

На правах рукописи

**КАСАТКИН Денис Витальевич**

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ БИОАМИНОВОГО  
ОБЕСПЕЧЕНИЯ МАТКИ КРЫС В ПОСЛЕРОДОВОМ ПЕРИОДЕ**

Специальность 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Иваново – 2022

Работа выполнена на кафедре гистологии, эмбриологии, цитологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:** доктор медицинских наук, доцент  
**Диндяев Сергей Валерьевич**

**Официальные оппоненты:** **Павлов Алексей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ярославский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии

**Григорьева Юлия Владимировна**, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры гистологии и эмбриологии

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «15» декабря 2022 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.434.01 созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный университет им. Н.И. Ульянова» по адресу: г. Чебоксары, ул. Университетская, д. 38, учебный корпус № 3, зал заседаний Ученого совета, к. 301.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова по адресу: 428034, Чувашская республика, г. Чебоксары, ул. Университетская, д. 38 и на сайте [www.chuvsu.ru](http://www.chuvsu.ru).

Автореферат диссертации разослан «29» октября 2022 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.2.434.01,  
доктор биологических наук, доцент

Голубцова  
Наталья Николаевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы работы.** В области фундаментальной медицины среди современных исследований одно из ведущих мест занимают работы, посвященные изучению закономерностей процессов гистогенеза, регенерации, структурных основ жизнедеятельности органов и тканей (Одинцова И.А., Данилов Р.К., 2021). Гистогенетические процессы ремодулирования тканей матки в течение репродуктивного периода контролируются биологически активными веществами, в том числе биогенными аминами (Диндяев С.В., 2008; Циркин В.И. и др., 2014, 2016; Коноводова Е.Н. и др., 2015; Лычкова А.Э. и др., 2018; Тайтубаева Г.К., Грибачева И.А., 2019; Priyanka N.P., Nair R.S., 2020). Установлено, что симпатическая иннервация матки может изменяться в зависимости от физиологических колебаний уровня половых гормонов (Brauer A. Mónica, 2017). Дезорганизация иннервации матки оказывает резкое и негативное влияние на гистофизиологию органа, снижает вероятность беременности, а также увеличивает риск абортов и недоношенности (Kosmas I.P. et al., 2020).

Нарушения послеродовой инволюции могут стать причиной развития патологических состояний матки (Григорьева Ю.В., 2015, 2021; Alan E. e.a., 2015). Среди механизмов формирования послеродовых осложнений особое место занимает нарушение тканевого гомеостаза в матке. В регуляции местного гомеостаза ведущая роль принадлежит нервной и эндокринной системам, тучным клеткам (Петрянкин Ф.П. и др., 2015; Бирина В.В. и др., 2019), а также таким биоаминам, как серотонин, гистамин и катехоламины (Абрамченко В.В., Капленко О.В., 2000; Диндяев С.В., 2012; Лычкова А.Э., 2014; Akhmetova M.Zh. et al., 2019; Kosmas I.P. et al., 2020). Отмечено, что постоянство соотношения содержания биоаминов является одним из обязательных условий поддержания гомеостаза биологических структур (Виноградов С.Ю., Диндяев С.В., 2010).

Флуоресцентно-гистохимическое выявление биоаминов позволило обнаружить тесную взаимосвязь морфофункциональных изменений и насыщенностью моноаминами структур органов (Гордон Д.С. и др., 1982; Виноградов С.Ю., 1989; Гунин А.Г., 1989; Диндяев С. В., 2008; Сергеева В.Е., Гордон Д.С., 1992; Стручко Г. Ю., 1999; Голубцова Н. Н. и др., 2000; Дехканов Т.Д., Орипов Ф.С., 2021). Изменение уровня обмена биоаминов в микроокружении эффекторных структур ткани и органа может стимулировать переход одного уровня гомеостаза ткани и/или органа на другой (Виноградов С.Ю., 2004).

**Степень разработанности темы исследования.** Внедрение в экспериментальную практику флуоресцентно-гистохимических методов дифференцировки нейромедиаторных биоаминов позволило дать морфологическую оценку симпатического нервного аппарата матки во время полового цикла, беременности и в послеродовом периоде (Ракицкая В.В. и др., 1986; Шаляпина В.Г. и др., 1988; Абрамченко В.В., Капленко О.В., 2000). Установлена тесная связь симпатической иннервации матки с уровнем эстрогенов в организме (Zoubina E.V., Smith P.G., 2002; Latini C. et al., 2008).

Изучены изменения пространственных и гистохимических характеристик внутриматочных биоаминсодержащих структур в процессе полового цикла крыс

(Диндяев С.В., 2008). Информация об участии гистамина, серотонина, катехоламинов в регуляции гистогенетических процессов послеродовой инволюции матки очень немногочисленна. Имеющиеся литературные источники дают в основном описательную характеристику симпатического нервного аппарата и тучных клеток матки в послеродовом периоде. Отсутствуют работы о динамике содержания в них биогенных аминов в различные сроки после родов, не рассмотрено участие в обеспечении матки биогенными аминами таких околоорганных структур, как перитонеальная жидкость и брюшина. Нет данных о взаимосвязи внутри- и внематочных биоаминсодержащих структурных элементов в ходе послеродовой инволюции органа.

**Целью работы** является комплексное морфофункциональное исследование биоаминового снабжения матки крыс в течение послеродового периода.

**Основные задачи исследования.** Для достижения поставленной цели в работе решаются следующие основные задачи

1. Оценить в течение послеродового периода содержание и распределение гистамина, серотонина и катехоламинов в основных биоаминсодержащих структурах системы внутри- и внеорганного биоаминового снабжения матки крыс.

2. Оценить в ходе послеродовой инволюции интенсивность пролиферации и запрограммированной гибели клеток в структурах матки с применением маркеров клеточной пролиферации (Ki67) и апоптоза (anti-p53).

3. Определить корреляционную связь изменений оценочных параметров биоаминсодержащих элементов матки и перитонеальной жидкости в течение послеродового периода.

4. Провести анализ корреляционной связи изменений в ходе послеродового периода уровней гистамина, серотонина и катехоламинов в периферической крови и в маточных биоаминпозитивных структурных элементах.

5. Провести анализ динамики в течение послеродового периода плотности распределения флуоресцирующих нервных волокон матки и ее брюшины и содержания в них катехоламинов и серотонина.

**Методология и методы исследования.** Изучение структурной организации биоаминового снабжения матки крыс в течение послеродового периода проведено общегистологическими, специальными гистологическими, флуоресцентно-гистохимическими, цитоспектрофлуориметрическими, иммуногистохимическими и морфометрическими методами. Объектом исследования явились беспородные самки крыс репродуктивного возраста. С целью исключения сезонных влияний на обмен биогенных аминов исследование осуществлялось в осенне-зимний период.

Материалом исследования служили ткани тела и шейки матки, ее брюшина, перитонеальная жидкость, периферическая кровь, содержимое влагалища в различные сроки послеродового периода.

**Достоверность полученных результатов** обеспечивается достаточным количеством лабораторных животных (110 белых нелинейных крыс-самок), оптимальными условиями их содержания, адекватными флуоресцентными, общегистологическими и иммуногистохимическими методами исследования и корректными методами статистической оценки полученных данных.

**Соответствие паспорту специальности.** Работа соответствует специальности 1.5.22 Клеточная биология (медицинские науки), области исследований: 1. Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, строения и функции клеток и тканей. 2. Изучение закономерностей дифференцировки клеток и тканей, их физиологической регенерации и регуляции этих процессов, а также дифференцировки и жизнедеятельности недифференцированных клеток. 3. Системный анализ взаимоотношений клеток, тканей и функциональных систем организмов – представителей всех царств.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Процессы послеродовой инволюции матки крыс сопровождаются изменениями содержания катехоламинов, серотонина и гистамина в биоаминпозитивных структурах органа, маточной части брюшины, перитонеальной жидкости и периферической крови с закономерными корреляциями количественных отношений исследуемых биоаминов, свидетельствующими о сбалансированности процессов обмена веществ в каждый конкретный срок послеродового периода.

2. Восстановление биоаминового статуса матки крыс, включающего такие параметры, как плотность распределения биоаминпозитивных структур, содержание в них катехоламинов, серотонина и гистамина, уровень корреляционных связей биоаминов, и соответствующего физиологическим условиям полового цикла, происходит к 10-м суткам послеродового периода.

**Научная новизна работы:**

1. Впервые, используя флуоресцентно- и иммуногистохимические методы, осуществлено системное морфофункциональное исследование участия в гистогенетических процессах послеродовой инволюции матки крыс наиболее распространенных биогенных аминов – гистамина, серотонина и катехоламинов. Определено, что их содержание в исследуемых структурах в течение послеродового периода изменяется волнообразно, часто разнонаправленно, с сохранением или восстановлением высокой взаимосвязи между уровнями моноаминов.

2. Уточнена пространственная организация внутриорганный симпатического аппарата матки в ходе послеродового периода. Установлено, что одиночные симпатические нервные волокна выявляются в мышечной оболочке с 3-х суток послеродового периода, а нервные волокна, формирующие периваскулярные сплетения, – с 4-х суток. Впервые определено с помощью цитоспектрофлуориметрии содержание в нервных волокнах катехоламинов и серотонина по суткам до 15-го дня после родов.

3. Определено в различные сроки послеродового периода содержание катехоламинов, гистамина и серотонина во внутриматочных биоаминсодержащих элементах – эпителиоциты слизистой оболочки, гладкие миоциты мышечной оболочки, тучные клетки слизистой и мышечной оболочек, содержимое просвета матки крыс. Установлено, что наибольшие значения содержания биоаминов в указанных структурах приходятся на первые сутки после родов.

4. Впервые детально описана динамика количества тучных клеток в оболочках матки в ходе послеродовой инволюции. Установлено, что наименьшая

плотность тучных клеток наблюдается сразу после родов, в последующие сутки она увеличивается. Выявлено, что с 4-5 суток методом Дезага выявляется большее количество тучных клеток по сравнению с флуоресцентно-гистохимическими методами.

5. Впервые установлена региональность внутриматочного биоаминового обеспечения процессов послеродовой инволюции, которая проявляется в более высоких показателях большинства оценочных параметров в теле матки по сравнению с шейкой.

6. Установлено, что к 10-м суткам после родов происходит восстановление биоаминового статуса матки крыс, которое соответствует гистофизиологическим условиям эстрального цикла.

7. Выявлено, что в тканях послеродовой матки экспрессия маркера p53 наиболее выражена в начале послеродового периода (1-5-е сутки), что свидетельствует о преобладании процессов апоптоза, а с 6-х по 15-е сутки установлен рост количества клеток с экспрессией Ki-67.

8. Впервые дана морфофункциональная флуоресцентно-гистохимическая оценка биоаминопозитивных элементов крови, перитонеальной жидкости, маточной части брюшины крыс в послеродовой период. Установлено, что уровень исследуемых биогенных аминов зависит от срока послеродовой инволюции матки, наиболее высокие их показатели характерны для первых послеродовых суток. Отмечено увеличение в течение послеродового периода силы линейной корреляционной связи содержания серотонина и катехоламинов (от средней до сильной) во внутриматочных биоаминсодержащих структурных элементах.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Полученные результаты исследования о динамике плотности биоаминсодержащих структур, количества в них биоаминов, корреляционных связях оценочных параметров, региональности внутриорганного биоаминового обмена расширяют сведения об организации симпатического нервного аппарата участия гистамина, серотонина и катехоламинов в гистогенетических процессах ремодулирования тканей в послеродовой период.

2. Полученные результаты о сохранении или быстром восстановлении высокой тесноты связи уровней серотонина и катехоламинов в биоаминсодержащих структурах матки, о высокой взаимосвязи параметров, оценивающих биоаминовый статус внутри- и внутриматочных (перитонеальная жидкость, брыжейка матки, периферическая кровь) структур, дополняют теорию гомеостаза, расширяют представления о роли биоаминов в морфофункциональных процессах послеродовой инволюции матки.

3. Работа имеет экспериментальный характер, результаты об организации внутри- и внеорганного биоаминового снабжения матки в послеродовой период имеют фундаментальное значение и могут представлять интерес для специалистов в области гистологии, эмбриологии, акушерства, гинекологии.

4. Данные настоящего исследования могут найти применение в образовательном процессе при чтении лекций, проведении практических и семинарских занятий на кафедрах морфологического профиля, акушерства и

гинекологии медицинских вузов, а также при написании монографий и учебных пособий по проблемам репродуктивной медицины.

**Реализация и внедрение результатов работы.** Научные разработки и положения диссертационного исследования используются в учебном процессе на кафедре гистологии, эмбриологии, цитологии ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России при проведении практических занятий и чтении лекций студентам 2 курса лечебного и педиатрического факультетов при изучении темы «Женская половая система». Результаты исследования отражены в статьях и тезисах печатных изданий.

#### **Апробация результатов исследований.**

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены на 92-й ежегодной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «НЕДЕЛЯ НАУКИ - 2012» (Иваново, 17-20 апреля 2012 г.), межрегиональной научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием "Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека" (Иваново, 7–11.04 2014 г.), межрегиональной научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 13.04 2016 г.); III Всероссийской образовательно-научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием (Иваново, 10-14.04 2017 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Морфология в теории и практике» (Чебоксары, 22.11 2017 г.); Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 5-6.04 2018 г.); IV Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 9-12.04 2018 г.), Всероссийской научной конференции «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» (Санкт-Петербург, 13-14.05 2021 г.), VIII Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 12.04 2022 г.).

**Личный вклад автора.** Выбор экспериментальных животных, сроков послеродового периода, выведение животных из экспериментов проведены самим диссертантом. Лично диссертантом осуществлялось приготовление криостатных срезов, постановка люминесцентно-гистохимических реакций по методам Кросса, Эвена, Роста, Фалька-Хилларпа, Бьёрклунда, описание люминесцентной морфологии изучаемых структур, проведена цитоспектрофлуориметрия с последующей статистической обработкой полученных данных. Микроскопия препаратов, фотографирование, морфометрия также проводились автором лично. Написание глав диссертационного исследования, подготовка материалов диссертации к публикации осуществлялись автором самостоятельно.

**Публикации.** Основные положения диссертации отражены в 15 научных публикациях, 1 из которых опубликована в издании, рекомендованном ВАК Минобрнауки России, 4 - в изданиях, входящих в международные реферативные

базы данных и системы цитирования, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, утвержденные приказом Минобрнауки России.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы из 307 наименований, 2 приложений, включает в себя 174 страницы машинного текста, 78 рисунков, 40 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описаны актуальность работы, степень разработанности проблемы, цель, задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая ценность, методология и методы исследования, научные положения, выносимые на защиту, степень достоверности, апробация и внедрение результатов исследования.

В **первой главе** проведен обзор литературных источников, касающихся участия гистамина, серотонина и катехоламинов в регуляции гистофизиологии матки крыс в послеродовом периоде; рассматриваются внутри- и околоматочные структуры, участвующие в обмене биогенных аминов.

**Вторая глава** посвящена материалу и методам исследования.

Работа выполнена в осенне-зимний период на 110 беспородных самках крыс репродуктивного возраста стандартной массы, равномерно распределенных по срокам послеродового периода (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 сутки) и стадиям раннего и позднего диэструса полового цикла. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России (заключение от 09.12.2015 г., протокол № 6). Животные содержались в виварии экспериментально-биологической клиники ИГМА в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Вмешательства на животных осуществляли на основе «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза от 13.11.1984 г № 724) и Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Из опыта животных выводили путем дислокации шейных позвонков.

Материал исследования – 1) криостатные и парафиновые срезы тела и шейки матки, 2) мазок перитонеальной жидкости, 3) мазок периферической крови, полученной после отсечения части хвоста, 4) пленочный препарат брюшины матки.

Гистологические методы: окраска криостатных и парафиновых срезов тела и шейки матки, пленочных препаратов брюшины матки гематоксилин-эозином, мазков содержимого влагиалища 1%-ным раствором метиленового синего.

Специальные гистологические методы: окраска парафиновых срезов матки, пленочных препаратов ее брюшины, мазков перитонеальной жидкости альциановым синим-сафранином в прописи Деага для дифференцированного выявления гликозаминогликанов в тучных клетках (Desaga J. et al., 1971).

Флуоресцентно – гистохимические и цитоспектрофлуориметрические методы:

1. Параформальдегидный метод Фалька-Хилларпа в модификации Е.М.Крохиной и П.Н.Александрова (1969) для выявления биоаминсодержащих элементов в нефиксированных криостатных срезах, пленочных препаратах брюшины, мазках крови и перитонеальной жидкости.

2. Флуоресцентно-гистохимический метод А. Бьерклунда в модификации В.Н. Швалева и Н.И. Жучковой (1987) с использованием глиоксиловой кислоты (фирма «ICN Biomedicals Inc») для выявления биоаминов в нервных волокнах в нефиксированных криостатных срезах тела и шейки матки, пленочных препаратах брюшины.

3. Флуоресцентно-гистохимический метод Кросса-Эвана-Роста (Cross S.W.D. et al., 1971) с использованием ортофталевого альдегида (фирма «MERCK-Schuchardt») для дифференцировки гистамина в нефиксированных криостатных срезах тела и шейки матки, пленочных препаратах брюшины, мазках крови, перитонеальной жидкости.

4. Цитоспектрофлуориметрический метод (Карнаухов В.Н., 1978; Калмыков В.Л., 1982) – для количественного определения уровней серотонина, катехоламинов и гистамина в клеточных элементах и тканевых элементах. Уровень биоаминов (в усл.ед.) измеряли с помощью цитоспектрофлуориметрической насадки ФМЭЛ-1А на люминесцентном микроскопе ЛЮАМ-ИЗ. Выходное напряжение при всех измерениях составляло 600 В. Для стандартизации микроспектрофлуориметрии применялась система проверочных тестов, включающая калибровку аппаратуры и гистохимический контроль.

В процессе флуоресцентно-гистохимического исследования с препаратов с помощью окулярной квадратно-узловой стандартной сетки (шаг сетки 1 мкм при об. 90 мм., окуляр 7) на основе предложенного С.Ю. Виноградовым способа (1989) точечного счета и линейного интегрирования, собиралась первичная информация о плотности пространственного распределения флуоресцирующих нервных волокон и тучных клеток (ТКФ). При световом микроскопировании аналогичным способом проводилась оценка плотности пространственного распределения тканевых базофилов после окрашивания срезов по Дезага (ТКД).

Иммуногистохимическое исследование проводили с помощью набора для детекции ultraView Universal DAB Detection Kit производства Ventana Medical Systems (Ventana) с использованием мышинных моноклональных антител к белку:

1) МКАТ к белку Ki-67, направленными на С-концевую часть антигена Ki-67 – маркера пролиферации клеточных популяций,

2) МКАТ к гену, стимулирующему апоптоз – anti-p53 (BP53-11).

При проведении исследования использовали одношаговую систему визуализации BioGenex (QD 630-ХАК) Super Sensitive one-step Polymer – HRP Kit/DAB. Коричневая окраска цитоплазмы свидетельствовала о положительной реакции на белок anti-p53, а коричневое окрашивание ядра – об экспрессии белка Ki-67. Подсчет положительно окрашенных клеток осуществляли в десяти полях зрения (увеличение x400), результат оценивали в процентах.

Статистический анализ осуществлялся с помощью электронных таблиц программы Microsoft Excel (Карабутов Н.Н., 2005). Для оценки достоверности различий полученных статистических данных использовали параметрический критерий Стьюдента и непараметрический критерий Вилкоксона (Зайцев Г.Н., 1984; Автандилов Г.Г., 1990). Для оценки сопряженности количества серотонина и катехоламинов в исследуемых структурах, а также выявления линейной связи между полученными количественными показателями применялся параметрический корреляционный анализ Пирсона. С целью выявления взаимосвязи изменений в процессе послеродовой инволюции матки исследуемых оценочных параметров использовался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Результаты считались статистически достоверными при  $p \leq 0,05$ .

В третьей главе приводятся результаты собственных исследований.

В криостатных срезах тела и шейки матки выявлены следующие альдегидпозитивные структуры: нервные волокна, тучные клетки (ТК), гладкие миоциты миометрия, эпителиоциты эндометрия, содержимое полости матки.

Большинство нервных волокон матки крыс в послеродовом периоде входит в состав периваскулярных сплетений (ПВС), флуоресцирующих изумрудно-зеленым цветом (рисунок 1). От ПВС отходят отдельные терминали. В составе нервных волокон прослеживаются яркосветящиеся расширения («варикозы») и более тонкие, с меньшей степенью флуоресценции, межварикозные участки («межварикозы»).

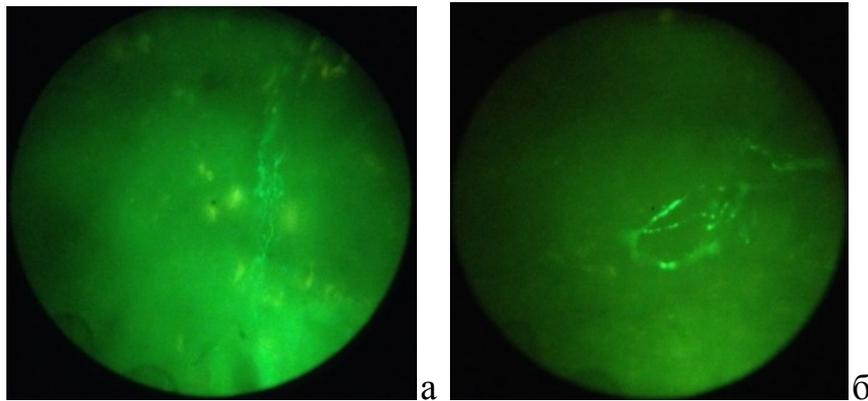


Рисунок 1 – Нервные волокна в составе ПВС миометрия тела матки. Метод Бьерклунда в модификации. Микроскоп ЛЮМАМ И3, об. 90 имм., а – 5-е сутки, б – 8-е сутки после родов. ЦФК «Cannon».

Выявляемость нервных волокон в миометрии отмечается с 3-х суток после родов. Вначале регистрируются единичные нервные волокна. В эндометрии и тела, и шейки органа незначительная флуоресценция нервных волокон отмечена только на 10-е сутки после родов.

Плотность одиночных нервных волокон минимальна на 3-и сутки после родов (рисунок 2).

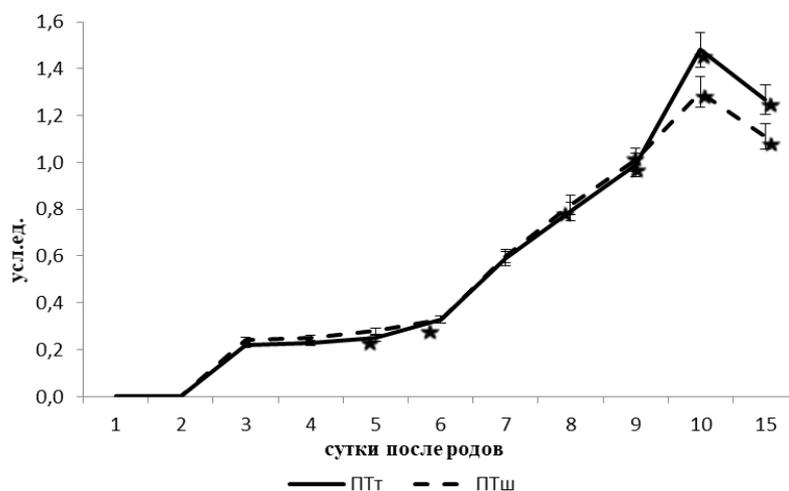
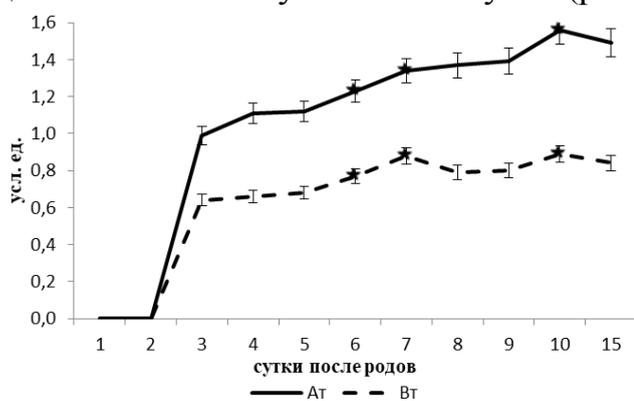


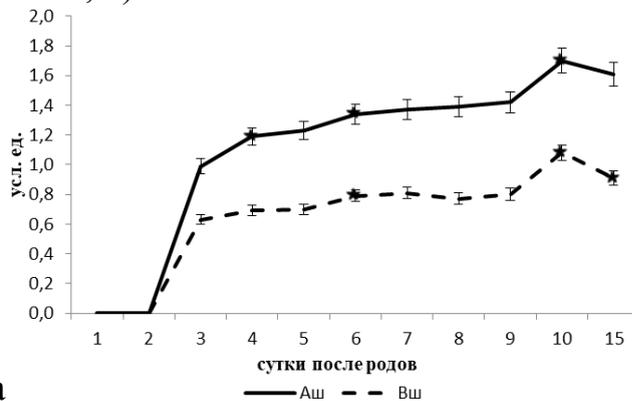
Рисунок 2 – Динамика в послеродовом периоде пространственной плотности одиночных симпатических нервных волокон мышечной оболочки тела (ПТт) и шейки (ПТш) матки крысы.

Постепенно увеличиваясь, она достигает максимальных значений на 10-е сутки. Различия в плотности терминалей в теле и шейке органа выявляются только на 10-е и 15-е сутки с преобладанием сравниваемых параметров в теле. Основная часть флуоресцирующих нервных волокон миометрия представлена периваскулярными сплетениями (ПВС), флуоресценция которых наблюдается с 4-х суток. Динамика показателей, оценивающих их плотность аналогична изменениям плотности терминалей.

Микроспектрофлуориметрически в нервных волокнах идентифицированы катехоламины и серотонин, содержание которых меняется в течение послеродового периода. Среднее содержание нейромедиаторов в структурных элементах нервных волокон минимально в 3-5-е сутки, постепенно возрастая, оно достигает максимума на 10-е сутки (рисунок 3, 4).



а



б

Рисунок 3 – Изменения в послеродовом периоде уровня катехоламинов в одиночных нервных волокнах мышечной оболочки тела (а) и шейки (б) матки крысы.

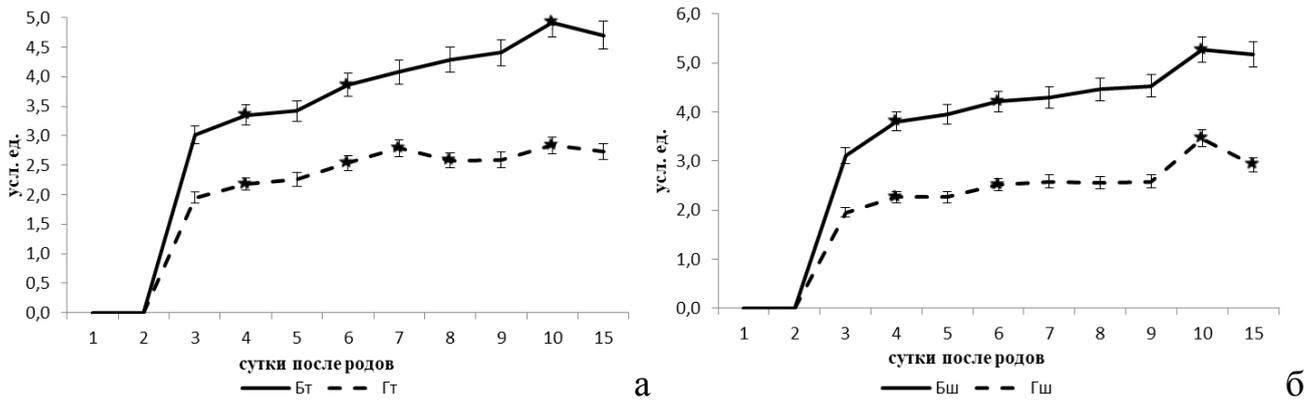


Рисунок 4 – Изменения в послеродовом периоде уровня серотонина в одиночных нервных волокнах мышечной оболочки тела (а) и шейки (б) матки крыс.

В большинстве исследуемых сроков количественные отношения между уровнем серотонина и катехоламинов в каждой отдельной точке зондирования нервных волокон характеризуются высокой степенью линейной корреляции ( $r=0,80-0,98$ ).

В результате проведенного исследования в эндометрии и миометрии матки выявлены тучные клетки (рисунок 5), в которых микроспектрофлуориметрически дифференцированы гистамин, серотонин и катехоламины. Указанные биогенные амины обнаружены также в эпителиоцитах эндометрия, содержимом полости матки и гладких миоцитах миометрия. Катехоламины в эпителиоцитах слизистой оболочки выявляются только в 1-е сутки после родов, а серотонин в гладких миоцитах миометрия в 1-е, 10-е и 15-е сутки.

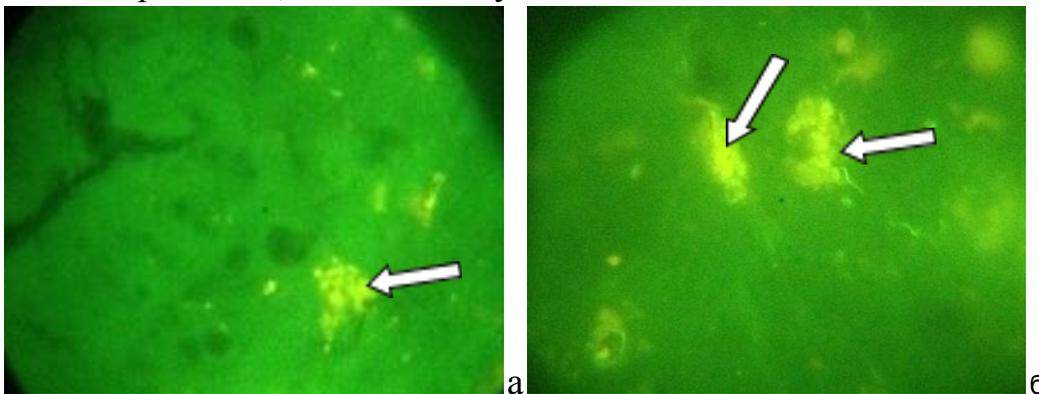


Рисунок 5 – Тучные клетки (отмечены стрелкой) и эпителиоциты эндометрия тела матки крыс. Метод Фалька-Хилларпа в модификации, микроскоп ЛЮМАМ-ИЗ, об. 90 имм.; а - 5-е сутки после родов, б - 10-е сутки после родов. ЦФК «Cannon».

Первые сутки после родов характеризуются максимальными значениями большинства исследуемых параметров – содержание гистамина, серотонина и катехоламинов в тучных клетках эндометрия и миометрия, уровень биоаминов в эпителиоцитах эндометрия, количество гистамина в содержимом матки. Плотность пространственного распределения тучных клеток имеет наименьшие значения сразу после родов. К 6-м суткам этот показатель в эндометрии увеличивается примерно в два раза, а в миометрии - в 4 раза ( $p<0,05$ ).

Плотность пространственного распределения тучных клеток, выявляемых при окрашивании срезов альциановым синим-сафранином (по Дезага), начиная с 4-5-х суток, достоверно выше, чем плотность флуоресцирующих тканевых базофилов. Отрицательная высокая взаимосвязь характеризует изменения

содержания моноаминов в тучных клетках и плотности их пространственного распределения.

Установлено увеличение силы корреляционной связи между количеством серотонина и катехоламинов в тучных клетках от средней (в 1-е сутки после родов) до сильной (к 7-м суткам в теле матки, к 3-м в шейке).

Ранговый корреляционный анализ выявляет высокую взаимосвязь изменений содержания серотонина и гистамина в эпителиальных клетках и тканевых базофилах эндометрия, как в теле, так и в шейке матки.

В нервных волокнах значительна степень корреляционной связи между колебаниями уровней одноименных медиаторов в варикозах и межварикозах. Высокой степенью синхронности характеризуются изменения средней концентрации биоаминов в одноименных структурных элементах нервных волокон в составе периваскулярных сплетений и терминалей.

Анализ гистохимической организации нервного аппарата и тучных клеток миометрия в процессе послеродовой инволюции матки выявляет высокую отрицательную взаимосвязь изменений содержания в них серотонина и катехоламинов. Установлена высокая положительная связь изменений плотности нервных волокон и тучных клеток ( $R=0,961-0,998$ ).

Большинство показателей, оценивающих уровень обмена биогенных аминов в матке (насыщенность клеточных и нервных элементов биоаминами, плотность распределения биоаминопозитивных структур), на 10-е и 15-е сутки послеродового периода по своим значениям сопоставимы с данными, характерными, соответственно, для стадий позднего диэструса и раннего диэструса.

В результате исследования выявлен ряд достоверных различий в уровне биоаминового статуса тела и шейки матки. в частности:

- бóльшая насыщенность биоаминами тучных клеток шейки;
- среднее количество, как флуоресцирующих ТК, так и клеток, окрашенных по Дезага, выше в теле матки по сравнению с шейкой;
- для показателей, оценивающих биоаминовый статус ТК в теле матки, характерны более выраженные изменения в сравнении с аналогичными в шейке;
- нервные волокна, входящие в состав ПВС мышечной оболочки тела, характеризуются большей насыщенностью нейромедиаторами по сравнению с аналогичными волокнами в шейке, а в одиночных нервных волокнах, наоборот, более высокое содержание медиаторов отмечается в шейке органа.

По данным иммуногистохимического исследования в слизистой оболочке количество клеток, позитивных к p53, изменяется незначительно. В строме в первые сутки пуэрперия они составляют от 1 до 2%, к 5-6-м суткам их число увеличивается до 10%. В последующем оно снижается сначала до 5 % (7-8-е сутки), а в последующем становится меньше 1% на 9-10-е сутки после родов. В мышечной оболочке (рисунок 6) к 5-м суткам послеродового периода значительно снижается частота клеток с положительной экспрессией гена p53 апоптоза – до  $35,2\pm 0,38\%$  (с  $70,12\pm 0,85\%$  в предшествующие сутки).

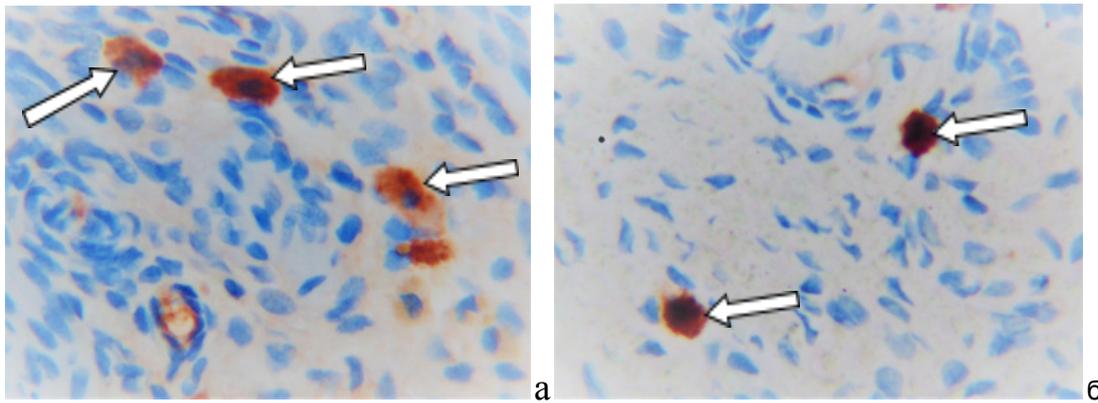


Рисунок 6 – Мышечная оболочка тела матки крыс; положительная иммуногистохимическая реакция к anti-p53: а – 6-е сутки после родов, б – 15-е сутки после родов. Объектив 40, камера Levenhuk M500 Base.

В слизистой оболочке позитивную реакцию к Ki-67 дают клетки эпителия и стромы. В строме до 4-х суток пуэрперия включительно количество таких клеток незначительно – 1-2%. Начиная с 6-х суток, оно достоверно увеличивается и достигает максимальных значений к 8-м суткам. В эпителиоцитах вплоть до 3-х суток пуэрперия экспрессия гена Ki-67 отсутствует. С 4-х суток она становится положительной, но выражена очень слабо ( $1,20 \pm 0,45$  %). На 6-7-е сутки количество пролиферирующих эпителиоцитов увеличивается до 5-6% и достигает максимальных значений на 8-е сутки послеродовой инволюции.

В мышечной оболочке послеродовой матки вплоть до 5-х суток пуэрперия экспрессия гена Ki-67 выявляется только в клетках кровеносных сосудов. С 6-х суток выявляются пролиферирующие клетки вне сосудов, но их количество незначительно – 1-2%.

Во внematочных биоаминпозитивных элементах крыс (тучные клетки и жидкостная фаза перитонеальной жидкости, периферическая кровь, тучные клетки и периваскулярные нервные сплетения брюшины матки) в различные сроки послеродовой инволюции микроспектрофлуориметрически определено содержание серотонина и катехоламинов, а в клеточных элементах – катехоламинов, серотонина и гистамина (рисунок 7). Содержание биоаминов динамично и зависит от срока после родов.

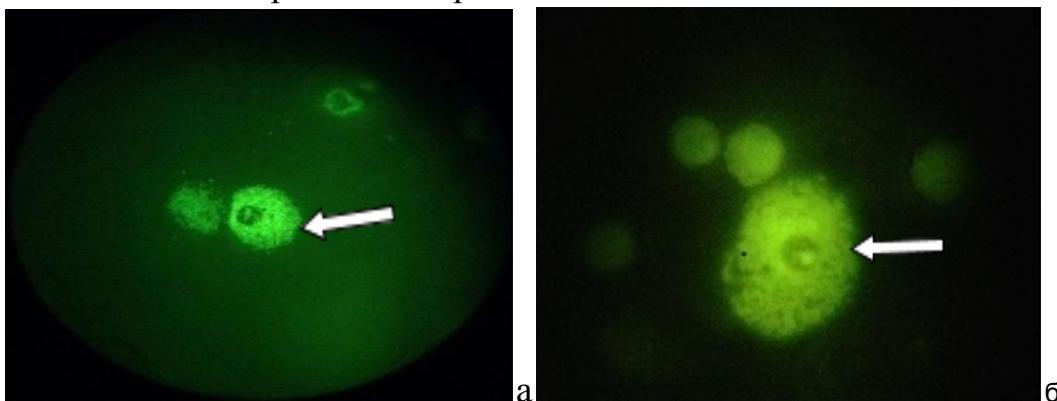


Рисунок 7 – Тучные клетки перитонеальной жидкости крыс: а 5-е сутки, метод Фалька-Хилларпа в модификации, б - 7-е сутки после родов, метод Кросса-Эвана-Роста; микроскоп ЛЮМАМ-ИЗ, об. 90 мм.

Содержание серотонина и катехоламинов в перитонеальных ТК и жидкостной фазе минимально сразу после родов, в ТК брюшины – на 4-е сутки.

Постепенно увеличиваясь, уровни моноаминов достигают наибольших значений к 10-м суткам. Наибольшее содержание гистамина в указанных структурах отмечается в 1-е сутки после родов, минимальное – на 10-е (в брюшине) и 15-е сутки (в перитонеальной жидкости).

Плотность пространственного распределения флуоресцирующих перитонеальных и мезентериальных тучных клеток максимальна в 1-е сутки после родов. Достоверно снижаясь, она достигает минимальных значений к 15-м суткам.

В нервных волокнах брюшины матки максимальное содержание катехоламинов и серотонина установлено сразу после родов, наиболее низкий уровень этих нейромедиаторов приходится на 7-8 и 15-е сутки. Аналогично изменяется и показатель удельной плотности периваскулярных сплетений брюшины. В мазках периферической крови наибольшее содержание исследуемых моноаминов наблюдается в первые сутки пуэрперия, минимальный уровень серотонина и катехоламинов характерен для 6-х суток, а гистамина – на 9-е сутки.

По данным параметрической линейной корреляции в течение послеродового периода происходит увеличение силы связи между содержанием серотонина и катехоламинов в биоаминпозитивных элементах от средней до сильной. Исключение составляют нервные волокна брюшины матки, в которых на протяжении всего исследуемого периода наблюдается высокий коэффициент линейной корреляции. С помощью рангового корреляционного анализа установлен ряд взаимосвязей изменений в течение послеродового периода оценочных параметров внematочных биоаминпозитивных структур. Более тесные корреляционные связи обнаруживаются между изменениями биоаминового статуса ТК перитонеальной жидкости и брюшины ( $R=0,800-0,982$ ). Особенно высокая связь выявлена между колебаниями плотности пространственного распределения ТК. Изменения насыщенности ТК и нервных волокон брюшины серотином и катехоламинами характеризуются достоверной отрицательной связью ( $R=-0,754$ ). Такая же корреляция установлена и между колебаниями содержания исследуемых моноаминов в жидкостной фазе перитонеальной жидкости и в нервных волокнах. Близкая по значениям, но положительная зависимость выявлена между изменениями уровня серотонина в структурных элементах нервных волокон и мазках крови ( $R=0,723$ ).

В результате статистического анализа установлена взаимосвязь изменений оценочных параметров внутри- и внеорганных биоаминсодержащих элементов матки в ходе ее послеродовой инволюции. Выявлена отрицательная высокая взаимосвязь изменений показателей плотности тучных клеток ПЖ и эндометрия ( $R= -0,868-0,984$ ), а также высокая положительная хроносопряженность колебаний уровня гистамина в жидкостной фазе перитонеальной жидкости и содержанием гистамина в эпителиоцитах ( $R=0,982$  в теле,  $0,800$  в шейке), содержанием гистамина в эпителиоцитах ( $R=0,818$  в теле,  $0,800$  в шейке). Взаимоотношения изменения уровней биоаминов в перитонеальных ТК и ТК оболочек матки характеризуются высокими коэффициентами корреляции: отрицательными для серотонина и катехоламинов ( $R=-0,555-0,873$ ), положительными для гистамина ( $R=0,855-0,90$ ). Установлена отрицательная достоверная корреляционная связь между

изменениями количества катехоламинов и серотонина в структурных элементах нервных волокон мышечной оболочки матки и брюшины ( $R=-0,800-0,847$ ).

Отметим также отрицательную связь изменений плотности пространственного распределения ТК брюшины и матки ( $R=-0,884-0,977$ ); положительную сопряженность динамики уровня гистамина в ТК брюшины и матки ( $R=0,782-0,873$ ); положительную связь изменений уровня гистамина в ТК брюшины и в эпителиоцитах эндометрия и содержимом матки ( $R=0,663-0,882$ ).

**Заключение** содержит обобщение полученных результатов, сопоставление их с данными литературы.

Параметры, оценивающие биоаминовый статус матки (насыщенность клеточных и нервных элементов биоаминами, плотность пространственного распределения биоаминпозитивных структур) характеризуются высокой связью в процессе гистогенетических изменений, обеспечивающих послеродовую инволюцию органа. В послеродовом периоде происходит восстановление высокого уровня корреляционных связей содержания серотонина и катехоламинов в биоаминпозитивных элементах матки, отражая общую закономерность о равновесии процессов анаболизма-катаболизма для поддержания гомеостаза биологических структур.

Восстановление биоаминового статуса матки, соответствующего гистофизиологическим условиям полового цикла, происходит к 10-м суткам после родов. Для внутриматочных биоаминсодержащих элементов характерна региональность их пространственной и биоамингистохимической организации, которая проявляется в неравнозначности оценочных параметров в различных оболочках и отделах органа. Одна из ведущих ролей в паракринной регуляции гистогенетических процессов, происходящих в матке в ходе ее послеродовой инволюции, особенно на ранних этапах принадлежит тучным клеткам. Возможно, что они способствуют восстановлению симпатической иннервации матки в послеродовой период.

Большинство пространственных и гистохимических показателей биоаминового статуса внематочных элементов сопряжены во времени послеродовой инволюции. Изменения этих параметров характеризуются положительными и отрицательными связями с аналогичными характеристиками биоаминсодержащих структур матки. Показатели, оценивающие биоаминовый статус структур матки, имеют более высокую тесноту связи с оценочными параметрами перитонеальной жидкости. Здесь обращают на себя внимание высокая положительная взаимосвязь изменений в течение послеродового периода содержания гистамина в жидкостной фазе перитонеальной жидкости и содержания гистамина в эпителиоцитах слизистой оболочки, а также в содержимом полости матки.

Выявленные закономерности изменений оценочных параметров и их корреляционные связи, региональность определяют и отражают интегрирование внутри- и внеорганных структур с целью обеспечения оптимального обмена гистамина, серотонина и катехоламинов в матке для поддержания ее гомеостаза в соответствии с гистофизиологическими условиями послеродовой инволюции.

Установленные особенности пространственной и биоамингистохимической организации внутри- и внематочных биоаминпозитивных элементов отражают и определяют их кооперирование с целью сохранения гомеостаза органа в соответствии с физиологическими условиями в процессе его послеродовой инволюции.

#### **Выводы:**

1. В течение послеродового периода оценочные параметры системы биоаминового снабжения матки крыс, представленной внутриорганными (симпатические нервные волокна, гладкие миоциты, тучные клетки, эпителиоциты слизистой оболочки) и внеорганными (перитонеальные и мезентериальные тучные клетки, симпатические нервные волокна брюшины матки, жидкостная фаза перитонеальной жидкости, периферическая кровь) биоаминсодержащими элементами, изменяются волнообразно, часто разнонаправленно, с сохранением или восстановлением высокой взаимосвязи между уровнями моноаминов.

2. В тканях матки с 1-х по 5-е сутки послеродового периода наблюдается наиболее выраженная экспрессия маркера p53, что свидетельствует о преобладании процессов апоптоза, с 6-х по 15-е сутки отмечается рост количества клеток с экспрессией Ki-67, свидетельствующий об усилении процессов пролиферации.

3. Послеродовые изменения оценочных показателей биоаминового статуса перитонеальной жидкости и матки характеризуются сильной корреляционной связью. Наиболее высокая отрицательная зависимость свойственна изменениям плотности тучных клеток.

4. Изменения содержания серотонина, катехоламинов и гистамина в крови и в клеточных элементах матки в ходе ее послеродовой инволюции характеризуются положительной корреляцией. Для преобразований насыщенности крови и нервных волокон миометрия катехоламинами и серотонином установлена отрицательная взаимосвязь.

5. Изменения в процессе послеродовой инволюции матки плотности распределения флуоресцирующих нервных волокон мышечной оболочки и брюшины матки, а также содержания в них серотонина и катехоламинов характеризуются отрицательной взаимосвязью.

#### **Практические рекомендации.**

Результаты настоящего диссертационного исследования могут быть использованы как дополнительный материал при изучении гистологии и эмбриологии, анатомии, физиологии, акушерства и гинекологии в образовательном процессе медицинских вузов.

Научные разработки и положения диссертационного работы используются в учебном процессе на кафедре гистологии, эмбриологии, цитологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами 2 курса лечебного и педиатрического факультетов при изучении темы «Женская половая система».

При изучении роли биогенных аминов в матке и других органах женской репродуктивной системы в норме и при патологии необходимо проводить их комплексное исследование, так как их изменения в клеточных и тканевых структурах характеризуются тесными ранговыми связями.

При проведении исследований гистогенетических процессов послеродовой инволюции матки необходимо учитывать региональные особенности пространственной и биоамингистохимической организации ее биоаминсодержащих структур, которая проявляется в неравнозначности изменений их оценочных параметров в различных оболочках и отделах органа.

Полученные результаты могут использоваться как модель морфофункциональной регуляции клеточного и тканевого гомеостаза в общей реакции адаптационно-компенсаторных реакций органов женской половой системы и представляют интерес для скрининга факторов риска специалистами в областях гистологии и репродуктологии.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

**В научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, рекомендованные ВАК Минобрнауки России**

1. Диндяев, С.В. Флуоресцентно-гистохимическая характеристика тучных клеток матки крыс в процессе послеродовой инволюции / С.В. Диндяев, **Д.В. Касаткин** // Морфологические ведомости. – 2022. – Т. 30(1). – С. 56-62. (Объем 0,44/0,30 п. л.)

**В изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования**

1. Диндяев, С.В. Тучные клетки в системе биоаминового обеспечения матки / С.В. Диндяев, Ф.А. Ромашин, А.А. Урпинаев, О.В. Сальникова, **Д.В. Касаткин** // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9 (18), №1 (1). – С. 53-55. (0,19/0,10 п.л.)

2. Диндяев, С.В. Тучные клетки в системе регуляции матки крыс / С.В. Диндяев, Ф.А. Ромашин, **Д.В. Касаткин** // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13 (22), №2. – С. 760-762. (0,19/0,11 п. л.)

3. Dindyaev, S.V. The Role of Neurogenic Bioamines in Nerve Fibers of Uterus during the Postpartum Involution in Experimental Animal Models / S.V. Dindyaev, N.M. Beeraka, **D.V. Kasatkin**, E.V. Mikhaylenko, S.G. Somasundaram, Kirkland, C.E., G. Aliev // Current Pharmaceutical Design. - 2021. – Vol. 27. № 27. - Pp: 3061-3073. DOI: [10.2174/1381612827666210322141205](https://doi.org/10.2174/1381612827666210322141205) (0,81/0,45 п. л.)

4. Gu H. The morphofunctional pattern of neuronal biogenic amines during postpartum involution period-an in vivo study / H. Gu, S.V. Dindyaev, N.M. Beeraka, **D.V. Kasatkin**, E.V. Mikhaylenko, J. Liu, C.E. Kirkland, G. Aliev, S.G. Somasundaram, C. Muresanu, R. Fan // Histol Histopathol. – 2021. – Vol. 36. – P. 1247-1260. doi: [10.14670/HH-18-377](https://doi.org/10.14670/HH-18-377). PMID: 34590705. (0,88/0,45 п. л.)

#### **Публикации в других изданиях**

1. Диндяев, С.В. Нейромедиаторные биогенные амины в системе регуляции матки // Актуальные вопросы профилактики, ранней диагностики, лечения и

медицинской реабилитации больных с неинфекционными заболеваниями и травмами / С.В. Диндяев, Ф.А. Ромашин, О.В. Кузнецова, **Д.В. Касаткин**, А.А. Урпинаев / Матер. III Межрегионал. научно-практ. конференции врачей ЦФО, Иваново, 23-24.11.2015 г. – Иваново, 2015. – С. 26-27. (0,13/0,07 п. л.)

2. Диндяев, С.В. Морфофункциональная характеристика содержания биоаминов в матке крыс / С.В. Диндяев, Ф.А. Ромашин, О.В. Кузнецова, **Д.В. Касаткин**, А.А. Урпинаев // Морфология. – 2016. – Т. 149, № 3. – С. 76. (0,06/0,04 п. л.)

3. **Касаткин, Д.В.** Морфофункциональная характеристика гистаминового обеспечения матки в период лактации / **Д.В. Касаткин**, Ф.А. Ромашин, С.В. Диндяев // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека. XII областной фестиваль «Молодые ученые – развитию Ивановской области: межрегиональная научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием. Министерство здравоохранения РФ; Ивановская государственная медицинская академия. – 2016. – С. 27-28. (0,13/0,08 п. л.)

4. **Касаткин, Д.В.** Тучные клетки как регуляторы реструктуризации матки / **Д.В. Касаткин**, А.В. Михайлова, С.В. Диндяев // Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека / Материалы III Всероссийской образовательно-научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, Иваново, 10-14 апреля 2017 г. – Иваново, 2017. – Том 1. – С. 27-29. (0,19/0,11 п. л.)

5. Диндяев, С.В. Участие биогенных аминов перитонеальной жидкости в регуляции функций матки // Актуальные вопросы профилактики, ранней диагностики, лечения и медицинской реабилитации больных с неинфекционными заболеваниями и травмами / С.В. Диндяев, **Д.В. Касаткин**, Ф.А. Ромашин, А.А. Урпинаев / Матер. V Межрегионал. научно-практ. конференции врачей ЦФО, Иваново, 27-28.11.2017 г. – Иваново, 2017. – С. 77-79. (0,19/0,11 п. л.)

6. Ромашин, Ф.А. Структурное обеспечение обмена биоаминов в эндометрии матки крыс в течение беременности и послеродового периода / Ф.А. Ромашин, **Д.В. Касаткин**, С.В. Диндяев, А.А. Урпинаев // Молодежь – практическому здравоохранению: Материалы XII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых-медиков / Твер. гос. мед. ун-т; редкол.: М. Н. Калинин [и др.]. – Тверь: Твер. гос. мед. ун-т, 2018. – С. 866-869. (0,25/0,15 п. л.)

7. Диндяев, С.В. Морфофункциональная характеристика биоаминового обеспечения матки крыс в процессе беременности и послеродового периода / С.В. Диндяев, Ф.А. Ромашин, **Д.В. Касаткин** // Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – Т. 25, № 3. – С. 131-136. DOI 10.24411/1609-2163. (0,38/0,20 п. л.)

8. Диндяев, С.В. Структуры перитонеальной жидкости в системе биоаминового обеспечения матки крыс / С.В. Диндяев, Ф.А. Ромашин, **Д.В. Касаткин**, А.А. Урпинаев, О.В. Кузнецова / Матер. докладов XIV Конгресса Международной ассоциации морфологов // Морфология. – 2018. – Т. 153, №3. – С. 97. (0,06/0,04 п. л.)

9. Диндяев, С.В. Участие нейромедиаторных биогенных аминов в послеродовой реструктуризации матки крыс / С.В. Диндяев, **Д.В. Касаткин**, О.В. Кузнецова / Матер. докладов VIII съезда НМОАГЭ // Морфология. – 2019. – Т. 155, №2. – С.100. (0,06/0,04 п. л.)

10. Диндяев, С.В. Участие нейромедиаторных биогенных аминов в процессах послеродовой инволюции матки / С.В. Диндяев, **Д.В. Касаткин** // Актуальные вопросы профилактики, ранней диагностики, лечения и медицинской реабилитации больных с неинфекционными заболеваниями и травмами / Материалы VII Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием. – Иваново. – 2019. – С. 86-88. (0,19/0,11 п. л.)

**КАСАТКИН ДЕНИС ВИТАЛЬЕВИЧ**

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ БИОАМИНОВОГО  
ОБЕСПЕЧЕНИЯ МАТКИ КРЫС В ПОСЛЕРОДОВОМ ПЕРИОДЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Подписано в печать 12.10.2022 г. Формат 60x84 1/16. Печ.л.1,0.  
Бумага офсетная. Печать оперативная. Тираж 100 экз. Заказ № 635.

Отпечатано с готового оригинал-макета в Центре оперативной полиграфии  
ООО «Энтер.Ком». Адрес: 153000, г. Иваново, ул. 8 Марта, д. 32, корп. «Б».  
Тел. (4932) 59-02-02