

# ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторы . . . . .	4
Список сокращений и условных обозначений . . . . .	5
Введение . . . . .	6
<b>Глава 1.</b> Возраст как основной элемент реконструкции биологического профиля неизвестного индивида . . . . .	9
<b>Глава 2.</b> Характеристика возрастных изменений тканей и органов . . . . .	15
2.1. Морфометрические возрастные изменения кожи . . . . .	17
2.2. Морфометрические возрастные изменения хрящевой ткани и щитовидного хряща . . . . .	45
2.3. Морфометрические возрастные изменения костной ткани . . . . .	84
2.4. Морфометрические возрастные изменения сосудов головного мозга и нервного аппарата сосудов спинного мозга . . . . .	111
<b>Глава 3.</b> Комплексная оценка возраста с использованием методов интеллектуального анализа . . . . .	124
3.1. Алгоритм решения задачи расчета возраста с использованием методов машинного обучения . . . . .	127
3.2. Структурно-функциональная организация программно-аппаратного комплекса для решения задачи установления возраста идентифицируемого объекта . . . . .	144
<b>Глава 4.</b> Экспертные модели и алгоритмы определения биологического возраста индивида . . . . .	150
4.1. Экспертная модель микроостеометрического определения биологического возраста индивида . . . . .	150
4.1.1. Расчет биологического возраста на основании результатов гистоморфометрического исследования эпифизов и диафизов большеберцовой кости . . . . .	151
4.1.2. Расчет биологического возраста на основании результатов гистоморфометрического исследования реберного хряща, эпифизов и диафизов большеберцовой кости . . . . .	157
4.2. Экспертная модель определения биологического возраста индивида на основании исследования щитовидного хряща . . . . .	160
4.3. Экспертные модели определения возраста по планиграфическим признакам старения костей кисти . . . . .	163
Заключение . . . . .	169
Тестовый контроль . . . . .	178
Эталоны ответов . . . . .	182
Список литературы . . . . .	182
Приложения . . . . .	183
Предметный указатель . . . . .	188

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ

Морфологические проявления возрастной инволюции, равно как и клинико-физиологические симптомы старения, достаточно вариabельны во временнóм, топологическом пространстве, «не допускают строгой регламентации и не поддаются предвидению» [35, 183]. Это отражает базовые характеристики возрастных изменений: гетерохронность, гетеротопию и гетерометрию, «асимметричность относительно различных систем» [183]. Морфометрическое исследование, которое включает в себя оценку инволютивных, деструктивных и адаптивных возрастных изменений различных органов и тканей, формирует объективное представление о биологическом возрасте индивида.

Представленные в данной главе данные о динамике возрастных изменений различных тканей и органов — результат комплексного анализа объектов, полученных в ходе секционного исследования 294 паспортизированных трупов мужского пола. Забор материала сопровождался ведением протокола с указанием даты и номера судебно-медицинского исследования, паспортных (пол, возраст) и антропометрических данных трупа, судебно-медицинского диагноза.

Критерии включения: давность смерти — не более суток (для препаратов костной и хрящевой ткани, кожи), не более 7 ч (для препаратов головного мозга, сосудов спинного мозга); отсутствие травматических повреждений исследуемой ткани, органа; отсутствие признаков патологических изменений, заболеваний соединительной ткани, эндокринной патологии; выраженных признаков хронической экзогенной интоксикации.

Объекты исследования: препараты кожи (фрагменты кожи из области грудины, нижней трети); препараты хрящевой ткани [фрагменты левой пластинки щитовидного хряща (ЩХ)], препараты костной ткани

[фрагменты диафиза и дистального эпифиза левой плечевой кости, большеберцовой кости (ББК)], препараты головного мозга (моторная кора полушарий большого мозга — поле 6), корковые концы слухового анализатора (задняя часть височной извилины — поле 41); препараты мягкой оболочки спинного мозга (передняя спинальная артерия).

Для дифференцированного исследования возрастных изменений весь возрастной диапазон был разделен:

- 1) на возрастные группы на основе возрастной периодизации, принятой на VII Всесоюзной конференции по проблемам возрастной морфологии, физиологии и биохимии АПН СССР, в 1965 году;
- 2) на группы с десятилетним интервалом;
- 3) на группы, сформированные с учетом результатов собственных исследований и данных литературы.

Также в процессе исследования производилась кластеризация с формированием возрастных групп посредством метода машинного обучения (ММО).

### **Этапы исследования**

*1-й этап* — морфологическое исследование.

*2-й этап* — морфометрическое исследование и формирование баз данных количественных показателей, характеризующих возрастные изменения изученных тканей и органов.

- Исследование проводилось по программе признаков (табл. 2.1.1, 2.2.1, 2.2.2, 2.3.1, 2.3.2, 2.4.1, 2.4.2), разработанных на основе анализа специализированной литературы [29–31, 83–85, 90, 91, 117, 119, 122, 126, 154, 220, 226–229, 379–381] и результатов собственных многолетних исследований.
- Для проведения количественного морфометрического исследования в работе используется микроскопическая техника («Leica DM 1000», объектив «Leica HIPLAN 10x/0.25»), система анализа изображения («HIPLAN 20x/0.10»), позволяющая получить фотоизображения (JPEG).
- Измерения проводятся с использованием программы обработки графических файлов ImageJ. Данное программное приложение разработано National Institutes of Health «специально для анализа изображений, полученных при биологических и медицинских исследованиях» [93]. В ImageJ производится вычисление площадей изучаемых структур, линейных размеров исследуемых областей (в том числе автоматическое определение максимальных, минимальных и средних значений исследуемого показателя), подсчет количества отдель-

ных элементов структуры. При активации команды Measure (Ctrl+M) («Измерение») выбираются необходимые параметры Set Measurements. Analyze > Measure и Analyze > Analyze Particles и единицы измерения (Analyze > Set Scale).

- Программы гистоморфометрических признаков включают в себя последовательность параметров, которые подразделяются на первичные (непосредственно измеряемые) и расчетные признаки.
- При проведении гистоморфометрических исследований необходимо соблюдать правила измерений подобного рода показателей, допускающие в том числе пропуск от двух до пяти полей зрения в зависимости от исследуемого показателя, без перекрытия полей зрения; выбор увеличения от 50- до 200-кратного в зависимости от показателя и др. [1, 28, 154].

*3-й этап* — математический анализ количественных показателей с использованием ММО.

- Пайплайн данного этапа — feature engineering — включал в себя двухмерную визуализацию данных, анализ информативности признаков с использованием деревьев решений, анализ зависимости качества работы моделей от размерности признакового пространства; сравнение различных классификаторов и выбор наиболее подходящего алгоритма для решения данной целевой задачи; построение и анализ матрицы ошибок и ROC-кривой для каждого из классов.

*4-й этап* — формирование итогового алгоритма решения задачи расчета биологического возраста.

## 2.1. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОЖИ

**Состояние вопроса.** В судебно-медицинской экспертной практике возраст идентифицируемого устанавливают в подавляющем большинстве случаев по скелету человека. Возможность использования других органов и тканей человека не реализована. Активный научный поиск в области возрастной морфологии с позиций клинической практики, анатомии, геронтологии, расширение возможностей гистологических техник, использование количественных методик позволяют рассматривать внутренние органы, мягкие ткани в качестве приемлемых объектов для определения возрастных модификаций. Следует отметить

работы коллектива кафедры судебной медицины Саратовского государственного медицинского университета, где созданы методики установления возраста посредством оценки происходящих инволютивных трансформаций в щитовидной железе [146], почках [29], семенниках [29, 111], аорте [38, 39], коже [29, 38, 133]. Исследователи отмечают, что действенными мерами, способными повысить доказательную значимость, точность оценки возраста, являются расширение набора диагностических параметров, использование комплексного подхода [4, 29, 41].

В современной биологии накоплено много информации о морфологии возрастных изменений внутренних органов, которые целесообразно использовать для судебно-медицинского установления возраста. Еще в прошлом столетии были детально описаны этапы и сроки онтогенетического развития органов и тканей [3, 6, 7, 25, 75, 144, 161, 163].

Возрастная инволюция кожи как неизбежное проявление старения всего организма является достаточно сложным полифакторным процессом. При этом выделяют (по Международной классификации болезней 10-го пересмотра) хроностарение (L57.4) и фотостарение (L57). В контексте данного исследования нас интересует именно биологическое, «эндогенное» старение кожи, являющееся генетически детерминированным процессом [12]. В судебно-медицинской экспертной практике возраст оценивался преимущественно путем констатации степени выраженности морщин. Между тем современный уровень развития дерматокосметологии и смежных дисциплин вывел оценку возрастных изменений кожи на абсолютно новый уровень, прежде всего за счет внедрения инновационного диагностического оборудования. Это позволило сформировать огромный информационный массив знаний о возрастных изменениях кожи [30, 32, 36, 53, 59, 83, 84, 85, 87, 94, 106, 127, 145, 164, 176, 185, 188, 190, 199, 211, 215, 238, 239, 243, 259, 279, 280, 287, 288, 290, 296, 306, 317, 342, 356, 394, 402–405]. Однако в судебной медицине на сегодняшний день исследований, посвященных изучению кожи как предиктора старения, крайне мало [31, 39, 60, 133].

В.Г. Каукаль в своей работе использовал количественные значения толщины кожи различной региональной принадлежности для построения математических моделей с помощью многомерного дискриминантного анализа [60]. Представленные в работе результаты позволяют сделать вывод, что методы эмиссионной спектрографии и инфракрасной спектроскопии кожи и волос, исследование их микроэлементного состава можно применять в целях диагностики возраста лишь в ком-

плексе с другими методиками. Автор предлагает использовать для диагностики возраста только метрические признаки (толщину) кожи и ногтей детей и взрослых. Реалии сегодняшнего времени и уровень научно-технических достижений позволяют значительно расширить арсенал используемых методов.

Ряд исследований в данном направлении выполнен под руководством А.А. Ефимова. Изучены некоторые количественные показатели инволютивных изменений кожи, выявлены их гендерные и топологические отличия, проведен сравнительный анализ синхронности происходящих с возрастом изменений кожи и крупных сосудов [38, 39, 40, 133]. При этом исследователи справедливо отмечают, что для совершенствования судебно-медицинской оценки возраста необходимо расширять круг исследуемых органов и тканей и модернизировать методы математического анализа данных [40, 41].

С. Trojahn и соавт. (2015) разработали новые параметры учета модификаций возрастного профиля кожи, которые объективно регистрируются прибором VisioScan VC98. Для оценки трансформации эпидермальных структур во времени использована оптическая когерентная томография, позволившая объективизировать дополнительные критерии неинвазивной оценки возрастных изменений кожи на открытых и защищенных от солнца участках [393, 394]. Высокое разрешение данного инструмента гарантирует диагностику ранних признаков старения кожи, в том числе формирования различных типов коллагеновых волокон [306, 345]. J.P. McLean и соавт. (2019) разработали оригинальный метод автоматизированной визуализации структурной архитектоники коллагеновых волокон и их количественной оценки на изображениях, полученных с помощью оптической когерентной томографии. Подобный подход расширяет функциональные возможности классических методов визуализации [321].

Накоплено большое количество сведений, касающихся патогенетических механизмов старения кожи [314, 342, 345]. Происходящие с возрастом изменения кожи напрямую зависят от сочетания внутреннего (хронологического) старения, модулируемого генетически predisполагающими факторами, и внешнего старения (фотостарения). Исследователи отмечают, что значительное количество гистоморфологических преобразований, формирующихся в стареющей коже, в основном зависит от кумулятивного воздействия экзогенных факторов, среди которых главенствующая роль принадлежит ультрафиолетовому облучению. Т. Kanaki и соавт. (2016) отмечают потребность в объективной оценке индивидуального патогенеза возрастных измене-

ний посредством создания реестра биомаркеров [279]. Для этих целей используются самые разнообразные показатели.

В работе А. Kozarova и соавт. (2017) с помощью высокочастотного ультразвукового исследования (частота — 20 МГц) дана оценка возрастных изменений толщины кожи в зависимости от воздействия ультрафиолетового и инфракрасного излучения. Предложено использовать в качестве маркера выраженности фотостарения оценку субэпидермальной низкоэхогенной полосы [297]. Результаты работы У. Коуано и соавт. (2017) также свидетельствуют о достоверном снижении толщины дермы с возрастом [296]. Ученые провели проспективное когортное исследование среди пожилых пациентов в возрасте 65 лет и старше (N=149) на протяжении 8 мес. Изучались свойства кожи предплечья (толщина дермы, эхогенность структур) с помощью ультразвукового сканера 20 МГц.

К. Kikuchi и соавт. (2015), используя систему визуализации, оснащенную осветительным устройством и цифровой камерой высокого разрешения, разработали метод оценки изображения на неоднородность цвета кожи. В ходе анализа неоднородности цвета кожи щек у 194 женщин были зафиксированы возрастные изменения меланина [288]. Продолжив исследования, коллектив авторов создал систему количественной оценки пигментных пятен на лице, доказав наличие четкой связи пигментации с возрастом [287]. Wang Hequn и соавт. (2015) разработали алгоритм для документирования возрастных дефектов кожного матрикса. В работе использовалась микроскопия с двухфотонной флуоресценцией для прямой визуализации кожных волокон кожи *in vivo*. На изображениях двух анатомических областей (внутренняя поверхность плеча и щека) женщин в возрасте 20–30 лет и 60–80 лет исследованы структурные изменения дермальных волокон: пространственная ориентация, плотность. В старшей возрастной группе (60–80 лет) отмечена более высокая анизотропия в ориентации волокон кожи на внутренней поверхности плеча. Плотность волокон эластина увеличивалась с возрастом, тогда как плотность волокон коллагена уменьшалась с возрастом. Средние доли коллагеновых и эластических волокон во всей дерме составляли  $28,96 \pm 14,63\%$  и  $8,06 \pm 3,75\%$  соответственно [403]. К. Mizukoshi и соавт. (2017) также установили, что в коже более старших возрастных групп происходят снижение четкости и рост изотропности волокон коллагена и эластина [326]. В исследовании использовались CLSM-изображения коллаген-эластинового каркаса от 90 японских женщин в возрасте от 20 до 60 лет. Для оценки результатов применен метод анализа основных компонентов.

Трансформация дермальных волокон является основным элементом происходящих с возрастом изменений. Выраженность данных преобразований зависит от эндогенного воздействия и максимально проявляется при фотостарении. Большинство исследователей сходятся во мнении, что состояние коллагеновых волокон сосочкового слоя дермы имеет ведущее значение в формировании статуса стареющей кожи.

Коллаген синтезируется соединительнотканными клетками, существует более 20 вариантов его генетической разновидности. Содержание того или иного типа коллагена зависит от возраста, стадии репаративного процесса. Его разрушение (деградация) осуществляется в несколько этапов с участием фибробластов, различных ферментов [108, 109, 141, 400]. Существуют как внеклеточная фиброклазия, так и коллагенолиз, происходящий внутри клеток [94, 164]. Активность данного процесса зависит от типа коллагена. Естественно, что старение приводит к снижению интенсивности обмена коллагена: волокна за счет множественных «поперечных сшивок» распрямляются, становятся «жесткими», малодоступными для коллагеназы. Коллаген не только основной структурный элемент дермы, но и базисный фибриллярный белок межклеточного матрикса, необходимый для полноценного функционирования всего организма в целом. Следовательно, количественные характеристики, отражающие изменения коллагенового каркаса дермы с возрастом, можно использовать в качестве биомаркера. Коллаген выполняет в организме ряд очень важных функций. Во-первых, опорную — от количества и расположения коллагеновых волокон, а также от их качественного состава зависят механические свойства тканей организма. Во-вторых, коллаген играет важную информативно-регуляторную роль в морфогенезе тканей. Синтез коллагена, структурная организация волокон обеспечиваются в первую очередь механическим фактором. Согласно «теории регуляции роста соединительной ткани на основе обратной связи между распадом и синтезом коллагена», разработанной В.В. Серовым и А.Б. Шехтером, процесс ауорегуляции — двуфазный [141]. Первая фаза состоит из фагоцитоза макрофагами компонентов разрушенного коллагена и выработки фиброгенетического фактора, активирующего пролиферацию как соединительнотканых клеток, так и фибриллярного белка (коллагена). Вторая фаза — снижение активности соединительной ткани, активация инволютивной перестройки посредством воздействия на мембраны фибробластов. Таким образом, можно говорить о наличии общебиологических закономерностей развития

соединительной ткани: развитие, стабилизация, инволюция [141]. В соответствии с концепцией биомеханического контроля морфогенеза фибробласт является ключевым звеном, способным регулировать не только свое микроархитектурное окружение, но и архитектонику ткани в целом посредством поверхностного микрорельефа клетки, ее двигательной траектории, пространственного взаиморасположения отростков. В условиях отсутствия функциональной нагрузки волокна подвергаются резорбции. Таким образом, конструирование тканей происходит посредством обратной связи: клетка ↔ матрикс [108, 109, 141]. Снижение механического напряжения (физической активности) напрямую сказывается на формировании и архитектонике соединительно-тканых элементов, в данном случае коллагена дермы.

Большое практическое значение имеют разработки коллектива авторов A.N. Annaidh и соавт. (2012) по оптимизации процессов распознавания и автоматизации морфометрии дермальных структур. В предложенном ими методе используются стандартные гистологические методы и алгоритм, реализованный в инструментарии обработки изображений MATLAB. M. Ueda и соавт. (2019) применили комбинированную фотонную микроскопию для изучения пространственной организации коллагеновых волокон в дерме человека и их взаимосвязи с эластическими волокнами [399]. Согласно полученным данным, средние значения диаметра коллагенового волокна, ориентированного горизонтально, больше в сетчатом слое дермы, чем в сосочковом (средний диаметр волокна в сосочковом слое —  $47 \pm 18$  мкм, в сетчатом —  $136 \pm 14$  мкм;  $p < 0,01$ ). Аналогичный вывод получен и относительно диаметра эластических волокон (средний диаметр волокна в сосочковом слое —  $4,4 \pm 0,6$  мкм, в сетчатом —  $5,9 \pm 0,8$  мкм;  $p < 0,05$ ). Слои дермы также имели различные показатели углов ориентации между волокнами.

S. Amano и соавт. (2016) выявили, что воздействие ультрафиолетовых лучей на кожу, помимо повреждения дермальных эластических волокон, приводит к увеличению фактора роста эндотелия сосудов, ангиогенного фактора, в то время как антиангиогенный фактор уменьшается. Эти изменения вызывают ангиогенез в папиллярной дерме с увеличением миграции эластазоположительных лейкоцитов [188]. T. Ahmed и соавт. (2017) использовал инновационный подход изучения физических свойств коллагена и установил, что наличие возрастных различий в удержании воды внутри фибрилл приводит к изменению их плотности [185].

N.N. Golubtsova и соавт. (2015) провели иммуногистохимическое исследование содержания ангиомотина, эндостатина и баланса между

этим веществами у лиц с момента рождения до 85 лет. Авторы отметили возрастное снижение содержания ангиотина в кровеносных сосудах дермы в возрасте 61–85 лет. Эндостатин-положительные кровеносные сосуды были обнаружены в образцах кожи людей всех возрастов, при этом их количество увеличивалось с возрастом [259]. По данным Р.М. Kinn и соавт. (2015), старение кожи сопровождается не только неизбежным истончением эпидермиса, снижением ее барьерной функции, но и постепенным ухудшением эпидермального иммунного ответа, меняется уровень и роль цитокинов, хемокинов и биологических аналитов [290]. В исследовании N.E. Chalyk и соавт. (2017) изучены образцы рогового слоя, полученные неинвазивным методом у 53 лиц женского пола. У пожилых женщин (50–73 года) наблюдалось достоверное уменьшение размера липидных капель и количества кристаллов липидов, а десквамация корнеоцитов была значительно выше [212]. R.M. Elewa и соавт. (2015), выполнив иммуногистохимическое исследование уровня белка кожи 42 молодых и пожилых людей, установили, что с возрастом формируются дефектные реакции на стресс, активируется онкогенез, что было особенно заметно в сальных железах [239].

Вполне закономерно S. Bielfeldt и соавт. (2018) приходят к выводу, что с учетом накопленных знаний о старении в целом, большого количества опубликованных обзоров клинических методов диагностики старения кожи только комплексная количественная оценка, возможно, является объективной мерой, доказательной базой как самих возрастных изменений, так и дерматологических средств, их корректирующих [199]. Помимо неинвазивных методов, позволяющих выполнить количественную оценку старения кожи, исследователи рекомендуют дополнять клинические исследования инвазивными процедурами.

На основе проведенного анализа следует констатировать, что в большинстве случаев объектом исследования была кожа лиц женского пола. Вместе с тем известно, что кожа относится к гормонально зависимым органам. Эстрогены оказывают стимулирующее влияние на рост и развитие клеток эпидермиса, его базального слоя, активируют выработку дермальных волокон фибробластами. Таким образом, эстрогены играют заметную роль в поддержании упруго-эластических свойств кожи, и научные исследования в области дерматогеронтологии доказали взаимосвязь дефицита половых гормонов со старением кожи. Вышеизложенное ограничивает возможность экстраполяции имеющихся данных о возрастных изменениях кожи на противоположный пол.

При анализе литературных источников мы также столкнулись с большим разнообразием числовых значений, характеризующих дермальные волокна. Гистоморфометрическое исследование данных структур в процессе старения — достаточно сложный процесс. Уменьшение эластических свойств кожи как проявление возрастной инволюции — известный факт. Однако разнообразие структурной композиции волокон, зависимость их от целого ряда факторов, разнообразие аранжировки и фрагментации в конечном итоге могут привести к артефактным результатам. Волокна коллагена и эластина «плотно» упакованы, что значительно затрудняет процесс морфометрического исследования. Решение данной проблемы возможно, например, по мнению L. Charles-de-Sá, N.F. Gontijo-de-Amorim, G. Rigotti и соавт. (2020), посредством использования многофотонной микроскопии [214]. Это еще раз подчеркивает необходимость разработки набора признаков, отличающихся технической воспроизводимостью и способностью объективно отражать происходящие с возрастом изменения изучаемого объекта с последующим формированием банка цифровых значений и обработкой ее ММО.

#### **Методика исследования**

*Гистологический метод исследования.* Приготовление препаратов из образцов кожи осуществляется по методике, включающей стандартные процедуры: фиксация в забуференном растворе формальдегида (Формалина\*) (10%) → промывка → стандартная спиртовая проводка → заливка в парафин жидкий → изготовление срезов толщиной 5–7 мкм → окраска *гематоксилин-эозином* (обзорная окраска).

Для выявления эластических волокон рекомендуется выполнять дополнительное окрашивание по *Вейгерту*: цвет окрашенных эластических волокон — темно-синий.

Для выявления коллагеновых волокон — дополнительное окрашивание по *Ван-Гизону*: цвет окрашенных коллагеновых волокон — различные оттенки красного, возможно, пурпурный; по *Массону*: цвет окрашенных коллагеновых волокон — различные оттенки синего.

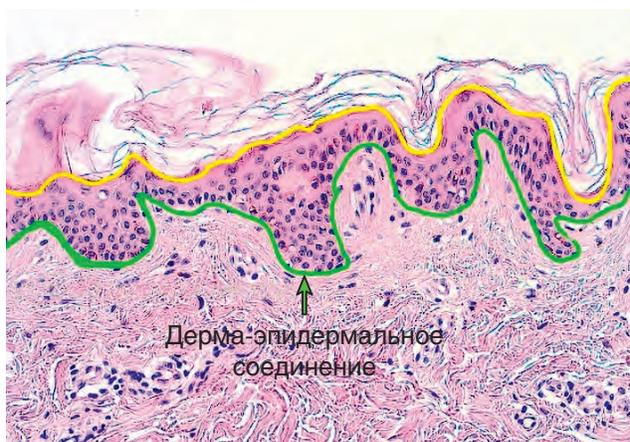
*Иммуногистохимический метод исследования.* Препараты кожи фиксируются в 10-процентном нейтральном забуференном формальдегиде (Формалине\*) в течение 24 ч. Микроскопическое исследование проводится по традиционным методикам: приготовленные парафиновые срезы окрашивают гематоксилином и эозином по методам Вейгерта, Ван-Гизона. Часть срезов подвергается антигенной демаскировке в 0,1 М цитратном буфере pH 6,0 в течение 30 мин [13], далее срезы обрабатываются первичными антителами Monoclonal Mouse а Ну

Ki-67 Clone MM1 фирмы Novocastra (Германия), Monoclonal Mouse a Hu bcl-2 Clone bcl-2/100/D5 той же фирмы, Monoclonal Rb a Hu p53 Clone 318-6-11 фирмы Dako (США), реагентами системы визуализации EnVision+System-HRP (DAV), code K4010 фирмы Dako (США). Экспрессию иммуногистохимических маркеров Ki-67, p53 и bcl-2 определяют в базальном слое эпидермиса неповрежденной кожи путем подсчета общего количества клеток в каждом поле зрения светового микроскопа при увеличении 100–200 (не менее 50 на один гистологический препарат), клеток, меченных МКА к указанным белкам, с последующим вычислением индекса Ki-67-, p53- и bcl-2-позитивных клеток в процентах.

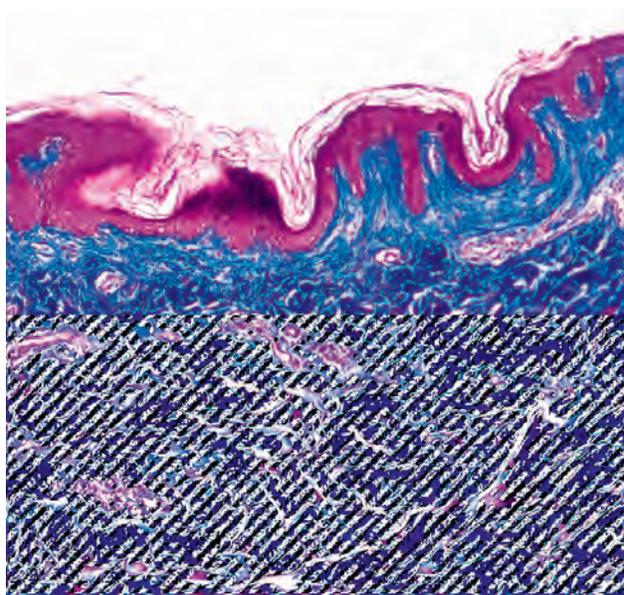
*Морфометрический метод исследования.* С помощью микроскопа в каждом объекте осуществляют микрофотографирование с проведением дальнейшего морфометрического измерения, используя программу (ImageJ) для морфометрического исследования. Морфометрия проводится в соответствии с общими методологическими рекомендациями. В каждом объекте в трех полях зрения микроскопа с пропуском двух-трех полей зрения осуществляется измерение признаков, представленных в табл. 2.1.1 (рис. 2.1.1–2.1.6).

**Таблица 2.1.1.** Программа признаков для гистоморфометрического исследования кожи

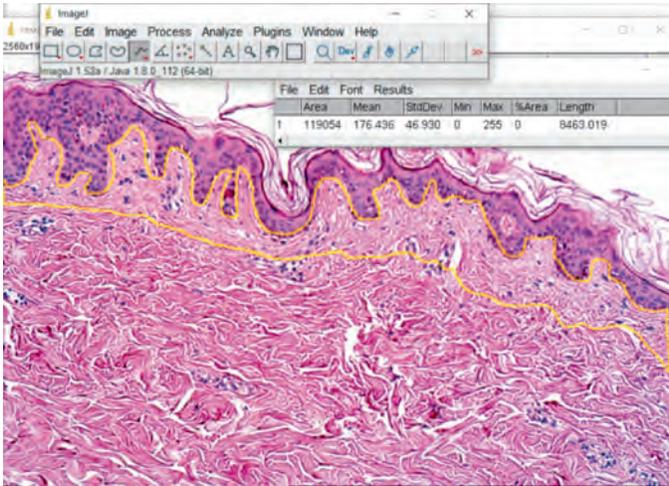
Имя признака	Название признака
D1	Толщина эпидермиса кожи
D2	Степень выраженности возрастных изменений (полуколичественная оценка в баллах)
D3	Площадь коллагеновых волокон
D4	Толщина эластического волокна
D5	Длина границы раздела эпидермиса и дермы
D6	Длина – расстояние между точками по прямой (вспомогательный признак)
D7	Интегральный индекс D5/D6
D8	Толщина сосочкового слоя дермы
D9	Количество фибробластов среднее в поле зрения
D10	Выраженность завитка эластического волокна



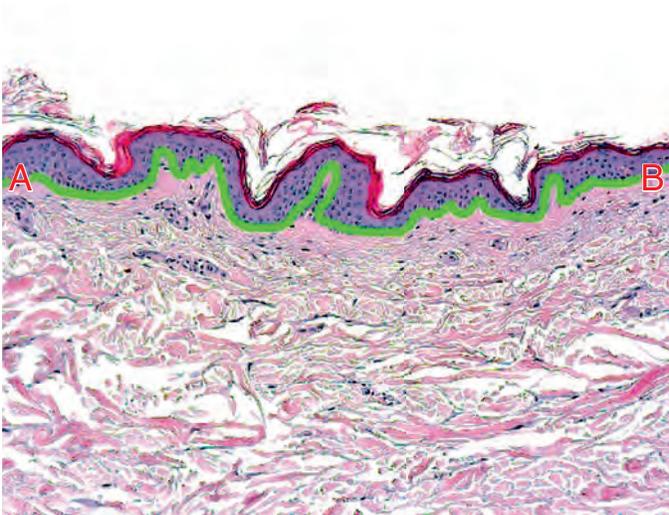
**Рис. 2.1.1.** Морфометрическая методика измерения показателя D1. Препарат кожи. Окраска гематоксилин-эозином,  $\times 200$



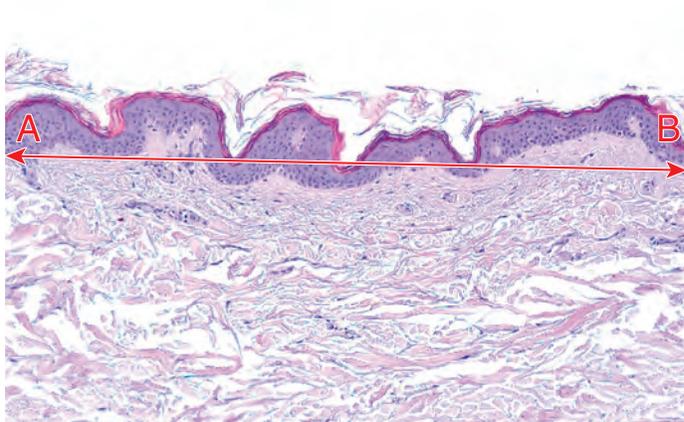
**Рис. 2.1.2.** Морфометрическая методика измерения площади коллагеновых волокон в поле зрения препарата кожи. Часть площади, занимаемая коллагеновыми волокнами, размечена штриховкой. Препарат кожи. Окраска по Массону,  $\times 200$



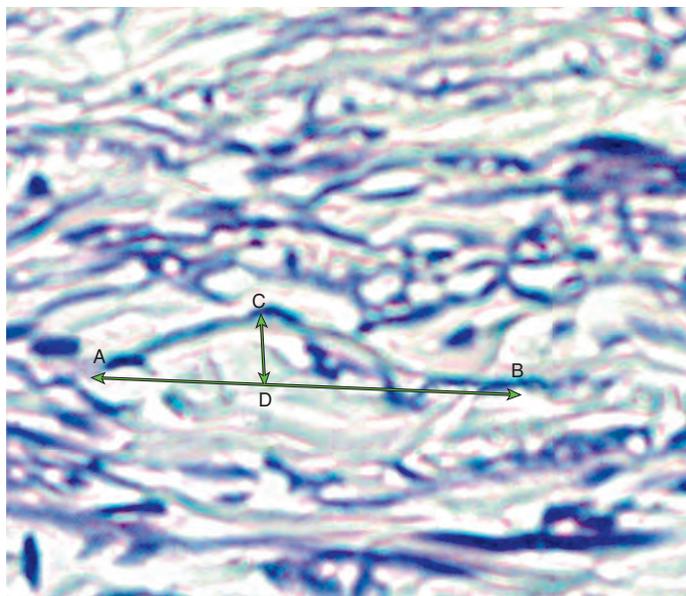
**Рис. 2.1.3.** Морфометрическая методика измерения показателя D8. Скриншот страницы в процессе измерения. Препарат кожи. Окраска гематоксилин-эозином,  $\times 100$



**Рис. 2.1.4.** Морфометрическая методика измерения показателя D5. Препарат кожи. Окраска по Вейгерту,  $\times 100$



**Рис. 2.1.5.** Морфометрическая методика измерения показателя D6. Препарат кожи. Окраска по Вейгерту,  $\times 100$



**Рис. 2.1.6.** Морфометрическая методика измерения показателя D10. Препарат кожи. Окраска по Вейгерту,  $\times 200$

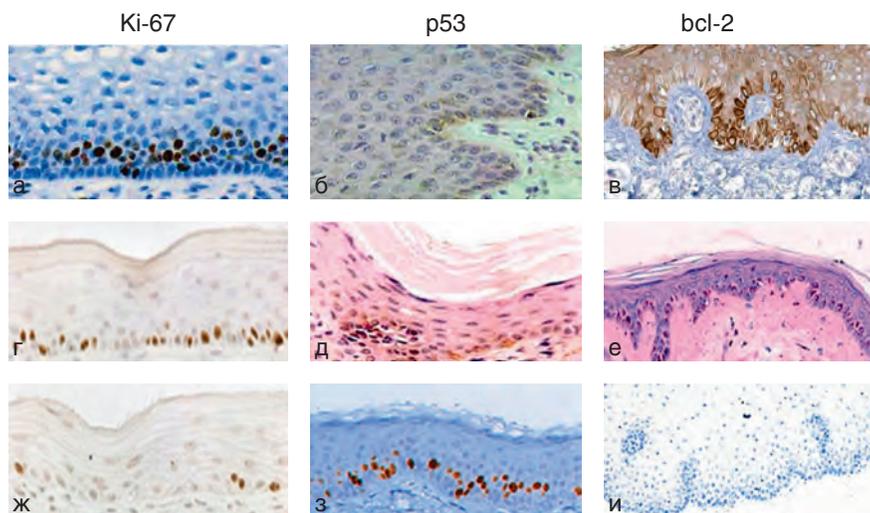
D1 — толщина эпидермиса — является расчетным показателем, полученным путем деления площади эпидермиса на его длину (см. рис. 2.1.1). Аналогичным образом был получен показатель D8 (см. рис. 2.1.3). Суммарный балл возрастной инволюции отражен в показателе D2. При морфологическом описании гистологических препаратов кожи необходимо отметить признаки возрастной инволюции, для оценки степени выраженности которых использована оценка в баллах (0 — отсутствие признака, 1 — наличие признака). Оцениваются: характеристика рельефа эпидермиса в совокупности с состоянием дермо-эпидермального соединения (наличие неравномерной толщины, кератинизации, разрыхления рогового слоя, уплощение дермо-эпидермального соединения); наличие лимфоидной инфильтрации (скопление лимфоидных клеток); наличие дезорганизации коллагеновых волокон; изменение структурной композиции, толщины эластических волокон; наличие скопления меланоцитов. Гистоморфометрия показателя D3 производится на препаратах, окрашенных по Массону. При данной окраске коллагеновая соединительная ткань приобретает интенсивно-синий цвет, облегчающий процесс распознавания и последующее измерение (см. рис. 2.1.2).

Контуром желтого цвета обозначена граница сосочкового слоя дермы между базальным слоем эпидермиса и уровнем расположения поверхностных сосудов (см. рис. 2.1.3). Измерение длины дерма-эпидермального соединения (D5) — расстояние между точками А и В на рис. 2.2.4 — разметка контуром зеленого цвета. Показатель D6 — расстояние между точками А и В по прямой (см. рис. 2.1.5). Показатель D7 рассчитывается как соотношение  $D5/D6$  (см. рис. 2.1.4, 2.1.5). Показатель D10 рассчитывается как соотношение  $AB/CD$ , где АВ — длина волокна, CD — перпендикуляр к наиболее удаленной точке завитка эластического волокна (см. рис. 2.1.6). Измерение данного показателя производится на препаратах кожи, окрашенных по Вейгерту с увеличением до 200. Данная окраска позволяет выявить эластические волокна в тканях (см. рис. 2.1.4–2.1.6).

**Характеристика возрастных изменений кожи.** Гистологическая картина эпидермиса *в детском возрасте* характеризуется тонким, недостаточно развитым базальным слоем с повышенной митотической активностью клеток, слаборазличимыми зернистым и блестящим слоями, тонким (2–3 ряда клеток) роговым слоем. Коллагеновые волокна — в виде нежных волокнистых структур, расположенных достаточно рыхло в сетчатом слое дермы. Эластические волокна — в виде

густых сплетений, напоминающих клубки. Дермальные волокна имеют меньшую, чем у взрослых, толщину ( $D4=1,52\pm 0,09$ ;  $\sigma=0,39$ ;  $p < 0,05$ ). У детей и подростков практически все изученные морфометрические показатели меньше, чем у взрослых, что свидетельствует о процессе роста и развития. При иммуногистохимическом исследовании индекс пролиферации Ki-67 в кератиноцитах базального слоя эпидермиса в возрасте до 10 лет находится в пределах  $22,0\pm 4,2\%$  ( $18,3-24,7$ ) при  $p < 0,05$ . Количество базальных клеток, экспрессирующих маркер апоптоза:  $p53=0,2\pm 0,05\%$  ( $0,1-0,3$ ) при  $p < 0,05$ . В большом количестве эпителиоцитов базального слоя экспрессируется маркер  $bcl-2=15,3\pm 1,2\%$  ( $12,2-17,1$ ) при  $p < 0,05$  (рис. 2.1.7, а–в).

В юношеском возрасте суммарный балл признаков возрастной инволюции (D2) равнялся нулю. По нашим данным, именно к 20 годам гистоморфометрические показатели достигают уровня дефинитивных значений. Это и толщина эпидермиса ( $D1=59,95\pm 0,33$ ;  $\sigma=0,98$ ;  $p < 0,05$ ); и толщина сосочкового слоя дермы ( $D8=137,27\pm 2,43$ ;  $\sigma=7,29$ ;  $p < 0,05$ ). Базальная мембрана хорошо развита, о чем свидетельствуют значения интегрального индекса ( $D7=1,48\pm 0,03$ ;  $\sigma=0,08$ ;  $p < 0,05$ ).

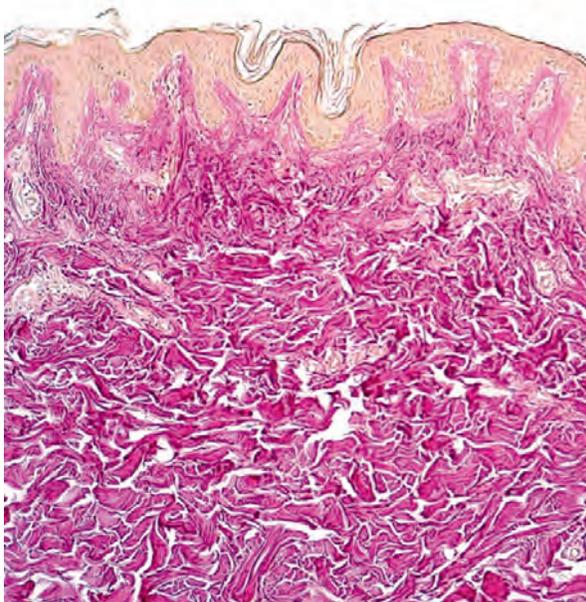


**Рис. 2.1.7.** Иммуногистохимические изменения кожи различных возрастных групп: а, б, в – 10 лет; г, д, е – 38 лет; ж, з, и – 75 лет. Иммуногистохимическое исследование с Ki-67, p53, bcl-2;  $\times 100-200$

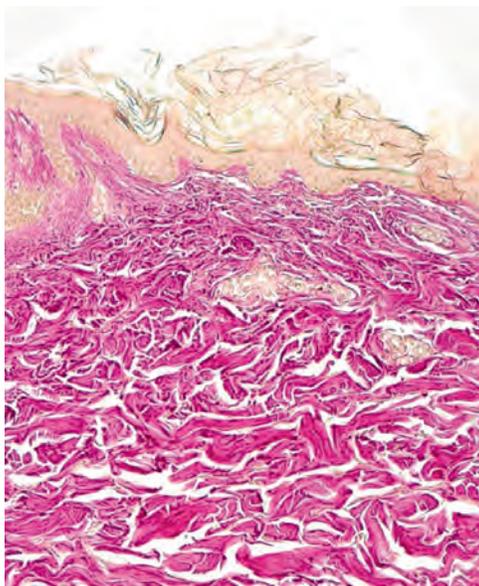
К 20 годам увеличивается количественное содержание эластических волокон, сами волокна утолщаются:  $D4=1,92\pm 0,08$ ;  $\sigma=0,36$ ;  $p < 0,05$ . Процентное содержание коллагеновых волокон при этом по сравнению с предыдущей возрастной группой практически не меняется.

*Возраст от 21 до 30 лет* можно расценить как период относительной стабилизации ввиду отсутствия признаков возрастных изменений, выраженных в количественном эквиваленте (рис. 2.1.8, 2.1.16, 2.1.18, 2.1.20, 2.1.22, 2.1.24, 2.1.26). В последующей декаде уже отмечены начальные признаки возрастных изменений.

*В возрасте от 31 до 40 лет* незначительно снижается (на 3,5%) по сравнению с возрастной группой от 21 до 30 лет количественное содержание коллагеновых волокон, уменьшается (на 5,6%) толщина эластических волокон. Уменьшение на 14% значений показателя, характеризующего дермо-эпидермальное соединение, не сопровождается визуальной различимой сглаженностью (рис. 2.1.10, 2.1.12, 2.1.14). Среднее значение количества баллов возрастных изменений  $D2=0,98\pm 0,20$ ;  $\sigma=1,27$ ;  $p < 0,05$ .

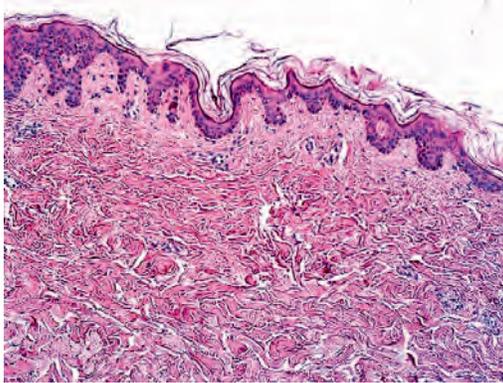


**Рис. 2.1.8.** Препарат кожи; мужчина, 25 лет. Окраска по Ван-Гизону,  $\times 100$

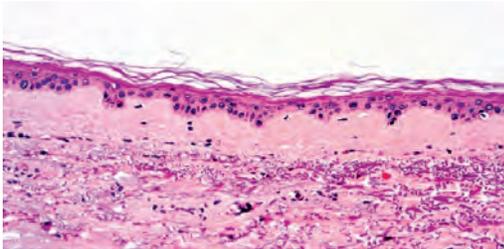


**Рис. 2.1.9.** Препарат кожи; мужчина, 45 лет. Окраска по Ван-Гизону,  $\times 100$

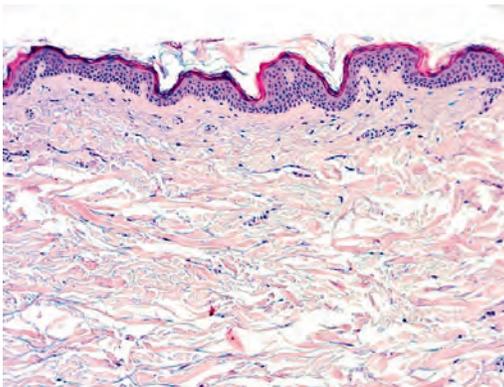
В гистологических препаратах кожи от трупов лиц *в возрасте 41–50 лет* возрастные изменения более выраженные: снижается (на 8%) толщина эпидермиса, главным образом за счет истончения шиповатого и зернистого слоев. Роговой слой, напротив, демонстрирует тенденцию к утолщению, разрыхлению. В базальном слое эпидермиса выявлялись единичные участки как гиперплазии, так и атрофии. Отмечается визуально различимая сглаженность дермо-эпидермального соединения.  $D7=1,12\pm 0,01$ ;  $\sigma=0,01$ ;  $p < 0,05$ . Снижение его по сравнению с декадой 21–30 лет составляет 22,3%. Толщина сосочкового слоя дермы уменьшается (на 3,5%),  $D8=135,10\pm 4,11$ ;  $\sigma=21,46$ ;  $p < 0,05$ . В верхних отделах дермы формируются первоначальные признаки изменений коллагеновых волокон в виде сглаженной фибриллярности. Нарушение периодической исчерченности исследователи связывают с недостатком зрелых молекул коллагена [36, 87]. Волокна располагаются более рыхло, появляются единичные участки гомогенизации, нарушается их пространственная ориентация за счет расположения вдоль поверхности (см. рис. 2.1.9). Снижается по сравнению с декадой 21–30 лет содержание коллагеновых волокон (на 2,8%), толщина эластических волокон увеличивается в 1,5 раза.



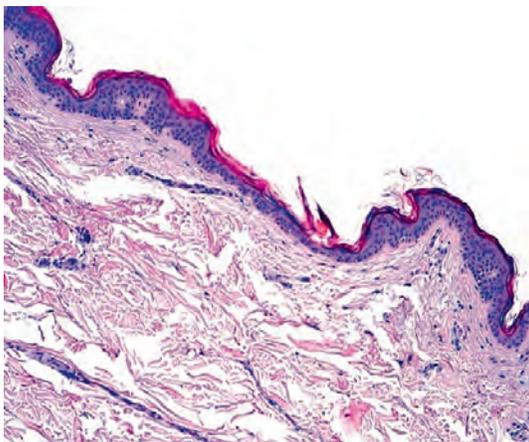
**Рис. 2.1.10.** Препарат кожи; мужчина, 33 года. Окраска гематоксилин-эозином,  $\times 100$



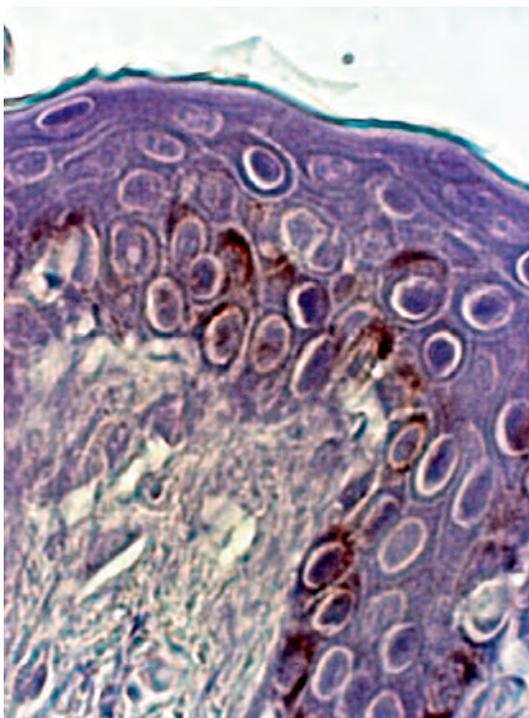
**Рис. 2.1.11.** Препарат кожи; мужчина, 78 лет. Окраска гематоксилин-эозином,  $\times 100$



**Рис. 2.1.12.** Препарат кожи; мужчина, 42 года. Окраска по Вейгерту,  $\times 100$



**Рис. 2.1.13.** Препарат кожи; мужчина, 68 лет. Окраска по Вейгерту,  $\times 100$



**Рис. 2.1.14.** Препарат кожи; мужчина, 32 года. Окраска по Вейгерту,  $\times 1000$

Различим дисбаланс коллаген-эластинового соотношения как предикт образования морщин. Следует отметить, что в целом возрастной интервал 41–50 лет имеет достаточно высокий темп возрастных изменений. Индекс пролиферации Ki-67=9,1±2,2% (7,3–11,6). Количество базальных клеток, экспрессирующих маркер апоптоза: p53=1,8±0,6% (1,0–2,3). Экспрессия маркера bcl-2 в эпителиоцитах=4,7±2,1% (2,5–7,5) (см. рис. 2.1.7, г–е).

Возрастная инволюция в последующее десятилетие (51–60 лет) продолжается, что подтверждается статистически достоверными различиями исследуемых показателей с более молодыми возрастными группами. Толщина эпидермиса по сравнению с группой 21–30 лет уменьшается на 20,7%, по сравнению с предыдущей — на 12%. Нарушается роговой слой, прогрессирует сглаженность контура дерма-эпидермального соединения, интегральный индекс (D7=1,10±0,02; σ=0,08; p <0,05). Снижение его по сравнению с возрастной группой 21–30 лет составляет 24,5%, по сравнению с предыдущим десятилетием — на 1,8%. В дерме формируются визуально различимые пустоты, прогрессирует редукция волокнистой сети. Уменьшается процентное содержание коллагеновых (на 10%) и эластических волокон, изменяется соотношение плотности их распределения. В первую очередь, с редукцией эластических волокон связывают процесс снижения эластичности возрастной кожи и формирование морщин. Фиксируются фрагментация коллагеновых волокон и гетерогенность их структуры, в препаратах появляются скрученные, комковатые волокна. По мере старения подобные явления распространяются на более глубокие слои дермы. Происходящие процессы, вероятнее всего, сопряжены с изменением гормонального уровня.

С возрастом эластические волокна характеризуются формированием участков «сенильного эластоза». Следует отличать его от солнечного актинического эластоза, представляющего собой деструкцию дермальных волокон с формированием базофильных гомогенных масс. Патогистологическим маркером фотостарения является скопление преимущественно в сосочковом слое дермы эластоидных масс на фоне дегенеративных изменений коллагена [214].

*В пожилом возрасте* возрастная инволюция продолжается, однако темп происходящих изменений в седьмой (61–70 лет) и восьмой (71–80 лет) декадах снижается. Эпидермис истончается и разрыхляется. Дермальные волокна с выраженной пространственной дезорганизацией имеют вид хаотичных, грубых (утолщенных) пучков с участками гомогенизации, встречаются участки «запустения» (без сое-

динительнотканых волокон). Граница между эпидермисом и дермой выравнивается, в восьмой декаде зачастую имеет вид прямой линии. Снижено количество фибробластов. Содержание коллагеновых волокон по сравнению с периодом относительной стабилизации уменьшается на 24%. Нарушается периодическая исчерченность волокнистых структур (см. рис. 2.1.13, 2.1.23). Происходящие процессы, вероятнее всего, связаны с нарушением процесса «созревания» коллагена, нарушением соотношения предшественников и зрелых субстанций [36, 87]. Эластические волокна огрубевают, волокна теряют контурность, разбухают, окрашиваются метахромо. Толщина эластических волокон у лиц в возрасте от 61 до 70 лет увеличивается по сравнению со значениями в возрасте от 21 до 30 лет более чем в 2 раза. Значение показателя, характеризующего выраженность завитка эластического волокна, также увеличивается в 2,23 раза. Визуально различимо не только утолщение волокон, но и увеличение объемной доли этих волокон в гистологическом препарате. При окраске по Вейгерту в сосочковом слое дермы выявляются фуксинофильноокрашенные эластические волокна (см. рис. 2.1.13, 2.1.17, 2.1.19, 2.1.21, 2.1.23).

*У лиц старше 75 лет* эпидермис достаточно тонкий, с перинуклеарной вакуолизацией клеток. Толщина эпидермиса ( $D_1$ )= $47,95 \pm 1,77$  (см. рис. 2.1.15). В базальном слое эпидермиса у лиц старше 70 лет индекс пролиферации Ki-67 составляет  $1,7 \pm 0,6\%$  (0,3–2,8) при  $p < 0,05$ . Количество базальных клеток, экспрессирующих маркер апоптоза:  $p53 = 6,2 \pm 1,9\%$  (5,5–7,8) при  $p < 0,05$ . В умеренном количестве эпителиоцитов базального слоя экспрессируется маркер bcl-2 —  $0,4 \pm 0,1\%$  (0,1–0,5) при  $p < 0,05$  (см. рис. 2.1.7, ж–и). Сосочковый слой дермы атрофирован, граница между эпидермисом и дермой нередко представляется в виде ровной линии. В дерме, особенно в ее сосочковом слое, уменьшено количество клеточных элементов. В старческом возрасте расширяются зоны разряжения, визуализируются очаги деколлагенизации (в них различимы тоненькие волоконца, глыбки, обрывки коллагена), увеличивается фуксинофилия волокон. Деструкция эластических волокон нарастает, они набухают, утолщаются, склеиваются с формированием «комков», частично фрагментируются, распадаются.

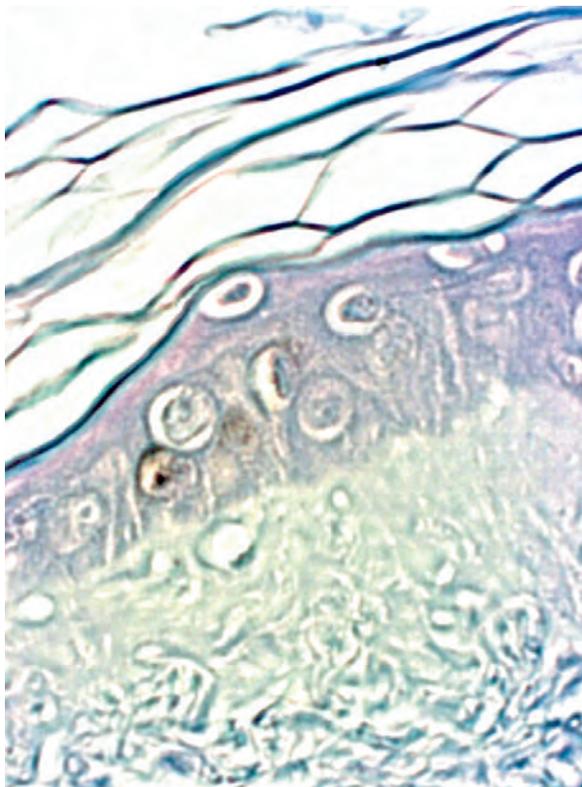
На рис. 2.1.8, 2.1.10, 2.1.12, 2.1.14, 2.1.18, 2.1.20, 2.1.22, 2.1.24, 2.1.26 — хорошо выраженное эпидермально-дермальное соединение, множественные сосочки, эпидермис с пролиферативной активностью. Дермальные волокна относительно упорядочены, с чередованием кол-

лагеновых и эластических волокон; равномерно расположены по всей поверхности, имеют вид «мазков» розового цвета.

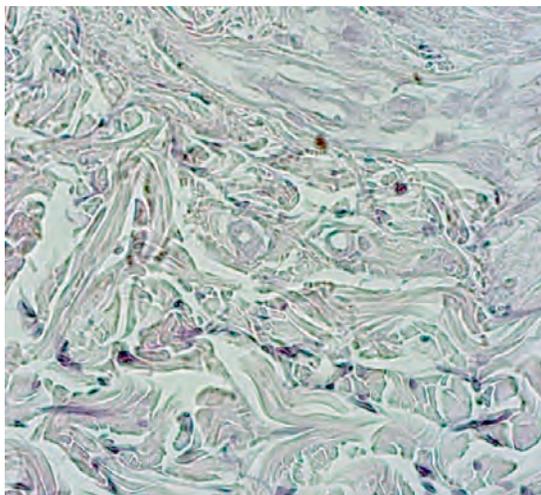
На рис. 2.1.9 — сглаженность эпидермально-дермального соединения, неравномерная толщина эпидермиса, выраженная кератинизация; огрубение коллагеновых волокон, количество эластических волокон снижено.

На рис. 2.1.11, 2.1.13 — сглаженность эпидермально-дермального соединения, разрыхление рогового слоя. На рис. 2.1.13 — неравномерное истончение эпидермиса, уменьшение количества его слоев, дезорганизация, фрагментация дермальных волокон.

На рис. 2.1.15 — истончение и уменьшение количества слоев эпидермиса.

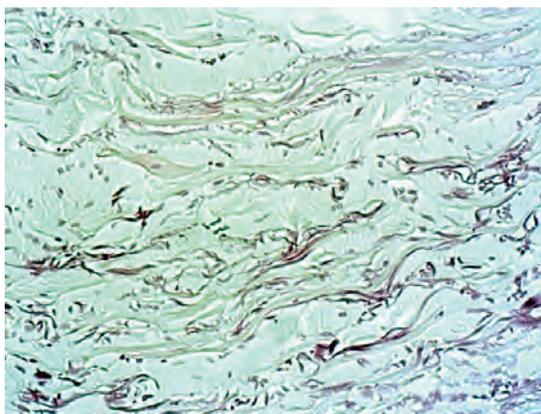


**Рис. 2.1.15.** Препарат кожи; мужчина, 72 года. Окраска по Вейгерту,  $\times 1000$



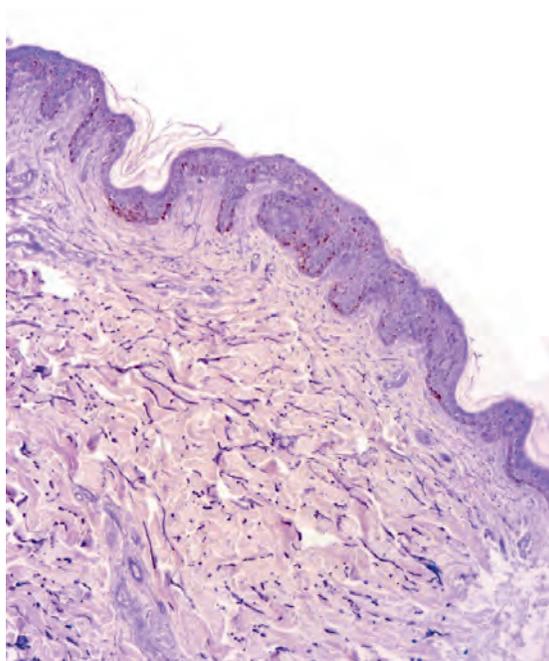
**Рис. 2.1.16.** Препарат кожи; мужчина, 25 лет. Окраска по Вейгерту,  $\times 400$

На рис. 2.1.17 — тонкие дезорганизованные волокна с фрагментацией; эластоз.

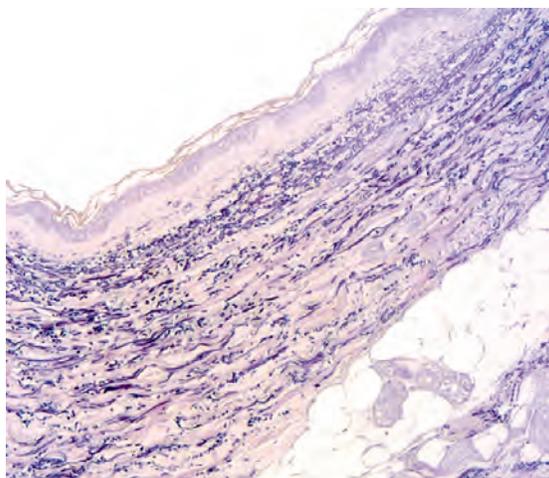


**Рис. 2.1.17.** Препарат кожи; мужчина, 68 лет. Окраска по Вейгерту,  $\times 400$

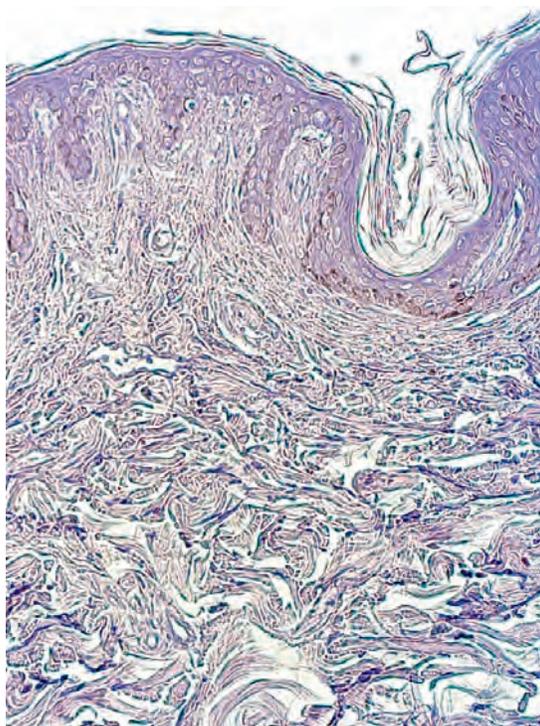
На рис. 2.1.19 — сглаженность эпидермально-дермального соединения, неравномерное истончение эпидермиса, уменьшено количество слоев, базальная мембрана не выражена; дезорганизация волокон, эластоз; уменьшение толщины сосочкового и сетчатого слоев дермы.



**Рис. 2.1.18.** Препарат кожи; мужчина, 22 года. Окраска по Вейгерту,  $\times 100$



**Рис. 2.1.19.** Препарат кожи; мужчина, 77 лет. Окраска по Вейгерту,  $\times 100$



**Рис. 2.1.20.** Препарат кожи; мужчина, 25 лет. Окраска по Вейгерту,  $\times 200$

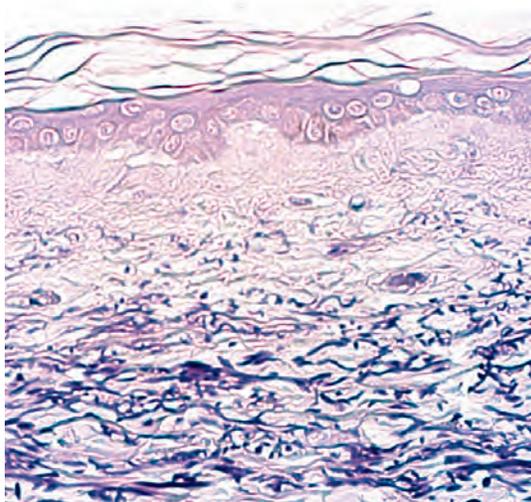
На рис. 2.1.21 — сглаженность эпидермально-дермального соединения (неравномерное истончение эпидермиса, избыточная кератинизация); дезорганизация волокон, эластоз.

На рис. 2.1.23 — сглаженность эпидермально-дермального соединения; дезорганизация волокон, эластоз.

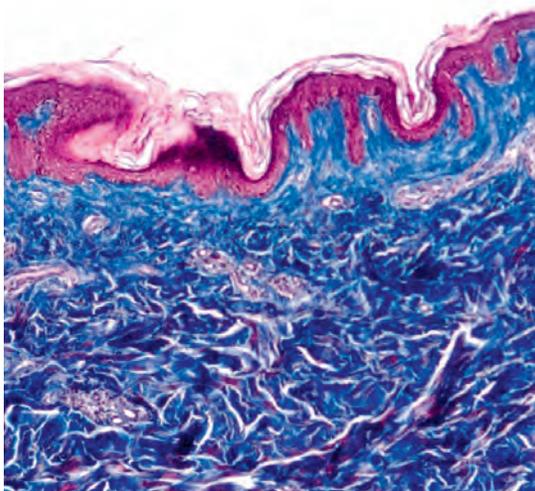
На рис. 2.1.25 — сглаженность эпидермально-дермального соединения, неравномерное истончение эпидермиса, избыточная кератинизация; коллагеновые волокна расположены рыхло, параллельно поверхности эпидермиса; эластоз; дезорганизация волокон, более выраженная в верхнем слое дермы. На рис. 2.1.27 — фрагментация волокон, очаги гомогенизации.

**Резюме.** Возрастная инволюция, сопровождающая хроностарение кожи, присуща всем компонентам как эпидермиса, так и дермы [124, 125].

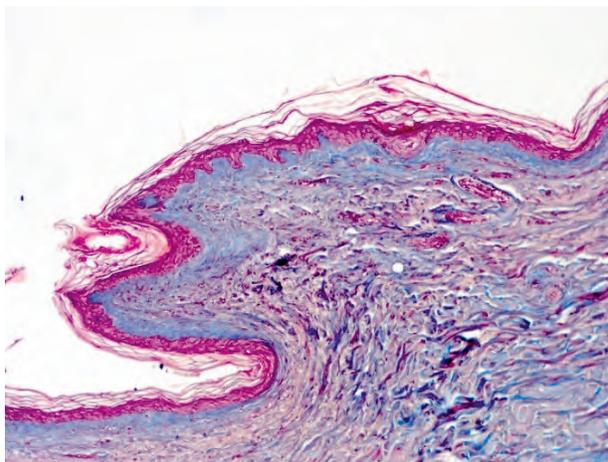
Полученные результаты [124] доказывают возможность использования иммуногистохимических маркеров Ki-67, bcl-2, p53 как количественных параметров комплексной оценки биологического возраста.



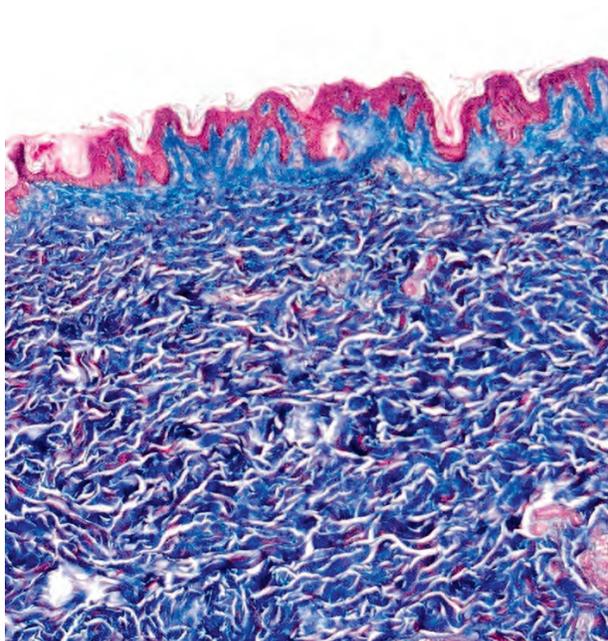
**Рис. 2.1.21.** Препарат кожи; мужчина, 77 лет. Окраска по Вейгерту,  $\times 200$



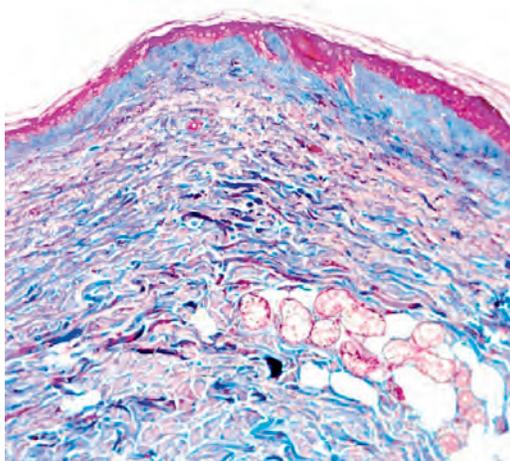
**Рис. 2.1.22.** Препарат кожи; мужчина, 25 лет. Окраска по Массону,  $\times 100$



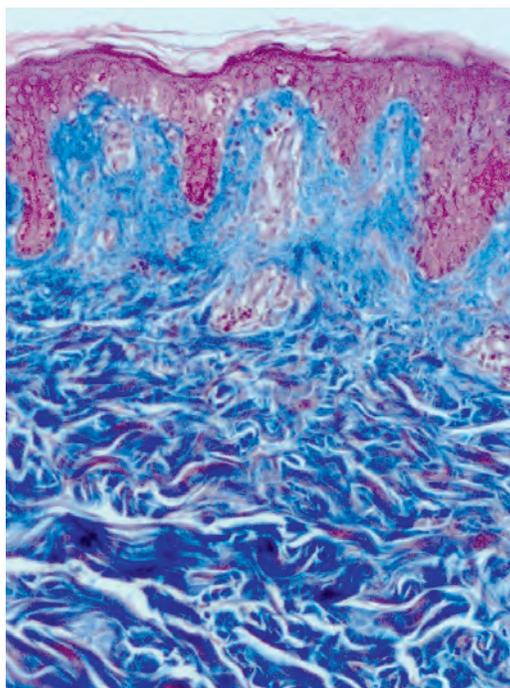
**Рис. 2.1.23.** Препарат кожи; мужчина, 77 лет. Окраска по Массону,  $\times 100$



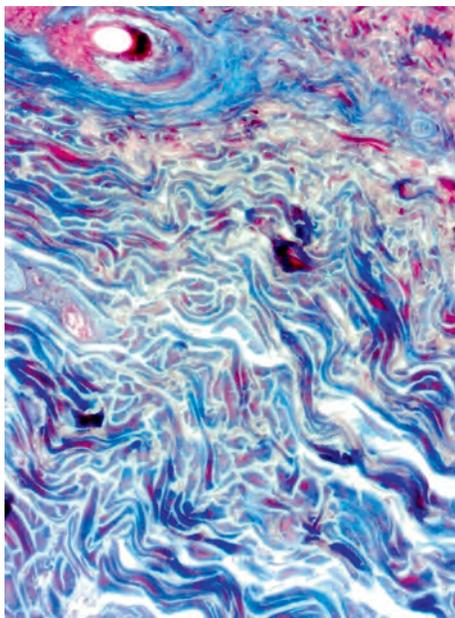
**Рис. 2.1.24.** Препарат кожи; мужчина, 25 лет. Окраска по Массону,  $\times 100$



**Рис. 2.1.25.** Препарат кожи; мужчина, 65 лет. Окраска по Массону,  $\times 100$



**Рис. 2.1.26.** Препарат кожи; мужчина, 28 лет. Окраска по Массону,  $\times 200$



**Рис. 2.1.27.** Препарат кожи; мужчина, 64 года. Окраска по Массону,  $\times 200$

Установлено, что с возрастом коллагеновый матрикс подвергается существенным инволютивным изменениям, характеризующимся определенной динамикой. Уменьшение процентного содержания коллагеновых волокон отмечено уже у лиц в группе от 31 до 40 лет. Процент снижения данного показателя в последующие декады составил 4,2% (41–50 лет), 3,2% (51–60 лет). Толщина эластического волокна увеличивалась на протяжении трех деkad (31–40; 41–50; 51–60 лет) с минимальным приростом в последующем. Схожая динамика зафиксирована и у показателя, характеризующего выраженность завитка эластического волокна: максимум прироста в период от 31 до 60 лет и минимум в последующие годы. Количественные изменения сопровождались и качественными преобразованиями: дезорганизацией, уплотнением волокон, их утолщением и скрученностью. Интегральный индекс, характеризующий дерма-эпидермальное соединение, продемонстрировал наличие достоверных различий между возрастными группами с десятилетним интервалом. Несомненным преимуществом данного параметра является его универсальность (для измерения не требуется уникального окрашивания), а также хорошая воспроизводимость показателя.