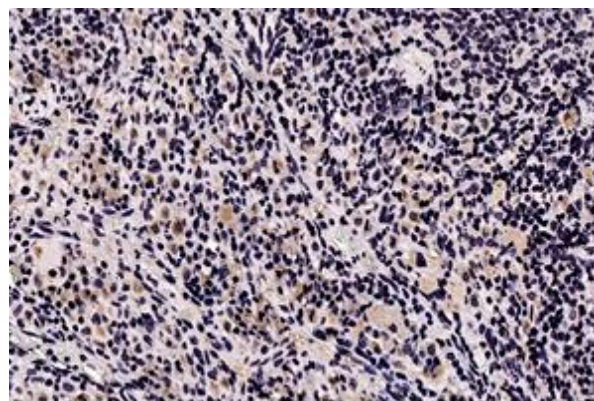


Рис. 1. Микрофото препарата селезенки. CD68-позитивные клетки (коричневый цвет) в красной пульпе. Окр. иммуногистохимическим методом с докраской ядер гематоксилином. Ув.: x600

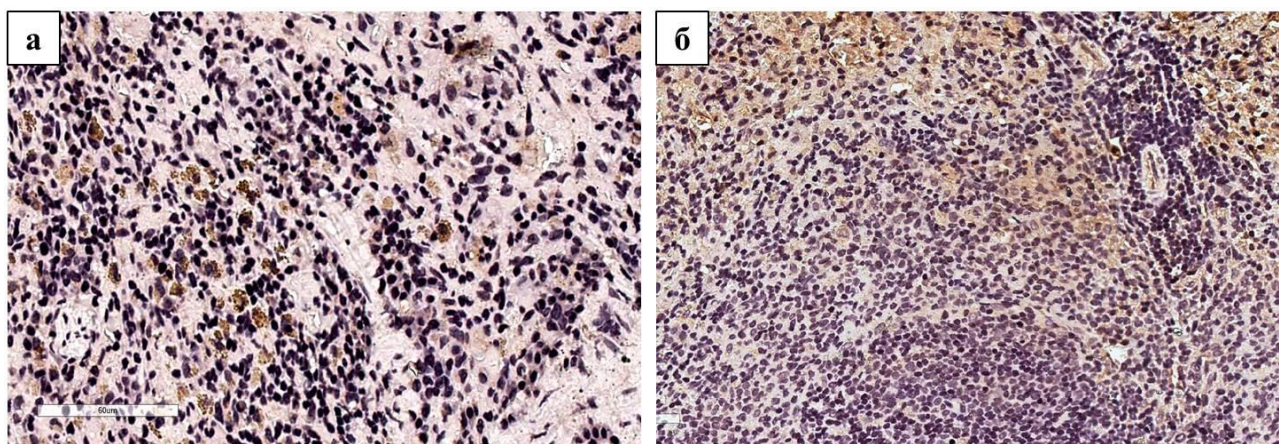


Рис. 2. Микрофото препарата селезенки. 120-е сутки эксперимента; а - экспрессия eNOS в структурах красной пульпы контрольной группы животных (а); б - экспрессия iNOS в структурах белой пульпы экспериментальной группы животных. Локализация маркеров – коричневые гранулы. Окр. иммуногистохимическим методом с докраской ядер гематоксилином. Ув.: а - x500, б - x240

Этот процесс сопровождается повышением функциональной активности макрофагов с последующей продукцией биологически активных веществ и цитокинов. Результатом совокупного действия этих факторов становится изменение функциональной активности эндотелия, а также последующее переключение активности с эндотелиальной NO-синтазы на индуцибельную.

Заключение. Таким образом, проведенные в настоящем исследовании эксперименты по моделированию хронической гипоксии на лабораторных крысах-самцах с использованием образцов природного газа Астраханского месторождения показали, что индуцибельная синтаза

инициирует образование оксида азота в цитотоксических дозах в структурах селезенки животных под воздействием гипоксии. Нарастание концентрации оксида азота сопровождается изменением его биодоступности и реализацией цитотоксических эффектов. При повышении функциональной активности эндотелиальных клеток сосудистого компонента кроветворных органов происходит не усиление микроциркуляции, а реализация токсических эффектов по отношению к иммунокомпетентным клеткам. Как видно из полученных результатов далеко не последнюю роль в этом играют макрофаги.

Литература

References

1. Petrenko VM. Limfoidnye ili krovetvoornye organy? Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2011;(1):142-143. In Russian
2. Mateva EV, Panteleeva NI. Reaktsiya serdechno-sosudistoy i dykhatel'noy sistem cheloveka na normobaricheskiy gipoksiyu do i posle kursa interval'nykh gipoksicheskikh vozdeystviy. Fundamental'nye issledovaniya. 2014;(6-7):1406-1411. In Russian
3. Rafi IS, Mohle R, Shapiro F et al. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. Leuk. Lymphoma. 1997;27(5-6):375-386
4. Jacobsen K, Kravitz J, Kincade PW, Osmond DG. Adhesion receptor on bone marrow stromal cells: in vivo expression of vascular cell adhesion molecule - 1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and γ -ir radiated mice. Blood. 1996;87(1):73-82
5. Ponomarev T, Peled A, Petit I. et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. J. Clin. Invest. 2000;106(11):1331-1339
6. Payushina OV. Krovetvoornoe mikrookruzhenie i rol' mezenkhimnykh stromal'nykh kletok v ego organizatsii. Uspekhi sovremennoy biologii. 2015;135(1):52-63. In Russian
7. Titova ON, Kuzubova NA, Lebedeva ES. Rol' gipoksiynogo signal'nogo puti v adaptatsii kletok k gipoksii. RMZH. Meditsinskoe obozrenie. 2020;4(4):207-213. In Russian. <https://doi.org/10.32364/2587-6821-2020-4-4-207-213>
8. Prihod'ko VA, Selizarova NO, Okovity SV. Molekulyarnye mekhanizmy razvitiya gipoksii i adaptatsii k ney. Chast' I. Arkhiv patologii. 2021;83(2):52-61. In Russian. <https://doi.org/10.17116/patol20218302152>
9. Taylor CT, Doherty G, Fallon PG, Cummins EP. Hypoxia-dependent regulation of inflammatory pathways in immune cells. J Clin Invest. 2016;126(10):3716-3724. <https://doi.org/10.1172/JCI84433>
10. Taylor CT, Colgan SP. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. Nat Rev Immunol. 2017;17(12):774-785. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.103>
11. Petrishchev NN, Vlasov TD. Fiziologiya i patofiziologiya endotelii. V kn.: Disfunktsiya endotelii. Prichiny, mekhanizmy, farmakologicheskaya korraktsiya. Pod red. N.N. Petrishcheva. S-Pb: Izd-vo SPbGIMU, 2003. - S. 4-39. In Russian
12. Karoli NA, Rebrov AP. Endotelial'naya disfunktsiya i ee klinicheskoe znachenie u bol'nykh khronicheskimi obstruktsionnymi zabolevaniyami legkih. Klinicheskaya meditsina. 2005;(9):10-16. In Russian
13. Ketlinsky SA, Simbirtsev AS. Citokiny. Sankt-Peterburg: OOO «Izdatel'stvo Foliant», 2008. - 552s. In Russian
14. Zapadnyuk VI, Zapadnyuk IP, Zakhariya EA. Laboratornye zhivotnye. Kiiv: Vishcha shkola, 1983. - 383s. In Russian
15. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC: The national academies press, 2011. - 243pp. URL: <http://www.nap.edu/catalog/12910.html> (Date: 05.07.18)
16. Nikolaeva AG. Ispol'zovanie adaptatsii k gipoksii v meditsine i sporte. Vitebsk: VGMU, 2015. - 150s. In Russian
17. Chuyan OM, Tribrat NS. Metodichni aspekti zastosuvannya metodu lazernoy dopleriv'skoy floumetrii. Vcheni zapiski Tavriys'kogo natsional'nogo universitetu imeni V.I. Vernads'kogo. Seriya «Biologiya, khimiya». 2008;21(2):156-171. In Ukrainian
18. Barkhatov IV. Primenenie lazernoy doplerovskoy floumetrii dlya otsenki narushenykh sistem mikrotsirkulyatsii krovi cheloveka. Kazansky meditsinskiy zhurnal. 2014;95(1):63-69. In Russian
19. Chernyago TYu, Fomina VS, Feduyk OV, Yashkin MN. Metody otsenki funktsional'nogo sostoyaniya endotelii u patsientov s varikoznoy bolezn'yu ven nizhnikh konechnostey: perspektivy lechebnoy taktiki. Vestnik natsional'nogo mediko-hirurgicheskogo tsentra imeni N.I. Pirogova. 2021;16(1):145-150. In Russian. <https://doi.org/10.25881/BPNMSC.2021.17.48.028>
20. Stefanovska A, Bracic M, Koernmo HD. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. IEEE Trans. Biomed. Eng. 1999;46(10):1230-1239
21. Meyer MF, Rose CJ, Hulsman JO et al. Impaired 0.1-Hz vasomotion assessed by laser Doppler anemometry as an early index of peripheral sympathetic neuropathy in diabetes. Microvasc. Res. 2003;65(2):88-95
22. Krupatkin AI. Klinicheskaya neyroangiofiziologiya konechnostey (perivaskulyarnaya innervatsiya i nervnaya trofika). M.: Nauchny mir, 2003. - 328s. In Russian
23. Popova AA, Berezikova EN, Mayanskaya SD. Endotelial'naya disfunktsiya i mekhanizmy ee formirovaniya. Sibirskoe meditsinskoe obozrenie. 2010;64(4):7-11. In Russian
24. Pizov AV, Pizov NA, Skachkova OA, Pizova NV. Endotelial'naya funktsiya v norme i pri patologii. Meditsinsky sovet. 2019;(6):154-159. In Russian
25. Dorofienko NN. Rol' sosudistogo endotelii v organizme i universal'nye mekhanizmy izmeneniya ego aktivnosti (obzor literatury). Byull. fiz. i pat. dykh. 2018;(68):107-116. In Russian

Авторы заявляют об отсутствии каких-либо конфликтов интересов при планировании, выполнении, финансировании и использовании результатов настоящего исследования

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Наумов Александр Валентинович, ассистент кафедры гистологии и эмбриологии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия;
e-mail: naumov_histo@mail.ru

Никитюк Дмитрий Борисович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией спортивной антропологии и нутрициологии, директор, Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии, Москва, Россия;
e-mail: dimitrynik@mail.ru

Овсянникова Ольга Александровна, кандидат медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой патологической физиологии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия;
e-mail: ovolga.a@yandex.ru

Шишкина Татьяна Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии и эмбриологии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия;
e-mail: suntata@rambler.ru

Наумова Любовь Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой гистологии и эмбриологии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия;
e-mail: naumova_histo@mail.ru

The authors declare that they have no conflicts of interest in the planning, implementation, financing and use of the results of this study

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Aleksandr V. Naumov, Assistant of the Department of Histology and Embryology of the Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia;
e-mail: naumov_histo@mail.ru

Dimitry B. Nikityuk, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Sports Anthropology and Nutrition, Director of the Federal Research Center for Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia;
e-mail: dimitrynik@mail.ru

Olga A. Ovsyannikova, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Pathological Physiology of the Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia;
e-mail: ovolga.a@yandex.ru

Tatyana A. Shishkina, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology of the Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia;
e-mail: suntata@rambler.ru

Lyubov I. Naumova, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Histology and Embryology of the Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia;
e-mail: naumova_histo@mail.ru