

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 9 | № 1 | 2020

ISSN 2226-5988 (print)

ISSN 2686-6749 (online)

**«Клиническая
и экспериментальная
морфология»**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Периодичность 4 раза в год

Основан в 2011 году

Включен в перечень ВАК

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

Учредитель

ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт
морфологии человека»
117418, Москва,
ул. Цюрупы, д. 3

Адрес редакции

117418, Москва,
ул. Цюрупы, д. 3

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

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

www.morpholhum.ru

Тираж 500 экземпляров

Издательство

«Группа МДВ»

www.mdv-group.ru

Подписные индексы:

70045 по каталогу агентства
«Роспечать»

70045 по каталогу «Урал-
Пресс»

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

© ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт
морфологии человека»

Главный редактор

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

Заместители главного редактора

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

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

Ответственный секретарь

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции.

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

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

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

With the support of the Russian Society of Pathology

Volume 9 | № 1 | 2020

ISSN 2226-5988 (print)

ISSN 2686-6749 (online)

«Clinical
and Experimental
Morphology»

SCIENTIFIC AND PRACTICAL
PEER-REVIEWED JOURNAL

Frequency: 4 issues per year

Founded in 2011

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

Journal founder

FSBSI «Research Institute of
Human Morphology»

117418, Tsyurupy st., 3,
Moscow, Russia

Editorial office address

117418, Tsyurupy st., 3,
Moscow, Russia

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

e-mail: cem.journal@mail.ru

www.cem-journal.ru

www.morfolhum.ru

Edition of 500 copies

Publisher

«Gruppa MDV»

www.mdv-group.ru

Subscription index:

70045 according to the
«Rospechat» Agency catalog

70045 according to the
«Ural-Press» catalog

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

Editor-in-chief

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

Deputies editor-in-chief

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

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

Executive secretary

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

Editorial board

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

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

Aliev, Gjumrakch M., Cand. Sci. Med.,
Professor, San Antonio, USA

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

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

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

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

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

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

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

Korshunov, Andrey G., Cand. Sci. Med.,
Professor, Heidelberg, Germany

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Savel'yev, Sergey V., Dr. Sci. Biol., Professor,
Moscow, Russia

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

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

Editorial Review Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

- Л.М. Сомова, Б.Г. Андрюков,
Е.И. Дробот, И.Н. Ляпун
Гранулематозное воспаление как фактор,
способствующий персистенции патогена
при инфекции, вызванной *Yersinia*
pseudotuberculosis 5 *L.M. Somova, B.G. Andryukov,*
E.I. Drobot, I.N. Lyapun
Granulomatous inflammation as a factor contributing
to the persistence of the pathogen associated with
Yersinia pseudotuberculosis infection
- А.В. Асатурова, А.В. Трегубова, Д.В. Шушканова
Ингибирование контрольных точек иммунитета
при раке яичников 11 *A.V. Asaturova, A.V. Tregubova, D.V. Shushkanova*
Inhibition of immunity control points in ovarian
cancer

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCHES

- Л.М. Родионова, Л.В. Мехеда, Л.Я. Фомина
Сложности цитологической диагностики
фиброэпителиальных опухолей:
фиброаденома и филлоидная опухоль 20 *L.M. Rodionova, L.V. Mekheda, L.Y. Fomina*
Difficulties in the cytological diagnosis
of fibroepithelial tumors: fibroadenoma
and phylloid tumor
- Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, Е.М. Малышева,
С.Е. Тимофеев, Е.А. Старцева, О.А. Розенберг
Морфогенез ателектазов легких
при экспериментальном радиоиндуцированном
воздействии 30 *Yu.A. Kirillov, I.A. Chernov, E.M. Malysheva,*
S.E. Timofeev, E.A. Startseva, O.A. Rozenberg
Development of pulmonary atelectasis after
experimental radiation exposure
- А.Ю. Ништ, В.С. Чирский, Н.Ф. Фомин
Морфологическая характеристика изменений
периферических нервов и тканей таргетных зон
при соединении периферических нервов по типу
«конец-в-бок» в эксперименте 40 *A. Yu. Nisht, V.S. Chirskij, N.F. Fomin*
Morphological characteristics of changes in peripheral
nerves and tissues of target zones after the end-to-side
neurorrhaphy in an experiment

С.Л. Кабак, В.В. Заточная, Д.М. Гордионок
Количественная характеристика тканей
позвонков у эмбрионов и плодов человека

49 S.L. Kabak, V.V. Zatochnaya, D.M. Gordionok
Quantitative characteristic of vertebral tissues
in human embryos and fetuses

Д.К. Матвеева, Е.Р. Андреева, Н.Н. Новиков,
В.И. Пустовой, Л.Б. Буравкова
Структурная организация и состав внеклеточного
матрикса мультипотентных мезенхимальных
стромальных клеток при различном уровне
содержания кислорода *in vitro*

57 D.K. Matveeva, E.R. Andreeva, N.N. Novikov,
V.I. Pustovoy, L.B. Buravkova
Structural organization and composition of
extracellular matrix of multipotent mesenchymal
stromal cells under different oxygen levels *in vitro*

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов,
Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, Д.А. Цомартова
Возрастные изменения структуры митохондрий –
регулятор активности стероидогенеза
в кортикостероцитах надпочечников крыс

64 N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov,
E.P. Timokhina, S.V. Nazimova, D.A. Tsomartova
Age-dependent changes of mitochondrial structure
regulate steroidogenic activity
of rat adrenal cortical cells

ЮБИЛЕИ ANNIVERSARIES

Валентин Васильевич Яглов
(к 85-летию со дня рождения)

71

ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ SPECIAL DAYS AND TRIBUTES

Николай Константинович Пермяков
(1925–1999)
К 95-летию со дня рождения

73

Гранулематозное воспаление как фактор, способствующий персистенции патогена при инфекции, вызванной *Yersinia pseudotuberculosis*

Л.М. Сомова, Б.Г. Андрюков, Е.И. Дробот, И.Н. Ляпун

ФГБНУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

Гранулематозное воспаление представляет собой специализированную форму воспалительной реакции, при которой основным морфологическим субстратом являются гранулемы (узелки), возникающие в результате пролиферации и трансформации способных к фагоцитозу клеток. Гранулематозные реакции обычно возникают при внутриклеточной персистенции микроорганизмов в макрофагах, которые эти клетки не способны разрушить. В 2000-х годах, с развитием научных исследований о некультивируемом состоянии патогенных бактерий, стали формироваться представления о персистентных, хронически рецидивирующих инфекциях, трудно поддающихся антибиотикотерапии. В данном обзоре впервые обсуждаются вопросы гранулематозного воспаления в его взаимосвязи с персистенцией возбудителей инфекционных болезней, в частности псевдотуберкулеза. При псевдотуберкулезе гранулематозное воспаление является наиболее типичной тканевой реакцией, что может создавать условия для персистенции возбудителя. При анализе патологии особого клинико-эпидемического проявления псевдотуберкулеза, протекающего в форме дальневосточной скарлатиноподобной лихорадки, определены этиопатогенетические предпосылки рецидивирования болезни и развития персистентной инфекции. Морфология гранул, формирующихся при заражении *Yersinia pseudotuberculosis*, отражает тяжесть течения инфекционного процесса и выраженность иммунной защиты макроорганизма. Все большее подтверждение находит концепция развития гранулематозного воспаления с инфицированием штаммами *Y. pseudotuberculosis*, имеющими сниженную вирулентность, когда в воспалительных очагах преобладают реакции гиперчувствительности замедленного типа. Показано, что патогенетическое значение в формировании типичных псевдотуберкулезных гранул имеет цитотоксический некротизирующий фактор – CNFY токсин, присутствующий в вирулентных штаммах *Y. pseudotuberculosis*, и он обуславливает сильную воспалительную реакцию с деструкцией тканей. Благоприятный исход большинства случаев заболевания у человека позволяет предположить, что еще в фазе острой псевдотуберкулезной инфекции, под влиянием эндогенных факторов, происходит переход патогена в слабовирулентный *cnfY* мутант, способный к персистенции в сайтах гранулематозного воспаления.

Ключевые слова: гранулематозное воспаление, макрофаг, *Yersinia pseudotuberculosis*, персистенция, цитотоксический некротизирующий фактор

Для корреспонденции: Лариса Михайловна Сомова. E-mail: l_somova@mail.ru

Для цитирования: Сомова Л.М., Андрюков Б.Г., Дробот Е.И., Ляпун И.Н. Гранулематозное воспаление как фактор, способствующий персистенции патогена при инфекции, вызванной *Yersinia pseudotuberculosis*. Клини. эксп. морфология. 2020;9(1):5–10. DOI:10.31088/CEM2020.9.1.5-10

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБНУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова (№ 4А-А19-119011090003-7).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 05.12.2019. Получена после рецензирования 28.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

Granulomatous inflammation as a factor contributing to the persistence of the pathogen associated with *Yersinia pseudotuberculosis* infection

L.M. Somova, B.G. Andryukov, E.I. Drobot, I.N. Lyapun

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Granulomatous inflammation is a specialized form of inflammatory response where granulomas (nodules) resulting from the proliferation and transformation of cells capable of phagocytosis are the main morphological substrate. Granulomatous reactions are usually associated with intracellular persistence of microorganisms

in macrophages, which cannot be destroyed by these cells. In the 2000s, with the development of research on the uncultivated state of pathogenic bacteria, ideas began to form about persistent, chronically recurring infections that hardly respond to antibiotics.

This review firstly discusses the relationship of granulomatous inflammation with the persistent pathogens of infectious disease, in particular, pseudotuberculosis. Granulomatous inflammation is the most typical tissue response during pseudotuberculosis and thus it provides a background for the persistence of the pathogen. Analysis of the pathology of the special clinical and epidemic manifestation of pseudotuberculosis, which proceeds in the form of Far Eastern scarlet fever, determined the etiopathogenetic prerequisites for the recurrence of the disease and the development of persistent infection. The morphology of granulomas that form during *Y. pseudotuberculosis* infection reflects the gravity of the infection process and the severity of the immune defense of the macroorganism. The concept of the development of granulomatous inflammation in *Yersinia pseudotuberculosis* infection caused by reduced virulence strains and resulting in predominating of delayed-type hypersensitivity reactions in inflammatory foci, is finding ever greater confirmation. It was shown that the cytotoxic necrotizing factor CNFY toxin, which is present in virulent strains of *Y. pseudotuberculosis*, has a pathogenetic significance in the formation of typical pseudotuberculosis granulomas causing the strong inflammatory reaction accompanied by tissue destruction. The favorable outcome of most cases of the disease in humans suggests that under the influence of endogenous factors, even in the phase of acute pseudotuberculosis infection, the pathogen passes into the weakly virulent *cnfY* mutant capable of persistence at the sites of granulomatous inflammation.

Keywords: granulomatous inflammation, macrophage, *Yersinia pseudotuberculosis*, persistence, cytotoxic necrotizing factor CNFY toxin

Corresponding author: Larisa M. Somova. E-mail: l_somova@mail.ru

For citation: Somova L.M., Andryukov B.G., Drobot E.I., Lyapun I.N. Granulomatous inflammation as a factor contributing to the persistence of the pathogen in the infection caused by *Yersinia pseudotuberculosis*. Clin. exp. morphology. 2020;9(1):5–10 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.1.5-10.

Funding. The work is done in the framework of the state assignment of FSBI Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology (No 4A-A19-119011090003-7).

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

Received 05.12.2019. **Received in revised forms** 28.01.2020. **Accepted** 11.02.2020.

Одной из форм взаимодействия макро- и микроорганизмов является персистенция бактерий в клетках и тканях хозяина. Длительная персистенция микроорганизмов – необходимое условие формирования вирусо- и бактерионосительства, которое с медицинской точки зрения представляет собой одну из форм инфекционного процесса. С наличием бактерий-персистеров связывают хроническое течение инфекционных заболеваний, не поддающихся лечению антибактериальными препаратами, а также образование микробных биопленок [1, 2].

В настоящее время известно, что некультивируемые формы бактерий – это особые формы покоящихся (дормантных) клеток, которые формируются в популяциях бактерий при прекращении их роста [3, 4]. Они являются стратегическим резервом микробной популяции, реализующимся в крайне неблагоприятных для роста микроорганизмов условиях. В персистирующих клетках активируются группы генов, обеспечивающих снижение уровня их биосинтетической и энергетической активности, что свидетельствует о переходе клеток в покоящееся состояние [5]. Эти клетки устойчивы ко многим неблагоприятным факторам внешней среды и значительно отличаются от активно растущих клеток [6–9]. Персистенцию бактерий обуславливают как биологические свойства возбудителя, так и иммунный статус

хозяина [10, 11], и ее следует рассматривать как результирующую отношений в системе паразит–хозяин [12].

Вклад бактерий-персистеров в хронизацию инфекционного процесса может быть связан с тем, что они сохраняются в клетках зараженного организма, в частности в макрофагах и клетках гранулем [13], поэтому изучение гранулематозных болезней с позиций их взаимосвязи с персистенцией возбудителей инфекционных заболеваний представляет особую актуальность.

Персистенцию патогенов связывают с образованием ими факторов, направленных на инактивацию естественной противоиной резистентности макроорганизма. Среди факторов бактериальной персистенции определенное место отведено антилизотической активности [2], которая стабильно встречается у грамотрицательных бактерий, в том числе у иерсиний. Доказано, что устойчивость к действию лизоцима можно рассматривать как маркер персистенции бактерий, способных к внутриклеточному паразитированию [10].

Гранулематозные болезни – это гетерогенная группа нозологических форм различной этиологии, структурную основу которых составляет гранулематозное воспаление [14]. Общеизвестно, что гранулематозное воспаление – это специализированная форма хронической воспалительной реакции, при которой преобладающий тип эффекторных клеток – активированные макрофаги

(или их производные), имеющие модифицированный эпителиоидный вид. Это вариант продуктивного воспаления, при котором основным морфологическим субстратом являются гранулемы (узелки), возникающие в результате пролиферации и трансформации способных к фагоцитозу клеток.

При гранулематозном воспалении, в условиях незавершенного фагоцитоза и измененной реактивности организма, патогенные бактерии оказываются сильнейшим антигенным стимулятором для макрофагов, Т- и В-лимфоцитов. При этом завязываются механизмы клеточно-опосредованного иммунитета, в частности механизмы гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

Образование гранулемы – это способ элиминации повреждающего агента, который невозможно удалить путем фагоцитоза или переварить с помощью макрофагов. Гранулемы возникают при заболеваниях, носящих хронический, причем волнообразный характер течения, то есть с периодами обострений и ремиссий. Тем не менее гранулематозное воспаление может протекать и остро, что наблюдается, как правило, при острых инфекционных заболеваниях, в том числе при псевдотуберкулезе [14–16].

Гранулематозные реакции обычно возникают при внутриклеточной персистенции микроорганизмов в макрофагах, которые эти клетки не способны разрушить. Персистенция антигенов приводит к дифференцировке макрофагов в эпителиоидные клетки и их слиянию с образованием гигантских многоядерных клеток, которые недавно стали рассматривать как реакцию макрофагов на персистенцию в них патогенных бактерий [17]. При этом инфицированные макрофаги становятся главными резервуарами бактерий, вмещающихся в созревание фагосом, блокируя слияние образовавшихся фагосом с лизосомами. Патогенный агент персистирует и служит хроническим антигенным стимулом.

В Европе инфекция, вызываемая *Yersinia pseudotuberculosis*, у человека обычно возникает спорадически, в виде самоограниченного гастроэнтерита. В России и Японии вспышки псевдотуберкулезной инфекции вызывают серьезные системные воспалительные симптомы, и этот вариант болезни называется дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой (ДСЛ) [18]. Во время диссеминации бактерии распространяются преимущественно в печень, селезенку, почки, легкие и вызывают образование туберкулезоподобных, гранулематозных абсцессов [19].

В 2000-х годах, с развитием научных исследований о некультивируемом состоянии патогенных бактерий, стали формироваться представления о персистентных инфекциях [3, 5, 20], однако относительно псевдотуберкулеза этот вопрос остается открытым. При анализе патологии псевдотуберкулеза, его клинико-эпидемиологического проявления в виде ДСЛ выделены этиопатогенетические предпосылки рецидивирования болезни и развития персистентной инфекции [21]. Рецидивиру-

ющее течение псевдотуберкулеза взаимосвязано с особенностями противоинфекционной защиты организма при этой инфекции. Частота возникновения рецидивов колеблется от 13,4 до 69,5% [22, 23], когда преимущественно возникают артралгии (до 89,2% случаев) и абдоминальные боли (до 85,3% случаев), связанные с поражением илеоцекального отдела кишечника и печени [22]. В ответ на заражение бактериями рода *Yersinia* главную роль в первичной иммунной защите и ограничении диссеминации бактерий в организме играют полиморфноядерные лейкоциты, которые используют несколько механизмов для ликвидации бактерий, в том числе эффероцитоз (стратегия выживания иерсиний в макрофагах, фагоцитированных инфицированных ими фосфатидилположительные нейтрофилы) [24, 25]. По нашему мнению, эффероцитоз может быть одним из механизмов, обеспечивающих персистенцию возбудителя псевдотуберкулеза.

При псевдотуберкулезе характерны нарушения во всех звеньях фагоцитарной системы с нередким развитием вторичного иммунодефицита [26]. Рецидивирующей псевдотуберкулез расценивают как заболевание с аутоиммунным (узловатая эритема) и иммунодефицитными компонентами [16, 23, 26, 27].

У человека в течение нескольких лет *Yersinia* могут персистировать латентно в слизистой оболочке кишечника и лимфоидной ткани подслизистой основы, вызывая хронический илеит, рецидивирующий энтерит и реактивный артрит [28, 29]. Получены данные о длительном, хроническом носительстве патогенных иерсиний у людей [30, 31], но надежные доказательства этого состояния отсутствуют, за исключением связи между *Y. pseudotuberculosis* и реактивным артритом.

Еще в конце 1980-х годов развитие гранулематозного воспаления стали связывать с инфицированием штаммами *Y. pseudotuberculosis*, имеющими сниженную вирулентность. Так, по данным M. Simonet et al. (1990) [32], получено электронномикроскопическое доказательство, что бактерии *Y. pseudotuberculosis*, несущие плазмиду вирулентности pYV, локализованные в основном внеклеточно на участках воспаления во время инфекции у мышей, однозначно подвергались активной репликации. Вирулентные pYV⁺ бактерии, часто обнаруженные адгезированными к тромбоцитам, строго сдерживали формирование гранулемы, вызывая некротические микроабсцессы. Это контрастировало с гранулемой, вызванной слабовирулентными pYV⁻ бактериями, которая состояла в основном из полиморфноядерных и моноклеарных клеток [32]. Ингибирование образования гранулемы связывают с подавлением иммунитета *in vivo*, наблюдаемом у мышей, инфицированных вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis*, содержащим плазмиду вирулентности [33].

Клинико-морфологическая сущность псевдотуберкулеза позволяет отнести его к группе гранулематозных болезней [15, 16, 26]. Наиболее типичным морфологическим признаком болезни, аналогичным у человека

и животных, является формирование гранулем с так называемым центральным кариорексисом.

В экспериментах *in vivo* [16] после парентерального заражения вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis*, содержащим плазмиду вирулентности, рYV⁺ бактерии очень быстро размножались в тканях животных в течение первых 2–4 суток инфекции, достигая 10⁸ микробных клеток на 1 г органа, и вызывали их гибель. В противоположность этому рYV⁻ бактерии росли медленными темпами, достигая численности примерно 10⁴–10⁵ микробных клеток на 1 г органа на четвертые сутки, и к 14-м суткам инфекции бактериальная репликация прекращалась [34]. К четвертым суткам парентеральной инфекции, вызванной дозой 10³ микробных клеток рYV⁺ бактерий, наблюдались множественные абсцессоподобные гранулемы, слабоинфильтрированные воспалительными клетками, со скоплениями бактерий в просвете окружающих капилляров [16]. К четвертым суткам инфекции, вызванной *Y. pseudotuberculosis* рYV⁻ бактериями, были видны небольшие гранулемы, состоящие в основном из мононуклеарных клеток, без видимого некроза. С увеличением инфицирующей дозы (примерно 10⁶ микробных клеток) к этому сроку рYV⁻ бактерии вызывали образование множественных гранулем в тканях животных.

В центре гранулемы среди клеточного детрита часто выявлялись колонии грамотрицательных бактерий. Принадлежность их к возбудителю псевдотуберкулеза подтверждалась при иммунофлуоресцентном исследовании с помощью обнаружения свечения специфического антигена в клетках воспалительных очажков. Это доказывало значение повреждающего действия бактерий псевдотуберкулеза при гематогенной диссеминации их в организме как пускового механизма инициации гранулематозного воспаления. Среди клеток псевдотуберкулезной гранулемы нередко встречались гигантские многоядерные клетки типа Пирогова–Лангханса.

Таким образом, при псевдотуберкулезе, возбудитель которого обладает способностью к внутри- и внеклеточному паразитизму и цитотоксичности, гранулематозное воспаление создает условия для незавершенности фагоцитоза и персистенции возбудителя. На экспериментальной модели инфекции прослежена четкая зависимость тяжести течения заболевания от характера воспалительных реакций [26, 35]. При тяжелом, септическом течении с летальным исходом в очагах воспаления преобладали экссудативные и некротические изменения. При благоприятном течении преимущественно отмечался гранулематозный характер воспаления с отграничением гранулем соединительнотканной капсулой от окружающей неповрежденной ткани.

В последние годы всплеск научного интереса к персистентным (устойчивым) формам возбудителей инфекций связан с возрастающим медико-эпидемиологическим значением феномена гетероморфизма патогенных бактерий в разных условиях их обитания [36]. При электронномикроскопических исследованиях

Y. pseudotuberculosis [37] установлено, что при периодическом культивировании в фазе отмирания в бактериальной популяции определялись клетки с пустым цитозолем, имевшие сходство с некультивируемыми формами, аналогично описанным J.-S. Kim et al. (2017) [3].

Недавно идентифицирован новый фактор патогенности возбудителя псевдотуберкулеза – токсический некротизирующий фактор, CNFY токсин [38], и установлено его значения в переходе *Y. pseudotuberculosis* в персистенцию. Доказано, что CNFY токсин, присутствующий у вирулентных бактерий дикого типа, инициирует сильную воспалительную реакцию, которая приводит к обширному разрушению тканей [39]. Напротив, удаление CNFY токсина подавляет индуцированные патогеном воспалительно-деструктивные изменения, и этого достаточно для уклонения от иммунной защиты хозяина, что способствует переходу *cnfY*-мутанта в состояние персистенции. Следует согласиться с мнением W. Heine et al., что основа для этого процесса формируется еще в фазе острой *Y. pseudotuberculosis* инфекции, когда возбудитель локализуется в макрофагах лимфоидных фолликулов подвздошной кишки, способствуя развитию терминального илеита [39].

Изолированные на территории России штаммы *Y. pseudotuberculosis*, возбудителя ДСЛ, так же как и европейские штаммы, содержат ген *cnfY*, детерминирующий продукцию CNFY [40]. По данным Е.К. Псаревой с соавторами, синтез этого токсина может приводить к апоптозу клеток хозяина и невозможности патогена использовать их резерв для собственной жизнедеятельности и размножения. По нашему мнению, апоптоз тканевых макрофагов косвенно также предполагает способность *Y. pseudotuberculosis* к персистенции в очагах гранулематозного воспаления.

В настоящей работе впервые обсуждаются вопросы гранулематозного воспаления в его взаимосвязи с персистенцией возбудителей инфекционных болезней, в частности псевдотуберкулеза. Морфология гранулем, формирующихся при заражении *Y. pseudotuberculosis*, отражает тяжесть течения инфекционного процесса и выраженность иммунной защиты макроорганизма. Все большее подтверждение находит концепция развития гранулематозного воспаления с инфицированием штаммами *Y. pseudotuberculosis* со сниженной вирулентностью, когда в воспалительных очагах преобладают реакции гиперчувствительности замедленного типа. Показано, что патогенетическое значение в формировании типичных псевдотуберкулезных гранулем имеет присутствующий в вирулентных штаммах *Y. pseudotuberculosis* CNFY токсин, который обуславливает сильную воспалительную реакцию с некрозом тканей. Благоприятный исход большинства случаев заболевания у человека позволяет предположить, что еще в фазе острой псевдотуберкулезной инфекции под влиянием эндогенных факторов происходит переход патогена в слабовирулентный *cnfY*-мутант, способный к персистенции в сайтах гранулематозного воспаления.

Литература/References

1. Евдокимова Н.В., Черненко Т.В. Персистирующие клетки микроорганизмов – новый взгляд на старую проблему. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013;15(3):192–197.
Evdokimova NV, Chernenkaya TV. Persistent cells of microorganisms – a new look at an old problem. Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy. 2013;15(3):192–197 (In Russ.).
2. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. Москва: Медицина, 2005. 367 с.
Bukharin OV, Gunzburg AL, Romanova YuM, El-Registan GI. Bacterial survival mechanisms. Moscow: Medicine, 2005. 367 p. (In Russ.).
3. Kim J-S, Chowdhury N, Wood TK. Viable but non-culturable cells are persister cells. Environmental Microbiology. 2018;20(6):2038–48. DOI: 10.1111/1462-2920.14075.
4. Ayrapetyan M, Williams TC, Baxter R, Oliver JD. Viable but non-culturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum. Infect Immunology. 2015;83(11):4194–203. DOI: 10.1128/IAI.00404-15.
5. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. Journal of Biosciences. 2008;33(5):795–805. DOI: 10.1007/s12038-008-0099-3.
6. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. J of Bacteriol. 2010;192(23):6191–9. DOI: 10.1128/JB.01651-09.
7. Alix E, Blanc-Potard A. Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membranes. Mol. Microbiol. 2009;72(1):5–11. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06626.x
8. Avery SK. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. Nat. Rev. Microbiol. 2006;4(8):577–87. DOI: 10.1038/nrmicro1460.
9. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science. 2004;305(5690):1622–25. DOI: 10.1126/science.1099390
10. Бухарин О.В., Усвятсов Б.Я. Антилизосимный тест как маркер персистенции микроорганизмов. Теоретическая и прикладная иммунология: Тезисы докладов I Всесоюзной конференции. Москва, 1982. С. 87–88.
Bukharin OV, Usvyatsov BYa. Antilysocyme test as a marker of the persistence of microorganisms. Theoretical and applied immunology: Abstracts. 1 All-Union Conf. Moscow, 1982. P. 87–88 (In Russ.).
11. Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. Nat. Rev. Microbiol. 2004;2(9):747–65. DOI: 10.1038/nrmicro955.
12. Бухарин О.В. Персистенция бактериальных патогенов как результат отношений системы паразит–хозяин. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1997;4:3–9.
Bukharin OV. The persistence of bacterial pathogens as a result of the parasite–host system relationships. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 1997;4:3–9 (In Russ.).
13. Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. Handb Exp Pharmacol. 2012;211:121–33. DOI: 10.1007/978-3-642-28951-4_8.
14. Струков А.И., Кауфман О.Я. Гранулематозное воспаление и гранулематозные болезни. Москва: Медицина, 1989. 180 с.
Strukov AI, Kaufman OYa. Granulomatous inflammation and granulomatous diseases. Moscow: Meditsina, 1989. 180 p. (In Russ.).
15. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Марачев А.Г., Милованов А.П. Патология человека на Севере. Москва: Медицина, 1985. 451 с.
Avtsyn AP, Zhavoronkov AA, Marachev AG, Milovanov AP. Human pathology in the North. Moscow: Medicine, 1985. 451 p. (In Russ.).
16. Исачкова Л.М., Жаворонков А.А., Антоненко Ф.Ф. Патология псевдотуберкулеза. Владивосток: Дальнаука, 1994. 189 с.
Isachkova LM, Zhavoronkov AA, Antonenko FF. Pathology of pseudotuberculosis. Vladivostok: Dal'nauka, 1994. 189 p. (In Russ.).
17. Шкурупий В.А., Ильин Д.А., Архипов С.А. Феномен многоядерности – реакция макрофагов на персистенцию в них *M. tuberculosis*. Международный журнал фундаментальных и прикладных исследований. 2017;11(2):218–222.
Shkurupy VA, Ilyin DA, Arkhipov SA. The phenomenon of multicore – the response of macrophages to the persistence of *M. tuberculosis* in them. International journal of basic and applied research. 2017;11(2):218–222 (In Russ.).
18. Amphlett A. Far Eastern Scarlet-Like Fever: A Review of the Epidemiology, Symptomatology, and Role of Superantigenic Toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-Derived Mitogen A. Open Forum Infect Dis. 2016;3(1):1–7. DOI: 10.1093/ofid/ofv202.
19. Barnes PD, Bergman MA, Mecasas J, Isberg RR. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. J Exp Med. 2006;203(6):1591–601. DOI: 10.1084/jem.20060905.
20. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. Virulence. 2013;4(4):273–83. DOI: 10.4161/viru.23987.
21. Сомова Л.М., Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Псарева Е.К. Псевдотуберкулез как персистентная инфекция: этиопатогенетические предпосылки. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019;2:110–119.
Somova LM, Andryukov BG, Timchenko NF, Psareva EK. Pseudotuberculosis as a persistent infection: etiopathogenetic prerequisites. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2019;2:110–119 (In Russ.). DOI: 10.36233/0372-9311-2019-2-110-119.
22. Борисова М.А. Клиника иерсиниозов. Владивосток: Изд-во ДВГУ, 1990. 157 с.
Borisova MA. Clinic of Yersinioses. Vladivostok: Izd-vo DVGU, 1990. 157 p. (In Russ.).
23. Мотавкина Н.С., Малый В.П., Туркутюков В.Б. Рецидивирующий псевдотуберкулез (иммуногенетика, клиника, иммунология). Москва: Голос, 1999. 145 с.
Motavkina NS, Maly VP, Turkutyukov VB. Recurrent pseudotuberculosis (immunogenetics, clinic, immunology). Moscow: Golos, 1999. 145 p. (In Russ.).
24. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Дробот Е.И., Матосова Е.В. Антимикробная стратегия нейтрофилов при инфекционной патологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(12):825–833.

- Andryukov BG, Somova LM, Drobot EI, Matosova EV. Antimicrobial strategy of neutrophils for infectious diseases. *Clinical laboratory diagnostics*. 2016;61(12):825–833.
25. Martin CJ, Booty MG, Rosebrock TR, Nunes-Alves C. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell Host Microbe*. 2012;12:289–300. DOI: 10.1016/i.chom.2012.06.010.
 26. Сомова Л.М. Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка: формирование представлений о патоморфогенезе «новой» болезни. *Здоровье. Медицинская экология. Наука. Материалы научно-практической конференции «Фундаментальная дальневосточная наука – медицине»*. 2017;3(70):12–16. Somova LM. Far Eastern scarlet-like fever: the formation of ideas about the pathomorphogenesis of the “new” disease. *Health. Medical ecology. Science. Materials of the Scientific and Practical Conference «Fundamental Far Eastern science for medicine»*. 2017;3(70):12–16 (In Russ.). DOI: 10.5281/zenodo.817843.
 27. Dube P. Interaction of *Yersinia* with the gut: mechanisms of pathogenesis and immune evasion. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;337:61–91. DOI: 10.1007/978-3-642-01846-6_3.
 28. Hoogkamp-Korstanje JA, de Koning J, Heesemann J. Persistence of *Yersinia enterocolitica* in man. *Infection*. 1988;16(2):81–5. DOI: 10.1007/bf01644307
 29. Fahlgren A, Avican K, Westermark L, Nordfelth R, Fallmana M. Colonization of cecum is important for development of persistent infection by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun*. 2014;82(8):3471–82. DOI: 10.1128/IAI.01793-14.
 30. Netea MG, van der Leij F, Drenth JP, Joosten LA, te Morsche R, Verweij P et al. Chronic yersiniosis due to defects in the TLR5 and NOD2 recognition pathways. *Neth J Med*. 2010;68:310–15.
 31. Watson GT, Huaman MA, Semler MW, Manners J, Woron AM, Carpenter LR, Christman BW. When nature meets nurture: persistent *Yersinia* infection. *Am J Med*. 2013;126(7):578–80. DOI: 10.1016/j.amjmed.2013.03.006.
 32. Simonet M, Richard S, Berchel P. Electron Microscopic Evidence for In Vivo Extracellular Localization of *Yersinia pseudotuberculosis* Harboring the pYV Plasmid. *Infect Immun*. 1990;58(3):841–45.
 33. Simonet M, Berche P. In vivo immunosuppression induced by a virulent strain of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1986;137B:207–10. DOI: 10.1016/s0769-2609(86)80109-0
 34. Simonet M, Mazigh D, Berche P. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* in mouse spleen despite loss of a virulence plasmid of mol. wt. 47 x 106. *Journal of Medical Microbiology*. 1984;18(3):371–75. DOI: 10.1099/00222615-18-3-371.
 35. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Дробот Е.И. Новые аспекты патологии псевдотуберкулеза. *Архив патологии*. 2012;74(3):60–64. Somova LM, Plekhova NG, Drobot EI. New aspects of the pseudotuberculosis pathology. *Archive of Pathology*. 2012;74(3):60–64 (In Russ.).
 36. Somova LM, Andryukov BG, Lyapun IN. Cell Geteromorphism in the Conditions of Persistence of Sapronoses Causative Agents in Various Environments. *AIMS Microbiology (USA)*. 2019;5(2):147–57. DOI: 10.3934/microbiol.2019.2.147-157.
 37. Сомова Л.М., Бузолева Л.С., Плехова Н.Г. Ультраструктура патогенных бактерий в разных экологических условиях. Владивосток: Медицина ДВ, 2009. 200 с. Somova LM, Buzoleva LS, Plekhova NG. Ultrastructure of pathogenic bacteria in different ecological conditions. Vladivostok: Medicine of the Far East, 2009. 200 p. (In Russ.).
 38. Schweer J, Kulkarni D, Kochut A, Pezoldt J, Pisano F, Pils M et al. The cytotoxic Necrotizing Factor of *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) Enhances Inflammation and Yop Delivery during Infection by Activation of Rho GTPases. *PLOS Pathogens*. 2013;9(11):e1003746. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003746.
 39. Heine W, Beckstette M, Heroven K, Thienmann S, Heise U, Nuss A et al. Loss of CNFY toxin-induced inflammation drives *Yersinia pseudotuberculosis* into persistency. *PLOS Pathogens*. 2018;14(2):e1006858. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006858.
 40. Псарева Е.К., Тимченко Н.Ф., Ермолаева С.А. Цитотоксический некротизирующий фактор *Yersinia pseudotuberculosis* как агент псевдотуберкулезной инфекции. *Инфекционные болезни*. 2017;15(S1):228. Psareva EK, Timchenko NF, Ermolaeva SA. The cytotoxic necrotizing factor of *Yersinia pseudotuberculosis* as an agent of pseudotuberculosis infection. *Infectious diseases*. 2017;15(S1):228 (In Russ.).

Информация об авторах

Лариса Михайловна Сомова – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова.

Борис Георгиевич Андриюков – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова.

Елена Игоревна Дробот – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова.

Ирина Николаевна Ляпун – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова.

Author information

Larisa M. Somova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology. <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>

Boris G. Andryukov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology. <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>

Elena I. Drobot – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology. <https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

Irina N. Lyapun – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Somov Institute of Epidemiology and Microbiology. <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Ингибирование контрольных точек иммунитета при раке яичников

A.V. Asaturova¹, A.V. Tregubova¹, D.V. Shushkanova²

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

² Московская международная лаборатория патоморфологии «Лаборатория Де Жени», Москва, Россия

Контрольные точки иммунитета, такие как CTLA4 и PD-1, функционируют на разных этапах иммунного ответа для регуляции продолжительности и уровня Т-клеточного ответа. Опухолевые клетки могут использовать этот механизм, чтобы избежать иммунного надзора, в том числе за счет модификации сигнального пути PD-1. В настоящее время активно расширяется спектр возможностей иммунотерапии опухолей, включая использование терапевтических анти-PD1 и анти-PD-L1 моноклональных антител, приводящих к реактивации специфического противоопухолевого иммунного ответа. Оценка уровня экспрессии PD-L1 рассматривается как потенциальный биомаркер прогноза эффективности и продолжительности лечения злокачественных новообразований, а также как предиктор ответа на анти-PD-1/PD-L1 иммунотерапию. В области иммунотерапевтического лечения рака яичников пока остаются неясными многие вопросы: как именно развивается патологический иммунный ответ при возникновении данных опухолей, как выявить наиболее перспективные опухоли для воздействия анти-PD-L1 и анти-PD-L2 антителами, какие системы оценки экспрессии молекулы в тканях использовать, какая комбинация препаратов с включением иммунотерапии будет наиболее эффективной и другие. В обзоре приведены сведения, уже полученные при поиске ответов на эти вопросы, и очерчен круг тех исследований, которые еще предстоит провести.

Ключевые слова: PD-1, PD-L1, иммунологические контрольные точки, иммунотерапия опухолей

Для корреспонденции: Александра Вячеславовна Асатурова. E-mail: a.asaturova@gmail.com

Для цитирования: Асатурова А.В., Трегубова А.В., Шушканова Д.В. Ингибирование контрольных точек иммунитета при раке яичников. Клини. эксп. морфология. 2020;9(1):11-19. DOI:10.31088/CEM2020.9.1.11-19

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 02.10.2019. **Получена после рецензирования** 06.11.2019. **Принята в печать** 19.11.2019.

Inhibition of immunity control points in ovarian cancer

A.V. Asaturova¹, A.V. Tregubova¹, D.V. Shushkanova²

¹ V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

² Moscow international laboratory of pathomorphology «Laboratory De Genie», Moscow, Russia

Immune checkpoints such as CTLA4 and PD1 and PD2 have significant impact on the immune response through T-cell function modulation. Tumor cells can use this mechanism to avoid immune surveillance through PD-L1 signaling pathway. Currently, the number of tumor immunotherapies is growing, including the application of anti-PD1 and anti-PDL1 monoclonal antibodies for specific immune response reactivation. Assessment of PD-L1 expression can be used as a potential prognostic biomarker for the efficacy of malignant tumor treatment and its duration as well as an immunotherapy-modulated response predictor. In the field of immunotherapeutic treatment of ovarian cancer, a number of questions remain unclear: how exactly does the pathological immune response develop when these tumors occur, how to identify the most promising tumors for exposure to anti-PDL1 and anti-PDL2 antibodies, which systems to use for the expression of molecules in tissues, which combination drugs with the inclusion of immunotherapy will be most effective and many others. The review provides information already obtained in the search for answers to these questions, and outlines the range of those studies that have yet to be carried out.

Keywords: PD-1, PD-L1, immune checkpoints, cancer immunotherapy

Corresponding author: Aleksandra V. Asaturova. E-mail: a.asaturova@gmail.com

For citation: Asaturova A.V., Tregubova A.V., Shushkanova D.V. Inhibition of immunity control points in ovarian cancer. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(1):11-19. (in Russ.) DOI:10.31088/CEM2020.9.1.11-19

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

Received 02.10.2019. **Received in revised form** 06.11.2019. **Accepted** 19.11.2019.

Введение

Иммунотерапия привлекает самое пристальное внимание исследователей во всем мире как перспективный подход к лечению широкого спектра опухолей различного гистогенеза, поскольку данный метод дает потенциальную возможность активировать естественные механизмы иммунной защиты для подавления опухолевого роста [1]. История иммунотерапии опухолей началась с работ американского хирурга Вильяма Коли, который в 1891 году впервые внедрил стрептококковые бактерии в организм пациента с неоперабельной формой рака. С формированием представления о компонентах и функциях иммунной системы развивались и различные подходы к использованию ее ресурсов для терапии опухолей. Как методы активной иммунотерапии изучались аллогенные трансплантаты стволовых клеток, местные инъекции агентов, вызывающих воспаление (например, вакцина БЦЖ), применение провоспалительных цитокинов, вакцины против рака, клеточная терапия [2]. Новым, наиболее привлекательным с точки зрения возможностей широкого применения подходом в иммунотерапии опухолей стало воздействие на механизмы регуляции активности клеточного звена иммунитета [3]. Обнаружение и уничтожение опухолевых клеток иммунной системой представляет собой сложный многоступенчатый процесс. Как известно, ведущую роль в обеспечении клеточного противоопухолевого иммунитета играют цитотоксические Т-лимфоциты, способные осуществлять лизис любых поврежденных клеток.

Концепция иммунного надзора над опухолью

Согласно данной концепции, клетки иммунной системы могут влиять на рост и прогрессию злокачественного новообразования, потенцируя локальное воспаление, продукцию специфических антител к опухолюассоциированным антигенам, цитолиз опухолевой клетки посредством NK-, NKT-клеток, CD8+ Т-лимфоцитов. Однако опухолевые клетки способны подавлять направленный иммунный ответ, используя различные механизмы, один из которых основан на передаче ингибирующего сигнала от рецепторов CTLA4 или PD-1 на CD8+ Т-лимфоцитах, что вызывает анергию опухолюспецифических клонов [4]. Рецептор PD-1 экспрессируется на поверхности активированных Т- и В-лимфоцитов [5]. Его взаимодействие с лигандом на опухолевых клетках и клетках опухолевого микроокружения приводит к увеличению иммуносупрессивного эффекта и способствует подавлению противоопухолевого иммунного ответа [6, 7]. PD-1 имеет два лиганда – PD-L1 (CD274; B7-H1) и PD-L2 (CD273; B7-DC) [8]. Ингибиторные лиганды PD-L1

и PD-L2 играют важную роль в иммунном гомеостазе. PD-L1 взаимодействует с двумя рецепторами – B7-1 (CD80) и PD-1 (CD279), экспрессируется на Т- и В-лимфоцитах, дендритных клетках, макрофагах, эндотелиальных, гемопоэтических и эпителиальных клетках [9–11]. Кроме того, экспрессия PD-L1 была обнаружена у взрослых пациентов на клетках многих типов злокачественных опухолей, таких как меланома [12], почечно-клеточный рак [13], немелкоклеточный рак легкого [14], опухоли головы и шеи [15], опухоли желудочно-кишечного тракта [16], рак яичника [17], лимфомы и лейкозы, а у детей – на клетках лимфомы Ходжкина, глио- и нейробластомы [18]. PD-L2 имеет ограниченную экспрессию на активированных макрофагах и дендритных клетках и связывается главным образом с PD-1 рецептором. В результате PD-1/PD-L1 взаимодействия происходит блокирование активации и пролиферации Т-лимфоцитов, а также продукции ими цитокинов и хемокинов [12]; индуцирование апоптоза CD8+ Т-лимфоцитов, направленных против опухолевых клеток [19]; дифференцировка CD4+ Т-лимфоцитов в Foxp3+ регуляторные Т-лимфоциты (Treg), участвующие в супрессии иммунного ответа.

Взаимодействие PD-1/PD-L1 в естественных условиях необходимо для предотвращения чрезмерного повреждения клеток и тканей при развитии хронического воспаления и активации иммунной системы в ответ на проникновение чужеродного агента, для блокирования иммунной системы во время беременности, приживления аллотрансплантата [20–22]. Активация PD-1/PD-L1/PD-L2 путей считается одним из ключевых механизмов развития иммуносупрессии при злокачественных новообразованиях, поэтому молекула PD-1 и ее лиганды PD-L1 и PD-L2 являются перспективными терапевтическими мишенями.

Микроокружение опухоли

Клеточный состав микроокружения опухоли также играет важную роль в блокировании противоопухолевого иммунного ответа и прогрессии новообразования. Опухоль может вызывать подавление иммунного ответа, повышая экспрессию блокирующих молекул, таких как PD-L1, как на клетках самого новообразования, так и на опухолюинфильтрирующих клетках [5]. Опухолевое микроокружение включает клетки самой опухоли, опухолюинфильтрирующие иммунные клетки (лимфоидные и миелоидные), способные стимулировать или ингибировать иммунный ответ, и стромальные клетки (опухольассоциированные фибробласты и эндотелиальные клетки), которые обуславливают структурную инте-

грацию опухоли [23]. FoxP3+/CD4+ Т-регуляторные клетки (Treg) и миелоидные супрессорные клетки (MDSCs) продуцируют противовоспалительные цитокины IL-10 и трансформирующий ростовой фактор (transforming growth factor, TGF) β , ингибируя активность Т-лимфоцитов [6, 7]. NK-клетки вырабатывают цитотоксические гранулы, содержащие перфорин и протеазы, и секретируют IFN γ , который активирует окружающие провоспалительные M1-макрофаги [24]. Противовоспалительные M2-макрофаги блокируют противоопухолевый иммунный ответ, продуцируя IL-10 и TGF β , и способствуют метастазированию опухоли путем высвобождения матриксных металлопротеиназ (matrix metalloproteinases, MMPs) [10]. MMPs и TGF β также секретируются окружающими тучными клетками [25].

Классификация опухолей в аспекте иммунного ответа

Наблюдаются четыре типа ответа на ингибирование иммунной контрольной точки [26]:

- 1) регресс основной линии поражения;
- 2) стабилизация заболевания с последующим медленным снижением опухолевой нагрузки;
- 3) отсроченный ответ после начального увеличения опухолевой нагрузки;
- 4) ответ после появления новых поражений.

Опухоли можно классифицировать на четыре группы на основе экспрессии PD-L1 и инфильтрации Т-клетками. Опухоли типа I (PD-L1-позитивный, TILs+) проявляют адаптивный иммунитет, устойчивость и, вероятно, реагируют на ингибиторы контрольных точек, тогда как опухоли типа II (PD-L1-негативные, TILs-) не обнаруживали явную иммунную реакцию и, вероятно, не будут отвечать на блокировку контрольной точки. Опухоли типа III (PD-L1-позитивные, TILs-) проявляют внутреннюю экспрессию PD-L1 без иммунной реактивности – это говорит о том, что сам PD-L не является прогностическим биомаркером ответа на антитела против pD-1/PD-L1. Опухоли типа IV (PD-L1-негативные, TILs+) могут быть нацелены на другие рецепторы контрольных точек (не-PD-1/PD-L1) [26].

Контрольные точки иммунитета и рак яичников: способы оценки

С учетом положительных результатов в области иммунотерапии таких опухолей как меланома и немелкоклеточный рак легкого сейчас в качестве потенциальных мишеней для воздействия иммунотерапевтических препаратов тестируются все новые и новые локализации. Не стали исключением и опухоли яичников, поскольку применяющиеся в настоящее время стратегии лечения данных опухолей зачастую не могут считаться успешными: две трети случаев рака яичников диагностируется на III–IV стадии, и возможности его лечения достаточно ограничены как с хирургиче-

ской точки зрения, так и с химиотерапевтической. В последние годы, несмотря на изменения парадигмы патогенеза рака яичников и получение дополнительных сведений о молекулярных подтипах данных опухолей, смертность от этого заболевания практически не уменьшилась [27, 28]. В связи с этим было проведено много исследований, посвященных возможности ингибирования контрольных точек иммунитета при раке яичников, не принимая во внимание то, что опухоли яичников являются самой разнообразной группой с морфологической и молекулярно-биологической позиции [28–41]. В то же время способы оценки полученных результатов в отношении экспрессии PD-L1, PD-1 и других связанных параметров в разных исследованиях значительно отличались и до сих пор никак не стандартизованы. Так, С. Xue et al. подсчитывали экспрессию PD-L1 и PD-L2 в клетках опухоли согласно рекомендациям К. Al-Shibli et al., которые оценивали экспрессию данных маркеров в немелкоклеточном раке легкого [30]. Исследователи считали положительной мембранную или цитоплазматическую окраску и результат выражали в H-score [31]. Таким образом, высокая экспрессия PD-L1 при раке яичников была выявлена в 44,16% случаев. Другая группа ученых получила более низкий процент PD-L1-позитивных случаев рака яичника (23%), при этом считая позитивными опухолями те, что имели не менее 5% позитивно окрашенных клеток (принималось во внимание мембранное и цитоплазматическое окрашивание) [32]. Некоторые авторы пользовались своей собственной системой, разработанной для конкретного исследования. Так, экспрессию PD-L1 оценивали в баллах от 0 до 4, где 0 соответствовал отсутствию экспрессии, а 4 – наиболее высокой экспрессии маркера [33]. Однако для сравнения исследований наиболее важными параметрами являлись локализация экспрессии, то, какие именно клетки оценивались (опухолевые или TILs), какая система детекции использовалась и какой порог был принят для отсека позитивных случаев.

Некоторые исследователи отдельно учитывали гистотип опухоли, что также является важным параметром. Было отмечено, что наиболее часто оценке подвергались серозные карциномы высокой степени злокачественности и светлоклеточные карциномы, экспрессия чаще оценивалась в опухолевых клетках, локализация экспрессии была преимущественно цитоплазматической и/или мембранной. В аспектах порога отсека и используемых клонов отмечено широкое разнообразие: при оценке экспрессии в процентах в качестве порогов принимались 1%, 5%, 10%, в баллах – 1 или 2, с применением индекса иммунного ответа (immune response score, IRS) – 4 и 6. В качестве клонов использовались E1L3N (CST, США), nbp1-03220 (Novus Biologicals), SP142 и SP 263 (Ventana) EPR 1161 (Abcam, Великобритания), ab205921 (Abcam, США) [34–41].

Контрольные точки иммунитета и рак яичников: сочетание с MSI и BRCA

Кроме изолированной оценки экспрессии PD-L1 в рамках определения возможности иммунотерапии пациенток с раком яичников и оценки факторов прогноза были также проведены исследования по выявлению корреляции между экспрессией данного маркера и такими параметрами как микросателлитная нестабильность и BRCA-статус.

Исследование микросателлитной нестабильности в раке яичников помимо собственной ценности (возможности таргетной терапии без учета гистотипа опухоли) также интересно с точки зрения сравнения с результатами, полученными при раке эндометрия, где была отмечена существенно более высокая экспрессия PD-L1/PD-1 в группе с наличием MSI в отличие от опухолей без MSI [42]. Даже принимая во внимание значительно более редкое выявление микросателлитной нестабильности при раке яичников, чем при раке эндометрия, выделение определенной морфологической группы, в которой MSI встречается значительно чаще (эндометриоидные и светлоклеточные карциномы), позволило бы выделить пациенток, наиболее перспективных с точки зрения потенциального применения иммунотерапии [43, 44]. Результаты, полученные специалистами при поиске корреляции MSI и экспрессии PD-L1 в раке яичников, существенно отличаются. Так, T. Minamoto et al. не выявили корреляции между MSI статусом и экспрессией CD8+ и PD-L1/PD-1 [32]. K. Jensen et al. показали, что экспрессия CD8+ и PD-1 в группе с MSI была существенно выше, чем без нее, при светлоклеточных карциномах [45]. Тем не менее общий процент таких пациенток (с позитивным MSI статусом и высокой экспрессией PD-L1) во всех исследованиях был весьма невелик (не более 8%), что свидетельствует об очень ограниченных возможностях комбинированной терапии, а клинические наблюдения связи между наличием MSI и эффективностью иммунотерапии до сих пор не проведены [32]. Что касается связи BRCA и экспрессии PD-L1, в нескольких исследованиях было показано, что опухоли с мутациями в генах BRCA1/2 имеют значительно более высокую экспрессию PD-1 и PD-L1, чем спорадические опухоли. В некоторых исследованиях более высокую экспрессию PD-1 и PD-L1 отмечали в отношении BRCA1 опухолей, чем BRCA2. Таким образом, пациентки с наследственным раком яичников с мутациями BRCA1/2 также являются особой группой для потенциально эффективной иммунотерапии [46, 47].

Контрольные точки иммунитета и рак яичников: факторы прогноза

Особенного внимания заслуживает оценка прогностической ценности PD-L1 и PD-1 у пациенток с раком яичников. Чтобы достоверно выяснить влияние PD-1 и PD-L1 на выживаемость у больных онкологического профиля, необходимо провести более масштабное

исследование для изучения этих факторов, молекул в ткани яичника, со стандартизированными протоколами, где определены пороговые значения для оценки положительного окрашивания. На эффективность реакции пациенток на терапию антителами, блокирующими PD-1/PD-L1, могут влиять плотность инфильтрации, другие предсуществующие или появляющиеся молекулы контрольных точек в опухолях, включая T-клеточный иммуноглобулин 3 (TIM-3), ген активации 3 лимфоцитов (LAG-3) и V-домен Ig-супрессор активации T-клеток (VISTA). Такие параметры как наличие миелоидного происхождения супрессорных клеток, уровни цитокинов (например, IL-10) и индоламин 2,3-диоксигеназы (IDO) тоже могут ограничить противораковые иммунные реакции на терапию блокаторами PD-1/PD-L1. Кроме того, генетические изменения внутри опухоли, включая перестройки ДНК, мутации, делеции и вставки, изменяют мутационную нагрузку в новообразовании, и было отмечено, что опухоли с высокой мутационной нагрузкой имеют наибольший отклик на терапию ингибиторами контрольных точек [48–50]. Следует также отметить важную роль гиперэкспрессии PD-L1 для опухолевого роста и метастазирования, что позволило предположить прогностическую значимость указанного маркера [51–53]. Проведенные клинические исследования показали, что данное предположение можно считать верным: уровень экспрессии молекулы PD-L1 опухолевыми клетками и клетками опухолевого микроокружения является потенциальным биомаркером прогнозирования течения злокачественных новообразований и может быть использован как предиктор ответа на анти-PD-1/PD-L1 иммунотерапию [54, 55]. Во многих исследованиях анти-PD-1/PD-L1 моноклональные антитела используют для анализа связи между клиническим улучшением и уровнем экспрессии PD-1 на опухолеинфильтрирующих T-лимфоцитах. Большинство из этих исследований показывает, что у пациентов с PD-L1-позитивными опухолями развивается больший ответ на терапию, чем у PD-L1-негативных [56]. Однако для пациенток с раком яичников результаты проведенных исследований достаточно разноречивы. Одни авторы убедительно показывают, что повышение экспрессии PD-L1 expression ассоциировано со значительно худшим прогнозом [34, 41]. Метаанализ, проведенный для установления прогностического значения PD-1/PD-L при раке яичников на основании исследований последних лет, показал, что позитивная экспрессия PD-L1 была в значительной мере ассоциирована с плохим прогнозом в исследованиях, проводимых в азиатских странах. При этом в других странах данный показатель, напротив, ассоциировался с хорошим прогнозом. При анализе гистотипов опухоли выявлено, что позитивная экспрессия PD-L1 была связана с низкой общей выживаемостью пациенток со светлоклеточными карциномами и длительной безрецидивной выживаемостью у пациенток с серозной карциномой высокой степени злокачественности.

Наряду с этим выявлена корреляция между клеточной принадлежностью PD-L1 позитивных клеток и выживаемостью – при экспрессии PD-L1 в TILs или в опухолюассоциированных иммунных клетках наблюдалась длительная безрецидивная и общая выживаемость больных [57]. Многие исследователи считают, что терапия антителами, направленная на модификацию PD-1/PD-L1-сигнального пути, при раке яичников будет максимально эффективной при использовании в сочетании с применением препаратов других биологических классов. Например, S. Grabosch et al. [58], выявили, что химиотерапевтическое воздействие препаратами, содержащими платину, и таксаном усиливает действие PD-L1. Кроме того, сочетание высоких доз ингибитора PD-L1 и цисплатина *in vivo* способно контролировать и снижать опухолевую нагрузку, даже если оптимальные сроки и дозировка еще не определены [59, 60].

Наибольший энтузиазм вызывают результаты, полученные при изучении комбинированной терапии метастазов меланомы, в том числе с применением различных ингибиторов контрольных точек иммунитета, которые ученые пытаются экстраполировать на опухоли других локализаций. Однако доклинические данные показали, что, вероятно, самая перспективная стратегия в подгруппе пациенток с BRCA-ассоциированным раком яичников, у которых также отмечается высокий уровень PD-1 и PD-L1, заключается в применении иммунотерапии в сочетании с ингибиторами поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP-ингибиторы) или химиотерапией на основе платины [61–63].

Разработка препаратов – блокаторов контрольных точек иммунитета (CTLA4, PD-1, PD-L1) с высоким противоопухолевым эффектом представляет огромный интерес для исследователей (в этом направлении иммунотерапии опухолей уже получены впечатляющие результаты), вселяет надежду и стимулирует поиск дальнейших решений в фундаментальных вопросах современной онкологии, который мог бы существенно расширить возможности подобных блокирующих реагентов. Стратификация опухолей позволила бы более точно определять целевую группу пациентов для каждого конкретного препарата, увеличив тем самым эффективность лечения. В настоящее время проводятся испытания препаратов (ниволумаб, пембролизумаб), ингибирующих PD-1/PD-L1-сигнальный путь, для рецидивирующих или рефрактерных опухолей. Изучение ниволумаба (BMS-936558/MDX1106) – первого анти-PD-1 моноклонального антитела – было начато в 2010 году. В первой фазе клинического исследования приняли участие 39 пациентов с рефрактерными опухолями с наличием метастазов: метастатической меланомой, колоректальным раком, немелкоклеточным раком легкого, раком почки, раком простаты. Уже в течение первой фазы испытания препарата был продемонстрирован явный противоопухолевый эффект ниволумаба при его относительной безопасности [64].

Дальнейшие клинические исследования проходили по ускоренной программе, и в декабре 2014 года Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (Food and Drug Administration, FDA) одобрило ниволумаб для лечения метастатической меланомы [65], а в марте 2015 года – для лечения метастатического рака легкого [66]. Другой анти-PD-1 препарат, пембролизумаб (MK3475), в проведенном исследовании KEYNOTE-001 также показал выраженный противоопухолевый эффект и высокую безопасность [67].

В октябре 2015 года FDA одобрило применение данного препарата в качестве второй линии лечения пациентов с метастатической меланомой и метастатическим раком легкого [66]. Кроме того, в мае 2014 года была завершена первая фаза клинических испытаний IgG1 анти-PD-L1 моноклонального антитела третьего поколения – атезолизумаба (MPDL3280A). В исследовании были включены 175 пациентов, страдавших разными формами рака: немелкоклеточным раком легкого, метастатической меланомой, почечно-клеточным раком. Примерно у 18% больных было зафиксировано уменьшение размеров опухолей. Авторы выяснили, что эффективнее препарат оказался у пациентов с высокой экспрессией PD-L1 и гена CTLA4 [68]. Несмотря на то, что для широкого применения данные препараты пока не одобрены ни для одного из подтипов рака яичников, клинические исследования, направленные на выявление эффективности анти-PD-L1 препаратов при раке яичников, достаточно обширны, в том числе с применением препаратов атезолизумаб, дурвалумаб, бевацизумаб, авелумаб, причем некоторые из этих исследований включают пациентов из Российской Федерации (согласно portalу clinicalTrial.gov). Противоопухолевая активность и выраженность побочных эффектов ингибиторов PD-L1 и PD-1 довольно схожи [69]. Ведутся работы по выявлению потенциальных различий в противоопухолевом эффекте и выраженности побочных реакций данных препаратов. Так, было показано, что при блокировании только PD-L1 сохраняется активность PD-L2, которая может снижать противоопухолевый иммунный ответ, но при этом сохраняется способность к предотвращению аутоагрессии против нормальных клеток организма [2].

В настоящее время не существует стандартизированных методов для оценки экспрессии PD-L1. Иммуногистохимическое окрашивание – наиболее распространенный метод, но и он не лишен недостатков. На результаты исследования влияют такие факторы как качество используемых анти-PD-L1 антител и метод фиксации исследуемого материала [24]. PD-L1 – динамический маркер, его экспрессия может изменяться со временем и зависит от проводимой терапии [2]. Тем не менее иммуногистохимический метод используется для оценки экспрессии PD-L1 в соответствии с динамическими изменениями в течение проводимой таргетной терапии.

Заключение

В заключение следует отметить, что данных для комплексного понимания иммунного опухолевого окружения при раке яичников и возможности его модификации пока недостаточно. Успехи иммунотерапии рака яичников можно назвать весьма скромными, поскольку в настоящее время наиболее чувствительные гистотипы данных опухолей малочисленны. В преобладающих же опухолях, серозных карциномах высокой степени злокачественности, доминирующий путь, управляющий подавлением противоопухолевого иммунитета, регулируется не столько и (или) не только PD-1/PD-L1. Вероятнее всего, в этом процессе принимают участие другие иммунные контрольные точки, однако их роль до конца не ясна. При этом комбинированное воздействие, в том числе и на эти пути (включая CTLA-4) в сочетании с анти-PD-1/PD-L1 терапией, может существенно повысить эффективность терапии рака яичников. Альтернативные подходы иммунотерапии в настоящее время находятся в фазе клинических испытаний и включают комбинации ингибиторов PD-1/PD-L1 с ингибиторами PARP, таргетно воздействующими на MDSC/макрофаги, адаптивные технологии иммунного переноса и ингибирование других путей иммуносигнализации (например, GAS6/AXL). Таким образом, крайне важно, чтобы планируемые исследования были направлены на оптимизацию прогностических биомаркеров для терапии анти-PD-1/PD-L1 и выяснение ключевых механизмов, регулирующих иммуносупрессию в этих опухолях.

Литература/References

1. *Chen DS, Mellman I.* Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1–10. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
2. *Swaika A, Hammond WA, Joseph RW.* Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol Immunol*. 2015;67(2PtA):4–17. DOI: 10.1016/j.molimm.2015.02.009.
3. *Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll DM, Chen L.* Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):95–106. DOI: 10.1038/nrc2051.
4. *Pardoll DM.* The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252–64. DOI: 10.1038/nrc3239.
5. *Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L.* B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999;5(12):1365–9. DOI: 10.1038/70932.
6. *Quezada SA, Peggs KS.* Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. *Br J Cancer*. 2013;108(8):1560–5. DOI: 10.1038/bjc.2013.117.
7. *Zeng J, Zhang XK, Chen HD, Zhong ZH, Wu QL, Lin SX.* Expression of programmed cell death-ligand 1 and its correlation with clinical outcomes in gliomas. *Oncotarget*. 2016;7(8):8944–55. DOI: 10.18632/oncotarget.6884.
8. *Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison J.* PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(9):4275–80. DOI: 10.1073/pnas.0915174107.
9. *Haworth KB, Leddon JL, Chen CY, Horwitz EM, Mackall CL, Cripe TP.* Going back to class I: MHC and immunotherapies for childhood cancer. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(4):571–6. DOI: 10.1002/pbc.25359.
10. *Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA.* Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(11):759–71. DOI: 10.1038/nrc3611.
11. *Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM.* Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):207–12. DOI: 10.1016/j.coi.2011.12.009.
12. *Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Heutin D et al.* Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007;110(1):296–304. DOI: 10.1182/blood-2006-10-051482.
13. *Thompson RH, Kwon ED.* Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2006;5(3):206–11. DOI: 10.3816/CGC.2006.n.038.
14. *Mao Y, Li W, Chen K, Xie Y, Liu Q, Yao M et al.* B7-H1 and B7-H3 are independent predictors of poor prognosis in patients with nonsmall cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015;6(5):3452–61. DOI: 10.18632/oncotarget.3097.
15. *Lyford-Pike S, Peng S, Young GD, Taube JM, Westra WH, Akpeng B et al.* Evidence for a role of the PD-1: PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2013;73(6):1733–41. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2384.
16. *Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N et al.* Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2947–53. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1469.
17. *Maine CJ, Aziz NH, Chatterjee J, Hayford C, Brewig N, Whilding L et al.* Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(3):215–24. DOI: 10.1007/s00262-013-1503-x.
18. *Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P et al.* MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*. 2011;471(7338):377–81. DOI: 10.1038/nature09754.
19. *Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793–800. DOI: 10.1038/nm730.
20. *Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH et al.* Restoring function in exhausted CD8 T-cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439(7077):682–7. DOI: 10.1038/nature04444.
21. *Shen JK, Cote GM, Choy E, Yang P, Harmon D, Schwab J et al.* Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma.

- Cancer Immunol Res. 2014;2(7):690–8. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0224.
22. Ramsay AG. Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumor T-cell immunity. *Br J Haematol.* 2013;162(3):313–25. DOI: 10.1111/bjh.12380.
 23. Liu T, Han C, Wang S, Fang P, Ma Z, Xu L et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):86. DOI: 10.1186/s13045-019-0770-1.
 24. Mentlik JA, Cohen AD, Campbell KS. Combination immune therapies to enhance anti-tumor responses by NK cells. *Front Immunol.* 2013;4:481. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00481.
 25. Krstic J, Santibanez JF. Transforming growth factor beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. *Scientific World Journal.* 2014;2014:521754. DOI: 10.1155/2014/521754.
 26. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL, Singh N, Nottegar A, Bosse T et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol.* 2019;pii:mdz116. DOI: 10.1093/annonc/mdz116.
 27. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Niksic M et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): Analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet.* 2018;391(10125):1023–75. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
 28. Nezhat FR, Apostol R, Nezhat C, Pejovic T. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention. *Am J Obstet Gynecol.* 2015;213(3):262–7. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.03.044.
 29. Levinson K, Dorigo O, Rubin K, Moore K. Immunotherapy in Gynecologic Cancers: What We Know Now and Where We Are Headed. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book.* 2019;39; e126–e140. DOI: 10.1200/EDBK_237967
 30. Al-Shibli K, Al-Saad S, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund LT et al. The prognostic value of intraepithelial and stromal innate immune system cells in non-small cell lung carcinoma. *Histopathology.* 2009;55(3):301–12. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2009.03379.x.
 31. Xue C, Zhu D, Chen L, Xu Y, Xu B, Zhang D et al. Expression and prognostic value of PD-L1 and PD-L2 in ovarian cancer. *Transl Cancer Res.* 2019;8(1):111–9. DOI: 10.21037/tcr.2019.01.09.
 32. Yamashita H, Nakayama K, Ishikawa M, Ishibashi T, Nakamura K, Sawada K et al. Relationship between Microsatellite Instability, Immune Cells Infiltration, and Expression of Immune Checkpoint Molecules in Ovarian Carcinoma: Immunotherapeutic Strategies for the Future. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20):5129. DOI: 10.3390/ijms20205129.
 33. Drakes ML, Mehrotra S, Aldulescu M, Potkul RK, Liu Y, Grisoli A et al. Stratification of ovarian tumor pathology by expression of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand-1(PD-L1) in ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2018;11(1):43. DOI: 10.1186/s13048-018-0414-z.
 34. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(9):3360–5. DOI: 10.1073/pnas.0611533104
 35. Wang Q, Lou W, Di W, Wu X. Prognostic value of tumor PD-L1 expression combined with CD8(+) tumor infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer. *Int Immunopharmacol.* 2017;52:7–14. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.08.017.
 36. Xu M, Zhang B, Zhang M, Yang L, Feng-Lin Y, Xia L et al. Clinical relevance of expression of B7- H1 and B7-H4 in ovarian cancer. *Oncol Lett.* 2016;11:2815–9. DOI: 10.3892/ol.2016.4301.
 37. Webb JR, Milne K, Kroeger DR, Nelson BH. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2016;141(2):293–302. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.03.008.
 38. Mills AM, Peres LC, Meiss A, Ring KL, Modesitt SC, Abbott SE et al. Targetable immune regulatory molecule expression in high-grade serous ovarian carcinomas in African american women: a study of PD-L1 and IDO in 112 cases from the African American Cancer Epidemiology Study (AACES). *Int J Gynecol Pathol.* 2019;38(2):157–70. DOI: 10.1097/PGP.0000000000000494
 39. Li M, Li H, Fei L, Bi R, Tu X, Chen L et al. Characterization of ovarian clear cell carcinoma using target drug-based molecular biomarkers: implications for personalized cancer therapy. *J Ovarian Res.* 2017;10:9. DOI: 10.1186/s13048-017-0304-9.
 40. Mesnage SJL, Auguste A, Genestie C, Dunant A, Pain E, Drusch F et al. Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC). *Ann Oncol.* 2017;28(3):651–7. DOI: 10.1093/annonc/mdw625.
 41. Zhu J, Wen H, Bi R, Wu Y, Wu X. Prognostic value of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in ovarian clear cell carcinoma. *J Gynecol Oncol.* 2017;28(6):e77. DOI: 10.3802/jgo.2017.28.e77.
 42. Yamashita H, Nakayama K, Ishikawa M, Nakamura K, Ishibashi T, Sanuki K et al. Microsatellite instability is a biomarker for immune checkpoint inhibitors in endometrial cancer. *Oncotarget.* 2017;9(5):5652–64. DOI: 10.18632/oncotarget.23790.
 43. Rambau PF, Duggan MA, Ghatage P, Warfa K, Steed H, Perrier R et al. Significant frequency of MSH2/MSH6 abnormality in ovarian endometrioid carcinoma supports histotype-specific Lynch syndrome screening in ovarian carcinomas. *Histopathology.* 2016;69(2):288–97. DOI: 10.1111/his.12934.
 44. Howitt BE, Strickland KC, Sholl LM, Rodig S, Ritterhouse LL, Chowdhury D et al. Clear cell ovarian cancers with microsatellite instability: A unique subset of ovarian cancers with increased tumor-infiltrating lymphocytes and PD-1/PD-L1 expression. *Oncoimmunology.* 2017;6(2):e1277308. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1277308.
 45. Jensen KC, Mariappan MR, Putcha GV, Husain A, Chun N, Ford JM et al. Microsatellite Instability and Mismatch Repair Protein Defects in Ovarian Epithelial Neoplasms in Patients 50 Years of Age and Younger. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008;32(7):1029–37. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31816380c4.
 46. Strickland KC, Howitt BE, Shukla SA, Rodig S, Ritterhouse LL, Liu JF et al. Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade

- serous ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016;7(12):13587–98. DOI: 10.18632/oncotarget.7277.
47. *Wiese V, Gaugg I, Fleischer M, Shivalingaiah G, Wenzel S, Sprung S et al.* BRCA1/2 and TP53 mutation status associates with PD-1 and PD-L1 expression in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2018;9(25):17501–11 DOI: 10.18632/oncotarget.24770
 48. *Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A et al.* Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol*. 2019;30(1):44–56. DOI: 10.1093/annonc/mdy495.
 49. *Fancellò L, Gandini S, Pelicci P-G, Mazzarella L.* Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):183 DOI: 10.1186/s40425-019-0647-4.
 50. *Forschner A, Battke F, Hadaschik D, Schulze M, Weißgraeber S, Han CT et al.* Tumor mutation burden and circulating tumor DNA in combined CTLA-4 and PD-1 antibody therapy in metastatic melanoma- results of a prospective biomarker study. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):180. DOI: 10.1186/s40425-019-0659-0.
 51. *Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y.* PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(5):1111–22. DOI: 10.1080/21645515.2019.1571892.
 52. *Gong J, Chehrizi-Raffle A, Reddi S, Salgia R.* Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):8. DOI: 10.1186/s40425-018-0316-z.
 53. *Dent P, Booth L, Poklepovic A, Hancock JF.* Signaling alterations caused by drugs and autophagy. *Cell Signal*. 2019;64:109416. DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.109416,
 54. *Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X et al.* Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Mol Cancer*. 2018;17:129. DOI: 10.1186/s12943-018-0864-3.
 55. *Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB.* Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016;17(12):e542–e551. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30406-5.
 56. *Conroy JM, Pabla S, Nesline MK, Glenn ST, Papanicolaou-Sengos A, Burgher B et al.* Next generation sequencing of PD-L1 for predicting response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):18. DOI: 10.1186/s40425-018-0489-5.
 57. *Huang LJ, Deng XF, Chang F, Wu XL, Wu Y, Diao QZ.* Prognostic significance of programmed cell death ligand 1 expression in patients with ovarian carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(43):e12858. DOI: 10.1097/MD.00000000000012858.
 58. *Grabosch S, Zeng F, Zhang L, Strange M, Brozick J, Edwards RP et al.* PD-L1 biology in response to chemotherapy in vitro and in vivo in ovarian cancer. *J Immunother Cancer*. 2015;3(Suppl2):P302. DOI: 10.1186/2051-1426-3-S2-P302.
 59. *Grabosch S, Bulatovic M, Zeng F, Ma T, Zhang L, Ross M et al.* Cisplatin-induced immune modulation in ovarian cancer mouse models with distinct inflammation profiles. *Oncogene*. 2019;38(13):2380–93. DOI: 10.1038/s41388-018-0581-9.
 60. *Zhang L, Chen Y, Li F, Bao L, Liu W.* Atezolizumab and Bevacizumab Attenuate Cisplatin Resistant Ovarian Cancer Cells Progression Synergistically via Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition *Front Immunol*. 2019;10:867. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00867.
 61. *Jiao S, Xia W, Yamaguchi H, Wei Y, Chen MK, Hsu JM et al.* PARP Inhibitor Upregulates PD-L1 Expression and Enhances Cancer-Associated Immunosuppression. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3711–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3215.
 62. *Boussios S, Karihtala P, Moschetta M, Karathanasi A, Sadauskaitė A, Rassy E et al.* Combined Strategies with Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors for the Treatment of Ovarian Cancer: A Literature Review. *Diagnostics (Basel)*. 2019;9(3). pii: E87. DOI: 10.3390/diagnostics9030087.
 63. *Fan CA, Reader J, Roque DM.* Review of Immune Therapies Targeting Ovarian Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2018;19(12):74. DOI: 10.1007/s11864-018-0584-3.
 64. *Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH et al.* Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*. 2010;28(19):3167–75. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.7609.
 65. *Deeks ED.* Nivolumab: a review of its use in patients with malignant melanoma. *Drugs*. 2014;74(11):1233–9. DOI: 10.1007/s40265-014-0234-4.
 66. *Reichert JM.* Antibodies to watch in 2015. *MAbs*. 2015;7(1):1–8. DOI: 10.4161/19420862.2015.988944.
 67. *Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L et al.* Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *New Engl J Med*. 2015;372(26):2521–32. DOI: 10.1056/NEJMoa1503093.
 68. *Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А.* Иммунотерапия опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов»). *Медицинская иммунология*. 2015;17(5):395–406. *Bogolubova AE, Efimov GA, Druskaya MC, Nedospasov SA.* Cancer immunotherapy based on the blockade of immune checkpoints. *Medical immunology*. 2015,17(5):395–406 (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2015-5-395-406.
 69. *Хохлова С.В., Кушлинский Д.Н.* Лекарственное лечение больных раком яичников. Часть 2. Антиангиогенные препараты и производные платины в лечении больных раком яичников: основные принципы терапии рецидивов. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2018;8:13–26. *Khokhlova SV, Kushlinsky DN.* Drug treatment for patients with ovarian cancer. Part 2. Anti-angiogenic drugs, their combination with taxanes and platinum derivatives in the treatment of patients with ovarian cancer: basic principles of relapse therapy. *Biological and medical chemistry questions*. 2018;8:13–26 (In Russ.).

Информация об авторах

Асатурова Александра Вячеславовна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Трегубова Анна Васильевна – младший научный сотрудник патологоанатомического отделения НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Шушканова Дарья Витальевна – врач-патологоанатом московской международной лаборатории патоморфологии «Лаборатуар Де Жени».

Author information

Aleksandra V. Asaturova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Pathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0001-8739-5209>

Anna V. Tregubova – Junior Researcher, Pathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0003-4601-1330>

Darya V. Shushkanova – Pathologist, Moscow International Laboratory of Pathomorphology «Laboratory De Genie».

<https://orcid.org/0000-0002-7060-3179>

Сложности цитологической диагностики фиброэпителиальных опухолей: фиброаденома и филлоидная опухоль

Л.М. Родионова, Л.В. Мехеда, Л.Я. Фомина

ФГБУ НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

Фиброэпителиальные опухоли (фиброаденома и филлоидная опухоль) характеризуются как новообразования, имеющие двухкомпонентное строение с преобладанием соединительнотканного компонента. Филлоидная опухоль является редким фиброэпителиальным новообразованием со своеобразным клиническим течением и полиморфизмом морфологического строения, что объясняет ограниченную осведомленность врачей как о природе указанных процессов, так и о принципах лечебных подходов. Часто филоидную опухоль ошибочно диагностируют как фиброаденому молочной железы, в связи с чем цитологу необходимо иметь дополнительные клинические данные о пациенте, без которых диагноз ставить нельзя.

С целью оценки цитологической диагностики фиброаденомы и листовидной (филоидной) опухоли нами был проведен анализ диагностических возможностей. Кроме того, нами изучены причины расхождений при диагностике филоидной опухоли. Особенно сложной в постановке диагноза оказалась доброкачественная форма филоидной опухоли. Наименьшие трудности вызывала диагностика пограничной и злокачественной формы филоидной опухоли.

Нами были определены клинические и морфологические признаки, наиболее значимые для диагностики филоидной опухоли.

Ключевые слова: фиброэпителиальные опухоли, фиброаденома, филоидная опухоль, листовидная опухоль

Для корреспонденции: Лилия Яшаровна Фомина. E-mail: 3050244@gmail.com

Для цитирования: Родионова Л.М., Мехеда Л.В., Фомина Л.Я. Сложности цитологической диагностики фиброэпителиальных опухолей: фиброаденома и филоидная опухоль. Клини. эксп. морфология. 2020;9(1):20–29. DOI:10.31088/CEM2020.9.1.20-29

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 04.12.2019. Получена после рецензирования 28.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

Difficulties in the cytological diagnosis of fibroepithelial tumors: fibroadenoma and phylloid tumor

L.M. Rodionova, L.V. Mekheda, L.Y. Fomina

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russia

Fibroepithelial tumors (fibroadenoma and phylloid tumor) are characterized as neoplasms with a two-component structure with a predominant connective tissue component.

A phylloid tumor is a rare fibroepithelial neoplasm with a peculiar clinical course and morphological polymorphism, as a result of which physicians have a limited understanding both of the nature of these processes and of the management tactics.

Phylloid fibroadenoma of the breast is often mistakenly diagnosed as breast fibroadenoma, and therefore the cytologist must obtain additional clinical data on the patient for the correct diagnosis.

We analyzed diagnostic capabilities of cytological diagnostics of fibroadenoma and leaf-shaped (phylloid) tumor. In addition, we have studied the causes of misdiagnosing. Benign form of phylloid tumor was especially difficult to identify whereas borderline and malignant forms of phylloid tumor caused the least difficulties. In conclusion, we have determined the most significant clinical and morphological features of phylloid tumor.

Keywords: fibroepithelial tumors, fibroadenoma, phylloid tumor, leaf-shaped tumor

Corresponding author: Liliya Y. Fomina. E-mail: 3050244@gmail.com

For citation: Rodionova L.M., Mekheda L.V., Fomina L.Y. Difficulties of cytological diagnostics of fibroepithelial tumors: fibroadenoma and phylloid tumor. Clin. exp. morphology. 2020;9(1):20–29 (In Russ.) DOI:10.31088/CEM2020.9.1.20-29

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

Received 04.12.2019. Received in revised 28.01.2020. form Accepted 11.02.2020.

Введение

Фиброаденома (ФА) является довольно частой доброкачественной опухолью. Встречается в любом возрасте, но чаще в 20–45 лет. Это, как правило, небольшое плотное относительно подвижное новообразование размером от 0,7 до 3,5 см. Кожа над ФА не изменена, безболезненна. По данным УЗИ образование имеет четкие контуры.

Цитологическое заключение «фиброаденома» можно дать только в тех случаях, когда цитограмма представлена мелкими кубическими клетками, расположенными изолированно друг от друга, группами и своеобразными длинными ветвящимися тяжами (рис. 1 А, В). Ядра клеток округлые или овальные, одинаковой величины, с равномерным распределением хроматина. Ядрышки не определяются. Обнаруживаются «голаядерные» элементы, которые могут составлять фон препарата. Встречаются так называемые голые «целующиеся» ядра (рис. 1 С). Иногда фон препарата представлен мелкозернистым или гомогенным розовым межклеточным веществом (рис. 1 D), в котором могут быть «замурованы» эпителиальные клетки (рис. 1 E). Также присутствуют хотя бы единичные клетки стромы – фибробласты и фиброциты.

Филлоидные (листовидные) опухоли (рис. 2) являются редким заболеванием и составляют 1% от всех новообразований молочных желез. Существующие методы исследования молочных желез (ультразвуковой, рентгенологический, цитологический) не имеют достоверных критериев для диагностики филлоидных опухолей (ФО) и не позволяют дифференцировать различные гистологические варианты этих новообразований [1].

Появляющиеся в литературе сообщения о редких случаях ФО носят, как правило, описательный характер, что лишь подчеркивает трудности дифференциальной диагностики и выбора эффективной тактики лечения для таких больных. Диагностика ФО весьма затруднительна еще и потому, что число этих пациентов невелико и требует высокой квалификации как от клинициста, так и от морфолога.

Филлоидная опухоль характеризуется преобладанием соединительнотканного компонента, склонностью к рецидивированию и большой вероятностью малигнизации. Риск рецидива при доброкачественной ФО составляет 4,7–30%, при пограничной и злокачественной ФО – 30–65% [2]. Однако нередко ФО ошибочно принимают за ФА молочных желез. Такие ошибки в диагностике приводят к неправильной тактике лечения пациентов.

Клинически ФО представляет собой гладкую при пальпации многоузловую структуру, достигающую 5–6 см в диаметре (иногда до 41 см).

В более крупных по размерам ФО могут наблюдаться кистозно расширенные полости (расщелины), а сама опухоль может иметь вид «цветной капусты». В некоторых случаях встречаются очаги кровоизлияний, что является признаком быстрого роста опухоли и возможной ее малигнизации.

В Международной гистологической классификации ВОЗ 2012 года в разделе фиброэпителиальных новообразований выделена группа филлоидных опухолей, которые подразделяются на доброкачественные, пограничные и злокачественные.

Доброкачественные ФО (рис. 3) характеризуются повышенной стромальной клеточностью с легкой или умеренной клеточной атипией и низкой митотической активностью (менее 4 митозов в 10 полях зрения) [3]. При определении ploидности с помощью проточной цитофлуориметрии в доброкачественных ФО была выявлена 100% диплоидия клеток опухоли. Отдаленные рецидивы в группе доброкачественных ФО не встречались.

Пограничные ФО (рис. 4) имеют большую степень стромальной клеточности, более выраженный полиморфизм и атипию фибробластических клеток. Количество митозов составляет от 4 до 9 в 10 полях зрения (при $\times 400$). Отдаленные рецидивы редки.

В пограничных ФО с помощью проточной цитофлуориметрии при определении ploидности клеток выявлены как диплоидные, так и анеуплоидные клетки. Определяется высокий индекс пролиферативной активности (Ki 67 – 48%). Число делящихся клеток в G2 + M фазе равно 19,8%, что близко к показателям сарком. В дальнейшем, при рецидиве через 6 месяцев, число делящихся клеток в G2 + M фазе подтверждалось [4].

При злокачественной филлоидной опухоли/периканаликулярной стромальной опухоли низкой степени злокачественности (гистологическая классификация 2012 года) обнаруживаются обширные участки оксифильных масс, в которых замурованы многочисленные опухолевые клетки (рис. 5 и 6). Оксифильные массы образуют тяжи в виде ярко-малиновых нитевидных субстанций [5].

Диагноз «злокачественная филлоидная опухоль» можно ставить только в том случае, если в препарате обнаружены эпителий и злокачественные мезенхимальные клетки (клетки саркомы).

Способность ФО к рецидивированию, малигнизации и развитию саркомы является основной особенностью листовидных опухолей.

Средний размер опухоли составляет от 5 до 9 см. В редких случаях опухоль размерами около 1,1 см уже может являться ФО. Размер новообразования не относится к прогностическим факторам (описан случай метастазирования опухоли размером 2 см).

Большинство авторов указывают на большую частоту малигнизации опухолей больших размеров. Развитие рецидива при доброкачественном и промежуточном варианте листовидной опухоли ассоциируется с более высоким уровнем эстрогенов по сравнению с таковым при благоприятном течении заболевания. По мере нарастания злокачественности новообразования (от доброкачественной листовидной опухоли до саркомы молочных желез) снижается уровень прогестеронов [6].

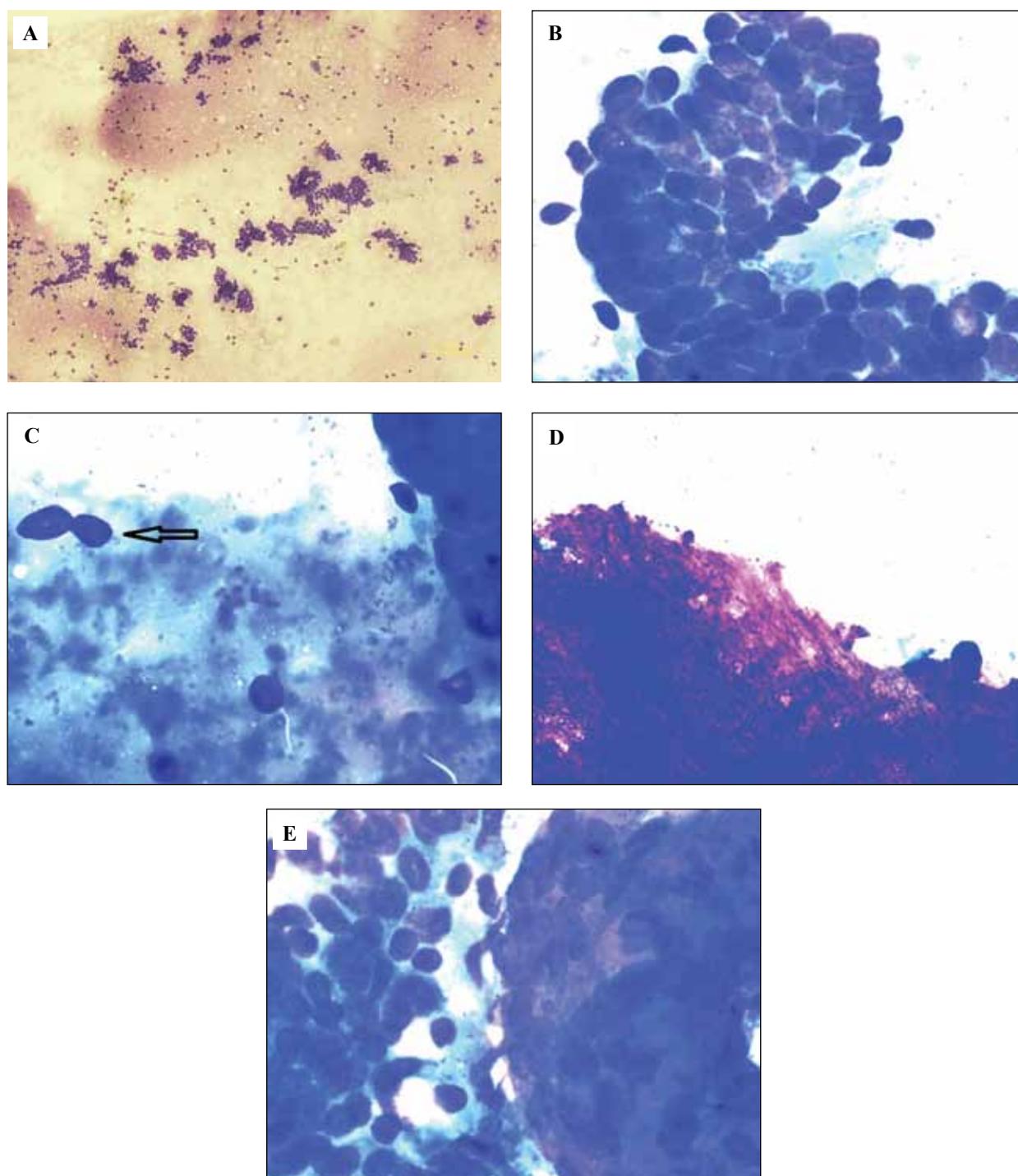


Рис. 1. Фиброаденома молочной железы. Цитологические препараты. Окраска по Лейшману.

A – мелкие кубические эпителиальные клетки, расположенные изолированно друг от друга, группами и своеобразными длинными ветвящимися тяжами, $\times 10$. B – скопление пролиферирующих эпителиальных клеток, $\times 100$. C – голые «целующиеся» ядра, $\times 100$. D – бесструктурное оксифильное вещество, $\times 100$. E – скопление пролиферирующих эпителиальных клеток, «замурованных» в бесструктурном оксифильном веществе, $\times 100$

Fig. 1. Breast fibroadenoma. Cytological slides. Leishman stain.

A – small cuboidal epithelial cells either isolated from each other, or in cell groups and peculiar long branching strands, $\times 10$. B – clusters of proliferating epithelial cells, $\times 100$. C – naked «kissing» nuclei, $\times 100$. D – structureless oxyphilic substance, $\times 100$. E – clusters of proliferating epithelial cells in structureless oxyphilic substance, $\times 100$



Рис. 2. Пациентка с диагнозом «филлоидная (листовидная) опухоль левой молочной железы». Молочная железа резко увеличена в размере, выражен сосудистый рисунок
Fig. 2. A patient diagnosed with a phyloid (leaf) tumor of the left breast. The mammary gland is increased in size, with prominent vascular pattern

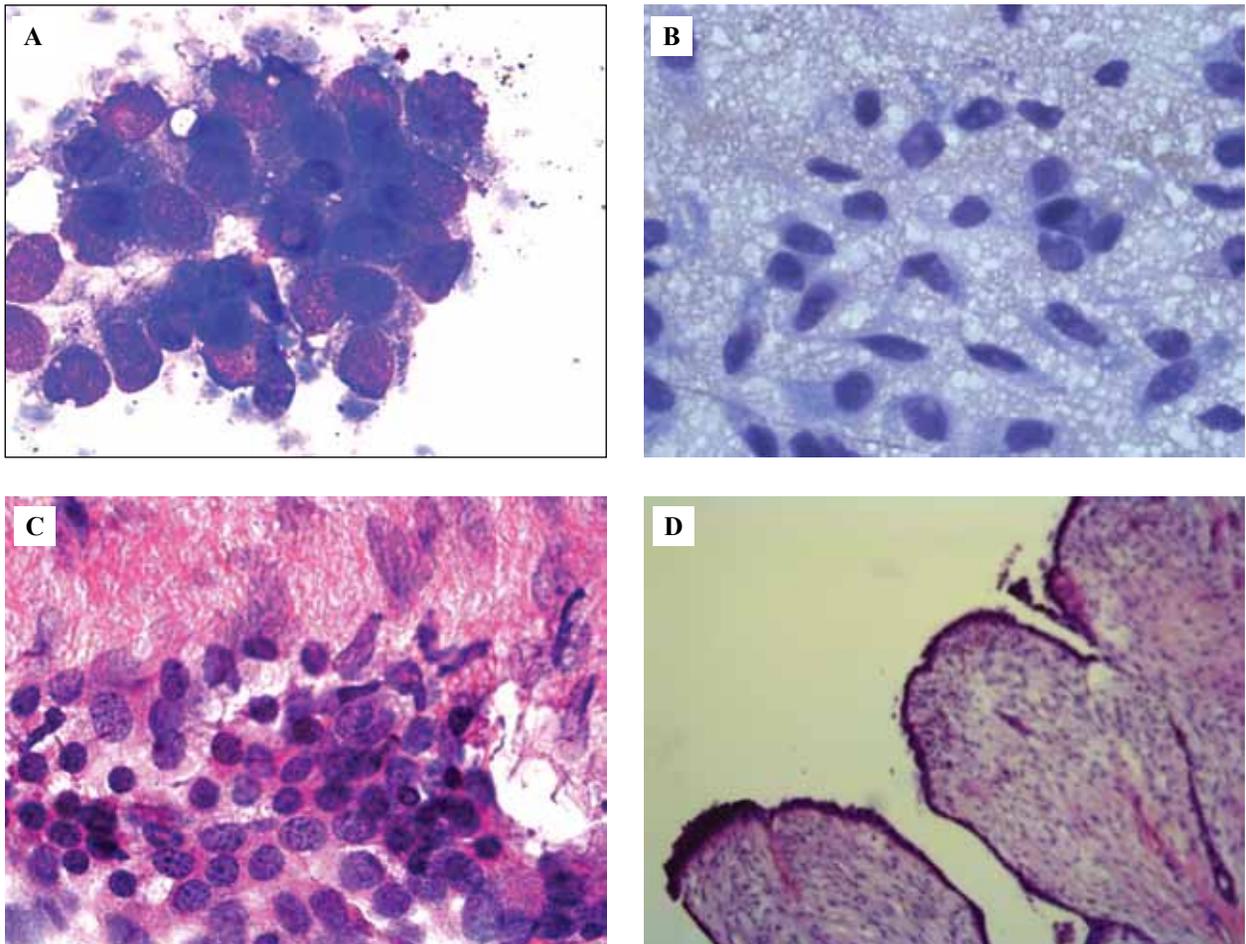


Рис. 3. Доброкачественная филлоидная опухоль молочной железы.
 А – скопление пролиферирующих эпителиальных клеток с легкой степенью атипии. Цитологический препарат. Окрашивание по Лейшману, $\times 100$. В – фибробластические клетки. Гистологический препарат. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$. С – пролиферирующие эпителиальные клетки с легкой степенью атипии. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 100$. D – гистологический препарат. Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 10$

Fig. 3. Benign phyloid tumor of the breast.
 A – clusters of proliferating epithelial cells with a mild atypia. Cytological slide. Leishman stain, $\times 100$. B – fibroblastic cells. Histological slide. H&E stain, $\times 100$. C – proliferating epithelial cells with a mild atypia. H&E stain, $\times 100$. D – histological slide. H&E stain, $\times 10$

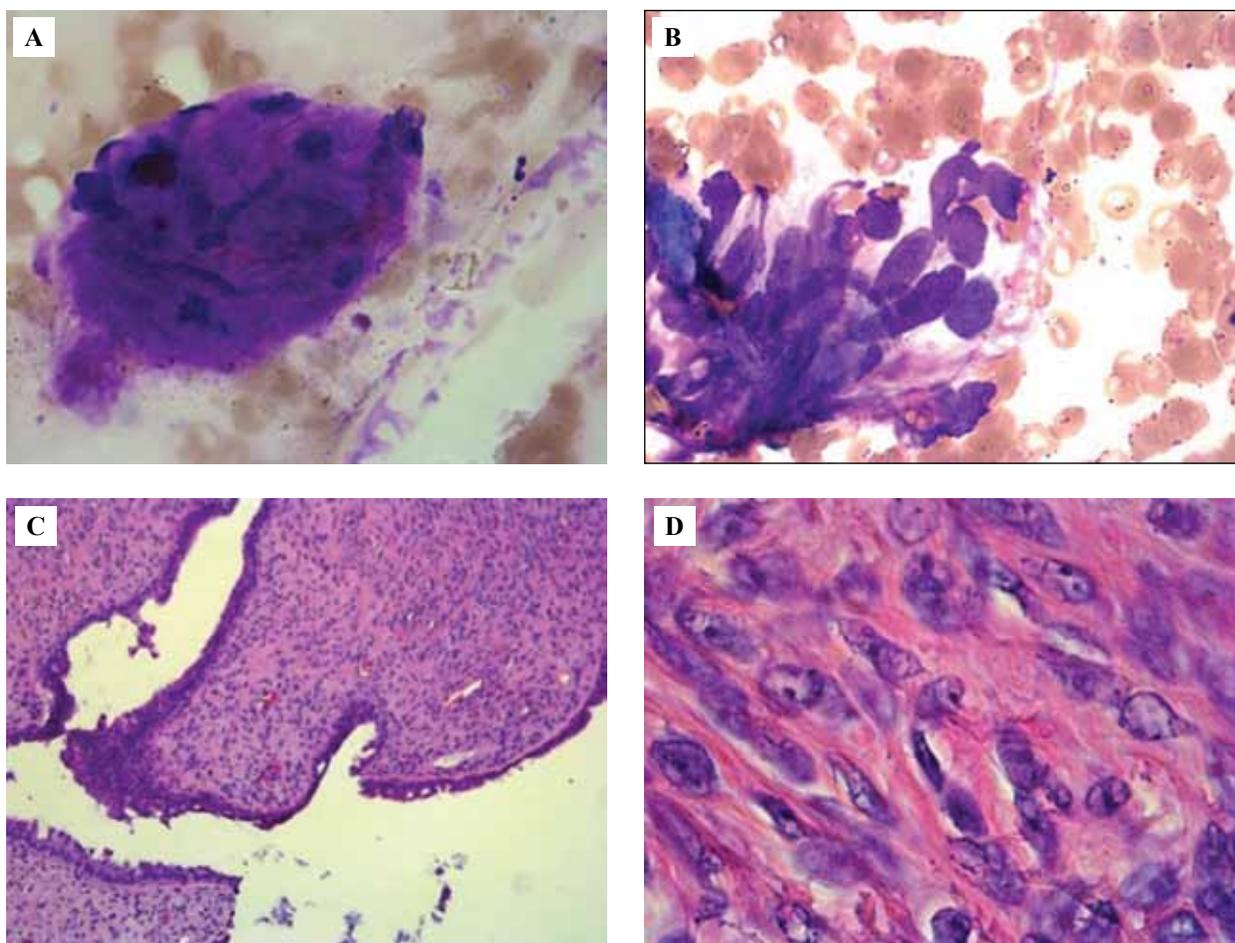


Рис. 4. Пограничная филоидная опухоль молочной железы.

А – элементы стромы в оксифильном веществе. Цитологический препарат. Окрасивание по Лейшману, $\times 100$.

В – полиморфные фибробластические клетки. Цитологический препарат. Окрасивание по Лейшману, $\times 100$.

С – гистологический препарат. Окрасивание гематоксилином и эозином, $\times 10$.

Д – гистологический препарат. Окрасивание гематоксилином и эозином, $\times 100$.

Fig. 4. Borderline phyllodes tumor of the breast.

A – stromal elements in an oxyphilic substance. Cytological slide. Leishman stain, $\times 100$.

B – polymorphic fibroblast cells. Cytological slide. Leishman stain, $\times 100$. C – histological slide. H&E stain, $\times 10$.

D – histological slide. H&E stain, $\times 100$.

Наиболее значимыми и хорошо изученными молекулярно-генетическими маркерами в возникновении опухоли молочных желез являются мутации генов-супрессоров BRCA1/2, TP53. Делеции и хромосомные перестройки зоны гена FHIT (локус D 35/300) 3p12-p14 были описаны как в стромальном, так и в эпителиальном компонентах ФО. Эти данные подтверждают, что оба компонента являются частью неопластического процесса. Делеция короткого плеча хромосомы 1 (1p) и аллельный дисбаланс были ассоциированы с более агрессивным течением и рецидивированием опухоли. При молекулярно-генетическом исследовании ФО у пациенток с множественными и контралатеральными ФО характерно выявление потери гетерозиготности ряда локусов, не характерных для ФА, в частности потеря локусов 1q42; 3p24.1; 4q34; 7p21; 7p12.3-p13; 7q21.2-q22.1; 9p21.2-p21.3;

10p12.1-p14; 15q21; 16q23.1; 16q23.3-q24.1; 17p12-p13; 20p12-p13 [7].

Цель работы – определить морфологические и клинические признаки для диагностики ФО.

Материалы и методы

Нами был проведен ретроспективный пересмотр цитологических препаратов 26 пациенток с диагнозом «фиброаденома» (возраст от 20 до 67 лет). Из них 17 пациенток с узлами диаметром 0,7–2,0 см, пять пациенток – 2,5–3,0 см, четыре пациентки – 3,5–4,0 см. Также были проанализированы 13 пациенток с ФО (возраст от 28 до 87 лет). Из них три пациентки с доброкачественной ФО, семь пациенток с пограничной ФО, три пациентки со злокачественной ФО. Был проведен сравнительный анализ цитологических и гистологических заключений в данных группах пациенток.

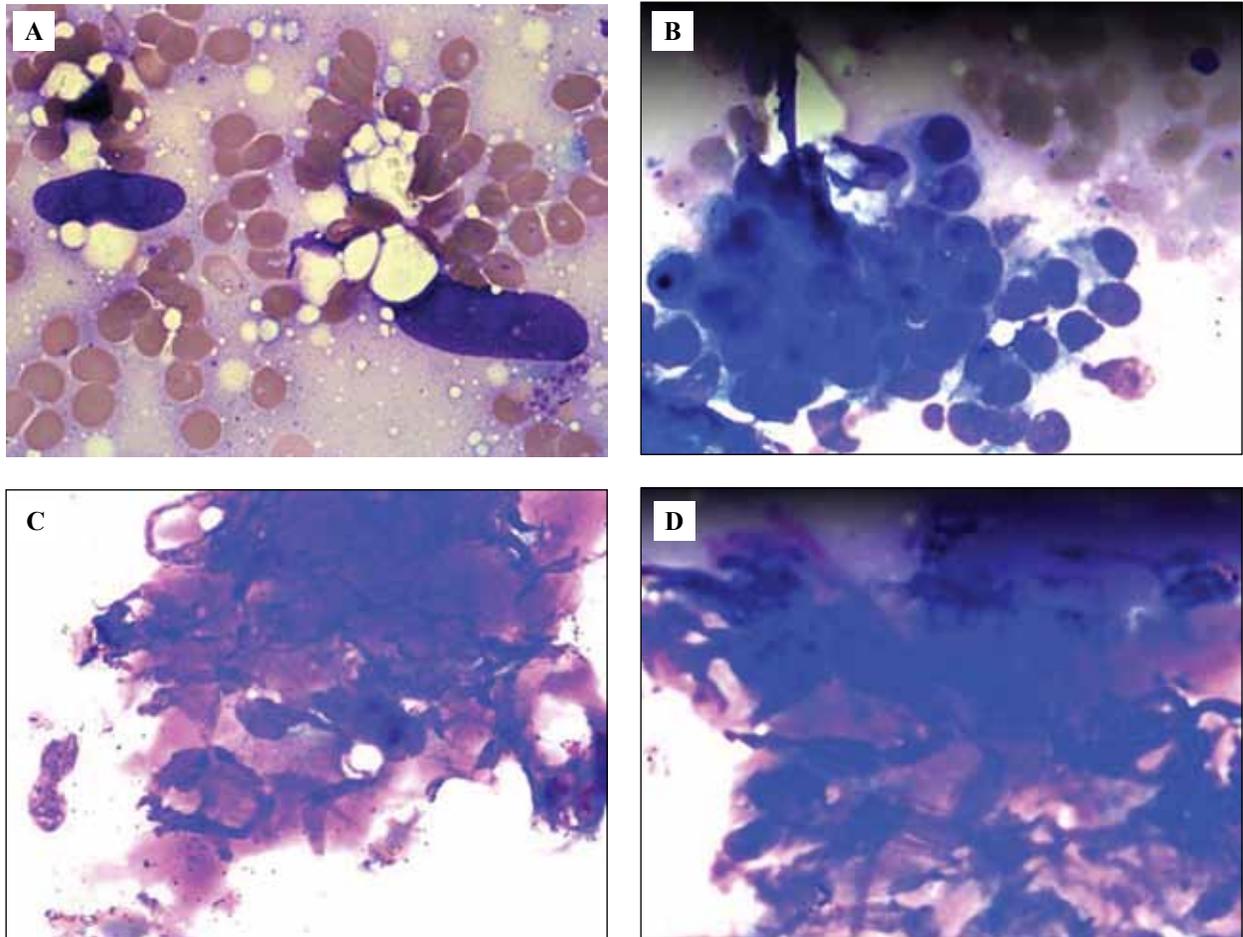


Рис. 5. Злокачественная филлоидная опухоль молочной железы. Окраска по Лейшману. Цитологические препараты.
 А, В – злокачественные клетки филлоидной опухоли, $\times 100$. С, D – разрушенные злокачественные элементы стромы
 в миксоматозном веществе, $\times 100$

Fig. 5. Malignant phyllodes tumor of the breast. Leishman stain. Cytological slides.

A, B – malignant cells of the phyllodes tumor, $\times 100$. C, D – destroyed malignant elements of the stroma in the myxomatous substance, $\times 100$

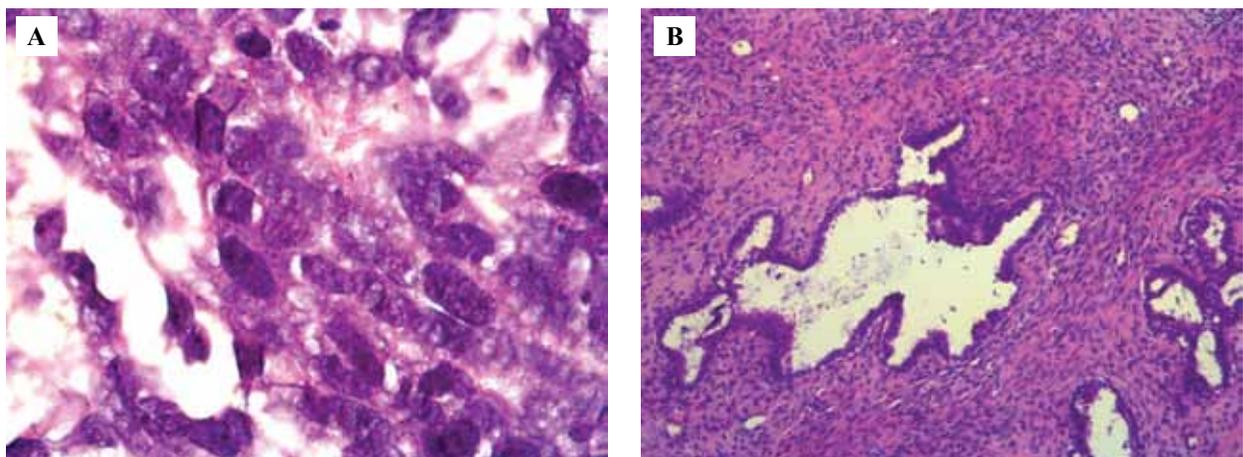


Рис. 6. Злокачественная филлоидная опухоль молочной железы. Гистологические препараты. Окрасивание гематоксилином и эозином.

А – злокачественные клетки филлоидной опухоли, $\times 100$. В – злокачественные клетки филлоидной опухоли, $\times 10$

Fig. 6. Malignant phyllodes tumor of the breast. Histological slides. H&E stain.

A – malignant cells of the phyllodes tumor, $\times 100$. B – malignant cells of the phyllodes tumor, $\times 10$

Результаты

При проведении сравнительного анализа цитологических и гистологических заключений в группе пациенток с диагнозом «фиброаденома» выявлены расхождения между цитологическим и гистологическим диагнозами в шести случаях, что отражено в таблице 1, и осуществлен контроль совпадения цитологического и гистологического диагнозов, приведенный в таблице 2.

Узловые образования 3,5–4 см могут наблюдаться как при ФА, так и при ФО.

Рассмотрим случаи с расхождениями.

Пациентка П., 21 год. Во время первичного приема врачом поставлен диагноз «листовидная опухоль» (размер опухоли 6 см). Цитологическое заключение: листовидная опухоль. Гистологическое заключение: фиброаденома. По данным ультразвукового исследования (УЗИ) узел плотно-эластичный, дольчатого вида (размеры опухоли 4,0 × 3,5 × 4,0 см).

При пересмотре цитологического препарата отмечено, что в данном материале отсутствуют полиморфные фибробластические клетки. Отсутствие указанного признака исключает диагноз «листовидная опухоль»,

так как ведущим морфологическим признаком листовидных опухолей является гиперцеллюлярность, богатство стромы полиморфными веретенообразными клетками типа фибробластов. Следовательно, диагноз, поставленный цитологом, необходимо признать некорректным.

Пациентка Т., 51 год. Клинический диагноз: «фиброаденома» (размеры опухоли 1,5 × 1,0 × 1,0 см). Цитологическое заключение: фиброаденома. Гистологическое заключение: участки фиброза, эктазия отдельных протоков, часть выстлана апокриновым эпителием.

При пересмотре цитологического материала обнаружено преобладание в препарате уплощенного эпителия (рис. 7 А), макрофагов (рис. 7 В, С) и элементов фиброза (рис. 7 D), который говорит об инволютивных изменениях молочной железы. По данному материалу (рис. 7) цитологом был ошибочно поставлен диагноз «фиброаденома».

В пяти случаях было расхождение цитологического и гистологического диагнозов. Большая часть пациенток старше 45 лет.

Также был проведен анализ размеров узлообразования у пациенток с разными вариантами ФО (табл. 3).

Таблица 1 / Table 1

Сравнительный анализ цитологических и гистологических заключений
Comparative analysis of cytological and histological findings

Клинический диагноз/Clinical diagnosis	Число случаев/ Number of cases	Цитологическое заключение/ Cytology diagnosis	Число случаев/ Number of cases	Гистологическое заключение/ Pathology diagnosis	Число случаев/ Number of cases
Подозрение по наличию рака/ Cancer suspicion	1	ФА/ФА	1	ФА/ФА	1
Фиброзно-кистозная болезнь (ФКБ)/ Fibrocystic disease (FD)	1	ФА/ФА	1	ФА/ФА	1
Опухоль/Tumor	1	ФА/ФА	1	ФА/ФА	1
Филлоидная опухоль (ФО)/Phylloid tumor (PT)	1	ФА/ФА	1	ФА/ФА	1
Фиброаденома (ФА)/ Fibroadenoma (FA)	22	ФА/ФА	15	ФА/ФА	15
		Рак/Carcinoma	1	Рак	1
		Подозрение по наличию рака/ Cancer suspicion	1	ФА/ФА	1
		ФКБ/FD	1	ФА/ФА	1
		ФА/ФА	1	Эктазия протоков/ Duct ectasia	1
		ФА/ФА	1	Склерозирующий аденоз/Sclerosing adenosis	1
		ФА/ФА	1	ФКБ/FD	1
ФО/PT	1	ФА/ФА	1		

Таблица 2 / Table 2

Контроль совпадения цитологического и гистологического диагнозов

Interobserver agreement of cytology and pathology diagnoses

Цитологическое заключение/ Cytology diagnosis	Число наблюдений/ Number of cases	Гистологический диагноз/ Pathology diagnosis	Число наблюдений/ Number of cases
ФА/FA	5	Доброкачественная ФО/Benign PT	1
		Пограничная ФО/Borderline PT	4
ФО/PT	3	Пограничная ФО/Borderline PT	2
		Злокачественная ФО/Malignant PT	1
Трудно дифференцировать ФА и ФКБ/ Difficult to differentiate between FA and FD	1	Доброкачественная ФО/Benign PT	1
Гиперплазия, пролиферация эпителия/ Hyperplasia, proliferation of epithelial cells	1	Доброкачественная ФО/Benign PT	1
Гиперплазия, пролиферация эпителия/ Hyperplasia, proliferation of epithelial cells	1	Пограничная ФО/Borderline PT	1
Рак/Carcinoma	1	Злокачественная бифазная опухоль, представленная эпителиальным и мезенхимальным компонентом веретеноклеточной опухоли с хондронной дифференцировкой/ Malignant biphasic tumor, represented by the epithelial and mesenchymal component of a spindle cell tumor with chondroid differentiation	1
Гиперплазия, пролиферация эпителия на фоне хондромиксоидного вещества и наличия хрящевых клеток/ Hyperplasia, proliferation of the epithelial cells on the background of chondromyxoid and chondrocytes	1	Злокачественная ФО фибромиксоидной саркомы/Malignant PT of fibromyxoid sarcoma	1

Таблица 3 / Table 3

Размер узлообразования

Nodule Size

Доброкачественная ФО, размер узлообразования у 3 пациенток, см/ Benign PT, nodule size in 3 patients, cm	Пограничная ФО, размер узлообразования у 7 пациенток, см/ Borderline PT, nodule size in 7 patients, cm	Злокачественная ФО, размер узлообразования (см) у 3 пациенток/ Malignant PT, nodule size in 3 patients, cm
3,2 × 2,5	2,0 × 1,0	10,5 × 7,5 × 5,5
3,0 × 2,5	3,2 × 2,5 × 3,5	25,0 × 17,0 × 13,0
8,7 × 9,0	3,5 × 2,5 × 3,5	16,0 × 10,0
	4,3 × 3,0	
	5,5 × 6,0	
	6,0 × 5,0	
	24,0 × 16,0 × 16,0	

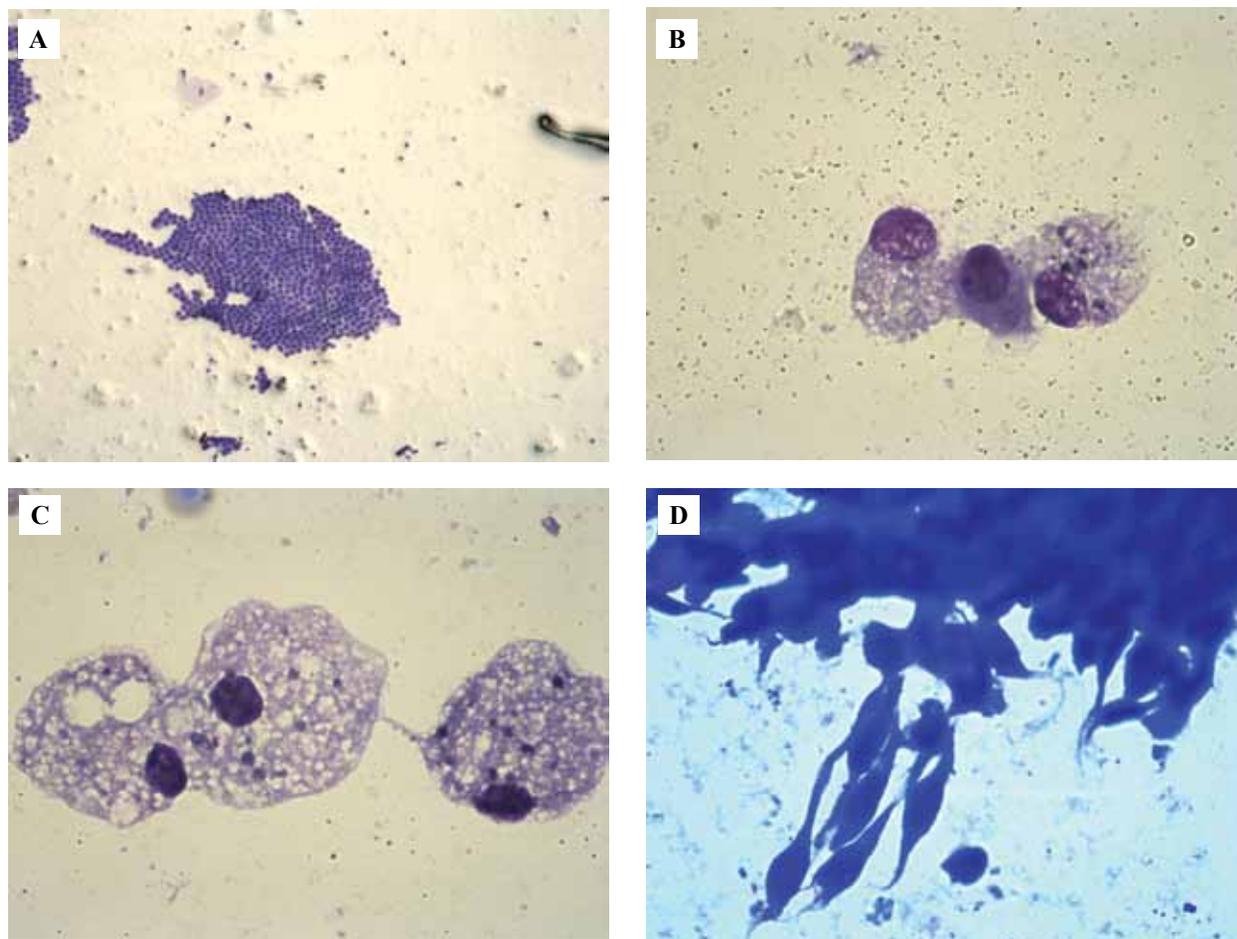


Рис. 7. Инволютивные изменения молочной железы. Цитологические препараты. Окрасивание по Лейшману.

A – уплощенный эпителий, $\times 10$. B,C – макрофаги, $\times 100$. D – элементы фиброза, $\times 100$

Fig. 7. Involutive changes in the breast. Cytological slides. Leishman stain.

A – flattened epithelium, $\times 10$. B,C – macrophages, $\times 100$. D – fibrosis elements, $\times 100$

Размер узлообразования не зависел от варианта ФО, и только при злокачественном варианте у всех пациентов диаметр узлов превышает 6,0 см.

Заключение

Филлоидная опухоль молочной железы является редкой и сложной для диагностики патологией.

Часто филлоидную опухоль ошибочно диагностируют как фибroadену молочной железы, в связи с чем цитологу необходимы клинические данные о пациентке, без которых диагноз ставить нельзя.

К значимым клиническим данным для филлоидной опухоли можно отнести возраст после 40 лет, быстрый рост опухоли (опухоль больших размеров), истонченную кожу с резко расширенными подкожными сосудами, изъязвления на коже (не всегда указывают на злокачественность процесса), по данным УЗИ размер узлообразования более 4,5 см. Размер новообразования не дает возможности дифференцировать доброкачественную и пограничную филлоидную опухоль, и только при злокачественном варианте она практически всегда больше (от 6,0 до 45 см).

К значимым морфологическим признакам для филлоидной опухоли относятся богатство стромы веретенообразными клетками типа полиморфных фибробластов, часто мелкозернистый фон и оксифильные массы, иногда с замурованными в нем элементами стромы.

Диагноз «злокачественная филлоидная опухоль» можно ставить при обнаружении в материале не только злокачественных мезенхимальных клеток (клеток саркомы), но и клеток эпителия молочной железы, или в том случае, когда известно, что ранее был установлен диагноз «филлоидная опухоль».

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Родионова, Л.Я. Фомина, Л.В. Мехеда.

Сбор и обработка материала – Л.М. Родионова.

Написание текста – Л.М. Родионова.

Редактирование – Л.В. Мехеда.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Rodionova, L.Y. Fomina, L.V. Mekheda.

Collected the data and performed the analysis – L.M. Rodionova.

Wrote the paper – L.M. Rodionova.

Edited the manuscript – L.V. Mekheda.

Литература/References

1. *Закиряходжаев А.Д., Широких И.М., Харченко Н.В., Запиров Г.М., Сарибекян Э.К., Н. В. Аблицова Н.В. и др.* Филлоидные опухоли молочных желез. Современное состояние проблемы. Исследования и практика в медицине. 2017;4(2):13–22.
Zakiryakhodzhaev AD, Shirokih IM, Kharchenko NV, Zapirov GM, Saribekyan EK, Ablitsova NV et al. Phylloid tumors of mammary glands. Current state of the problem. Research and Practical Medicine Journal. 2017;4(2):13–22 (In Russ.). DOI: 10.17709/2409-2231-2017-4-2-2.
2. *Barrio AV, Clark BD, Goldberg JI, Hoque LW, Bernik SF, Flynn LW et al.* Clinicopathologic features and long-term outcomes of 293 phyllodes tumors of the breast. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(10):2961–70. DOI: 10.1245/s10434-007-9439-z.
3. *Волченко А.А., Пак Д.Д., Усов Ф.Н., Фетисова Е.Ю., Ефанов В.В.* Гигантская листовидная опухоль молочной железы. Онкохирургия. 2012;4(2):77–80.
Volchenko AA, Pak DD, Usov FN, Fetisova EYu, Efanov VV. Giant leaf-shaped breast tumor. *Oncosurgery.* 2012;4(2):7–80 (In Russ.).
4. *Григорчук О.Г., Богатырев В.Н., Лазарев А.Ф., Соколова В.К., Фролова Т.С., Базулина Л.М.* Цитологическая диагностика листовидных опухолей и сарком молочной железы. Маммология. 2005;1:23–28.
Grigorchuk OG, Bogatyrev VN, Lazarev AF, Sokolova VK, Frolova TS, Bazulina LM. Cytological diagnosis of leaf-shaped tumors and breast sarcomas. *Mammalogy.* 2005;1:23–28 (In Russ.).
5. *Летягин В.П., Ермилова В.Д., Воротников И.К.* Злокачественные неэпителиальные опухоли молочных желез (Предварительные результаты). Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 1996;7(3):57–59.
Letyagin VP, Ermilova VD, Vоротnikov IK. Malignant non-epithelial tumors of the mammary glands (Interim Results). Bulletin of N.N. Blokhin RCRC RAMS. 1996;7(3):57–59 (In Russ.).
6. *Воротников И.К., Богатырев В.Н., Корженкова Г.П.* Листовидные опухоли и саркомы молочных желез: клиника, диагностика, лечение. Маммология. 2006;1:29–34.
Vorotnikov IK, Bogatyrev VN, Korzhenkova GP. Phyllodes tumors and sarcomas of the breast: clinical features, diagnosis, and treatment. *Mammalogy.* 2006;1:29–34 (In Russ.).
7. *Wang ZC, Buraimoh A, Iglehart JD, Richardson AL.* Genome-wide analysis for loss of heterozygosity in primary and recurrent phyllodes tumor and fibroadenoma of breast using single nucleotide polymorphisms arrays. *Breast Cancer Res. Treat.* 2006;97(3):301–9. DOI: 10.1007/s10549-005-9124-5.

Информация об авторах

Людмила Максимовна Родионова – младший научный сотрудник лаборатории отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Лариса Владимировна Мехеда – кандидат медицинских наук, заведующая цитологической лабораторией отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Лилия Яшаровна Фомина – младший научный сотрудник лаборатории отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Author information

Ludmila M. Rodionova – Junior Researcher, Cytological laboratory of the Department of morphological and molecular genetic diagnosis of tumors, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center.
<https://orcid.org/0000-0003-0424-9543>

Larisa V. Mekheda – Cand. Sci. (Med.), Head of the Cytological laboratory of the Department of morphological and molecular genetic diagnosis of tumors, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center.
<https://orcid.org/0000-0002-6445-9983>

Liliya Y. Fomina – Junior Researcher, Cytological laboratory of the Department of morphological and molecular genetic diagnosis of tumors, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center.
<https://orcid.org/0000-0002-9306-5465>

Морфогенез ателектазов легких при экспериментальном радиоиндуцированном воздействии

Ю.А. Кириллов¹, И.А. Чернов², Е.М. Малышева^{2,4}, С.Е. Тимофеев^{2,4}, Е.А. Старцева⁴, О.А. Розенберг³

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, Тюмень, Россия

³ ФГБУ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ГБУЗ Городская клиническая больница № 40 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Введение. Ателектазы легких, возникающие при лучевом воздействии на органы грудной клетки, нередко сопровождаются развитием лучевых альвеолитов, фиброзов и дыхательной недостаточности. Показано существенное нарушение структуры альвеолоцитов при различных видах альвеолитов, однако влияние лучевого воздействия на сосудистый компартмент легочной ткани, бронхиолы и альвеолоциты, а также межклеточные структуры в процессе формирования ателектазов не подвергалось детальным исследованиям. Недостаточно изучено значение количественных и качественных изменений легочного сурфактанта (ЛС) при развитии ателектазов. Цель исследования – изучить морфогенез ателектазов при экспериментальной патологии легких, вызванной радиоиндуцированным воздействием.

Материалы и методы. Исследование проведено на 60 самцах крыс породы Вистар в возрасте 8–9 недель, массой тела 200–220 граммов. Однократное локальное облучение животных, находившихся под нембуталовым наркозом (40 мг/кг веса), осуществляли аппаратом РУМ–17 (напряжение 200 кВ, сила тока 15 мА, фильтры 0,5 мм Cu+ 1,0 мм Al, кожно-фокусное расстояние 25 см.) в дозе 12 Гр. Количественное определение фосфолипидов (ФЛ) легочного сурфактанта определяли в лаважной жидкости, извлеченной из легкого крысы. Материал исследовали гистологически (окраска гематоксилином и эозином, альциановым синим, пикрофуксином по Ван Гизону) и электронномикроскопически. Морфометрически на контрольных образцах и на разных сроках после воздействия ионизирующего излучения высчитывали толщину эпителиальной выстилки бронхиол, средний диаметр ядер эпителиоцитов бронхиол, толщину межальвеолярных перегородок.

Результаты. Ателектазы, возникающие в ранние сроки эксперимента, являются сурфактантзависимыми, что подтверждается снижением количества ЛС и ФЛ в лаважной жидкости. Формирование ателектазов в поздние сроки обусловлено реализацией обтурационного механизма, сужением просвета бронхов и бронхиол за счет утолщения эпителиальной выстилки и выраженной бронхо-бронхиолоконстрикции.

Заключение. Понимание механизмов развития ателектазов необходимо для реализации комплекса мероприятий по их профилактике и снижению числа осложнений.

Ключевые слова: ателектаз, дистелектаз, морфометрия, лучевой фиброз, лучевой альвеолит

Для корреспонденции: Юрий Александрович Кириллов. E-mail: youri_kirillov@mail.ru

Для цитирования: Кириллов Ю.А., Чернов И.А., Малышева Е.М., Тимофеев С.Е., Старцева Е.А., Розенберг О.А. Морфогенез ателектазов в развитии патологии легких при экспериментальном радиоиндуцированном воздействии. Клини. эксп. морфология. 2020;9(1):30–39. DOI:10.31088/CEM2020.9.1.30-39

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 18.11.2019. Получена после рецензирования 15.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

Development of pulmonary atelectasis after experimental radiation exposure

Yu.A. Kirillov¹, I.A. Chernov², E.M. Malysheva^{2,4}, S.E. Timofeev^{2,4}, E.A. Startseva⁴, O.A. Rozenberg³

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² Tyumen State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tyumen, Russia

³ AM Granov Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

⁴ City Clinical Hospital No. 40 of the Department of Health of the City of Moscow, Moscow, Russia

Introduction. Pulmonary atelectasis that occur in the chest organs exposed to radiation is often accompanied by the development of radiation alveolitis, fibrosis, and respiratory failure. Different forms of alveolitis cause severe disturbance of the structure of alveolocytes. However, the effect of radiation on the vascular compartment of pulmonary tissue, bronchioles and alveolocytes, and intercellular structures in the formation of atelectasis was not studied in detail. The importance of quantitative and qualitative changes in pulmonary surfactant (PS) in the development of atelectasis was understudied.

The aim of the work was to explore the development of pulmonary atelectasis in rats after radiation exposure. *Materials and methods.* The study was carried out on 60 male Wistar rats aged 8-9 weeks, body weight 200-220 g. Single local irradiation of animals under Nembutal anesthesia (40 mg / kg weight) was carried out by the RUM-17 apparatus (voltage 200 kV, current 15 mA, filters 0.5 mm Cu + 1.0 mm Al, skin-focal length 25 cm) at a dose of 12 Gy. Phospholipids (PL) in pulmonary surfactant were quantitatively determined in lavage fluid extracted from the rat lung. The material was examined histologically (hematoxylin and eosin, alcian blue, picrofuchsin according to Van Gieson) and under transmission electron microscope. The thickness of the epithelial lining of bronchioles, the average diameter of the nuclei of epithelial cells of bronchioles and the thickness of the interalveolar partitions were calculated morphometrically on control samples at different time periods after exposure to ionizing radiation.

Results. Atelectasis occurred at the early stages of the experiment is surfactant-dependent, which is confirmed by the decreased amount of PS and PL in lavage fluid. The formation of atelectasis in later periods is caused by the obturation, narrowing of the lumen of the bronchi and bronchioles due to thickening of the epithelial lining and pronounced bronchial bronchoconstriction.

Conclusion. Understanding the mechanisms of development of atelectasis is necessary in order to prevent the pathology described above and reduce the risk of complications.

Keywords: atelectasis, distelectasis, morphometry, radiation fibrosis, radiation alveolitis

Corresponding author: Yuri A. Kirillov. E-mail: youri_kirillov@mail.ru

For citation: Kirillov Yu.A., Chernov I.A., Malysheva E.M., Timofeev S.E., Startseva E.A., Rozenberg O.A. Development of pulmonary atelectasis after experimental radiation exposure. Clin. exp. morphology. 2020;9(1):30–39. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.1.30-39.

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

Received 18.11.2019. **Received in revised form** 15.01.2020. **Accepted** 11.02.2020.

Введение

Причины развития ателектаза легких достаточно широки, начиная от травматического повреждения грудной клетки, последствий расширенных операций на легких, вирусных пневмоний, ожогов поверхности тела и ингаляционной травмы, общего наркоза, обтурации бронха и различных экзогенных воздействий, включая химическое или лучевое поражение легких. В отечественной литературе серьезные фундаментальные исследования по изучению ателектазов были проведены в 1970–1990 годы [1–3]. В современных руководствах по пульмонологии и патологической анатомии легких ателектазу посвящено в лучшем случае несколько страниц [4, 5]. Е.А. Коган, отводящая ателектазу легких роль одного из возможных путей морфогенетического развития идиопатического фиброзирующего альвеолита, акцентирует внимание на его существовании, называя фиброателектазом – ателектаз как результат ранее перенесенных воспалительных изменений в легких. Последние, как правило, оставляют после себя обширные грубые склеротические изменения в ткани легких [6]. Экспериментально показано существенное нарушение структуры альвеолоцитов первого и второго типа при лучевом альвеолите [7], однако влияние рентгеновского облучения на изменения в структурных отношениях

сосудистого компартмента легочной ткани, бронхоиол и альвеолицитов первого и второго типа, а также межклеточных структур в процессе формирования ателектазов детально не исследовалось. Наблюдаемый в настоящее время пик публикационной активности обусловлен повышенным интересом исследователей к проблеме лучевого повреждения легких. В настоящее время существование радиоиндуцированной патологии легочной ткани объясняется развитием оксидативного (окислительного) стресса [8–10], при этом роль ателектазов и дистелектазов в развитии лучевых пневмонитов и фиброзов, как правило, не учитывается [11–13].

Известно, что повреждение многокомпонентного и многофункционального природного комплекса легочного сурфактанта (ЛС), обеспечивающего механику дыхания за счет способности снижать поверхностное натяжение и его защитные свойства по отношению к ткани легкого, обнаружено при многих легочных заболеваниях, однако количественные и качественные изменения ЛС при ателектазах изучены недостаточно.

Целью данной работы является изучение морфогенеза ателектазов в развитии патологии легких при экспериментальном радиоиндуцированном воздействии и роли количественных и качественных изменений со-

става фосфолипидов ЛС в формировании ателектазов легких.

Материалы и методы

В исследование были включены 60 самцов крыс породы Вистар в возрасте 8–9 недель массой тела 200–220 граммов. При проведении эксперимента соблюдались требования Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Животные содержались в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных по две особи в одной клетке с неимитированным доступом к воде и пище. Температура в комнате составляла $19 \pm 3^\circ\text{C}$, световой режим 12 часов, влажность 40–50%. Состояние животных оценивали по подвижности, уходу за собой, изменению массы тела, качеству волосяного покрова, признакам нарушения дыхания. Однократное локальное облучение животных, находившихся под нембуталовым наркозом (40 мг/кг веса), осуществляли аппаратом РУМ-17 (напряжение 200 кВ, сила тока 15 мА, фильтры 0,5 мм $\text{Cu}+$, 1,0 мм Al , кожно-фокусное расстояние 25 см) в дозе 12 Гр. Животное фиксировали на деревянной подставке с защитным свинцовым экраном толщиной 6 мм с прямоугольным окном размерами $3,0 \times 2,5$ см. Результаты рентгенографического контроля, полученные в предварительных опытах, свидетельствовали о включении в зону лучевого воздействия всех трех долей правого легкого. Контрольная группа животных состояла из шести особей – им имитировали процедуру фиксации, которой подвергались животные основной группы при проведении облучения. Для изучения динамики содержания фосфолипидов ЛС и их фракционного состава на каждом сроке эксперимента проводили тотальный бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) выделенного правого легкого посредством его трехкратного промывания 4,0–4,5 мл 0,9% раствором хлорида натрия (температура $22\text{--}23^\circ\text{C}$). Для этого весь объем лаважной жидкости, около 10–12 мл, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 10 минут с последующим охлаждением для освобождения от клеток и дегриса. Супернатант, содержащий ЛС, концентрировали упариванием на ротационном испарителе (Buchi, Швейцария). Аликвоту материала экстрагировали смесью хлороформа и метилового спирта в соотношении 1:2 и определяли в ней количество фосфолипидов по содержанию липидного фосфора после сжигания пробы при 180°C в хлорной кислоте [14].

Вывод из эксперимента остальных животных осуществляли также на 1-е, 3-и, 7-е сутки, 2-й, 7-й и 13-й неделях эксперимента путем внутрибрюшинного введения нембутала в дозе 80 мг/кг. У животных, находившихся в состоянии глубокого наркоза, вскрывали грудную клетку и через прокол трахеи медленно вводили 10% раствор формалина до момента расправления ткани обоих легких. Последующую фиксацию орга-

на также проводили в 10% нейтральном формалине в течение 24 часов. После окончания фиксации образцы легочной ткани, полученные из субплевральных и интрапульмонарных отделов средней доли правого легкого, проводили по стандартной методике и заключали в парафин с последующим приготовлением срезов толщиной 5 мкм, окрашиваемых гематоксилином и эозином, ализановым синим, пикрофуксином по ван Гизону. Для электронномикроскопического исследования участки ткани, полученные из тех же отделов легкого, объемом примерно 1 мм^3 фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на коллидиновом буфере (pH 7,4) при комнатной температуре в течение 1,5 часа. Затем материал промывали несколькими порциями того же буфера 30 минут. Кусочки ткани дофиксировали в 1% растворе тетроксид осмия на коллидиновом буфере в течение 1,0–1,5 часа при температуре $+4 \pm 6^\circ\text{C}$. Материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (от 50° до 96°) и нескольких порциях эфира и заливали в аралдит. Для визуализации микротопографии поверхности нативные образцы ткани объемом примерно 5 мм^3 помещали в раствор глутарового альдегида на нейтральном фосфатном буфере. После суточной экспозиции образцы ткани обезвоживали в водных растворах этанола от 40% до абсолютного спирта со ступенью 20% и экспозицией не менее 6 часов в каждой концентрации. Затем после часовой экспозиции в ацетоне переносили в камеру углекислотного высушителя Balzers CPD 030 (Balzers, Bal-Тес, Лихтенштейн) для окончательной дегидратации. На каждый образец наносили адгезивную углеродную ленту и напыляли сплавом Au-Pd с помощью плазменного напылителя Quorum SC7620 (Quorum, США). Визуализацию микротопографии поверхности осуществляли на сканирующем электронном микроскопе Zeiss EVO LS10 (Zeiss, Германия). Полутонкие срезы, приготовленные на ультрамикротоме LKB (Швеция), окрашивали метиленовым синим с докраской фуксином. Ультратонкие срезы, приготовленные на аналогичном ультрамикротоме, исследовали на том же сканирующем электронном микроскопе с установленным детектором для просвечивающей микроскопии (STEM).

Оцифровку подготовленных и окрашенных срезов выполняли при помощи цифрового сканера Panoramic MIDI (3DHISTECH Ltd, Венгрия) в автоматизированном режиме с использованием $20\times$ объектива Carl Zeiss. Проверку полученных цифровых снимков, а также выбор участков для анализа осуществляли с использованием программного обеспечения Panoramic Viewer (3DHISTECH Ltd, Венгрия).

Морфометрические исследования выполняли при помощи программного обеспечения, разработанного Национальным институтом здравоохранения США (National Institutes of Health, NIH) ImageJ, версия 1.52a, на контрольных образцах и на разных сроках после воздействия ионизирующего излучения. Количественно

измеряли толщину эпителиальной выстилки бронхиол, средний диаметр ядер эпителиоцитов бронхиол, толщину межальвеолярных перегородок. Для определения линейных размеров межальвеолярных перегородок, ядер эпителиоцитов, эпителиальной выстилки бронхиол использовали инструмент Straight Line Selection Tool программы ImageJ.

Полученные результаты обрабатывали на персональном компьютере с использованием программ, входящих в состав пакета Microsoft Office. В каждой из групп определяли показатели $M \pm (m)$, где M – среднее арифметическое значение, а (m) – ошибка среднего арифметического. Сравнение групп по одному признаку проводили с помощью критерия Манна–Уитни для независимых выборок (Mann-Whitney U-test). Статистически значимыми считались различия данных при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изменения легочной ткани в 1-е сутки после облучения обнаруживали преимущественно в субплевральных образцах и лишь на ультраструктурном уровне. В капиллярах межальвеолярных перегородок наблюдали выраженное набухание эндотелия, резкое уменьшение количества органелл, просветление цитозоля, сочетавшееся с пиноцитозом в одних клетках и идентификацией элементов цитоскелета в других. В просвете капилляров идентифицировали агглютинированные эритроциты и тромбоциты. Как правило, эти изменения сочетались с увеличением электронной плотности плазмы крови. Альвеолоциты первого и второго типа выглядели относительно сохранными, некоторые уплощенными. В осмиофильных пластинчатых тельцах альвеолоцитов второго типа наблюдали нарушение упорядоченного расположения мембран (рис. 1 А, В).

3-и сутки эксперимента характеризовались усилением полнокровия капилляров, прогрессированием отека и утолщением межальвеолярных перегородок, присоединением изменений клеточной составляющей аэрогематического барьера, сопровождавшейся разрушением сурфактанта (рис. 2). В этот период эксперимента суммарное содержание фосфолипидов, до этого неуклонно уменьшавшееся, достигло своего минимума.

Конец 1-й недели эксперимента стал в известной степени критическим для появления морфологических находок, поскольку в эти сроки отмечено формирование первых ателектазов, располагавшихся субплеврально (рис. 3). Бронхи и бронхиолы на участках ателектазов и дистелектазов были проходимы, а просвет несколько расширен. В некоторых наблюдениях в непосредственной близости с ателектазами обнаружены участки сохраненной воздушности. Биохимическое исследование фосфолипидов легочного сурфактанта выявило прогрессирующее снижение фракций фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилглицерина и дифос-

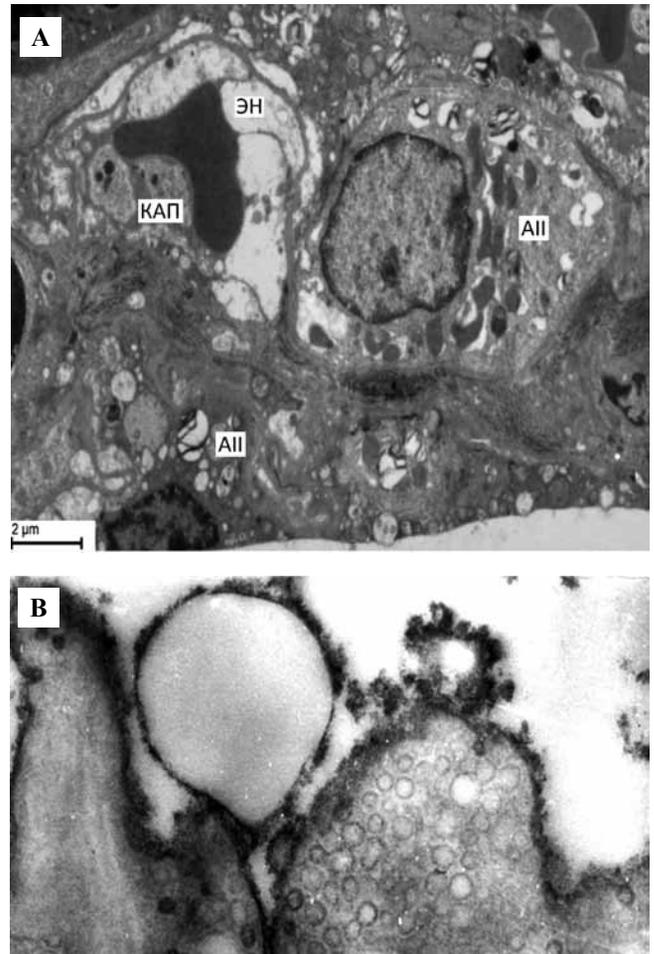


Рис. 1. Радиоиндуцированное повреждение легких, 1-е сутки.

А – выраженное набухание эндотелия (ЭН), резкое уменьшение количества органелл. В просвете капилляров (КАП) агглютинированные эритроциты и тромбоциты. Альвеолоциты второго типа (АII) относительно сохранны. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), $\times 15\ 000$.

В – пиноцитоз в эндотелии капилляров межальвеолярных перегородок. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), $\times 60\ 000$

Fig. 1. Radio-induced lung damage, day 1.

A – marked swelling of the endothelium (ЭН), a sharp decrease in the organelle number. Agglutinated red blood cells and platelets are found in the capillary lumen (КАП). Alveolocytes type II (АII) are relatively intact. Transmission electron microscopy (TEM), $\times 15\ 000$.

B – pinocytosis in the endothelium of the capillaries of the interalveolar septa. Transmission electron microscopy (TEM), $\times 60\ 000$

фатидилглицерола (кардиолипина) на фоне некоторого увеличения общего содержания фосфолипидов.

В дальнейшем (2 недели) отмечены прогрессирующие морфологические изменения и «продвижение» лучевых альтераций в глубь легкого, то есть в дистальном по отношению к плевре направлении. Изменения бронхов и бронхиол идентифицировали уже на

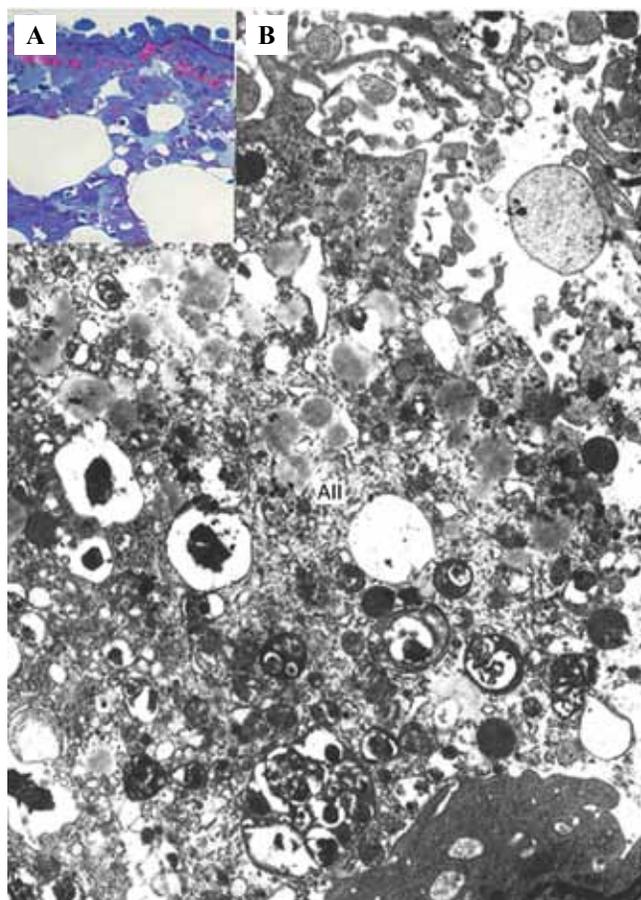


Рис. 2. Радиоиндуцированное повреждение легких, 3-и сутки. А – усиление полнокровия капилляров, прогрессирование отека и клеточной инфильтрации межальвеолярных перегородок. Полутоновый срез, окраска метиленовым синим с докраской фуксином, $\times 400$. В – фрагменты разрушенного альвеолоцита второго типа (АII) и сурфактанта в просвете альвеолы. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), $\times 15\,000$

Fig. 2. Radio-induced lung damage, day 3.

А – increased capillary plethora, progression of edema and cell infiltration of the interalveolar septa. Semi-thin section, stained with methylene blue with fuchsin, $\times 400$. В – fragments of the destroyed alveolocyte type II (AII) and surfactant in the alveolar lumen. Transmission electron microscopy (TEM), $\times 15\,000$

светооптическом уровне в виде сужения, деформации и обтурации их просвета серозно-слизистым экссудатом (рис. 4). В эти сроки стали появляться первые ателектазы и дистелектазы, расположенные уже интрапульмонарно (рис. 5). Перегородки альвеол были утолщены, однако в отличие от светооптического на ультраструктурном уровне ателектаз не выглядел «полным». Просветы альвеол имели щелевидную форму, содержали клеточный детрит, а элементы аэрогематического барьера и клетки инфильтрата свободно идентифицировались. Содержание фосфолипидов было незначительно увеличено по сравнению с контролем,

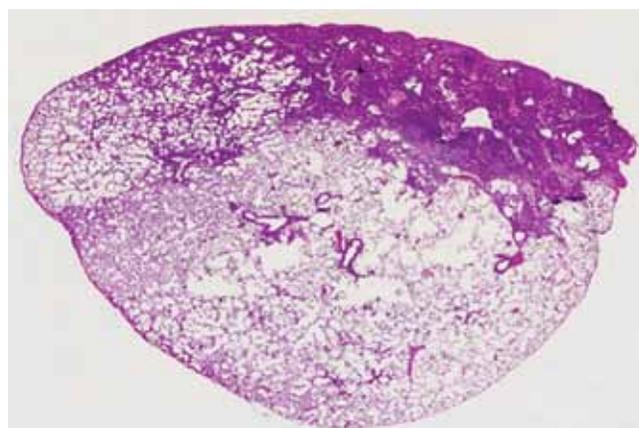


Рис. 3. Радиоиндуцированное повреждение легких, 7-е сутки. Участок ателектаза легочной ткани, расположенный субплеврально. Тотальный срез доли легкого. Окраска гематоксилином и эозином. Лупа

Fig. 3. Radio-induced lung damage, day 7. Subpleural pulmonary atelectasis. Total section of the lung lobe. H&E. Magnifier

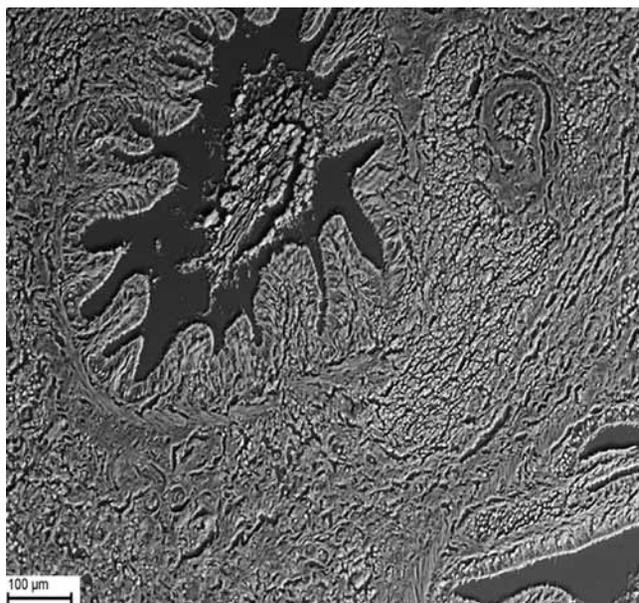


Рис. 4. Радиоиндуцированное повреждение легких, 14-е сутки. Спазм бронхиолы с формированием перибронхиолярных дистелектазов и ателектазов. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), $\times 300$

Fig. 4. Radio-induced lung damage, day 14. Spasm of the bronchiole with the formation of peribronchiolar distelectasis and atelectasis. Transmission electron microscopy (TEM), $\times 300$

но значения фосфатидилглицерина, кардиолипина и фосфатидилэтаноламина по-прежнему были ниже контрольных.

Спустя 7 недель после начала эксперимента отмечены ослабление интерстициального отека и частичное восстановление кровообращения на уровне капилляров микроциркуляторного русла. Характерной особенностью явилось также сочетание диффузных

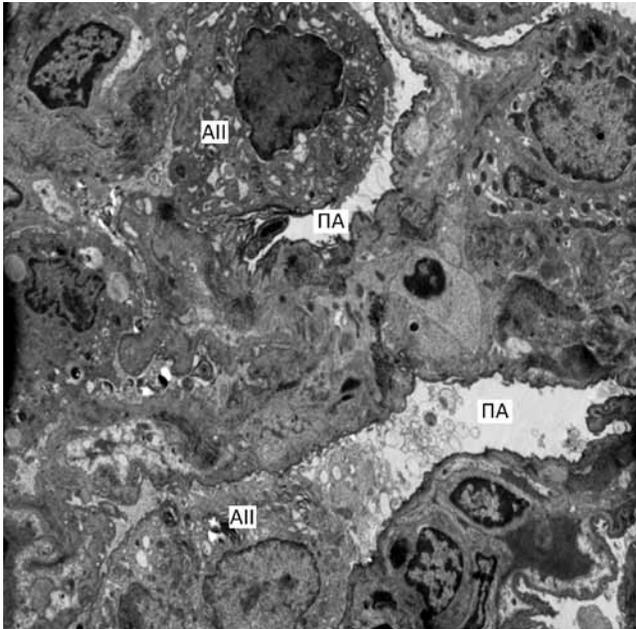


Рис. 5. Радиоиндуцированное повреждение легких, 14-е сутки. Интрапульмонарный дистелектаз. АII – альвеолоцит II типа. ПА – просвет альвеолы. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), $\times 8660$

Fig. 5. Radio-induced lung damage, day 14. Intrapulmonary distelettasis. АII – type II alveolocyte. ПА – alveolar lumen. Transmission electron microscopy (TEM), $\times 8660$

изменений в виде усиления клеточной инфильтрации межальвеолярных перегородок и утолщения последних и очаговых изменений в виде ателектазов и дистелектазов. Важной морфологической составляющей стала идентифицируемая на полутонких срезах все более выраженная однородность клеточного инфильтрата. Электронномикроскопическое исследование подтвердило, с одной стороны, большую однородность клеточного инфильтрата, локализующегося в интерстиции и состоящего преимущественно из фибробластов, а с другой – увеличение количества коллагеновых волокон. Субплеврально на участках первоначально реализовавшихся ателектазов отмечали разрастания соединительной ткани (рис. 6), состоящей из цилиндрических коллагеновых волокон преимущественно спиральной формы, связанных между собой системой связочных волокон. Висцеральная плевро, покрывающая участок предсуществующего ателектаза, имела мелкобугристый вид. Общее содержание фосфолипидов превысило контрольные показатели (рис. 7), однако значения фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилглицерина и кардиолипина были снижены.

Заключительный этап эксперимента (13 недель) характеризовался выраженным сочетанием диффузных и очаговых изменений в виде крупноочагового (субплевральные участки) и мелкоочагового (в местах формирования интрапульмонарных ателектазов и дистелектазов) пневмофиброза. Клеточная инфильтрация

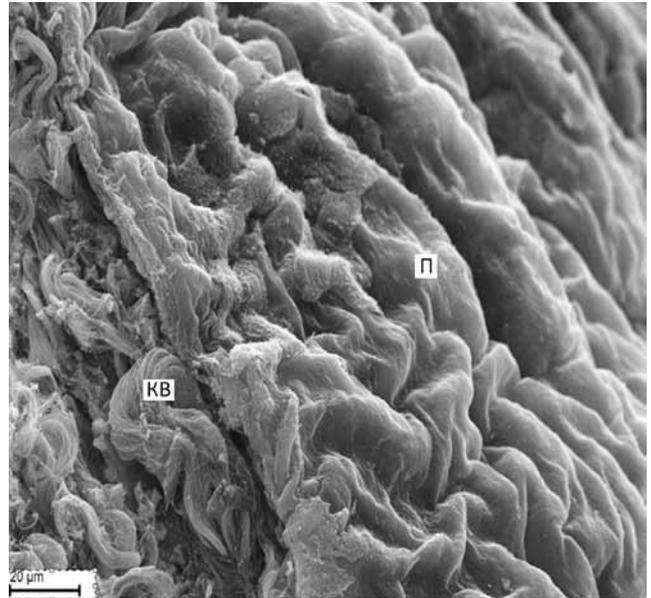


Рис. 6. Радиоиндуцированное повреждение легких, 7 недель. Соединительная ткань на участке реализовавшегося субплеврального ателектаза. КВ – коллагеновые волокна; П – плевро. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), $\times 150$

Fig. 6. Radio-induced lung damage, week 7. Connective tissue in the area of the subpleural atelectasis. КВ – collagen fibers; П – pleura. Scanning electron microscopy (SEM), $\times 150$

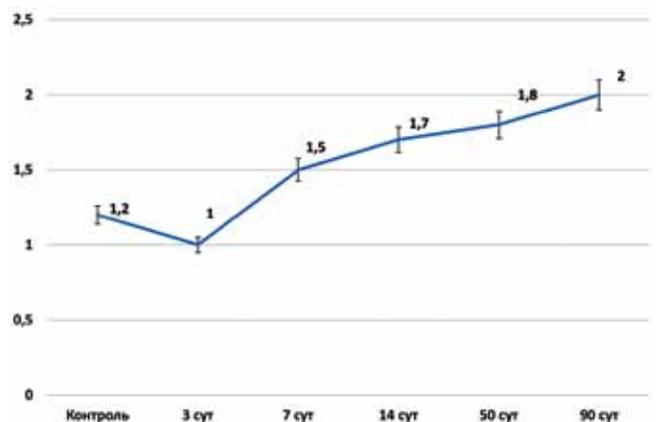


Рис. 7. Динамика содержания фосфолипидов сурфактанта в легком крыс при лучевом альвеолите

Fig. 7. Dynamics of the content of phospholipids of surfactant in the lungs in rat with radion-induced alveolitis

носила очаговый характер, проявления люминарного альвеолита были единичными. При электронномикроскопическом исследовании повсеместно обнаруживали коллагеновые волокна, заполняющие пространство между капиллярами и альвеолоцитами (рис. 8). Базальные мембраны выглядели значительно утолщенными, а эндотелиоциты и альвеолоциты атрофичными. Фракционный состав фосфолипидов сурфактанта соответствовал показателям контрольной группы, за исключением фосфатидилэтаноламина, фосфатидилглицерина

Динамика изменения состава фосфолипидов сурфактанта легкого крыс при лучевом альвеолите
The dynamics of the surfactant phospholipidic composition in rats with radiation-induced alveolitis

Показатель / Indicator	Контрольная группа / Control group (n – 6)	Сроки, сутки / Timing, days				
		3-и (n – 10)	7-е (n – 11)	14-е (n – 11)	50-е (n – 11)	90-е (n – 11)
Старт, % Start, %	0,5±0,07	0,4±0,06	0,6±0,03	0,5±0,06	0,3±0,05*	0,5±0,07
ЛФХ, % LPC, %	0,6±0,07	1,5±0,09***	1,6±0,11***	0,4±0,03*	0,5±0,09	0,6±0,08
СМ, % SM, %	1,7±0,11	1,4±0,06	2,1±0,11*	1,4±0,19	1,5±0,02	1,6±0,04
ФС + ФИ, % PS + PI, %	1,8±0,14	1,4±0,18	4,7±0,29***	2,0±0,11	2,3±0,13*	2,0±0,15
ФХ, % PC, %	78,5±0,19	83,3±0,26***	80,6±0,19***	81,6±0,52***	83,8±0,17***	85,2±0,30***
ФЭ, % PE, %	4,2±0,10	3,6±0,17	3,5±0,21**	3,7±0,14*	3,8±0,03**	3,6±0,07***
ФГл + Кл, % PG + CL, %	9,1±0,35	5,2±0,02***	4,1±0,09***	7,8±0,21**	6,2±0,08***	5,2±0,24***
НФЛ, % UPL, %	3,6±0,09	2,1±0,04***	1,8±0,09***	2,3±0,05***	2,1±0,04***	1,8±0,03***

ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭ – фосфатидилэтанолламин, ФГл – фосфатидилглицерин, Кл – кардиолипид, НФЛ – неидентифицированные фосфолипиды.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по сравнению с контрольной группой

LPC – lysophosphatidylcholine, SM – sphingomyelin, PS – phosphatidylserine, PI – phosphatidylinositol, PC – phosphatidylcholine, PE – phosphatidylethanolamine, PG – phosphatidylglycerol, CL – cardiolipin, UPL – unidentified phospholipids.

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ compared to the control group

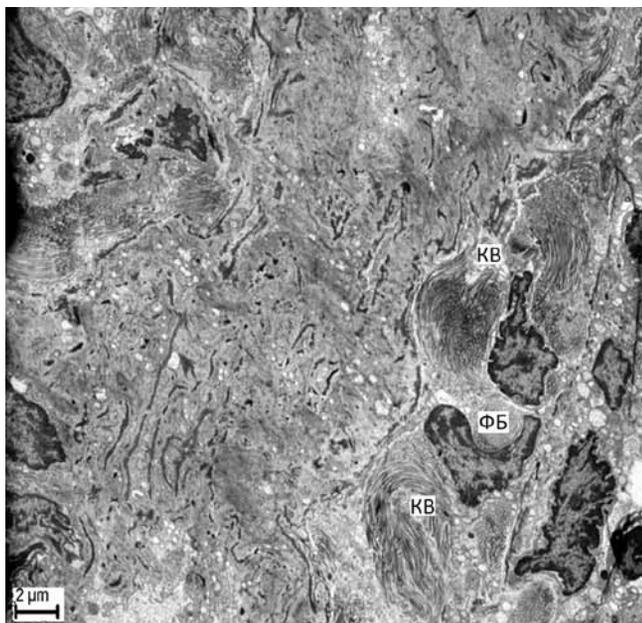


Рис. 8. Радиоиндуцированное повреждение легких, 13 недель.

Интрапультмонарный ателектаз. КВ – коллагеновые волокна, ФБ – фибробласты. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), $\times 7470$

Fig. 8. Radio-induced lung damage, week 13. Intrapulmonary atelectasis. КВ – collagen fibers, ФБ – fibroblasts. Transmission electron microscopy (TEM), $\times 7470$

и кардиолипина, содержание которых было сниженным в течение всего эксперимента и не нормализовалось (табл. 1).

В результате проведенного исследования установлено, что для развития ателектазов необходимо определенное время с начала эксперимента, то есть наличие весьма непродолжительного, недельного латентного периода, в который происходит формирование фоновых изменений в легочной ткани, обуславливающих дальнейшее формирование ателектазов и дистелектазов. К таковым относятся инициальное повреждение эндотелия кровеносных капилляров, реализующееся в выраженные расстройства кровообращения, развитие в результате отека интерстиция альвеолярно-капиллярного блока, повреждение альвеолоцитов второго типа и разрушение сурфактанта. Отмечена определенная закономерность развития ателектазов и дистелектазов, первоначально субплеврально (7-е сутки) и далее интрапультмонарно. Полученные данные дают основание предполагать, что ателектазы, возникающие на субплевральных участках легочной ткани, своим происхождением обязаны дефициту сурфактанта, разрушающегося как под влиянием ионизирующего излучения (радиолиз воды, поток активных радикалов кислорода), так и вследствие гипоксии, развивающейся на фоне расстройств кровообращения. Это подтверж-

Таблица 2 / Table 2

Динамика изменений межальвеолярных перегородок, эпителиальной выстилки бронхиол и ядер эпителиоцитов в контрольной группе и в разные сроки после воздействия ионизирующего излучения

Dynamics of changes in the interalveolar septa, epithelial bronchiolar lining and nuclei of epithelial cells in the control group and at different times after ionizing radiation exposure

Показатель / Indicator	Контрольная группа / Control group	Сроки, сутки / Timing, days			
		7-е	14-е	50-е	
Средняя толщина межальвеолярных перегородок Average thickness of the interalveolar septa	n	37	35	33	36
	µm	5,64±0,54	12,23±1,30	15,01±1,93	18,67±2,29
	p ₁	–	0,000014	0,000015	0,000001
	p ₂	–	–	0,236555	0,017054
	p ₃	–	–	–	0,226014
Средняя толщина эпителиальной выстилки бронхиол Average thickness of the epithelial lining of the bronchioles	n	157	153	154	157
	µm	13,82±0,90	21,48±7,33	59,36±3,56	47,61±2,74
	p ₁	–	0,300444	0,000000	0,000000
	p ₂	–	–	0,000005	0,000944
	p ₃	–	–	–	0,009347
Средний диаметр ядер эпителиоцитов бронхиол Average diameter of the nuclei of the epithelial cells of bronchioles	n	254	259	263	275
	µm	4,16 ± 0,11	4,74±0,01	7,46±1,55	7,56±0,17
	p ₁	–	0,000000	0,034173	0,000000
	p ₂	–	–	0,079883	0,000000
	p ₃	–	–	–	0,948889

p₁ – по сравнению с контрольной группой, p₂ – по сравнению с результатами на 7-е сутки, p₃ – по сравнению с результатами на 14-е сутки

p₁ – compared to the control group, p₂ – in comparison with day 7, p₃ – in comparison with day 14

дается и уменьшением содержания фосфолипидов ЛС, наблюдаемым в первые трое суток после облучения, и отсутствием осязаемых изменений в воздухопроводящих путях. Возникновение ателектазов, по-видимому, сопряжено не только с уменьшением общего содержания фосфолипидов, обеспечивающих, в частности, отсутствие слипания альвеол в конце выдоха, но и с нарушением соотношения отдельных фракций фосфолипидов [15]. В дальнейшем возникают изменения в бронхах и бронхиолах, выражающиеся в утолщении эпителиальной выстилки за счет увеличения в объеме как самих эпителиоцитов, так и их ядер, формировании серозно-слизистого экссудата, что проявляется уменьшением их просвета и подтверждено морфометрически (табл. 2).

Исходя из этого, развитие ателектазов и дистелектазов, локализующихся интрапульмонарно, по-видимому, обусловлено совместной реализацией как минимум трех факторов – прогрессирующим утолщением межальвеолярных перегородок, разрушением сурфактанта и усилением эффекта обтурационного механизма. Постепенно в развитии ателектазов становится ощутимым влияние еще одного фактора, усиливающего сужение просвета бронхов и бронхиол. Это бронхобронхиолоконстрикция, возникающая спустя 2 недели после начала эксперимента. В результате

секреции активированными макрофагами фосфолипиды А2 происходит высвобождение арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов. Свободная арахидоновая кислота быстро метаболизируется, превращаясь в высокоактивные соединения – простагландины и тромбоксаны, а по липооксигеназному пути ведет к синтезу сульфидопептидных лейкотриенов, обладающих выраженным бронхо- и бронхиолоконстрикторным действием, вызывающих отек слизистой оболочки, нарушение мукоцилиарного клиренса, увеличение продукции слизи [16]. Таким образом, в образовании ателектазов имеют значение названные нами быстро реализуемый фактор (разрушение сурфактанта под действием ионизирующего излучения и нарастающей гипоксии) и медленно реализуемые факторы (деструкция альвеолоцитов, нарастающая бронхобронхиолярная обструкция, бронхобронхиолоконстрикция). Первые ателектазы, появляющиеся субплеврально, по сути, монофакторные, сурфактантзависимые. Ателектазы и дистелектазы, расположенные более дистально интрапульмонарно, имеют отличительные особенности по сравнению с субплевральными монофакторными ателектазами: они значительно меньше по площади, более многочисленные и характеризуются мозаичностью расположения.

Заключение

В результате проведенного исследования изучен морфогенез ателектазов при однократном экспериментальном радиоиндуцированном воздействии. Выявлены морфологические и временные характеристики возникновения и развития субплевральных и интрапульмонарных ателектазов и дистелектазов. Полученные данные могут служить основой для разработки и применения пульмонопротективных средств и препаратов, реализации комплекса мероприятий по профилактике ателектазов и снижению числа осложнений.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Ю.А. Кириллов.
Сбор и обработка материала – Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, Е.М. Малышева, С.Е. Тимофеев, Е.А. Старцева, О.А. Розенберг.
Написание текста – Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, Е.М. Малышева, С.Е. Тимофеев.
Редактирование – Ю.А. Кириллов, И.А. Чернов, О.А. Розенберг.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Yu.A. Kirillov.
Collected the data and performed the analysis – Yu.A. Kirillov, I.A. Chernov, E.M. Malysheva, S.E. Timofeev, E.A. Startseva, O.A. Rozenberg.
Wrote the paper – Yu.A. Kirillov, I.A. Chernov, E.M. Malysheva, S.E. Timofeev.
Edited the manuscript – Yu.A. Kirillov, I.A. Chernov, O.A. Rozenberg.

Литература/References

1. Шляпников В.Н. Ателектаз и ателектатическая пневмония: Учебно-методическое пособие по патологической анатомии. Куйбышев, 1978. 140 с.
Shlyapnikov VN. Atelectasis and atelectatic pneumonia. Manual on pathological anatomy. Kuibyshev, 1978. 144 p. (In Russ.).
2. Чухриенко Д.П., Чухриенко Н.Д. Ателектаз легких. Киев: Здоровье, 1979. 182 с.
Chukhrienko DP, Chukhrienko ND. Atelectasis of the lungs. Kiev: Zdorov'e. 1979. 182 p. (In Russ.).
3. Woodring JH, Reed JC. Types and mechanisms of pulmonary atelectasis. J Thorac Imaging. 1996;11(2):92–108. DOI: 10.1097/00005382-199621000-00002.
4. Ерохин В.В., Романова Л.К. (ред.). Клеточная биология легких в норме и при патологии: Руководство для врачей. Москва: Медицина, 2000. С. 384–385.
Erokhin VV, Romanova LK (eds.). Cellular biology of the lungs in norm and in pathology: A guide for doctors. Moscow: Meditsina, 2000. P. 384–385 (In Russ.).
5. Чучалин А.Г. (ред.). Респираторная медицина: Руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. Т. 1. С. 317–319.
Chuchalin AG (ed.). Respiratory medicine: A guide. Moscow: GEOTAR-Media, 2007. V. 1. P. 317–319 (In Russ.).
6. Коган Е.А. Фиброзирующий альвеолит – современные аспекты проблемы. Архив патологии. 1995;57(4):5–11.
Kogan EA. Fibrosing alveolitis – current aspects of the problem. Arch Patol. 1995;57(4):5–11 (In Russ.).
7. Дубровская В.Ф., Кириллов Ю.А., Волчков В.А., Клестова О.В., Миролобова О.Ю., Шульга А.Э. и др. Модификация радиоиндуцированной патологии легких интра трахеальным введением фосфатидилхолин-холестериновых липосом. Пульмонология. 1998;2:74–78.
Dubrovskaya VF, Kirillov YuA, Volchkov VA, Klestova OV, Mirolyubova OYu, Shul'ga AE et al. Modification of radio-induced lung pathology by intratracheal administration of phosphatidylcholine-cholesterol liposomes. Pul'monologiya. 1998;2:74–78 (In Russ.).
8. Smith TA, Kirkpatrick DR, Smith S, Smith TK, Pearson T, Kailasam A et al. Radioprotective agents to prevent cellular damage due to ionizing radiation. J Transl Med. 2017;15(1):232. DOI: 10.1186/s12967-017-1338-x.
9. Abadi SHMH, Shirazi A, Alizadeh AM, Changizi V, Najafi M, Khalighfard S et al. The effect of melatonin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, and malondialdehyde levels in the targeted and the non-targeted lung and heart tissues after irradiation in xenograft mice colon cancer. Curr Mol Pharmacol. 2018;11(4):326–35. DOI: 10.2174/1874467211666180830150154.
10. Yin Z, Yang G, Deng S, Wang Q. Oxidative stress levels and dynamic changes in mitochondrial gene expression in a radiation-induced lung injury model. J Radiat Res. 2019;60(2):204–14. DOI: 10.1093/jrr/rry105.
11. Judge JL, Lacy SH, Ku WY, Owens KM, Hernady E, Thatcher TH et al. The Lactate Dehydrogenase Inhibitor Gossypol Inhibits Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. Radiat Res. 2017;188(1):35–43. DOI: 10.1667/RR14620.1.
12. Hawkins PG, Sun Y, Dess RT, Jackson WC, Sun G, Bi N et al. Circulating microRNAs as biomarkers of radiation-induced cardiac toxicity in non-small-cell lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 2019;145(6):1635–43. DOI: 10.1007/s00432-019-02903-5.
13. Carter CL, Jones JW, Farese AM, MacVittie TJ, Kane MA. Lipidomic dysregulation within the lung parenchyma following whole-thorax irradiation: Markers of injury, inflammation and fibrosis detected by MALDI-MSI. Sci Rep. 2017;7(1):10343. DOI: 10.1038/s41598-017-10396-w.
14. Vaskovsky VE, Kostetsky VY, Vasendin IM. A universal reagent for phospholipid analysis. J Chromatography. 1975;114(1):129–41. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)85249-8.
15. Bangham AD. Artificial lung expanding compound (ALECtm). In: D.D. Lasic, D. Papahajopoulos (eds.). Medical applications of liposomes. Elsevier Science, 1998. P. 452–455.
16. Тюренков И.Н., Воронков А.В., Слещанс А.А., Доркина Е.Г., Снугур Г.Л. Антиоксидантная терапия эндотелиальной дисфункции. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2013;1:14–25.
Tyurenkov IN, Voronkov AV, Slietsans AA, Dorkina EG, Snigur GL. Antioxidant therapy of endothelial dysfunction. Reviews on clinical pharmacology and drug therapy. 2013;1:14–25 (In Russ.).

Информация об авторах

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

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

Евгения Михайловна Малышева – аспирант кафедры патологической анатомии Тюменского ГМУ; заведующая патологоанатомическим отделением ГКБ № 40 ДЗМ.

Сергей Евгеньевич Тимофеев – аспирант кафедры патологической анатомии Тюменского ГМУ; врач-патологоанатом ГКБ № 40 ДЗМ.

Евгения Анатольевна Старцева – врач-патологоанатом ГКБ № 40 ДЗМ.

Олег Александрович Розенберг – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории медицинской биотехнологии РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова.

Author information

Yuri A. Kirillov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology; Professor of Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Tyumen State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0003-3555-0902>

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

Evgeniya M. Malysheva – Postgraduate Student, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Tyumen State Medical University; Head of the Pathology Department, City Clinical Hospital No. 40 of the Department of Health of the City of Moscow.
<https://orcid.org/0000-0003-0974-0403>

Sergei E. Timofeev – Postgraduate Student, Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Tyumen State Medical University; pathologist, Pathology Department, City Clinical Hospital No. 40 of the Department of Health of the City of Moscow.
<https://orcid.org/0000-0002-7098-9024>

Evgeniya A. Startseva – pathologist, Pathology Department, City Clinical Hospital No. 40 of the Department of Health of the City of Moscow.
<https://orcid.org/0000-0001-9844-7254>

Oleg A. Rozenberg – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Medical Biotechnology Laboratories, AM Granov Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technologies.
<https://orcid.org/0000-0002-4952-8936>

Морфологическая характеристика изменений периферических нервов и тканей таргетных зон при соединении периферических нервов по типу «конец-в-бок» в эксперименте

А.Ю. Ништ, В.С. Чирский, Н.Ф. Фомин

ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Перспективным способом восстановления иннервации, утраченной при травмах периферических нервов, является соединение дистального сегмента поврежденного нерва с интактным нервом-донором по типу «конец в бок». Немногочисленные публикации о случаях выполнения данных вмешательств наряду с отсутствием фундаментальных представлений об источнике и механизме восстановления волокон нерва-реципиента, состоянии нерва-донора, а также о полноте реиннервации тканей после подобных вмешательств сдерживают внедрение данного способа в широкую хирургическую практику. Цель исследования – дать морфологическую характеристику изменений нерва-донора и нерва-реципиента, а также оценить морфофункциональные результаты реиннервации мышечной ткани в условиях соединения пересеченного периферического нерва с интактным нервным стволом по типу «конец в бок» в эксперименте на лабораторных животных.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 79 лабораторных животных (кроликах). У животных экспериментальной группы после моделирования травмы общего малоберцового нерва на уровне середины бедра дистальный сегмент пересеченного нерва соединяли с интактным большеберцовым нервом по типу «конец в бок». В группе контроля после моделирования аналогичной травмы общего малоберцового нерва реконструктивные вмешательства на поврежденном нерве не проводили.

Результаты. При исследовании микрохирургической анатомии этапов реконструктивно-пластических вмешательств на периферических нервах, связанных с хирургическими манипуляциями на периневральных футлярах нервных стволов, подтверждена высокая вероятность частичного повреждения нервных волокон, непосредственно прилежащих к периневрию. Результаты морфофункционального исследования периферических нервов и иннервируемых ими мышц свидетельствуют о частичном восстановлении утраченной иннервации за счет соединения дистального сегмента поврежденного нерва-реципиента с интактным нервом-донором по типу «конец в бок» в эксперименте на лабораторных животных. Морфологической основой реиннервации нерва-реципиента в данном случае являются регенерирующие аксоны из состава нерва-донора, неизбежно повреждаемые на этапах микрохирургического вмешательства. Репаративная регенерация волокон нерва-донора обеспечивает как реиннервацию дистального сегмента нерва-реципиента, так и частичное восполнение собственных потерь нерва-донора.

Ключевые слова: периферический нерв, травма периферического нерва, мышечная атрофия, восстановление нервов, соединение периферических нервов по типу «конец в бок», регенерация периферических нервов, восстановление иннервации

Для корреспонденции: Алексей Юрьевич Ништ. E-mail: nachmed82@mail.ru

Для цитирования: Ништ А.Ю., Чирский В.С., Фомин Н.Ф. Морфологическая характеристика изменений периферических нервов и тканей таргетных зон при соединении периферических нервов по типу «конец-в-бок» в эксперименте. Клини. эксп. морфология. 2020;9(1):40–48. DOI:10.31088/CEM2020.9.1.40-48

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 11.12.2019. Получена после рецензирования 23.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

Morphological characteristics of changes in peripheral nerves and tissues of target zones after the end-to-side neurorrhaphy in an experiment

A. Yu. Nisht, V.S. Chirskij, N.F. Fomin

S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Introduction. The end-to-side neurorrhaphy of the distal segment of damaged nerve with an intact donor nerve is a promising way to restore the innervation. The introduction of this method into a wide surgical practice

is difficult because of the small number of publications on cases of these interventions alongside with the lack of fundamental understanding of the source and mechanism of recipient nerve repair, of the state of the donor nerve and of the completeness of tissue reinnervation after such operations.

The aim of the study was to characterize the morphological changes of the donor nerve and the recipient nerve, as well as to evaluate the morphofunctional results of muscle tissue reinnervation by the end-to-side neurorrhaphy of the transected peripheral nerve with an intact nerve-donor in an experiment on laboratory animals.

Materials and methods. The study was performed on 79 laboratory animals (rabbits). In the experimental group, the common peroneal nerve injury was modeled at the level of the mid-thigh and the distal segment of the transected nerve was connected to the intact tibial nerve by the end-to-side neurorrhaphy. In the control group, only the common peroneal nerve injury was modeled.

Results. The study of microsurgical anatomy stages of reconstructive plastic surgery on peripheral nerves associated with surgical manipulations on the perineurium of nerve trunks confirmed a high probability of partial damage of the nerve fibers directly adjacent to the perineurium.

Morphofunctional study of peripheral nerves and innervated muscles indicate a partial restoration of lost innervation after the end-to-side neurorrhaphy of the injured recipient nerve to the intact donor nerve in experiments on laboratory animals. In this case, reinnervation is morphologically based on regenerating axons from the donor nerve, which was inevitably damaged at the microsurgery. Reparative regeneration of the donor nerve fibers provides both reinnervation of the distal segment of the recipient nerve and partial recovery of the donor nerve.

Keywords: peripheral nerve, peripheral nerve injury, muscular atrophy, nerve repair, end-to-side neurorrhaphy, nerve regeneration, reinnervation of tissues

Corresponding author: Alexey Yu. Nisht. E-mail: nachmed82@mail.ru

For citation: Nisht A. Yu., Chirskij V.S., Fomin N.F. Morphological characteristics of changes in peripheral nerves and tissues of target zones after the end-to-side neurorrhaphy in an experiment. Clin. exp. morphology. 2020;9(1):40–48. DOI:10.31088/CEM2020.9.1.40-48

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

Received 11.12.2019. **Received in revised form** 23.01.2020. **Accepted** 11.02.2020.

Введение

В общей структуре травматизма мирного времени повреждения периферических нервов отмечаются у 3–6% пациентов [1, 2]. Функциональные результаты реконструктивно-пластических вмешательств на периферических нервах зависят от большого количества факторов, среди которых основными являются уровень первичной травмы периферических нервов, способ хирургического восстановления анатомической целостности нервных стволов и длительность денервации тканей целевых зон поврежденного нерва [1, 3]. Длительность периода регенерации аксонов при проксимальных ранениях периферических нервов – частая причина низкой эффективности восстановления утраченных функций вследствие атрофических изменений мышц дистальных сегментов конечностей [4, 5]. Перспективным способом реиннервации дистального сегмента поврежденного нерва является его соединение по типу «конец в бок» с интактным нервом-донором [6–8]. Немногочисленные публикации о выполнении данных вмешательств наряду с отсутствием четких представлений об источнике и механизме восстановления волокон нерва-реципиента, состоянии нерва-донора, а также о полноте реиннервации тканей после подобных вмешательств препятствуют широкому внедрению данного способа в хирургическую практику.

Цель исследования – дать морфологическую характеристику изменений нерва-донора и нерва-реци-

пиента и оценить морфофункциональные результаты реиннервации мышечной ткани в условиях соединения пересеченного периферического нерва с интактным нервным стволом по типу «конец в бок» в эксперименте на лабораторных животных.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 79 лабораторных животных – кроликах породы шиншилла, половозрелых особях обоего пола. Экспериментальное исследование с участием лабораторных животных проводилось с соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986) и Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (Москва, 1977). Хирургические вмешательства проводили в условиях экспериментальной операционной с соблюдением правил асептики и антисептики. После премедикации (внутривенно 0,5 мл ветранквила) экспериментальные хирургические вмешательства выполняли в условиях наркотического сна (внутривенно вводили 1% раствор тиопентала натрия) в сочетании с местной инфильтрационной анестезией 0,5% раствором новокаина. У животных экспериментальной группы (n=57) моделировали травму периферического нерва путем резекции 1 см длины общего малоберцового нерва на уровне средней трети бедра. Затем дистальный сегмент пере-

сеченного нерва соединяли по типу «конец в бок» со специально сформированным дефектом периневрия на боковой поверхности большеберцового нерва микрохирургическими швами (Prolene 10/0). Животным группы контроля (n=22) после моделирования травмы периферического нерва реконструктивные вмешательства на нервных стволах не проводили. В послеоперационном периоде животных наблюдали от 1 до 290 суток. После выведения животных из опыта (премедикация 0,5 мл ветранквила, затем на фоне передозировки тиопенталом натрия внутривенно вводили 10 мл пересыщенного хлорида калия) для морфологического исследования иссекали седалищный нерв и мышцы латерального костно-фасциального футляра голени на стороне оперативного вмешательства и контралатеральной конечности. Препараты фиксировали в 10% нейтральном формалине, с предварительной двойной иммобилизацией нервных стволов на полимерных шинах во избежание ретракции. Проводку и заливку в парафиновые блоки проводили по стандартным методикам. Окрашивали микропрепараты гематоксилином и эозином, препараты периферических нервов дополнительно окрашивали по методу Шпильмейера. Изучение микропрепаратов проводили с использованием светового микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) с цифровой системой захвата изображения Axio Cam HRC под управлением компьютерной программы Zen (blue edition). Часть препаратов периферических нервов после острых опытов была фиксирована и подготовлена для исследования методом сканирующей микроскопии (сканирующий электронный микроскоп Jeol JSM 6390LA, Япония).

Результаты и обсуждение

Актуальные вопросы при восстановлении периферических нервов соединением по типу «конец в бок» – источник регенерирующих аксонов и степень повреждения интактного нерва-донора при выполнении микрохирургических вмешательств данного типа. Сама идея соединения швами дистального сегмента пересеченного нерва с другим нервом предполагает невротизацию поврежденного нерва-реципиента волокнами нерва-донора. При прямой невротизации с пересечением менее важного в функциональном плане периферического нерва для соединения его проксимального сегмента с дистальным сегментом поврежденного нерва морфологической основой реиннервации футляров нерва-реципиента является репаративная регенерация за счет терминального спрутинга пересеченных волокон нерва-донора, как и при соединении швами обоих концов поврежденного нерва [9]. Соединение дистального сегмента поврежденного нерва с интактным нервом-донором по типу «конец в бок» не предусматривает намеренное повреждение волокон нерва-донора. При этом в исследованиях на экспериментальных животных подтверждено прораствание волокон нерва-донора в дистальный сегмент коапированного нерва-реципиента

[10]. Вместе с тем остается спорным вопрос о непосредственном механизме реиннервации дистального сегмента нерва-реципиента. Существует мнение, что при соединении дистального сегмента пересеченного нерва с интактным нервом-донором происходит невротизация нерва-реципиента за счет коллатерального спрутинга волокон нерва-донора. В области перехватов Ранвье интактные нервные волокна разветвляются, и их отростки направляются в футляры нерва-реципиента [6, 11]. Таким образом, интактный аксон за счет разветвления миелинизированного сегмента как бы расширяет территорию своего представительства. Факторы, являющиеся стимулом к разветвлению интактного аксона, а также морфологическая сторона данного процесса остаются спорными. При этом на одну нервную клетку может возлагаться даже иннервация волокон мышц-антагонистов, что само по себе ставит множество вопросов о центральной регуляции.

По другим данным, коллатеральный спрутинг является важным восстановительным механизмом при частичных утратах иннервации. Непосредственно в области терминальных разветвлений происходит частичная компенсация неврологических расстройств за счет вовлечения большего количества мышечных волокон в состав одной двигательной единицы [12]. При этом территория реиннервации ограничена соседними мышечными волокнами отдельных пучков в составе одной мышцы.

Соединение периферических нервов по типу «конец в бок» не предусматривает выполнение намеренной аксотомии. Вместе с тем в экспериментальных исследованиях выявлена положительная корреляция объемов функционального восстановления и дозированной аксотомии нерва-донора [13]. Разобщение проксимального и дистального сегментов аксона является пусковым механизмом комплекса дегенеративно-восстановительных процессов в миелинизированном нервном волокне. В данном исследовании было уделено особое внимание оценке микрохирургической анатомии и морфологической характеристике области экспериментального оперативного вмешательства, направленное на определение степени травматического воздействия на нерв-донор при соединении к его боковой поверхности дистального сегмента поврежденного нерва-реципиента.

При исследовании микрохирургической анатомии этапов реконструктивно-пластических вмешательств на периферических нервах, связанных с хирургическими манипуляциями на периневральных футлярах нервных стволов, была подтверждена высокая вероятность частичного повреждения нервных волокон, непосредственно прилежащих к периневрию.

Повреждение аксонов нерва-донора выявлялось как на этапе формирования дефекта периневрального футляра, так и в процессе соединения нервов микрохирургическими швами. При этом наибольшее количество пересеченных миелинизированных волокон определялось в случаях со вскрытием периневрального футляра поперечным разрезом (рис. 1 А, В).

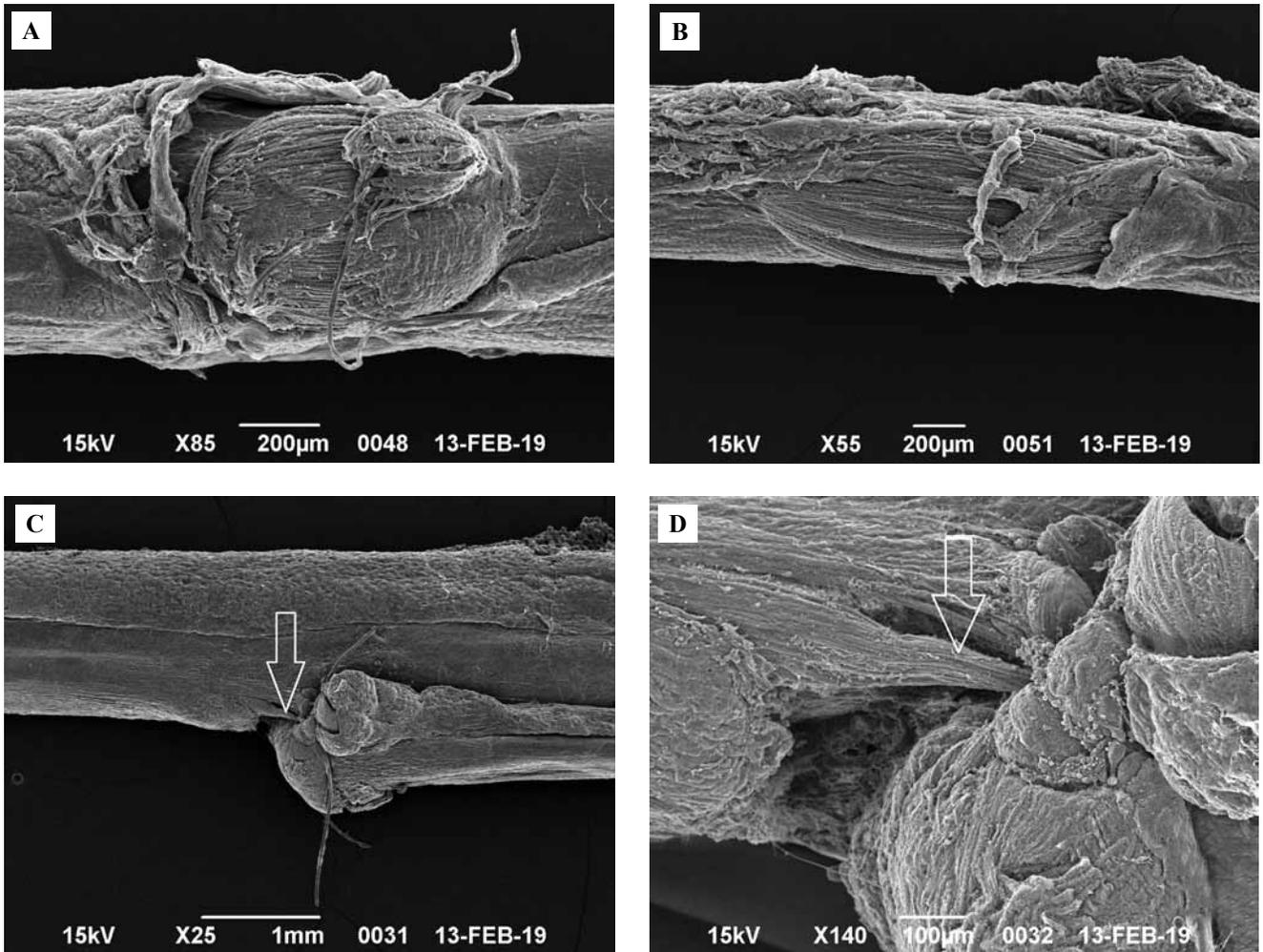


Рис. 1. Структура поверхности периферических нервов на разных этапах соединения нервов по типу «конец в бок». А – сформирован дефект периневрия поперечным разрезом (масштабный отрезок 200 мкм), В – сформирован дефект периневрия продольным разрезом (масштабный отрезок 200 мкм), С (масштабный отрезок 1 мм) и D (масштабный отрезок 100 мкм) – нерв-реципиент фиксирован двумя швами к нерву-донору (стрелкой обозначены волокна нерва-донора, подхваченные в шов)

Fig. 1. Structure of the peripheral nerves surface at different stages of «end-to-side» neurorrhaphy. А – defect of the perineurium formed by cross-section (scale bar 200 μm), В – defect of the perineurium formed by longitudinal section (scale bar 200 μm), С (scale bar 1 mm) and D (scale bar 100 μm) – nerve-recipient is fixed by two sutures to the nerve-donor (arrow denotes the fibers of the donor nerve, picked up in to the suture)

Диаметр микрохирургической иглы атравматического шовного материала, использованного при выполнении экспериментальных вмешательств, превосходил средний диаметр миелинизированных нервных волокон экспериментального животного в 5–7 раз, что подтверждает высокую вероятность ранения аксонов при наложении периневральных швов. Протрузия нервных волокон через специально сформированный дефект периневрального футляра также способствовала захвату нервных волокон в микрохирургический шов (рис. 1 С, D).

При исследовании методом световой микроскопии продольных и поперечных срезов периферических нервов после их соединения по типу «конец в бок» на ранних сроках после выполнения экспериментальных

вмешательств выявлены признаки вторичной дегенерации нервных волокон в обоих нервных стволах.

Внутри периневрального футляра нерва-реципиента валлеровскому перерождению подверглись все нервные волокна дистального сегмента пересеченного нерва. Их миелиновые оболочки были фрагментированы с образованием телец округлой и неправильной формы. Ядра шванновских клеток имели вытянутую форму и сместились на периферию. В цитоплазме отдельных шванновских клеток прослеживались фрагменты разрушенного миелина. Собственные сосуды нервного ствола, расположенные в эндоневральном пространстве, были дилатированы и полнокровны (рис. 2).

В отличие от нерва-реципиента дегенеративные изменения волокон нерва-донора имели ограниченный

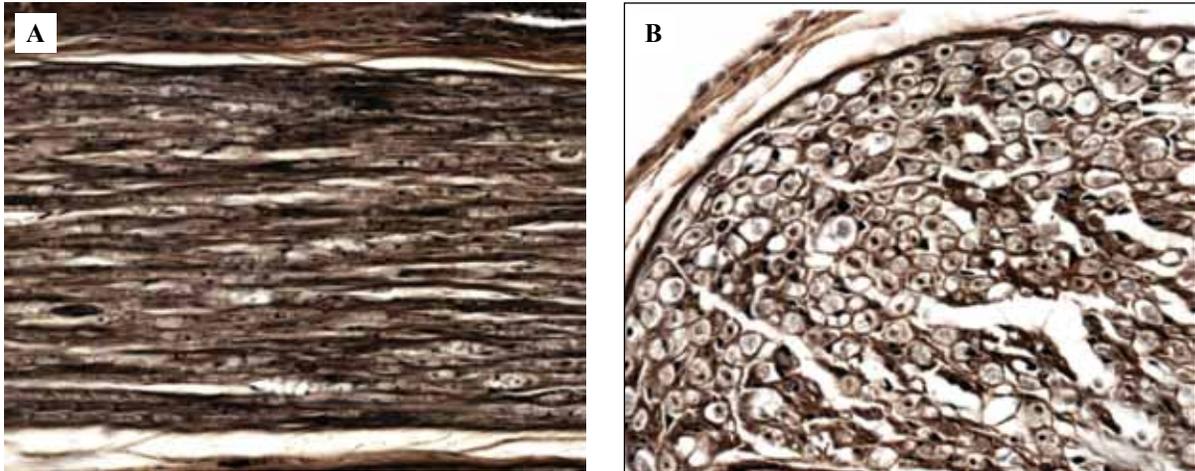


Рис. 2. Дегенеративные изменения волокон нерва-реципиента через 2 недели после его соединения в эксперименте с нервом-донором по типу «конец в бок». А – продольный срез, В – поперечный срез. Окраска по методу Шпильмейера, $\times 400$

Fig. 2. Degenerative changes in the fibers of the nerve-recipient in 2 weeks after its connection to the nerve-donor by «end-to-side» neurotaphy in the experiment. А – longitudinal section, В – cross section. Spielmeier stain, $\times 400$

характер. На продольных срезах миелинопатия и аксонопатия волокон нерва-донора локализовались в поверхностных отделах на стороне дефекта периневрального футляра. Проксимальная граница дегенеративных изменений соответствовала линии швов. Дистальное уровня оперативного вмешательства дегенеративные изменения ограниченного числа волокон нерва-донора определялись на всем протяжении исследованных препаратов. Между дегенерирующими волокнами отмечались отдельные миелинизированные аксоны с внешне неизменной структурой (рис. 3).

Дистальное уровня оперативного вмешательства на препаратах поперечных срезов в составе периневрального футляра нерва-донора помимо основной группы дегенерирующих аксонов, локализованной

в поверхностных отделах под периневрием на стороне, обращенной к нерву-реципиенту, визуализировались отдельные дегенерирующие волокна в толще нервного ствола. По всей вероятности, данное обстоятельство подтверждает изменчивость топографии нервных волокон в составе периневральных футляров, обусловленную перегруппировкой аксонов перед формированием боковых ветвей основного нервного ствола.

На продольных срезах, выполненных через зону оперативного вмешательства, отмечалось веерообразное расхождение во встречном направлении дегенерирующих волокон нерва-донора и нерва-реципиента выше и ниже линии лигатур с переплетением их по линии швов (рис. 4).

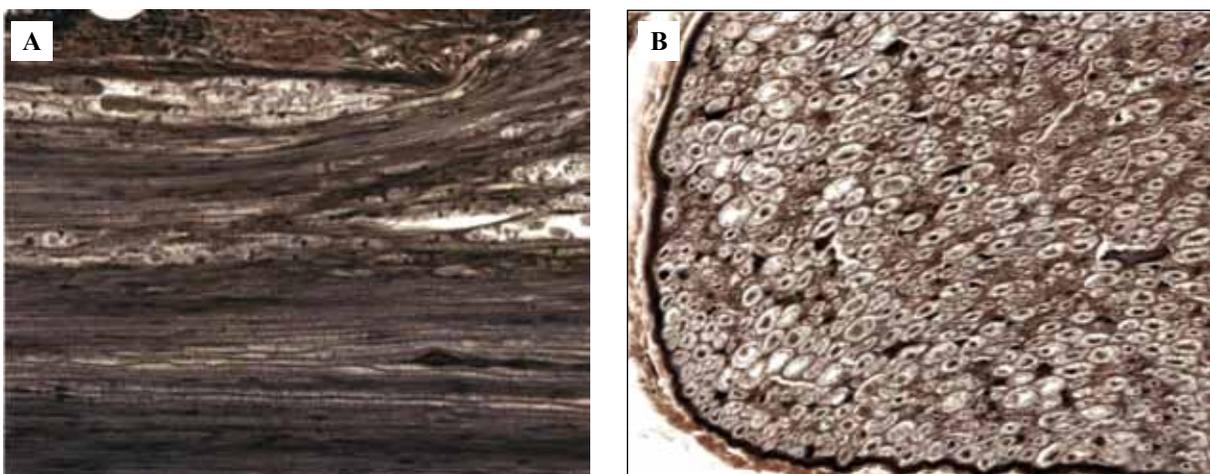


Рис. 3. Дегенеративные изменения волокон нерва-донора через 2 недели после подшивания к нему нерва-реципиента по типу «конец в бок». А – продольный срез, В – поперечный срез. Окраска по методу Шпильмейера, $\times 400$

Fig. 3. Degenerative changes in the fibers of the nerve-donor in 2 weeks after its connection to the nerve-recipient by «end-to-side» neurotaphy in the experiment. А – longitudinal section, В – cross section. Spielmeier stain, $\times 400$

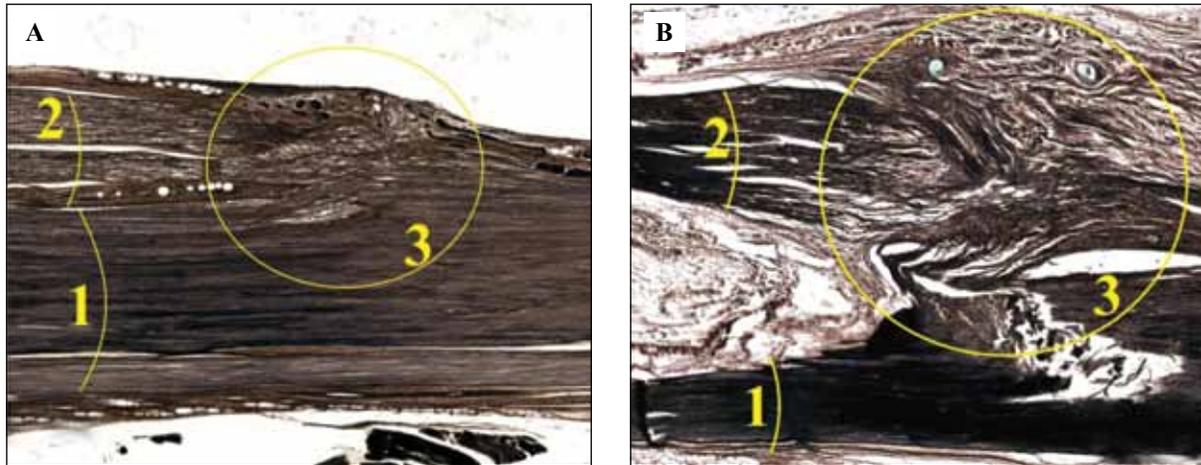


Рис. 4. Продольные срезы через зону шва нервов по типу «конец в бок» (1 – нерв-донор, 2 – нерв-реципиент, 3 – область шва нервов), выполненные в разные сроки наблюдения. А – через 14 дней после вмешательства, В – через 218 дней. Окраска по методу Шпильмейера, $\times 150$

Fig. 4. Longitudinal sections through the «end-to-side» neurorrhaphy zone (1 – nerve-donor, 2 – nerve-recipient, 3 – neurorrhaphy area), performed at different times of observation. A – 14 days after the operation, B – 218 days after the operation. Spielmeier stain, $\times 150$

Периневрий нерва-донора на стороне оперативного вмешательства истончился от уровня проксимальной границы дегенерации нервных волокон. Отдельные соединительнотканые волокна терялись в общей массе параневральных тканей в области послеоперационных изменений. В зоне наложенных лигатур периневрий не определялся методами световой микроскопии даже в отдаленные сроки (200 суток и более) после оперативного вмешательства. Дистальнее уровня швов периневрий визуализировался на обоих нервах, которые отделялись друг от друга небольшим слоем наружного эпинеурия.

На поздних сроках наблюдений структура тканей в зоне выполнения оперативного вмешательства несколько напоминала неврому. Хаотично направленные нервные волокна переплетались с волокнами соединительной ткани. На продольных срезах, выполненных через линию швов, отмечались отдельные миелинизированные нервные волокна, попавшие в срез поперечно, что, по всей видимости, свидетельствует о сложной траектории продвижения аксонов в дистальном направлении в процессе регенерации. При этом часть нервных волокон при смещении в дистальном направлении занимала позицию в футляре нерва-реципиента, а часть – в периневральном футляре нерва-донора (рис. 4). Таким образом, ветви регенерирующих волокон нерва-донора, поврежденные на этапах оперативного вмешательства, явились источником реиннервации не только для дистального сегмента нерва-реципиента, но и для частичного восполнения потерь со стороны нерва-донора.

На поперечных срезах нерва-реципиента выявлено резкое изменение соотношения удельной площади нервных волокон и соединительной ткани в составе нервного ствола. Основную площадь в поле зрения

микроскопа занимала соединительная ткань. Миелинизированные нервные волокна среднего и малого диаметра располагались внутри соединительнотканых тяжей по отдельности и небольшими группами.

Схожие изменения отмечались и в составе периневрального футляра нерва-донора, но в отличие от нерва-реципиента имели ограниченный характер распространения. Увеличение относительного объема соединительной ткани отмечалось только в поверхностных отделах нервного ствола на стороне выполнения оперативного вмешательства. В той же локализации отмечалось уменьшение числа волокон крупного диаметра (рис. 5).

На препаратах дистального сегмента пересеченного нерва животных контрольной группы определялась морфологическая картина полной дегенерации нервных волокон. Внутри периневрального футляра располагались шванновские клетки, разделяемые между собой соединительноткаными элементами. Миелинизированные нервные волокна ни в одном случае обнаружить не удалось. Эти данные свидетельствуют об адекватности использованной экспериментальной модели обширного дефекта периферического нерва.

Следует отметить, что у всех животных экспериментальной группы при наблюдении в послеоперационном периоде более 180 суток экспериментально-клиническими и электрофизиологическими исследованиями было подтверждено восстановление утраченных функций в удовлетворительном объеме.

Зафиксированные положительные результаты восстановления функций у животных экспериментальной группы и стойкая утрата сократительной активности соответствующей группы мышц у животных контрольной группы нашли подтверждение при исследовании структуры тканей целевых зон поврежденного нерва.

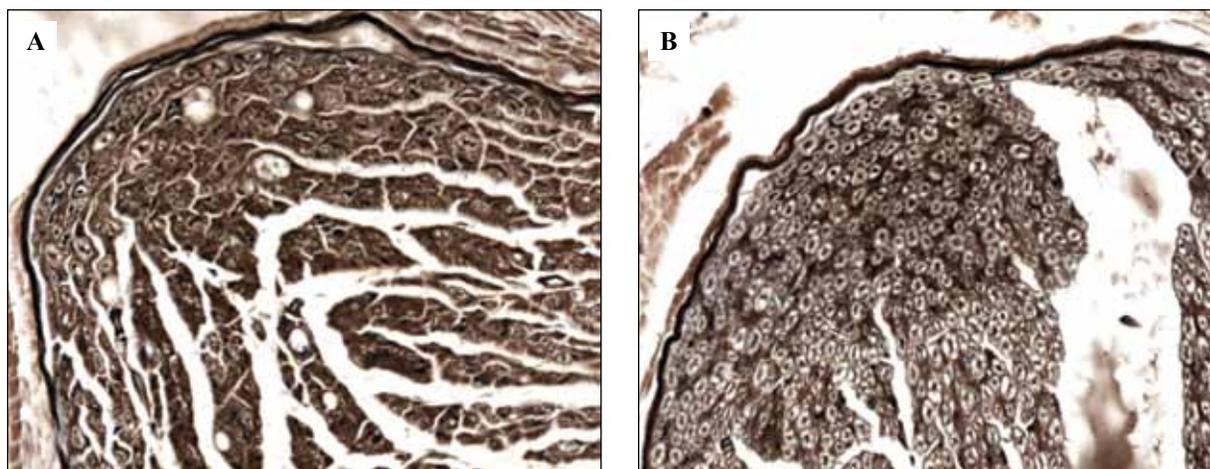


Рис. 5. Структура периферических нервов в отдаленном периоде (через 218 суток) после соединения нервов по типу «конец в бок». А – нерв-реципиент, В – нерв-донор. Окраска по методу Шпильмейера, $\times 400$

Fig. 5. Peripheral nerves structure in the long-term period (218 days) after «end-to-side» neurotaphy. А – nerve-recipient, В – nerve-donor. Spielmeyer stain, $\times 400$

У животных контрольной группы в мышцах переднего костно-фасциального футляра голени после пересечения общего малоберцового нерва развивалась выраженная атрофия. Пучки мышечных волокон были значительно уменьшены в размерах, утратили характерную исчерченность. Прослойки соединительной ткани, составляющие перимизий и эндомизий, по сравнению с контралатеральной конечностью были существенно утолщены (рис. 6). На всех исследованных препаратах отмечалось значительное увеличение удельной площади соединительной ткани.

У животных экспериментальной группы на фоне умеренно компенсированной реиннервации после восстановления общего малоберцового нерва отмечалась мозаичная структура мышц переднего и латерального футляров голени. Наряду с участками, сохранившими вид практически здоровой мышечной ткани, отмеча-

лись отдельные зоны атрофии мышечных волокон (рис. 6). При этом выраженность атрофии мышечных волокон была ниже по сравнению с группой контроля, о чем можно было судить по относительно большим диаметрам как отдельных мышечных волокон, так и их пучков. На наш взгляд, по структуре мышечной ткани в области иннервации ветвями восстановленного в эксперименте периферического нерва можно судить о продолжающихся процессах реиннервации мышечных волокон. Участки мышечной ткани, имеющие практически нормальную структуру, реиннервированы за счет достижения двигательными нервными волокнами дистальных отделов. Учитывая длительность наблюдения в эксперименте, которое в несколько раз превышало время, необходимое для достижения регенерирующими аксонами уровня середины голени, можно предположить, что в очагах выраженной мы-

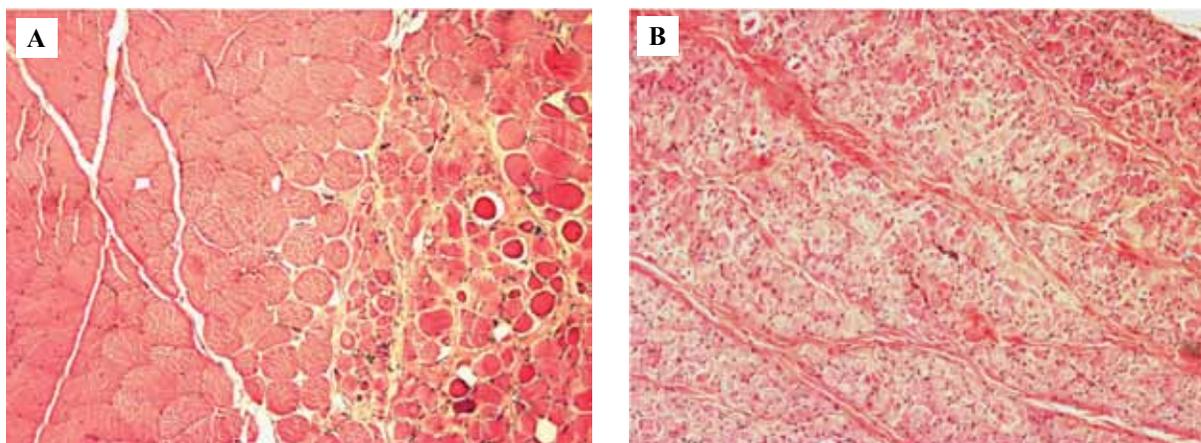


Рис. 6. Структура мышц латерального костно-фасциального футляра голени. А – через 218 суток после соединения нервов по типу «конец в бок», В – через 223 дня после пересечения нерва. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 6. Muscles structure of the lateral fascial leg compartment. А – 218 days after «end-to-side» neurotaphy, В – 223 days after crossing the nerve. H&E stain, $\times 100$

шечной атрофии двигательная иннервация безвозвратно утрачена. Участки умеренной атрофии мышечных волокон, прилежащие к реиннервированным областям, при условии их реиннервации за счет претерминальных ответвлений регенерирующих аксонов, могут впоследствии восстановить свою структуру. Соединение дистального сегмента пересеченного нерва с боковой поверхностью интактного нерва-донора привело к частичной реиннервации мышц в зоне распространения ветвей нерва-реципиента, что является морфологической основой умеренной компенсации двигательных расстройств.

Заключение

В экспериментах на лабораторных животных соединение дистального сегмента поврежденного нерва-реципиента с интактным нервом-донором по типу «конец в бок» приводит к частичному восстановлению иннервации конечности. Морфологической основой реиннервации нерва-реципиента в данном случае являются регенерирующие аксоны из состава нерва-донора, неизбежно повреждаемые на этапах микрохирургического вмешательства. Репаративная регенерация волокон нерва-донора обеспечивает как реиннервацию дистального сегмента нерва-реципиента, так и частичное восполнение собственных потерь нерва-донора.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.С. Чирский, Н.Ф. Фомин, А.Ю. Ништ.
Сбор и обработка материала – А.Ю. Ништ.
Написание текста – А.Ю. Ништ.
Редактирование – В.С. Чирский, Н.Ф. Фомин.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.S. Chirskij, N.F. Fomin, A. Yu. Nisht.
Collected the data and performed the analysis – A. Yu. Nisht.
Wrote the paper – A. Yu. Nisht.
Edited the manuscript – V.S. Chirskij, N.F. Fomin.

Литература/References

1. Говенько Ф.С. Хирургия повреждений периферических нервов. Санкт-Петербург: Феникс, 2010. 384 с.
Goven'ko FS. Surgery of peripheral nerve injury. Saint Petersburg: Feniks, 2010. 384 p. (In Russ.).
2. Берснев В.П. Практическое руководство по хирургии нервов. Москва: Умный доктор, 2017. 552 с.
Bersnev V.P. A practical guide to nerve surgery. Moscow: Umnyj doktor, 2017. 552 p. (In Russ.).
3. Белоусов А.Е. Пластика дефектов нервов. В кн.: Белоусов А.Е. Пластическая, реконструктивная и эстетическая хирургия. Санкт-Петербург: Гиппократ, 1998. С. 150–168.
Belousov AE. Plastic defects of nerves. In: Belousov A.E. Plastic, reconstructive and aesthetic surgery. Saint Petersburg, 1998. P. 150–168 (In Russ.).
4. Григорович К.А. Хирургия нервов. Ленинград: Медицина, 1969. 447 с.
Grigorovich KA. Nerve surgery. Leningrad: Medicina, 1969. 447 p. (In Russ.).
5. Ходжамурадов Г.М., Давлатов А.А., Исмоилов М.М., Одинаев М.Ф., Гулин А.В. Прогнозирование двигательных результатов пластики нервных стволов верхних конечностей. Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2012;3:898–900.
Xodzhamuradov GM, Davlatov AA, Ismoilov MM, Odinaev MF, Gulin AV. Prediction of motor results of upper extremity nerve trunks plasty. Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya: Estestvenny'e i texnicheskie nauki. 2012;3: 898–900 (In Russ.).
6. Байтингер В.Ф., Байтингер А.В. Шов нерва конец в бок: стратегия «получения» аксонов из интактного нерва (часть I). Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2013;2(45):6–12.
Bajtinger VF, Bajtinger AV. End-to-side nerve suture: strategy of «obtaining» axons from epy intact nerve (part I). Voprosy`rekonstruktivnoj i plasticheskoy xirurgii. 2013;2(45):6–12 (In Russ.).
7. Millesi H, Schmidhammer R. End-to-side coaptation – controversial research issue or important tool in human patients. *Acta Neurochir Suppl. 2007;100:103–6. DOI: 10.1007/978-3-211-72958-8_22.*
8. Viterbo F, Romão A, Brock RS, Joethy J. Facial reanimation utilizing orthodromic temporalis muscle flap and end-to-side cross-face nerve grafts. *Aesthetic Plast Surg. 2014;38(4):788–95. DOI: 10.1007/s00266-014-0357-8.*
9. Ноздрачев А.Д., Чумасов Е.И. Периферическая нервная система. Структура, развитие, трансплантация и регенерация. Санкт-Петербург: Наука, 1999. 272 с.
Nozdrachev AD, Chumasov EI. Peripheral nervous system. Structure, development, transplantation and regeneration. Saint Petersburg: Nauka, 1999. 272 p. (In Russ.).
10. Liao WC, Chen JR, Wang YJ, Tseng GF. The efficacy of end-to-end and end-to-side nerve repair (neurorrhaphy) in the rat brachial plexus. *J Anat. 2009;215(5):506–21. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2009.01135.x.*
11. Bontioti E, Kanje M, Lundborg G, Dahlin LB. End-to-side nerve repair in the upper extremity of rat. *J Peripher Nerv Syst. 2005;10(1):58–68. DOI: 10.1111/j.1085-9489.2005.10109.x.*
12. Живолупов С.А., Рашидов Н.А., Самарцев И.Н. Современные представления о регенерации нервных волокон при травмах периферической нервной системы. Вестник Российской Военно-медицинской академии. 2013;3:190–8.
Zhivolupov SA, Rashidov NA, Samarcev IN. Modern views on the regeneration of nerve fibers in injuries of the peripheral nervous system. Vestnik Rossijskoj Voenno-medicinskoj akademii. 2013;3:190–8 (In Russ.).
13. Brenner MJ, Dvali L, Hunter DA, Myckatyn TM, Mackinnon SE. Motor neuron regeneration through end-to-side repairs is a function of donor nerve axotomy. *Plast Reconstr Surg. 2007;120(1):215–23. DOI: 10.1097/01.prs.0000264094.06272.67.*

Информация об авторах

Алексей Юрьевич Ништ – кандидат медицинских наук, доцент, докторант Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Вадим Семенович Чирский – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Николай Федорович Фомин – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии (с топографической анатомией) Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова.

Author information

Alexey Yu. Nisht – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Doctoral-student, S.M. Kirov Military medical Academy.

<https://orcid.org/0000-0002-6696-1897>

Vadim S. Chirskij – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of pathological anatomy of the S.M. Kirov Military Medical Academy.

<https://orcid.org/0000-0003-3215-3901>

Nikolay F. Fomin – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of operative surgery (with topographic anatomy) of the S.M. Kirov Military Medical Academy.

<https://orcid.org/0000-0003-3961-1987>

Количественная характеристика тканей позвонков у эмбрионов и плодов человека

С.Л. Кабак, В.В. Заточная, Д.М. Гордионюк

Учреждение образования Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

Введение. Публикации, посвященные динамике роста хрящевых закладок позвонков в эмбриогенезе, немногочисленны. В них, как правило, содержатся сведения только о некоторых общих тенденциях изменения соотношения между отделами позвоночного столба и динамике роста размеров тел закладок отдельных его сегментов.

Цель работы – установить закономерности роста линейных размеров и объема закладки тела позвонков различной локализации, ее хрящевого и костного компонентов, у эмбрионов и плодов человека в первом триместре беременности.

Материалы и методы. Измерение морфометрических параметров тел закладок позвонков (высота, поперечный и переднезадний размер, максимальная площадь поперечного сечения тела/центра окостенения) проводилось на тотально окрашенных и просветленных препаратах, гистологических срезах фрагментов позвоночного столба, а также на серийных срезах цельных эмбрионов и плодов человека 6–20-недельного возраста, окрашенных гематоксилином и эозином.

Результаты. У зародышей человека в эмбриональном и раннем плодном периодах развития грудной отдел самый протяженный, а крестцовый отдел самый короткий. При этом наибольшие линейные размеры и объем имеют тела закладок поясничных позвонков. Во всех отделах позвоночного столба среднее значение поперечного размера превышало высоту и переднезадний размер тела. С возрастом увеличение высоты, поперечного и переднезаднего размеров тела закладки позвонков во всех отделах позвоночного столба носит линейный характер, а увеличение объема тела закладок позвонков более точно описывается степенной функцией.

Заключение. Различия морфометрических параметров тел позвонков разной локализации детерминированы генетически и выявляются уже в раннем плодном периоде развития. При этом наибольшие линейные размеры и объем имеют тела закладок поясничных позвонков. Во всех отделах позвоночного столба среднее значение поперечного размера превышает высоту и переднезадний размер тела. В раннем плодном периоде развития наибольшие средние линейные размеры и объем имеют центры окостенения, расположенные в закладках поясничных и грудных позвонков, так как с них начинается процесс окостенения хрящевых закладок.

Ключевые слова: эмбрион, плод человека, тело позвонка, морфометрия, окостенение

Для корреспонденции: Валентина Владимировна Заточная. E-mail: v.zatochnaya@gambler.ru

Для цитирования: Кабак С.Л., Заточная В.В., Гордионюк Д.М. Количественная характеристика тканей позвонков у эмбрионов и плодов человека. Клин. эксп. морфология. 2020;9(1):49–56. DOI:10.31088/СЕМ2020.9.1.49-56

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 19.12.2019. Получена после рецензирования 21.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

Quantitative characteristic of vertebral tissues in human embryos and fetuses

S.L. Kabak, V.V. Zatochnaya, D.M. Gordionok

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

There are very few publications on the dynamics of growth of cartilage models of the vertebrae in human embryos and fetuses. They usually deal with general trends in the change of the ratio between the spine regions and the dynamics of growth in the size of the vertebral bodies. The aim of the study was to reveal the patterns of the increase in linear dimensions and volume of the vertebrae of various localization, its cartilage and bone components in human embryos and fetuses during the first trimester of pregnancy.

Materials and methods. Whole-mount skeletal preparations stained with alcian blue and alizarin red as well as serial histological sections of spine fragments stained with hematoxylin and eosin were studied. A total of 48 human embryos/fetuses from 6 to 20 weeks of age were used. Morphometric analysis of vertebral bodies (height, transverse and anteroposterior size, maximum cross-sectional area of vertebral bodies and ossification center) was performed.

Results. In the embryonic and the early fetal periods of prenatal development, the thoracic spine is the longest region in human embryos, the sacral spine, the shortest. At the same time, lumbar vertebral body anlagen have the largest linear dimensions and volume. In all regions of the spine, the average transverse size exceeded the height and the anteroposterior size of the vertebral body. The linear increase in height, transverse and anterior dimensions of the vertebral body anlagen in all spine regions was detected with age. On the contrary, the volume increase is more accurately described by a power function.

Conclusion. Differences in morphometric parameters of vertebral bodies of different localization are determined genetically and are manifested in the early fetal period of prenatal development wherein the lumbar vertebral body anlagen have the largest linear dimensions and volume. In all parts of the vertebral column, the average transverse size exceeds the height and anteroposterior size of the vertebral body anlage. In the early fetal period, the ossification centers located in the lumbar and thoracic vertebral bodies show the largest average linear dimensions and volume.

Keywords: embryo, human fetus, vertebral body, morphometry, ossification

Corresponding author: Valentina V. Zatochnaya. E-mail: v.zatochnaya@rambler.ru

For citation: Kabak S.L., Zatochnaya V.V., Gordionok D.M. Quantitative characteristic of vertebral tissues in human embryos and fetuses. Clin. exp. morphology. 2020;9(1):49–56. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.1.49-56.

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

Received 19.12.2019. **Received in revised form** 21.01.2020. **Accepted** 11.02.2020.

В пренатальном онтогенезе развитие позвонков начинается с появления у 5-недельных эмбрионов человека (10 мм теменно-копчиковой длины, ТКД) мезенхимных конденсаций вокруг хорды. У плодов 9-недельного возраста закладки позвонков полностью хрящевые, а начиная с 10–11-й недели внутриутробного развития (плоды 45–60 мм ТКД) в них выявляются три центра оссификации – в области тела и в двух половинах нейральной дуги [1]. С 12-й недели эти центры визуализируются с помощью ультразвукового исследования с высокой разрешающей способностью, а также методами компьютерной и магнитно-резонансной томографии. Данные о линейных размерах центров окостенения тел позвонков разных отделов позвоночного столба плодов человека в горизонтальной и парасагитальной проекциях достаточно полно представлены в литературе [2–4]. Тем не менее о реальных размерах закладок тел позвонков, состоящих одновременно из хрящевой и костной части, по этим данным можно судить только опосредованно. Публикации, посвященные динамике роста хрящевых закладок позвонков в эмбриогенезе, немногочисленны. В них, как правило, содержатся сведения только о некоторых общих тенденциях изменения соотношения между отделами позвоночного столба и динамике роста размеров тел закладок отдельных его сегментов [1, 5, 6].

Цель работы – установить закономерности роста линейных размеров и объема закладки тела позвонков разной локализации, ее хрящевой и костной компонент, у эмбрионов и плодов человека в первом триместре беременности.

Материалы и методы

Изучено 46 неидентифицируемых по полу целых зародышей человека и их фрагментов 6–20-й недели гестации. Часть материала была получена в городской гинекологической больнице Минска в ходе искусственного прерывания беременности. После фиксации в 96% спирте и обезвоживания в ацетоне зародыши totally окрашивали ализариновым красным и ализариновым синим, а затем просветляли в 10% растворе КОН. Фрагменты плодов человека использовались для приготовления гистологических срезов в поперечной плоскости, окрашенных гематоксилином и эозином. Был также проведен анализ гистологических срезов зародышей, ранжированных по 23 стадиям развития из эмбриологической коллекции Карнеги (доступ получен через Digitally Reproduced Embryonic Morphology (DREM) project) и эмбриологической коллекции Белорусского государственного медицинского университета (диапазон ТКД – от 11 до 87 мм). Весь материал объединили в две возрастные группы: 6–10-недельные эмбрионы и плоды (на 10-й неделе эмбриогенеза появляются участки кальцификации в центре закладки тела двух нижних грудных и верхнего поясничного позвонков) и плоды 11–20-й недели внутриутробного развития.

На просветленных препаратах и гистологических срезах под стереомикроскопом Leica MS 5 (Leica Microsystems, Германия) с использованием программного обеспечения для обработки и анализа изображений Leica Application Suite V 3.80.0 измеряли следующие параметры хрящевой и костной части закладки (рис. 1): высота (мм) – расстояние между верхним

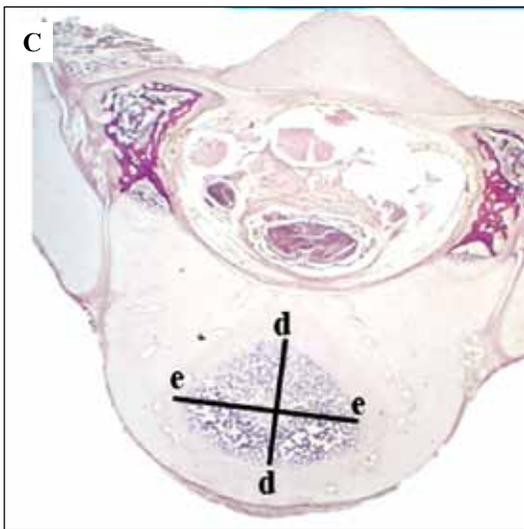
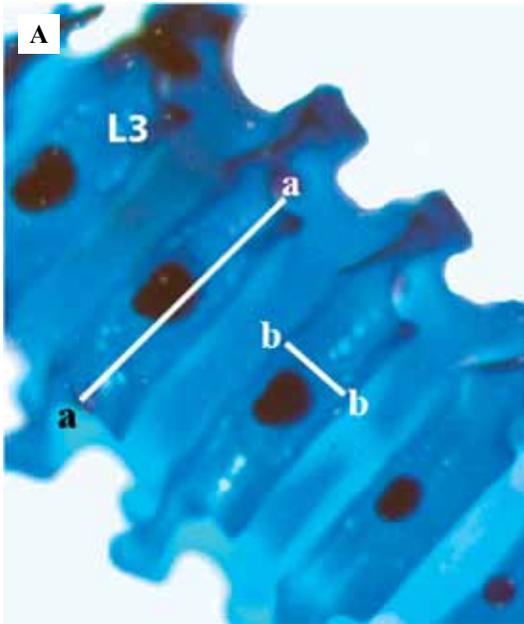


Рис. 1. Морфометрические параметры: aa – поперечный размер тела, bb – высота тела, cc – переднезадний размер тела, dd – переднезадний размер центра оксификации, ee – поперечный размер центра оксификации.

A – поясничные позвонки 11-недельного зародыша человека. Просветленный препарат. Окраска ализариновым красным и альтиановым синим, $\times 10$.

B – поперечный срез Th7 зародыша человека 23 стадии развития Карнеги. Гистологический препарат. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 80$

C – поперечный срез L4 20-недельного зародыша человека. Гистологический препарат. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 12,5$

Fig. 1. Morphometric parameters: aa – transverse body size, bb – body height, cc – anteroposterior body size, dd – anteroposterior size of the ossification center, ee – transverse size of the ossification center.

A – lumbar vertebrae of an 11-week-old human fetus. Whole-mount. Alizarin Red/Alcian Blue stain, $\times 10$.

B – cross section of Th7 human embryo of 23 Carnegie stage. Histology slide. H&E stain, $\times 80$.

C – cross section of L4 20-week-old human embryo. Histology slide. H&E stain, $\times 12,5$

и нижним краем тела/центра окостенения; поперечный размер (мм) – расстояние между боковыми краями тела/центра окостенения; переднезадний размер (мм) – расстояние между передним и задним краем тела/центра окостенения; максимальная площадь поперечного сечения тела/центра окостенения (мм^2). Объем тела позвонка/центра окостенения (мм^3) рассчитывали по формуле: максимальная площадь поперечного сечения \times высоту. В последующем анализировали средние значения перечисленных выше параметров для каждого отдела позвоночного столба. Статистический анализ полученных данных проводили в программе Statistica 10.0. Данные представлены в виде $M \pm SD$ (при параметрическом характере распределения переменных величин), или медианы и интерквартильного размаха ($Me [Q25; Q75]$), минимального и максимального значения (при непараметрическом характере распределения переменных величин). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента и U-критерию Манна–Уитни.

Результаты считали значимыми при вероятности 95,5% ($p < 0,05$).

Корреляцию между морфометрическими параметрами и возрастом зародышей анализировали методом наименьших квадратов в программе Excel 2011.

Результаты

Отделы позвоночного столба имеют разную протяженность (табл. 1). У зародышей человека в эмбриональном и раннем плодном периодах развития грудной отдел самый протяженный, крестцовый – самый короткий. Грудной отдел длиннее поясничного почти в 1,5 раза в первой возрастной группе и в 2 раза во второй возрастной группе. У зародышей 6–10-недельного возраста шейный отдел длиннее поясничного ($p = 0,0155$). У 11–20-недельных плодов разница этих двух параметров была не столь значительной, но статистически достоверной ($p = 0,046$). У всех зародышей поясничный отдел позвоночника длиннее крестцового.

Данные о морфометрических параметрах тела закладки позвонков разной локализации по двум возрастным группам представлены в таблице 2. Самая большая средняя высота характерна для тела закладок

поясничных позвонков. Этот показатель статистически достоверно больше в сравнении с закладками шейных, грудных и крестцовых позвонков зародышей 11–20-недельного возраста.

Таблица 1 / Table 1

Протяженность шейного, грудного, поясничного и крестцового отделов позвоночного столба у 6–20-недельных зародышей человека

The length of the cervical, thoracic, lumbar and sacral spine regions in 6–20-week-old human embryos

Возраст (неделя) Age (weeks)	n	Протяженность отделов позвоночного столба (мм) Spine regions length (mm)							
		C2–C7 Me (Q25; Q75), мм	Max-min, мм	Th1–Th12 Me (Q25; Q75), мм	Max-min, мм	L1–L5 Me (Q25; Q75), мм	Max-min, мм	S1–S5 Me (Q25; Q75), мм	Max-min, мм
6–10	26	4,19 (2,72; 4,87)	6,25–1,70	5,73 (4,13; 6,49)	11,63– 3,10	3,70 (2,15; 4,12)	6,43– 1,60	1,59 (1,44; 1,99)	3,54– 1,07
11–20	20	13,97 (11,58; 20,48)	24,93– 7,93	30,60 (25,48; 39,30)	46,81– 14,81	14,72 (11,69; 20,90)	25,69– 7,46	10,92 (8,93; 18,54)	22,42– 4,42

n – число зародышей; C2–C7 – шейные позвонки; Th1–Th12 – грудные позвонки; L1–L5 – поясничные позвонки; S1–S5 – крестцовые позвонки

n – number of embryos; C2–C7 – cervical vertebrae; Th1–Th12 – thoracic vertebrae; L1–L5 – lumbar vertebrae; S1–S5 – sacral vertebrae

Таблица 2 / Table 2

Размеры тел позвонков у 6–20-недельных зародышей человека

Vertebral body size in 6–20-week-old human embryos

Отдел позвоночника Spine region	6–10 недель 6–10 weeks		11–20 недель 11–20 weeks			
	n	M±SD, мм	n	M±SD, мм		
Высота/Height						
Шейный/Cervical	156	0,51±0,18	120	1,93±0,61		
Грудной/Thoracic	312	0,47±0,18	240	1,98 ±0,61*		
Поясничный/Lumbar	130	0,51±0,22	100	2,26±0,67◇		
Крестцовый/Sacral	130	0,28±0,12●	100	1,63±0,58●		
Поперечный размер/Cross size						
	n	Me (Q25; Q75), мм	Max-min, мм	n	Me (Q25; Q75), мм	Max-min, мм
Шейный/Cervical	156	1,08 (1,01; 1,51)	1,86–0,74	120	3,16 (2,14; 6,01)	6,86–1,91
Грудной/Thoracic	312	1,15 (1,01; 1,54)	2,07–0,77	240	4,17(2,85; 6,19)*	8,4–2,13
Поясничный/Lumbar	130	1,06 (0,95; 1,31) ◇	1,89–0,39	100	4,08 (2,49; 5,54)	7,52–1,43
Крестцовый/Sacral	130	0,69 (0,54; 0,91)●	1,31–0,14	100	3,19 (1,55; 4,72)●	6,1–0,91
Переднезадний размер/Anteroposterior size						
	n	Me (Q25; Q75), мм	Max-Min, мм	n	Me (Q25; Q75), мм	Max-min, мм
Шейный/Cervical	156	0,59 (0,43; 0,62)	0,87–0,24	120	2,32 (1,25; 3,12)	4,01–0,71
Грудной/Thoracic	312	0,54 (0,43; 0,62)	0,98–0,31	240	2,49(1,49; 3,31)*	4,38–0,7
Поясничный/Lumbar	130	0,58 (0,44; 0,67)◇	1,08–0,24	100	2,76 (1,52; 3,39) ◇	4,41–0,89
Крестцовый/Sacral	130	0,32 (0,21; 0,43)●	0,69–0,08	100	1,83 (0,99; 2,52)●	3,99–0,45

n – число позвонков; * – различия между закладками грудных и шейных позвонков статистически достоверны; ◇ – различия между закладками поясничных и грудных позвонков статистически достоверны; ● – различия между закладками крестцовых и поясничных позвонков статистически достоверны

n – number of vertebrae; * – differences between thoracic and cervical vertebral body anlagen are statistically significant; ◇ – differences between lumbar and thoracic vertebral body anlagen are statistically significant; ● – differences between sacral and lumbar vertebral body anlagen are statistically significant

Средний поперечный размер тела закладки позвонков в 1,5–2 раза больше его высоты. Самый большой показатель в обеих возрастных группах имеется у тела закладки грудных позвонков. У зародышей 11–20-недельного возраста различия среднего поперечного размера тела грудных и поясничных позвонков были статистически недостоверными.

Средний переднезадний размер тела закладок поясничных позвонков был статистически достоверно больше по сравнению с грудными и крестцовыми позвонками, а в возрастной группе 11–20-недельных плодов и относительно шейных позвонков. Во всех отделах позвоночного столба среднее значение переднезаднего размера превышало высоту тела, но было меньше, чем поперечный размер.

В таблице 3 представлены данные о морфометрических параметрах центров оссификации в закладке тел позвонков. Наибольшие средние линейные размеры и объем имели центры окостенения, расположенные

в хрящевых закладках поясничных и грудных позвонков. У плодов человека в возрастном интервале 11–20 недель гестации объем костной ткани в закладках тела шейных, грудных и поясничных позвонков составляет 13–14%. Вместе с тем в закладке тела поясничных позвонков площадь центра оссификации занимала 38% площади ее поперечного сечения, что статистически достоверно больше по сравнению с шейными и крестцовыми позвонками.

В проанализированной выборке с использованием регрессионного анализа установлено, что с возрастом увеличение высоты, поперечного и переднезаднего размеров тела закладок позвонков во всех отделах позвоночного столба носит линейный характер, а увеличение объема тела закладок позвонков более точно, учитывая значение коэффициента корреляции, описывается с помощью степенной функции. На графиках (рис. 2) это проиллюстрировано на примере тела закладок поясничных позвонков.

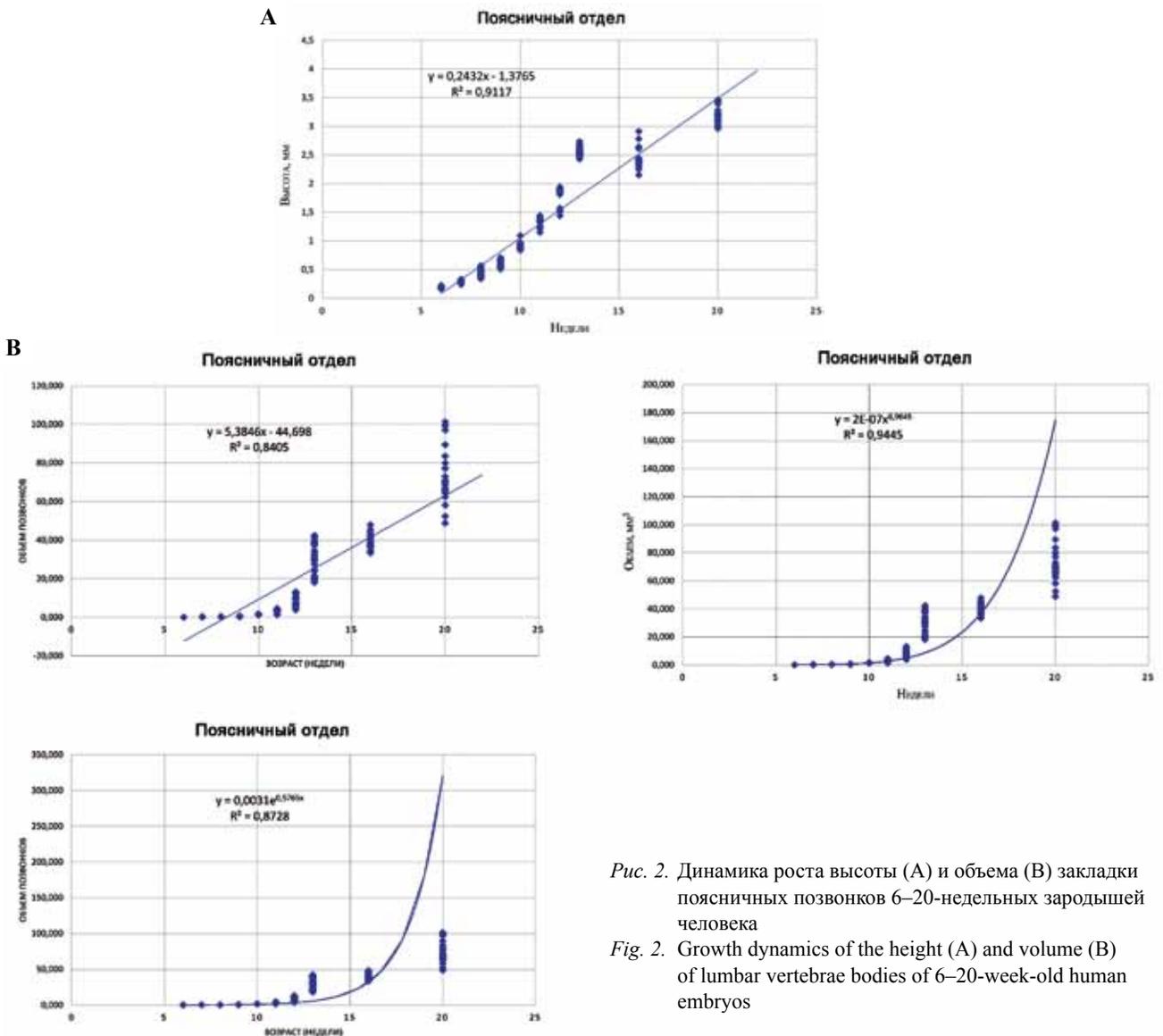


Рис. 2. Динамика роста высоты (А) и объема (В) закладки поясничных позвонков 6–20-недельных зародышей человека

Fig. 2. Growth dynamics of the height (A) and volume (B) of lumbar vertebrae bodies of 6–20-week-old human embryos

**Морфометрические параметры центра окостенения (ЦО) в закладке тела позвонков
11–20-недельных зародышей человека**

Morphometric parameters of the ossification centers (OS) in the vertebral body primordia of 11–20-week old human embryos

Морфометрический параметр / Morphometric indicator	Отделы позвоночного столба (мм) / Spine regions (mm)							
	C2–C7 Me (Q25; Q75), мм	Max- min, мм	Th1–Th12 Me (Q25; Q75), мм	Max- min, мм	L1–L5 Me (Q25; Q75), мм	Max- min, мм	S1–S5 Me (Q25; Q75), мм	Max- min, мм
Высота ЦО/ OS height	0,79 (0,51; 1,42)	1,64– 0,32	0,83 (0,62; 1,43)*	1,69– 0,22	0,87 (0,74; 1,42)	1,69– 0,32	0,72 (0,57; 1,2)●	1,42– 0,12
Поперечный размер ЦО/ OS cross size	1,22 (0,82; 1,73)	2,66– 0,75	1,37 (0,99; 2,17)*	3,53– 0,47	1,62 (1,26; 2,43)◇	2,78– 0,33	0,87 (0,62; 1,08)●	2,09– 0,11
Переднезадний размер ЦО/ OS anteroposterior size	0,82 (0,57; 1,4)	2,12– 0,41	1,31 (0,81; 1,88)*	3,32– 0,32	1,49 (1,05; 1,83)◇	2,92– 0,42	0,78 (0,52; 1,02)●	1,59– 0,13
Объем ЦО/ OS volume	1,22 (0,5; 3,09)	8,87– 0,08	3,96 (0,57; 5,61)*	14,31– 0,21	5,06 (1; 6,8)◇	14,49– 0,09	0,65 (0,18; 1,44)●	4,82– 0,02
S_1/S_2	0,21 (5,61/26,71)		0,34 (10,69/31,33)		0,38 (11,22/29,25)		0,23 (4,85/20,59)	
V_1/V_2	0,13 (8,87/68,9)		0,14 (14,31/101,22)		0,14 (14,49/104,02)		0,08 (4,82/58,15)	
n	96		216		103		80	

n – число измеренных закладок позвонков; S_1 – максимальная площадь поперечного сечения центра окостенения;

S_2 – максимальная площадь поперечного сечения закладки тела позвонка; V_1 – максимальный объем центра окостенения;

V_2 – максимальный объем закладки тела позвонка

* – различия между ЦО в закладках грудных и шейных позвонков статистически достоверны; ◇ – различия между ЦО

в закладках поясничных и грудных позвонков статистически достоверны; ● – различия между ЦО в закладках крестцовых и поясничных позвонков статистически достоверны

n – number of measured vertebral body anlagen; S_1 – maximal ossification center cross-sectional area; S_2 – maximal vertebral body anlage cross-sectional area; V_1 – maximal ossification center volume; V_2 – maximal vertebral body anlage volume

* – differences between thoracic and cervical vertebral ossification center are statistically significant; ◇ – differences between lumbar and thoracic vertebral ossification center are statistically significant; ● – differences between sacral and lumbar vertebral ossification center are statistically significant

Обсуждение

У 6–10-недельных зародышей человека тело закладок позвонков полностью состоит из хрящевой ткани. При этом грудной отдел позвоночника является самым протяженным, а крестцовый самым коротким. Наши данные о процентном соотношении шейного, грудного, поясничного и крестцового отделов совпадают с результатами, ранее представленными G.W. Friedland и P. de Vries [5], а также R. O’Rahilly et al. [6].

Нами установлено, что в обеих возрастных группах грудной и шейный отделы позвоночного столба длиннее поясничного, хотя у 11–20-недельных плодов различие протяженности шейного и поясничного отделов не столь значительно. По данным K.M. Bagnall et al. [7], в интервале от 8-й до 26-й недели эмбриогенеза поясничный отдел всегда длиннее шейного.

Несмотря на то, что поясничный отдел позвоночника не самый протяженный, у зародышей 11–20-недельного возраста тело закладок поясничных позвонков имеет самую большую среднюю высоту в сравнении с

закладками шейных, грудных и крестцовых позвонков. Об этом также свидетельствуют данные, полученные K.M. Bagnall et al. [7], которые установили, что средняя высота тела закладки грудного позвонка и нижележащего межпозвоночного диска составляет примерно 4/5 средней высоты тела закладки поясничного позвонка вместе с диском.

По данным литературы, у 9–10-недельных плодов человека субъективно самым широким является тело закладок шейных позвонков, а начиная с 11-й недели – тело закладок нижних грудных и верхних поясничных позвонков [1]. Морфометрические данные, полученные в настоящем исследовании, подтверждают тот факт, что в эмбриональном и раннем плодном периоде развития наибольший поперечный размер имеет тело закладок грудных позвонков.

Максимальный переднезадний размер по сравнению с шейными и крестцовыми позвонками был нами выявлен у тела закладок грудных и поясничных позвонков. При измерении параметров тела позвонка на

анатомических препаратах И.Р. Шальнева и соавт. [8] установили, что у 16–17-недельных плодов человека самый большой переднезадний и поперечный размеры из всех грудных позвонков имели тела Th1-3, а на 22-й неделе – тела Th8-12.

При своем появлении центрам окостенения в теле закладок позвонков в разных отделах позвоночника присущи примерно одинаковые размеры [9]. В последующем, в возрастном диапазоне 17–30 недель гестации, средняя высота центра окостенения тела закладки позвонка, выявляемая при компьютерной томографии, прогрессивно увеличивается на протяжении от С1 до S5 [4]. По нашим данным, наибольшие средние линейные размеры и объем имели центры окостенения, расположенные в закладках позвонков тораколумбального отдела позвоночника. Это связано с появлением данных центров сначала в нижних грудных и верхних поясничных позвонках, а затем в закладках других отделов позвоночника [10]. Более ранним началом процесса окостенения можно объяснить тот факт, что площадь центра окостенения занимает 38% площади поперечного сечения тела закладки поясничных позвонков. Это статистически достоверно больше по сравнению с шейными и крестцовыми позвонками. Вместе с тем у плодов человека в возрастном интервале 11–20 недель гестации выявляется практически одинаковое соотношение объемов костной и хрящевой ткани в закладках тела шейных, грудных и поясничных позвонков. Это, по всей видимости, указывает на одинаковую скорость процессов окостенения хряща и его новообразования.

Соотношение между протяженностью отделов позвоночного столба, выявленное у 11–20-недельных плодов, сопоставимо с аналогичным параметром, характерным для позвоночника в постнатальном онтогенезе. По нашим данным, у плодов 67,5% длины тораколумбального отдела позвоночника составляет грудной отдел и 32,5% – поясничный. При рождении соотношение этих отделов выражается пропорцией 2/3 к 1/3 [11]. В позвоночном столбе взрослого человека относительная длина шейного, грудного, поясничного и крестцового отделов позвоночника выражается пропорцией 2:5:3:2 [12], то есть так же, как у плодов, самым протяженным является грудной отдел. Это связано с наличием в грудном отделе большего числа позвонков по сравнению с другими отделами позвоночника.

У взрослого человека ширина и высота тел поясничных позвонков примерно в 2 раза больше соответствующих морфометрических параметров шейных позвонков [13]. Средняя ширина тела L1–L5 больше его высоты и примерно равна переднезаднему размеру [14]. По нашим данным, у зародышей 11–20-недельного возраста средний поперечный размер тела закладки поясничных позвонков в 1,8 раза больше его высоты и в 1,5 раза больше переднезаднего размера.

В литературе для описания динамики роста линейных размеров/объема тела закладок позвонков и центров окостенения в них у плодов человека используются линейные [3, 4], параболические [7], логарифмические [15] или экспоненциальные [16] функции. В проанализированной нами выборке установлено, что с возрастом увеличение высоты, поперечного и переднезаднего размеров тела закладок позвонков во всех отделах позвоночного столба носит линейный характер. Более точно, увеличение объема тела закладок позвонков отражает степенная функция, то есть чем больше размеры закладки тела позвонка, тем быстрее они растут в объеме. Н.К. Mekonen et al. [15] установили, что для этого параметра характерен экспоненциальный рост со скоростью ~6,5% в день.

Заключение

Различия морфометрических параметров тел позвонков разной локализации детерминированы генетически и выявляются уже в раннем плодном периоде развития. При этом наибольшие линейные размеры и объем имеют тела закладок поясничных позвонков. Во всех отделах позвоночного столба среднее значение поперечного размера превышает высоту и переднезадний размер тела.

В раннем плодном периоде развития наибольшие средние линейные размеры и объем имеют центры окостенения, расположенные в закладках поясничных и грудных позвонков, так как с них начинается процесс окостенения хрящевых закладок.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.Л. Кабак.
Сбор и обработка материала – В.В. Заточная.
Написание текста – С.Л. Кабак, В.В. Заточная, Д.М. Гордионюк.
Редактирование – С.Л. Кабак.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.L. Kabak.
Collected the data and performed the analysis – V.V. Zatochnyaya.
Wrote the paper – S.L. Kabak, V.V. Zatochnyaya, D.M. Gordionok.
Edited the manuscript – S.L. Kabak.

Литература/References

1. Skórzewska A, Grzymisławska M, Bruska M, Łupicka J, Woźniak W. Ossification of the vertebral column in human foetuses: histological and computed tomography studies. *Folia Morphol (Warsz)*. 2013;72(3):230–8. DOI:10.5603/fm.2013.0038.
2. Baumgart M, Szpinda M, Szpinda A. New anatomical data on the growing C4 vertebra and its three ossification centers in human fetuses. *Surg Radiol Anat*. 2013;35(3):191–203. DOI:10.1007/s00276-012-1022-z.
3. Szpinda M, Baumgart M, Szpinda A, Woźniak A, Mila-Kierzenkowska C. New patterns of the growing vertebra L3 and its 3 ossification centers in human fetuses – a CT, digital and statistical study. *Med Sci Monit Basic Res*. 2013;19:169–80. DOI: 10.12659/MSMBR.883956.

4. Szpinda M, Baumgart M, Szpinda A, Woźniak A, Mila-Kierzenkowska C. Cross-sectional study of C1–S5 vertebral bodies in human fetuses. *Arch Med Sci*. 2015;11(1):174–89. DOI:10.5114/aoms.2013.37086.
5. Friedland GW, De Vries P. Renal ectopia and fusion: Embryologic basis. *Urology*. 1975;5(5):698–706. DOI:10.1016/0090-4295(75)90137-5.
6. O’Rahilly R, Muller F, Meyer DB. The human vertebral column at the end of the embryonic period proper 1. The column as a whole. *J Anat*. 1980;131(3):565–75.
7. Bagnall KM, Harris PF, Jones PR. A radiographic study of the human fetal spine. 3. Longitudinal growth. *J Anat*. 1979;128(4):777–87.
8. Шальнева И.Р., Лященко Д.Н., Галиакбарова В.А. Морфометрические параметры грудного отдела позвоночника и спинного мозга человека в промежуточном плодном периоде онтогенеза. *Современные проблемы науки и образования*. 2016;6:264.
Shalнева IR, Lyashchenko DN, Galiakbarova VA. Morphometric parameters of the human thoracic spine and spinal cord in the intermediate fetal period of ontogenesis. *Modern problems of science and education*. 2016;6:264 (In Russ.).
9. Nolting D, Hansen BF, Keeling J, Kjær I. Prenatal development of the normal human vertebral corpora in different segments of the spine. *Spine*. 1998; 23(21): 2265–71. DOI: 10.1097/00007632-199811010-00003.
10. Кабак С.Л., Заточная В.В., Мельниченко Ю.М., Мохаммади Т.М. Гистологическое исследование оксификации позвонков зародышей человека. *Морфология*. 2019;13(2):27–36.
Kabak SL, Zatochnaya VV, Melnichenko YM, Mohammadi TM. Histological study of human fetuses vertebral column ossification. *Morphologia*. 2019;13(2):27–36 (In Russ.). DOI:0.26641/1997-9665.2019.2.27-36.
11. Canavese F, Dimeglio A. Normal and abnormal spine and thoracic cage development. *World J Orthop*. 2013;4(4):167–74. DOI: 10.5312/wjo.v4.i4.167.
12. Naidich TP, Castillo M, Cha S, Raybaud Ch, Smirniotopoulos JG, Kollias S. (eds.). *Imaging of the spine*. New York: Saunders Elsevier, 2011. Available from: https://books.google.by/books?id=NzyBq_wH1psC&pg=PA45&lpg (Accessed 15th December 2019).
13. Gilad I, Nissan M. Sagittal evaluation of elemental geometrical dimensions of human vertebrae. *J Anat*. 1985;143:115–20.
14. Гайворонский И.В., Кац А.В., Мануковский В.А., Кравцов М.Н. Морфометрические характеристики поясничных позвонков взрослого человека и их прикладное значение для выполнения вертебропластики. *Морфология*. 2008;133(2):29–30.
Gaivoronsky IV, Katz AV, Manukovsky VA, Kravtsov MN. Morphometric characteristics of the lumbar vertebrae of an adult and their applied value for vertebroplasty. *Morphology*. 2008;133(2):29–30 (In Russ.).
15. Mekonen HK, Hiksipoors JP JM, Mommen G, Kruepunga N, Köhler SE, Lamers WH. Closure of the vertebral canal in human embryos and fetuses. *J. Anat*. 2017;231(2):260–74. DOI:10.1111/joa.12638.
16. Schild RL, Wallny T, Fimmers R, Hansmann M. The size of the fetal thoracolumbar spine: a three-dimensional ultrasound study. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2000;16(5):468–72. DOI:10.1046/j.1469-0705.2000.00256.x.

Информация об авторах

Сергей Львович Кабак – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой морфологии человека Белорусского государственного медицинского университета.

Валентина Владимировна Заточная – старший преподаватель кафедры морфологии человека Белорусского государственного медицинского университета.

Дмитрий Михайлович Гординок – ассистент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Белорусского государственного медицинского университета.

Author information

Sergey L. Kabak – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Human Morphology Department, Belarussian State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-7173-1818>

Valentina V. Zatochnaya – Senior Lecturer, Human Morphology Department, Belarussian State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-6765-2420>

Dmitry M. Gordionok – Assistant Professor, Operative Surgery and Topographic Anatomy Department, Belarussian State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-7224-9345>

Структурная организация и состав внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при различном уровне содержания кислорода *in vitro*

Д.К. Матвеева¹, Е.Р. Андреева¹, Н.Н. Новиков², В.И. Пустовой², Л.Б. Буравкова^{1,3}

¹ ФГБУН ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

² ФГБУН Институт общей физики имени А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Внеклеточный матрикс (ВКМ) – ключевой компонент тканевого микроокружения мезенхимальных стромальных клеток (МСК), образующий сложную трехмерную сеть макромолекул с разными физическими и биохимическими свойствами. Пониженный уровень O₂ – один из важнейших физических факторов ниши стволовых и прогениторных клеток. Поскольку ВКМ является динамичной структурой, его свойства могут изменяться в зависимости от концентрации O₂.

Цель исследования – охарактеризовать особенности упаковки и содержание коллагеновых и неколлагеновых белков ВКМ МСК в условиях постоянного культивирования при 20% и 5% O₂.

Материалы и методы. МСК из жировой ткани человека постоянно культивировали при 20% или 5% O₂. Для стимуляции продукции компонентов ВКМ в культуральную среду добавляли 2-фосфо-L-аскорбат натрия. Коллагеновые и неколлагеновые белки выявляли с помощью гистологических красителей, а характер упаковки оценивали по данным сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии.

Результаты. При 20% O₂ молекулы ВКМ МСК образовывали плотную структуру без четкого разделения на отдельные фибриллы. При 5% O₂ ВКМ представлял густую сеть из тонких пересекающихся фибрилл. Содержание общего белка было достоверно больше в МСК при 5% O₂. Продукция коллагеновых и неколлагеновых белков была сходной при различном уровне O₂. Аскорбат натрия стимулировал продукцию коллагеновых белков, при 5% O₂ МСК были более чувствительны к этому стимулу.

Выводы. МСК, постоянно культивируемые при 5% или 20% O₂, продуцируют хорошо развитый ВКМ, сходный по содержанию коллагеновых и неколлагеновых компонентов, но отличающийся по структуре. Это может быть востребовано как для нужд регенеративной медицины с точки зрения использования ВКМ в качестве материала для скаффолдов, так и для изучения взаимодействия МСК с ВКМ как компонентом их микроокружения.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс, 2-фосфо-L-аскорбат натрия, коллагеновые и неколлагеновые белки, Sirius Red, Fast Green

Для корреспонденции: Елена Ромуальдовна Андреева. E-mail: andreeva1564@gmail.com

Для цитирования: Матвеева Д.К., Андреева Е.Р., Новиков Н.Н., Пустовой В.И., Буравкова Л.Б. Структурная организация и состав внеклеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при различном уровне содержания кислорода *in vitro*. Клини. эксп. морфология. 2020;9(1):57–63. DOI:10.31088/CEM2020.9.1.57-63

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке программы президиума РАН № 19.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.12.2019. Получена после рецензирования 04.02.2020. Принята в печать 11.02.2020.

Structural organization and composition of extracellular matrix of multipotent mesenchymal stromal cells under different oxygen levels *in vitro*

D.K. Matveeva¹, E.R. Andreeva¹, N.N. Novikov², V.I. Pustovoy², L.B. Buravkova^{1,3}

¹ Institute of Biomedical Problems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Prokhorov General Physics Institute of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Introduction. Extracellular matrix (ECM) forming a complex three-dimensional macromolecule network with different physical and biochemical properties is a key component of the local microenvironment of mesenchymal stromal cell (MSC). Low O₂ level is considered as one of the most crucial physical factors

in the niche of stem and progenitor cells As far as ECM is a dynamic structure, its properties can be varied depending on O₂ level.

The aim of the study was to characterize the peculiarities of ECM organization and the content of collagenous and non-collagenous proteins of MSCs permanently cultured at 20% and 5% O₂.

Materials and methods. Human adipose-derived MSCs were permanently expanded at 20% or 5% O₂. To stimulate a production of ECM, sodium L-ascorbate was added to the medium. Collagenous and noncollagenous components were analyzed by conventional histology, packaging of ECM was examined with scanning electron and atomic force microscopy.

Results. Under 20% O₂, ECM of MSCs formed a dense structure without clearly distinguishing between individual fibrils, while at 5% O₂ ECM was consisted of a network of thin intersecting fibrils. The total protein content was significantly higher in MSCs under 5% O₂. The production of collagenous and noncollagenous proteins was similar under different O₂ levels. Sodium ascorbate stimulated the production of collagen proteins; at 5% O₂, MSCs were more sensitive to this stimulus.

Conclusions. In vitro expanded MSCs produced a well-developed ECM at 5% as well as at 20% O₂. The content of collagenous and noncollagenous components was similar, but the structure was different in both groups. These data may be useful for regenerative medicine in terms of scaffold coatings, and for studies of the interaction of MSCs with their microenvironment.

Keywords: extracellular matrix, L-ascorbic acid 2-phosphate, collagenous and non-collagenous proteins, Sirius Red, Fast Green

Corresponding author: Elena R. Andreeva. E-mail: andreeva1564@gmail.com

For citation: Matveeva D.K., Andreeva E.R., Novikov N.N., Pustovoy V.I., Buravkova L.B. Structural organization and composition of extracellular matrix of multipotent mesenchymal stromal cells under different oxygen levels *in vitro*. Clin. exp. morphology. 2020;9(1):57–63. (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.1.57-63.

Funding. The research was supported in part with Program № 19 of the Presidium of the Russian Academy of Science.

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

Received 20.12.2019. **Received in revised form** 04.02.2020. **Accepted** 11.02.2020.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) способны к самообновлению, мультилинейной дифференцировке и секреции растворимых медиаторов, а также продуцируют хорошо развитый внеклеточный матрикс (ВКМ). ВКМ образует трехмерную молекулярную сеть, которая формирует механический каркас тканей, и регулирует клеточные функции, такие как пролиферация, миграция, дифференцировка, жизнеспособность и морфогенез [1]. В соответствии с классическими представлениями все компоненты ВКМ можно разделить на фибриллярные, которые образуют коллагеновые, ретикулярные и эластические волокна, и аморфные (неколлагеновые), сформированные гликопротеинами и протеогликанами [2]. Кроме того, возможно разделение ВКМ на два основных компартмента по структуре и по составу: перичеллюлярный и интерстициальный [3].

МСК активно продуцируют молекулы матрикса, а также ремоделируют его в зависимости от изменяющихся условий микроокружения [4]. Концентрация O₂ является критическим фактором ниши МСК. С одной стороны, МСК локализируются в областях со сниженным содержанием O₂, при «физиологической» гипоксии [5]. С другой стороны, они могут подвергаться коротким острым гипоксическим эффектам при повреждении тканей [6, 7]. Установлено, что резкое снижение содержания кислорода в микроокружении

клеток в патологических процессах ведет к увеличению продукции компонентов ВКМ и жесткости структуры ВКМ [8, 9]. Тем не менее в научной литературе практически не освещены особенности ВКМ, продуцируемого МСК при «физиологической» гипоксии, его ремоделирования и способности к модуляции клеточных ответов, что определяет актуальность исследований в этом направлении.

Целью нашей работы было охарактеризовать особенности упаковки и содержание коллагеновых и неколлагеновых белков ВКМ МСК в условиях постоянного культивирования при стандартном атмосферном (20%) и близком к тканевому (5%) уровне O₂.

Методы

Культивирование клеток. В работе использовали МСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека из коллекции лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Клетки постоянно культивировали при стандартных лабораторных условиях при 20% O₂ в CO₂-инкубаторе (5% CO₂, 95% воздуха) или в условиях «физиологической» гипоксии при 5% O₂ в мультигазовом инкубаторе (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂) (оба Sanyo, Япония) в полной среде α-MEM (Gibco, Великобритания) с 10% фетальной телячьей сыворотки. Плотность посадки составляла 3–3,5 тыс. клеток на 1 см². В экспериментах использовали клет-

ки 3–5 пассажей. Для анализа продукции ВКМ МСК высевали на культуральный пластик или стекла в плотности 7,5 тыс. клеток на 1 см². Для стимуляции продукции компонентов матрикса добавляли 2-фосфо-L-аскорбат натрия в концентрации 50 мкг/мл (Fluka, Германия).

Выявление компонентов ВКМ с помощью гистологических красителей. МСК культивировали в 24-луночных планшетах (Corning, США) при 20% и 5% O₂. После достижения монослоя к клеткам добавляли среду, содержащую 2-фосфо-L-аскорбат натрия в концентрации 50 мкг/мл (Fluka, Германия) для стимуляции продукции компонентов матрикса. Для выявления коллагеновых и неколлагеновых белков ВКМ использовали 0,1% Sirius Red F3BA или 0,1% Fast Green FCF (оба Sigma, США) в водном растворе насыщенной пикриновой кислоты. Относительное содержание белков ВКМ определяли с помощью полуколичественного метода, основанного на растворении и последующем колориметрическом определении относительного содержания красителей, связавшихся с компонентами матрикса при гистологическом окрашивании [10, 11]. Краситель, связавшийся с ВКМ, растворяли в смеси 0,1% NaOH и абсолютного метанола (1:1), и полученный элюат анализировали с помощью спектрофотометра (BioRad, США) при 550 и 620 нм. Для оценки общего количества белка клетки окрашивали 0,5% Crystal violet (Sigma, США) в абсолютном метаноле и экстрагировали 96% этанолом. Интенсивность окраски оценивали спектрофотометрически при 550 нм.

Микроскопия. Для световой микроскопии использовали микроскоп Nikon Eclipse TiU (Nikon, Япония).

Образцы для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) готовили, как описано в [12] и изучали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония). Микроскопия выполнена в общефакультетской лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М.В. Ломоносова под руководством Г.Н. Давидовича.

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) использована для исследования топографии ВКМ на высушенных клеточных препаратах, приготовленных для СЭМ. Изображения поверхности были получены на микроскопе NT-MDT Solver P47 (НТ-МДТ «Спектрум Инструментс», Россия) с помощью кантилевера NSG01 TiN с резонансной частотой сканирования от 100 до 200 кГц. Обработка изображения АСМ выполнялась с помощью программы Image Analysis.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 7.0. В качестве характеристик полученных выборок использовали среднее и стандартное отклонение. Статистическую достоверность различий между двумя группами данных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для малых выборок при выбранном уровне значимости $p < 0,05$. Эксперименты

выполняли на МСК из трех разных образцов ткани в трех технических повторах.

Результаты и обсуждение

Продукция коллагеновых и неколлагеновых белков МСК при различном уровне O₂. Для идентификации компонентов ВКМ использовали Sirius Red F3BA и Fast Green FCF (рис. 1 А, В). Оба красителя связывались с МСК и внеклеточными структурами, причем интенсивность окраски клеток была выше, чем ВКМ. Можно предположить, что целевые молекулы для Sirius Red (коллаген типа I и III) и Fast Green (белки протеогликанов и гликопротеинов) локализируются в основном перичеллюлярно.

Для полуколичественной оценки окрашенные препараты экстрагировали и спектрофотометрически определяли содержание красителей. Для нормирования на общий белок МСК окрашивали Crystal violet (рис. 1 С).

При расчете на единицу площади, занятой МСК, относительное содержание коллагеновых и неколлагеновых белков достоверно не отличалось при 20% и 5% O₂ (рис. 1 D, E). Тем не менее относительное содержание общего белка МСК оказалось достоверно выше при 5% O₂ (рис. 1 F). После пересчета на общий белок была выявлена тенденция к снижению продукции коллагеновых и неколлагеновых белков при 5% O₂ по сравнению с 20% O₂ (рис. 1 G, H).

В настоящее время изучение характера продукции и ремоделирования ВКМ стромальных клеток в условиях депривации O₂ связано в основном с короткими гипоксическими воздействиями, которые сопровождают патологические процессы. Адаптация к таким условиям рассматривается как ответ на стресс и сопровождается увеличением продукции ВКМ, необходимого для экспансии и миграции клеток [9]. При гипоксическом стрессе *in vivo* обнаружено увеличение экспрессии проколлагена I, II и IV типа в паренхиме легких крысы [13], а также продукции фибронектина в капиллярах мозга [14]. *In vitro* после короткой экспозиции перитонеальных фибробластов крысы в гипоксии на 30% увеличивалась продукция коллагена I типа [15]. Фибробласты роговицы, экспонированные при 0,5–2% O₂, синтезировали достоверно больше ВКМ, чем при стандартном атмосферном уровне O₂ [16]. В нашем исследовании, напротив, выявлена тенденция к снижению содержания ВКМ, что может указывать на различия в механизмах ответа МСК на короткие и постоянные экспозиции в гипоксических условиях.

Для усиления продукции ВКМ в экспериментах *in vitro* широко применяют аскорбат натрия, который стимулирует синтез коллагена [11, 17]. Этот эффект объясняется тем, что аскорбат натрия способствует гидроксигированию пролина, что является наиболее важным для эффективной сборки коллагена [18]. В наших экспериментах добавление аскорбата привело к достоверному увеличению относительного содержания

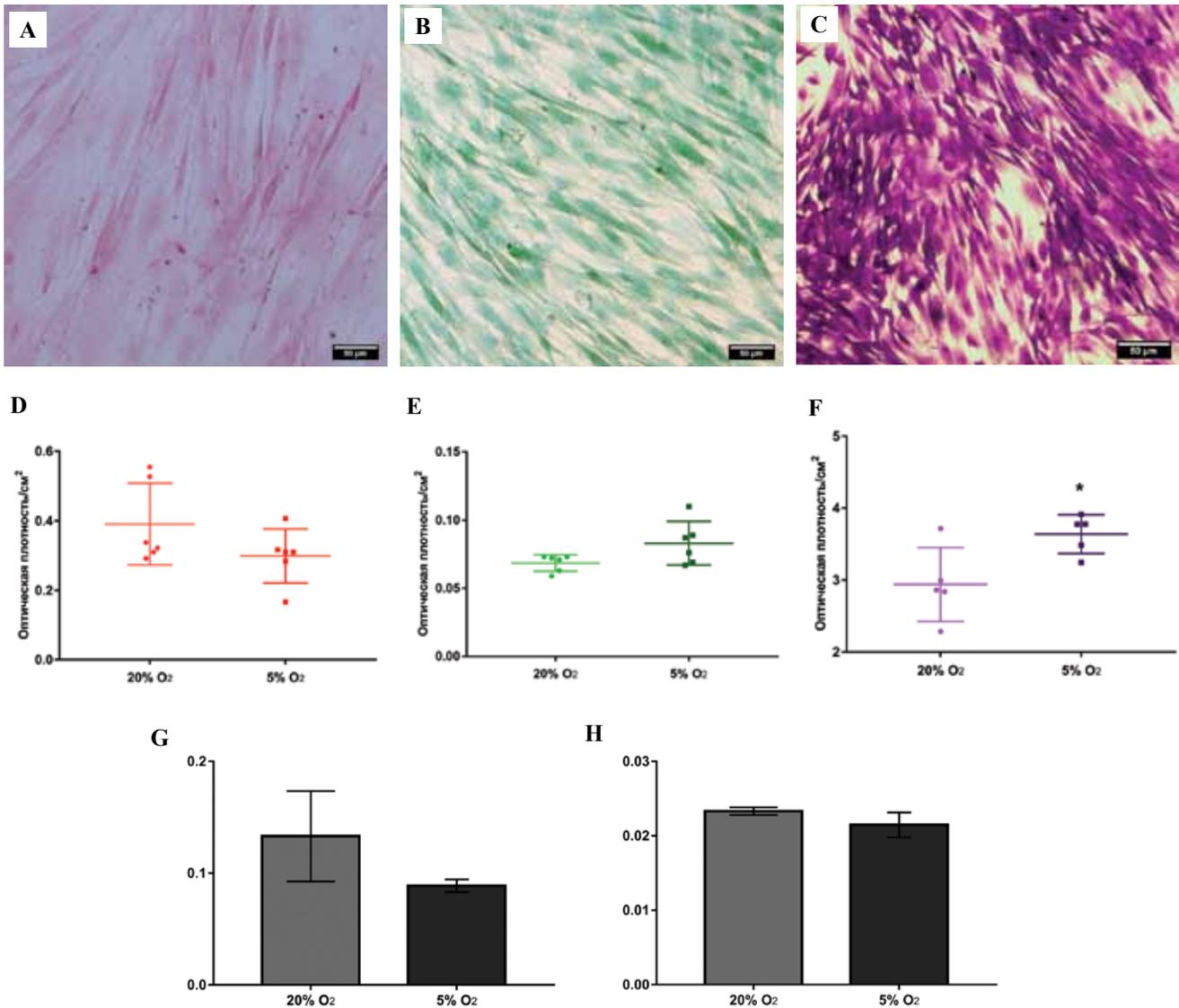


Рис. 1. Характеристика компонентов ВКМ культивируемых МСК.

А–С – гистологическая окраска: (А) коллагеновых белков, Sirius Red F3BA, $\times 10$, (В) неколлагенных белков, Fast Green FCF, $\times 10$, (С) общего белка, Crystal violet, $\times 10$. Светлое поле. Nikon Eclipse TiU. D–F – полуколичественное колориметрическое определение содержания (D) коллагеновых белков, 1550 нм; (E) неколлагенных белков, 1620 нм; (F) общего белка, 1550 нм. G–H – нормализация содержания белков матрикса на общий белок (G – значения Sirius Red/ Crystal violet, H – Fast Green/ Crystal violet, усл. ед.)

* $p=0,03$

Fig. 1. The characteristics of the ECM components of MSCs in vitro.

A–C – histological staining: (A) collagenous protein, Sirius Red F3BA, $\times 10$, (B) noncollagenous protein, Fast Green FCF, $\times 10$, (C) total protein, Crystal violet, $\times 10$. Bright field. Nikon Eclipse TiU. D–F – semiquantitative evaluation of collagenous (D) 1550 nm, noncollagenous proteins (E), 1620 nm, and total protein (F), 1550 nm. G–H – estimated amount of ECM proteins after normalization with total protein (G – Sirius Red/Crystal violet, H – Fast Green/Crystal violet, arb. un.)

* $p=0,03$

коллагеновых белков, причем при 5% O₂ данный эффект был более выраженным по сравнению с применением 20% O₂ (табл. 1). Эти данные позволяют предположить, что МСК при постоянном культивировании при 5% O₂ более чувствительны к действию аскорбата.

Морфологические особенности упаковки ВКМ МСК при различном уровне O₂. С помощью СЭМ была изучена морфология монослоев МСК, постоянно куль-

тивируемых при 20% или 5% O₂ (рис. 2 А, В). При 20% O₂ МСК были крупнее и более распластанными в сравнении с МСК при 5% O₂. Такое изменение размеров коррелирует с тем фактом, что МСК при гипоксии обладают более высокой пролиферативной активностью и выраженным фибробластоподобным фенотипом [19].

Мы обнаружили морфологические различия в структуре ВКМ, занимающего пространство под

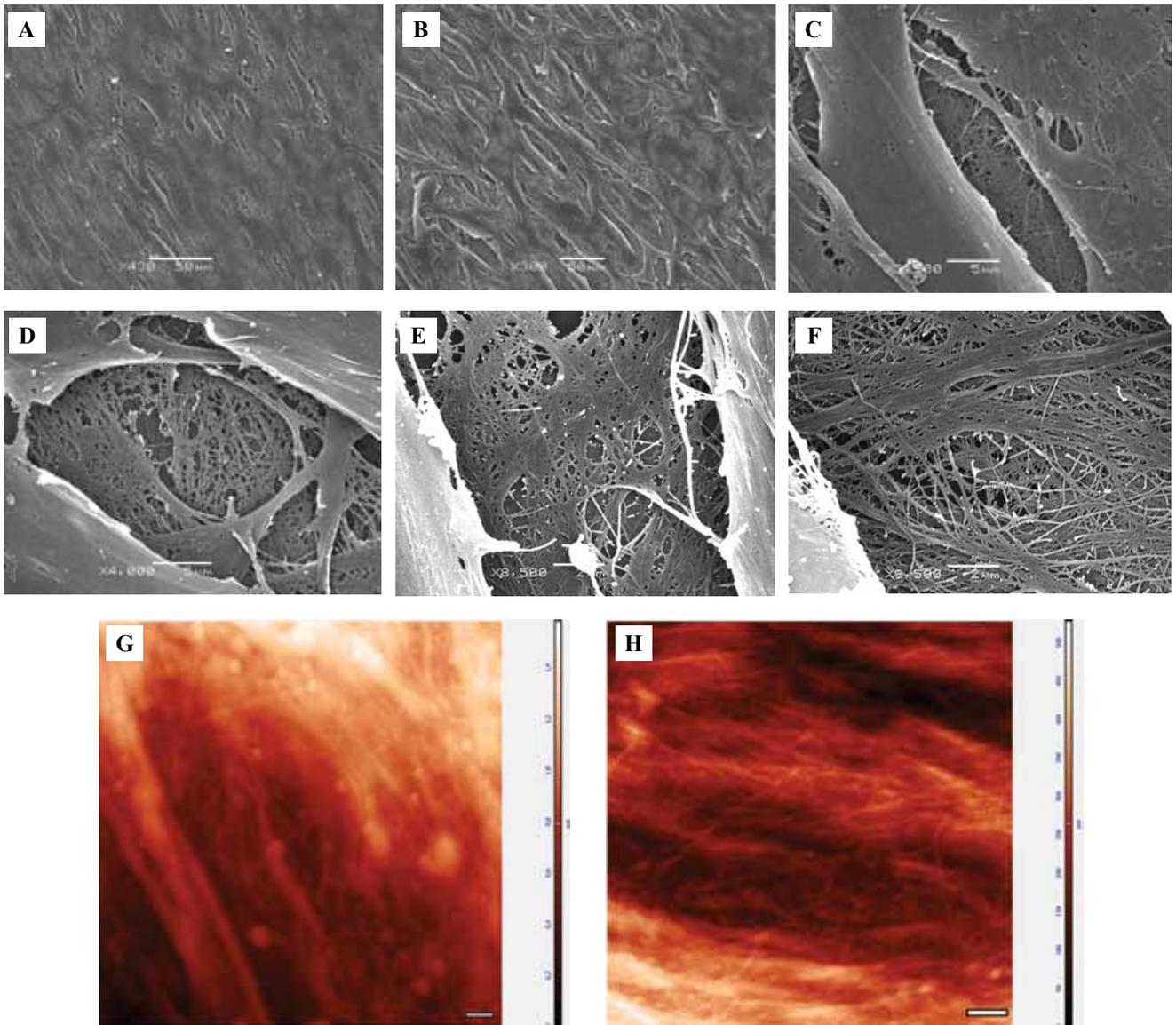


Рис. 2. Морфология МСК и ВКМ, продуцируемого МСК при 20% O₂ (А, С, Е, G) или 5% O₂ (В, D, F, H). Сканирующая электронная микроскопия (А–F). Атомно-силовая микроскопия (G, H). Масштабный отрезок – 1 мкм

Fig. 2. Morphology of MSCs and ECM produced by MSCs under 20% O₂ (A, C, E, G) or 5% O₂ (B, D, F, H). Scanning electron microscope (A–F). Atomic force microscopy (G, H). Scale bar – 1 μm

Таблица 1 / Table 1

Влияние 2-фосфо-L-аскорбата натрия на продукцию коллагеновых белков МСК при различном уровне O₂
 [Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение, усл. ед.]

The effect of sodium 2-phospho-L-ascorbate on collagenous protein level of MSCs at different O₂ levels
 [Data are presented in the form mean value ± standard deviation, arb. un.]

Уровень O ₂ , % O ₂ level, %	Экспериментальная группа Experimental group	Содержание коллагеновых белков Collagen protein	Кратность отличий Difference multiplicity
20%	– 2-фосфо-L-аскорбат	0,39±0,08	1,4*
	+2-фосфо-L-аскорбат	0,55±0,12	
5%	– 2-фосфо-L-аскорбат	0,32±0,01	1,85**
	+ 2-фосфо-L-аскорбат	0,6±0,09	

* Достоверные различия при добавлении аскорбата Na при 20% O₂, p=0,03

** Достоверные различия при добавлении аскорбата Na при 5% O₂, p=0,006

* Significant difference with sodium ascorbate at 20% O₂, p = 0.03

** Significant difference with sodium ascorbate at 5% O₂, p = 0.006

монослоем клеток и в промежутках между ними (рис. 2 С–F). При 20% O₂ молекулы ВКМ, как правило, образовывали плотную структуру с промежутками из пересекающихся волокон ВКМ (рис. 2 С, Е). ВКМ при 5% O₂, напротив, формировал густую сеть из тонких пересекающихся фибрилл (рис. 2 D, F) с единичными областями плотных структур. На изображениях, полученных с помощью АСМ, было хорошо видно, что тонкие волокна ВКМ локализованы как на поверхности, так и в пространствах между МСК, которые были менее упорядоченные и упакованные при 5% O₂ (рис. 2 G, H). Анализ топографии показал, что ВКМ (темные волокна на рис. 2 G, H) расположен под монослоем МСК (светлые отростки клеток на рис. 2 G, H). Различия в морфологии ВКМ, обнаруженные в настоящей работе, могут быть результатом изменения профиля протеаз, участвующих в ремоделировании ВКМ и являющихся гипоксиязависимыми [20, 21].

Заключение

Поскольку тотальное содержание коллагеновых и неколлагеновых белков не отличалось при 20% и 5% O₂, можно предположить, что выявленные различия в структуре могут определяться O₂-зависимым ремоделированием ВКМ за счет протеаз и изменением качественного состава ВКМ.

Полученные результаты могут быть востребованы как для анализа механизмов функционирования МСК в локальных тканевых депо, так и разработки протоколов получения скаффолдов на основе нативных ВКМ для нужд регенеративной медицины.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.Р. Андреева, Д.К. Матвеева. Сбор и обработка материалов – Д.К. Матвеева, Н.Н. Новиков, В.И. Пустовой. Написание текста – Д.К. Матвеева, Е.Р. Андреева. Редактирование – Е.Р. Андреева, Л.В. Буравкова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.R. Andreeva, D.K. Matveeva. Collected the data and performed the analysis – D.K. Matveeva, N.N. Novikov, V.I. Pustovoy. Wrote the paper – D.K. Matveeva, E.R. Andreeva. Edited the manuscript – E.R. Andreeva, L.V. Buravkova.

Литература/References

1. Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24(5):830–3. DOI:10.1016/j.copbio.2013.04.011.
2. Быков В.Л. Цитология и общая гистология. Санкт-Петербург: Сотис, 2002. 254 с. *Bykov VL. Cytology and basic histology. St. Petersburg: Sotis, 2002. 254 p. (In Russ.).*
3. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:4–27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
4. Riis S, Stensballe A, Emmersen J, Pennisi CP, Birkelund S, Zachar V et al. Mass spectrometry analysis of adipose-derived stem cells reveals a significant effect of hypoxia on pathways regulating extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):52. DOI: 10.1186/s13287-016-0310-7.
5. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol.* 2009;219(2):271–5. DOI: 10.1002/jcp.21690.
6. Myllyharju J, Schipani E. Extracellular matrix genes as hypoxia-inducible targets. *Cell Tissue Res.* 2009;339(1):19–29. DOI: 10.1007/s00441-009-0841-7.
7. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(6):430–9. DOI: 10.1038/nrc3726.
8. Jean C, Gravelle P, Fournie J-J, Laurent G. Influence of stress on extracellular matrix and integrin biology. *Oncogene.* 2011;30(24):2697–706. DOI: 10.1038/ncr.2011.27.
9. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(9):582–98. DOI: 10.1038/nrc.2016.73.
10. Keira SM, Ferreira LM, Gagnani A, Duarte IS, Barbosa J. Experimental model for collagen estimation in cell culture. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2004;19(1):17–22. DOI: 10.1590/s0102-86502004000700005.
11. Trackman PC, Saxena D, Bais MV. TGF-β1 and CCN2-stimulated Sirius Red assay for collagen accumulation in cultured cells. *Methods Mol Biol.* 2017;1489:481–5. DOI: 10.1007/978-1-4939-6430-7_39.
12. Матвеева Д.К., Андреева Е.Р., Буравкова Л.В. Выбор оптимального протокола получения децеллюляризованного внеклеточного матрикса мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека. *Вестник Московского университета.* 2019;74(4):294–300. *Matveeva DK, Andreeva ER, Buravkova LB. Selection of the optimal protocol for preparation of decellularized extracellular matrix of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. Moscow University Biological Sciences Bulletin.* 2019;74(4):294–300 (In Russ.).
13. Berg JT, Breen EC, Fu Z, Mathieu-Costello O, West JB. Alveolar hypoxia increases gene expression of extracellular matrix proteins and platelet-derived growth factor-B in lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(6):1920–8. DOI: 10.1164/ajrccm.158.6.9804076.
14. Milner R, Hung S, Erokwu B, Dore-Duffy P, LaManna JC, del Zoppo GJ. Increased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin in angiogenic cerebral blood vessels of mice subject to hypobaric hypoxia. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38(1):43–52. DOI: 10.1016/j.mcn.2008.01.013.
15. Saed GM, Diamond MP. Hypoxia-induced irreversible up-regulation of type I collagen and transforming growth factor-beta1 in human peritoneal fibroblasts. *Fertil Steril.* 2002;78(1):144–7. DOI: 10.1016/s0015-0282(02)03146-1.
16. Kumar P, Satyam A, Cigognini D, Pandit A, Zeugolis DI. Low oxygen tension and macromolecular crowding accelerate extracellular matrix deposition in human corneal fibroblast culture. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(1):6–18. DOI: 10.1002/term.2283.
17. Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal

- stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng.* 2008;105(6):586–94. DOI: 10.1263/jbb.105.586.
18. Davidson JM, LuValle PA, Zoia O, Quaglino D, Giro M. Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J Biol Chem.* 1997;272(1):345–52. DOI: 10.1074/jbc.272.1.345.
 19. Буравкова Л.Б., Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Жамбалова А.П., Козионова М.П. Характеристика мезенхимальных стромальных клеток из липоаспирата человека, культивируемых при пониженном содержании кислорода. *Цитология.* 2009;51(1):5–11.
 20. Buravkova LB, Grinakovskaya OS, Andreeva ER, Zhambalova AP, Kozionova MP. Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under lower oxygen tension. *Cell and Tissue Biology.* 2009;3(1):23–28 (In Russ.).
 21. Choi JY, Jang YS, Min SY, Song JY. Overexpression of MMP-9 and HIF-1 α in breast cancer cells under hypoxic conditions. *J Breast Cancer.* 2011;14(2):88–95. DOI: 10.4048/jbc.2011.14.2.88.
 22. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(6):430–9. DOI:10.1038/nrc37266.

Информация об авторах

Диана Константиновна Матвеева – аспирант лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН.

Елена Ромуальдовна Андреева – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной физиологии ИМБП РАН.

Николай Николаевич Новиков – инженер центра лазерной технологии и материаловедения ИОФ РАН им. А.М. Прохорова.

Владимир Иванович Пустовой – кандидат физико-математических наук, руководитель центра лазерной технологии и материаловедения ИОФ РАН им. А.М. Прохорова.

Людмила Борисовна Буравкова – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией клеточной физиологии ИМБП РАН; профессор кафедры экологической и экстремальной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.

Author information

Diana K. Matveeva – Post-graduate Student, Laboratory of Cell Physiology, Institute of Biomedical Problems RAS.

<https://orcid.org/0000-0002-1386-2836>

Elena R. Andreeva – Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Cell Physiology, Institute of Biomedical Problems RAS.

<https://orcid.org/0000-0002-1000-5804>

Nickolay N. Novikov – Engineer, Center of Laser Technology and Materials Science, Prokhorov General Physics Institute RAS.

<https://orcid.org/0000-0001-7250-2446>

Vladimir I. Pustovoy – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Head of the Center of Laser Technology and Materials Science,

Prokhorov General Physics Institute RAS.

<https://orcid.org/0000-0001-6383-3243>

Ludmila B. Buravkova – Corresponding Member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Cell Physiology,

Institute of Biomedical Problems RAS; Professor, Department of Ecological and Extreme Medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.

<https://orcid.org/0000-0001-6994-557X>

Возрастные изменения структуры митохондрий – регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов, Е.П. Тимохина, С.В. Назимова, Д.А. Цомартова

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Введение. Стероидогенная активность клеток надпочечников претерпевает существенные изменения в постнатальном периоде онтогенеза. Однако изменения структуры митохондрий кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторного процесса мало изучены.

Цель настоящей работы – исследовать структурные изменения митохондрий кортикостероцитов в клубочковой, пучковой и сетчатой зонах коркового вещества надпочечника крысы в процессе постнатального развития и сопоставить их с динамикой морфофункциональных показателей коркового вещества.

Материалы и методы. Исследование проведено на самцах крыс Вистар пубертатного и постпубертатного возраста. Определены количественные показатели структуры коркового вещества методом световой микроскопии и ультраструктуры кортикостероцитов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, а также продукция соответствующих стероидных гормонов.

Результаты. Выявлены изменения в продукции стероидных гормонов и структуре коркового вещества при переходе от полового созревания к половой зрелости. Установлено, что в процессе полового созревания происходит изменение размеров и числа митохондрий в кортикостероцитах, соответствующих показателям их функциональной активности.

Заключение. Установлено, что реорганизация митохондриального аппарата влияет на активность стероидогенеза в большей степени, нежели структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Изменения митохондрий, происходящие в клубочковой и сетчатой зонах, одинаковы, в то время как в пучковой зоне они носят качественно иной характер. Эти данные свидетельствуют о неоднозначности суждения о функциональной активности по изменению размеров зон и клеток коркового вещества надпочечников.

Ключевые слова: митохондрия, надпочечник, кортикостероцит, стероидогенез, стероидные гормоны, постнатальное развитие

Для корреспонденции: Наталья Валентиновна Яглова. E-mail: yaglova@mail.ru

Для цитирования. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Тимохина Е.П., Назимова С.В., Цомартова Д.А. Возрастные изменения структуры митохондрий – регулятор активности стероидогенеза в кортикостероцитах надпочечников крыс. Клини. эксп. морфология. 2020;9(1):64–70. DOI:10.31088/СЕМ2020.9.1.64-70

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека (№ АААА-А17-117013050048-6).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.12.2019. Получена после рецензирования 17.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

Age-dependent changes of mitochondrial structure regulate steroidogenic activity of rat adrenal cortical cells

N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov, E.P. Timokhina, S.V. Nazimova, D.A. Tsomartova

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. Steroidogenic activity of adrenal cells undergoes significant changes during postnatal development. However, alterations in the mitochondria of corticosterocytes during the development of adrenal cortex and their impact on the secretory process are still poorly studied.

The aim of the study was to evaluate alterations in mitochondrial structure in rat adrenal cortical cells during postnatal development and to compare them with changes in morphology and function of the adrenal cortex.

Materials and methods. Male Wistar rats of pubertal and post pubertal age were used in experiment. Quantification of histological and ultrastructural parameters of adrenal cortex and cortical cells as well as production of adrenal steroid hormones was performed.

Results. We found age-dependent changes in steroid hormone production and in morphology of adrenal cortex during the transition from puberty to maturity. Adrenal cortical cells showed significant changes in number and size of mitochondria during puberty corresponding to indicators of their functional activity.

Conclusion. Reorganization of the mitochondrial apparatus determines the activity of steroidogenesis to a greater extent than the structural changes in the corresponding zones of the adrenal cortex. Zona glomerulosa and zona reticularis demonstrated similar structural changes in mitochondria, whereas zona fasciculata exhibited another type of mitochondria remodeling. These data indicate the ambiguity of judgments about changing the sizes of zones and cells of the adrenal cortex as a marker of their functional activity.

Keywords: mitochondrion, adrenal gland, adrenal cortical cell, steroidogenesis, steroid hormones, postnatal development

Corresponding author: Natalia V. Yaglova. E-mail: yaglova@mail.ru

For citation: Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Timokhina E.P., Nazimova S.V., Tsomartova D.A. Age-dependent changes of mitochondrial structure regulate steroidogenic activity of rat adrenal cortical cells. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(1):64–70 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.1.64-70.

Funding. The work is done in the framework of the state assignment of Research Institute of Human Morphology (No AAAA-A17-117013050048-6).

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

Received 20.12.2019. **Received in revised form** 17.01.2020. **Accepted.** 11.02.2020.

Введение

Структурные основы секреторного процесса в клетках, синтезирующих стероидные гормоны, были подробно изучены в 1960–1980 годы. Основными оргanelлами, обеспечивающими стероидогенез, являются митохондрии и гладкая эндоплазматическая сеть. Электронномикроскопические исследования стероидпродуцирующих клеток показали, что наибольшие изменения при подавлении или стимулировании синтеза стероидов претерпевают митохондрии, а следовательно, именно структура митохондриального аппарата служит показателем секреторной активности стероидпродуцирующих клеток [1–3]. Тем не менее стероидогенная активность клеток как надпочечных желез, так и семенников и яичников претерпевает существенные изменения в постнатальном периоде онтогенеза. Наиболее сложное развитие и становление стероидогенеза наблюдаются в корковом веществе надпочечников. У крыс секреторная активность пучковой зоны начинается еще в антенатальном периоде, а после рождения значительно снижается [4–6]. С трехнедельного периода активизируется синтез половых гормонов в сетчатой зоне [7]. Общеизвестно, что эти процессы обусловлены активацией ферментов гидроксилаз, однако изменения структуры митохондрий кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторного процесса изучены в значительно меньшей степени.

Цель настоящей работы – исследовать структурные изменения митохондрий кортикостероцитов в клубочковой, пучковой и сетчатой зонах коркового вещества надпочечника крысы в процессе постнатального развития и сопоставить их с динамикой морфофункциональных показателей коркового вещества.

Материалы и методы

Исследование проведено на 20 самцах крыс Вистар. Животных выводили из эксперимента передозировкой золотила в возрасте 6 недель (n=10), что соответствует пубертатному периоду между адренархе и гонадархе, и 10 недель (n=10), после достижения половой зрелости, когда надпочечники крыс достигают своего максимального развития [7]. Эксперимент выполнен в соответствии с нормами и правилами обращения с лабораторными животными в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ от 19.06.2003 № 267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утвержденными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977.

Надпочечники фиксировали в жидкости Буэна. Изготавливали препараты экваториальных срезов органа, которые после стандартной гистологической проводки окрашивали гематоксилином и эозином («Биовитрум», Россия). Гистологические препараты изучали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия). Морфометрическое исследование проводили с помощью программы ImageScope (Leica Microsystems, Германия). Для изучения ультраструктуры надпочечники фиксировали в 2,5% (объем/объем) растворе глутарового альдегида в 0,1M какодилатном буфере (pH 7,3) с последующей заливкой в смесь эпон–аралдит. Контрастирование срезов проводили водным раствором 2,5% (объем/объем) уранилацетата и цитрата свинца.

Исследование срезов проводили методом электронной трансмиссионной микроскопии (Libra 120, Carl Zeiss, Германия).

В сыворотке крови крыс определяли концентрацию альдостерона, кортикостерона, а также эстрогена как конечного продукта синтеза половых стероидов сетчатой зоны иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов (Cusabio, Китай).

Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

Результаты

При гистологическом исследовании надпочечников крыс пубертатного возраста корковое вещество было хорошо развито. В нем отчетливо выделялись клубочковая, пучковая и сетчатая зоны. Пучковая и сетчатая зоны имели одинаковый размер и занимали приблизительно 90% площади коркового вещества (рис. 1).

При электронномикроскопическом исследовании кортикостероциты клубочковой зоны содержали многочисленные митохондрии овальной формы с пластинчатыми кристами. У некоторых митохондрий матрикс имел среднюю электронную плотность, но у многих наблюдались отек матрикса и просветление крист разной степени выраженности (рис. 2 А). В пучковой зоне митохондрии были более округлой формы, большего размера и имели везикулярные кристы (рис. 2 В). Количество митохондрий с отеком матрикса было несколько выше, чем в клубочковой зоне. В сетчатой зоне структура митохондрий более схожа с таковой у митохон-

дрий в пучковой зоне, но отличалась менее электронно плотным матриксом (рис. 2 С).

При переходе от пубертатного периода к половой зрелости, когда надпочечник достигает своего максимального развития, отмечалось уменьшение размеров клубочковой зоны и одновременное повышение продукции альдостерона (рис. 1, 3 А). Кортикостероциты клубочковой зоны уменьшались, но размеры их ядер не изменялись. Наблюдалось увеличение количества митохондрий и уменьшение их диаметра. Снижился и процент митохондрий с отеком матрикса. Сопоставление выраженности изменений размеров клеток, митохондрий и их числа показывало, что увеличение численности митохондрий в единице площади цитоплазмы обусловлено именно увеличением количества митохондрий, а не уплотнением за счет уменьшения объема цитоплазмы (рис. 4 А).

При исследовании пучковой зоны в постпубертатном периоде развития наблюдалось увеличение ее размеров, в то время как продукция кортикостерона не увеличивалась (рис. 1, 3 В). Количество митохондрий в клетках пучковой зоны в отличие от предыдущего срока исследования уменьшилось, а их размер увеличился. Наблюдалось и снижение доли митохондрий с отеком матрикса (рис. 4 В).

Размер сетчатой зоны с возрастом практически не изменялся, но в ней, как и в клубочковой зоне, уменьшился размер клеток, а число митохондрий в единице площади цитоплазмы значительно увеличилось (рис. 1, 4 С). Аналогично клубочковой зоне, увеличение числа митохондрий было более выраженным, нежели уменьшение их размера и объема цитоплазмы. Продукция половых гормонов снизилась по сравнению с предыдущим сроком исследования (рис. 3 С).

Обсуждение

Известно, что в митохондриальном аппарате клеток происходят изменения, связанные со слиянием и делением митохондрий [8, 9]. Полученные нами данные показывают разнообразные изменения в структуре коркового вещества, ультраструктуре его клеток и продукции гормонов. Когда надпочечник достигает своего максимального развития, размеры клубочковой зоны уменьшаются, а продукция альдостерона увеличивается. Наши исследования показали, что ключевым структурным механизмом усиления стероидогенеза является двукратное увеличение количества митохондрий в клетках в сочетании с уменьшением их размера. Способ, с помощью которого митохондрия может реагировать на цитозольные сигналы и изменять свою функциональность, – это процесс деления, при котором происходит образование одной или нескольких дочерних митохондрий [10, 11]. Таким образом, превращение небольшого числа крупных митохондрий в большее количество митохондрий меньшего размера позволяет увеличить площадь поверхности внутренних мембран и как активировать процессы биологического окисле-

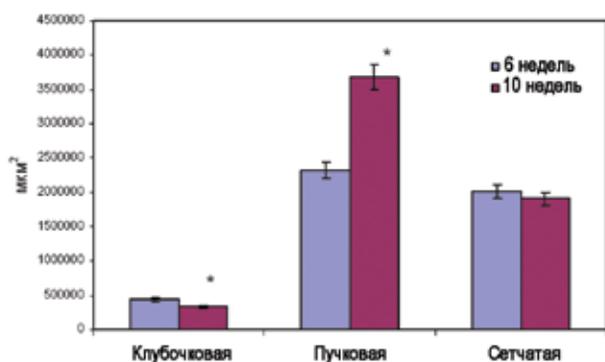


Рис. 1. Площадь зон коркового вещества надпочечников крысы в пубертатном и постпубертатном периодах ($M \pm m$)

* $p < 0,001$ по сравнению с предыдущим сроком исследования

Fig. 1. Adrenal cortex zone area in rats during puberty and postpubertal periods ($M \pm m$)

* $p < 0,001$ compared to the previous term

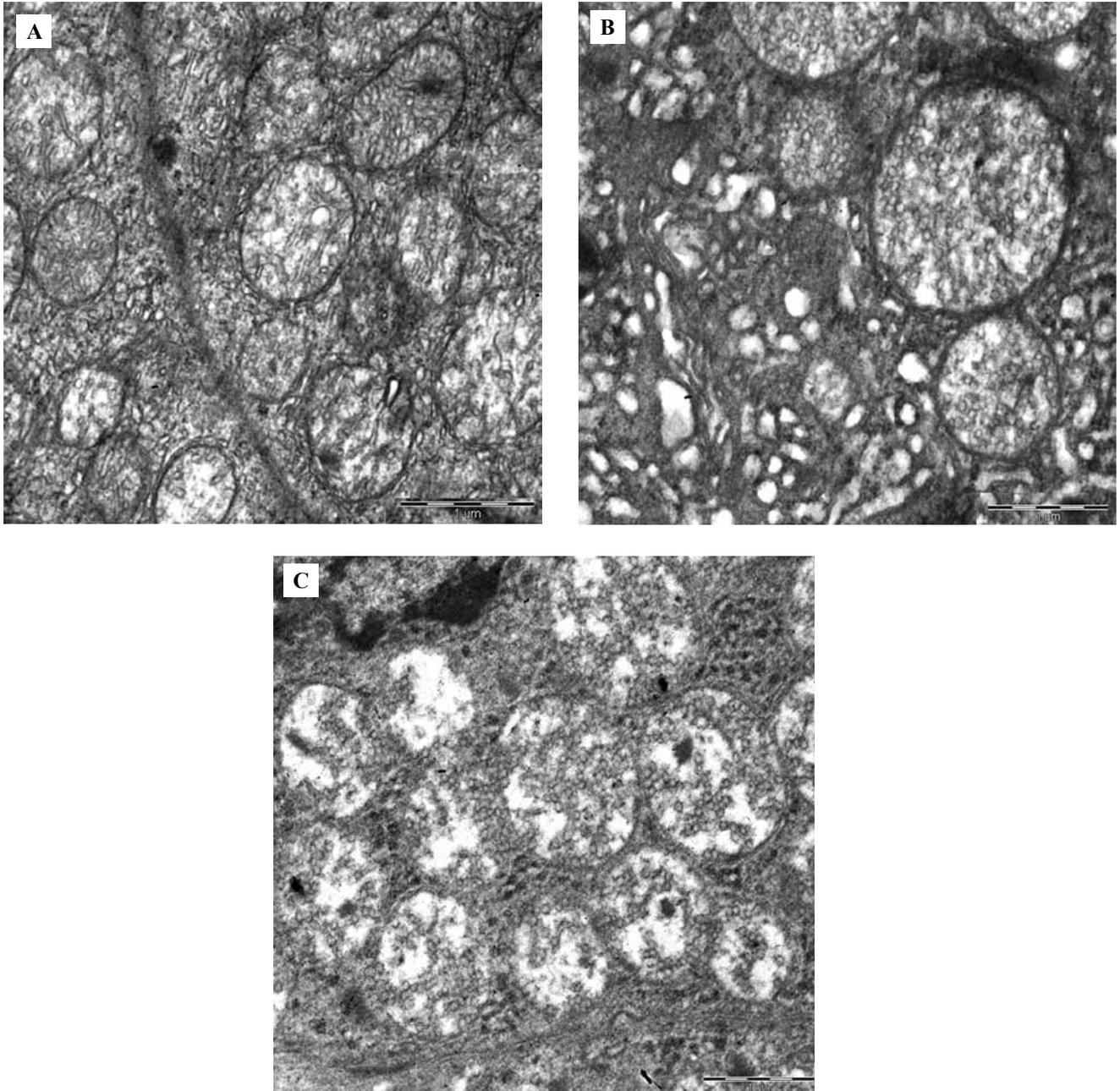


Рис. 2. Структура митохондрий кортикостероцитов клубочковой (А), пучковой (В) и сетчатой (С) зон коркового вещества надпочечника крысы в пубертатном периоде

Fig. 2. Mitochondria structure in adrenocortical cells of zona glomerulosa (A), zona fasciculata (B), and zona reticularis (C) in pubertal rats

ния, так и повысить стероидогенную активность. Это предположение подтверждается и уменьшением процента митохондрий с отеком матрикса, который возникает при их функциональной нагрузке. Важно отметить, что стероидогенез обеспечивается последовательными процессами в двух органеллах – митохондриях и гладкой эндоплазматической сети. Исследования показали, что деление митохондрий также происходит при участии ретикулярных структур путем образования «петли», перетягивающей митохондрию [12, 13], что

указывает на связь активности синтеза стероидов и изменений его структурного обеспечения.

В отличие от клубочковой пучковая зона коркового вещества при переходе к половой зрелости организма, наоборот, увеличивается в размерах, а продукция кортикостерона при этом не повышается. Количество митохондрий в клетках уменьшается, а их размер увеличивается. Происходит и снижение доли митохондрий с отеком матрикса, то есть выявляются признаки снижения морфологического субстрата стероидогенной

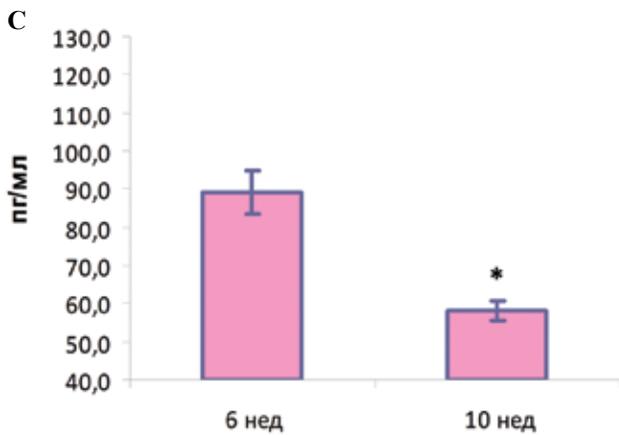
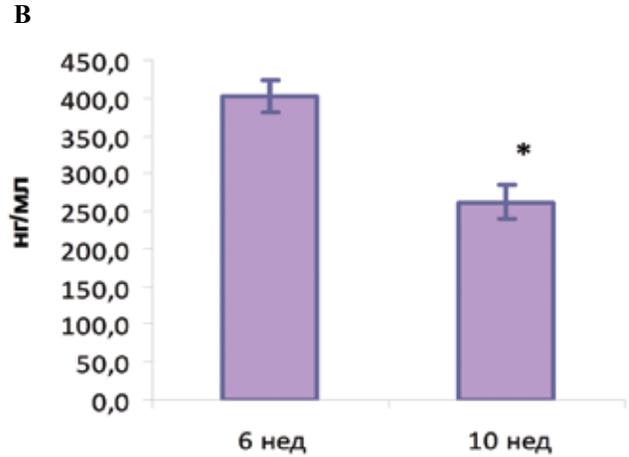
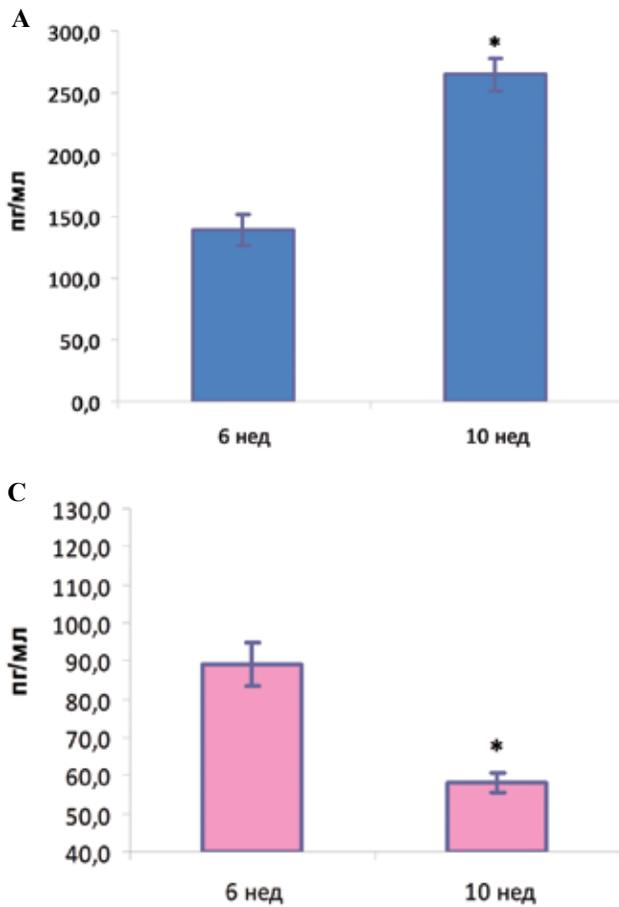


Рис. 3. Возрастная динамика концентрации гормонов коркового вещества надпочечников в сыворотке крови (M±m).

А – альдостерон, В – кортикостерон, С – эстрон
* p<0,001 по сравнению с предыдущим сроком исследования

Fig. 3. Age-dependent changes in serum concentration of adrenal hormones (M±m).

А – aldosterone, В – corticosterone, С – estrone
* p<0,001 compared to the previous term



Рис. 4. Морфологическая характеристика митохондрий кортикостероцитов клубочковой (А), пучковой (В) и сетчатой зоны (С).

За единицу приняты значения показателей пубертатного периода
* p<0,001 по сравнению с предыдущим сроком исследования

Fig. 4. Morphological parameters of mitochondria in adrenocortical cells of zona glomerulosa (A), zona fasciculata (B), and zona reticularis (C). Levels normalized to values of pubertal period
* p<0,001 compared to the previous term

активности. Такое изменение структуры, диктуемое увеличением числа клеток-продуцентов гормона, может происходить за счет слияния митохондрий [14].

После достижения половой зрелости, когда начинается активный синтез стероидов в семенниках, функциональная активность клеток сетчатой зоны снижается [7]. Наши данные также выявили снижение продукции половых стероидов (рис. 2). Размеры сетчатой зоны при переходе к половой зрелости практически не изменялись, но в отличие от пучковой зоны в ней происходит уменьшение размеров клеток. Возрастные изменения митохондриального аппарата клеток были фактически идентичными изменениям в клубочковой зоне. Тем не менее увеличения продукции женских половых стероидов не наблюдалось. Отек матрикса митохондрий был выражен одинаково и в пубертатном, и в постпубертатном периодах. Вероятно, такая перестройка митохондрий обусловлена значительным уменьшением объема цитоплазмы. В корковом веществе надпочечника клетки сетчатой зоны отличаются наименьшими размерами среди кортикостероцитов, а соответственно, и меньшим количеством митохондрий, обуславливающим их повышенную функциональную активность. После достижения половой зрелости уменьшение изначально небольших размеров цитоплазмы требовало перестройки митохондрий для обеспечения биоэнергетических процессов при ее критически малом объеме, что подтверждается неизменно высоким уровнем клеток с отеком матрикса митохондрий.

Выявленные изменения ультраструктуры клеток показывают, что морфологическая оценка изменения функциональной активности структурно-функциональных зон коркового вещества надпочечников по изменению размеров зоны не является достоверной. Учитывая ключевую роль перестройки митохондрий в кортикостероцитах в изменении продукции гормонов, особенно в клубочковой и пучковой зонах, необходимо дополнять морфологическое исследование гистологических препаратов электронномикроскопическими или биохимическими исследованиями.

Заключение

При переходе от пубертатного периода к половой зрелости в кортикостероцитах происходит реорганизация митохондриального аппарата, влияющая на активность стероидогенеза в большей степени, чем структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Изменения, происходящие в клубочковой и сетчатой зонах, одинаковы, в то время как в пучковой зоне они носят качественно иной характер. Выраженность связи секреции стероидных гормонов и структурных перестроек митохондрий указывает на необходимость дополнительных исследований при морфологической оценке состояния коркового вещества надпочечников развивающегося организма в эксперименте.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов.
Сбор и обработка материала – С.В. Назимова, Д.А. Цомартова, Е.П. Тимохина, Н.В. Яглова.
Написание текста – Н.В. Яглова, С.С. Обернихин.
Редактирование – В.В. Яглов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov.
Collected the data and performed the analysis – S.V. Nazimova, D.A. Tsomartova, E.P. Timokhina, N.V. Yaglova.
Wrote the paper – N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin.
Edited the manuscript – V.V. Yaglov.

Литература/References

1. *Domoto DT, Boyd JE, Mulrow PJ, Kashgarian M.* The ultrastructure of the adrenal zona glomerulosa of rats on potassium-supplemented or sodium-depleted diets. *Am J Pathol.* 1973;72(3):433–46.
2. *Nunnari J, Suomalainen A.* Mitochondria: in sickness and in health. *Cell.* 2012;148(6):1145–59. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
3. *Zemirli N, Morel E, Molino D.* Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2):pii:E564. DOI: 10.3390/ijms19020564.
4. *Could E, Woolley CS, McEwen BS.* Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *J Comp Neurol.* 1991;313(3):479–85. DOI: 10.1002/cne.903130308.
5. *Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y.* Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology.* 1999;140(7):3342–53. DOI: 10.1210/endo.140.7.6859.
6. *Dupouy JP, Coffigny H, Magre S.* Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J Endocrinol.* 1975;65(3):347–52. DOI: 10.1677/joe.0.0650347.
7. *Pignatelli D, Xiao F, Gouvtia AM, Ferreira JG, Vinson GP.* Adrenarache in the rat. *J Endocrinol.* 2006;191(1):301–8. DOI: 10.1677/joe.1.06972.
8. *Archer SL.* Mitochondrial dynamics – mitochondrial fission and fusion in human diseases. *N Engl J Med.* 2013;369(23):2236–51. DOI: 10.1056/NEJMra1215233.
9. *Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J.* Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 2018;62(3):341–60. DOI: 10.1042/ebc20170104.
10. *Van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S.* Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(6).pii: a011072 DOI: 10.1101/cshperspect.a011072.
11. *Chan DC.* Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu Rev Genet.* 2012;46:265–87. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132529.
12. *Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK.* ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science.* 2011;334(6054):358–62. DOI: 10.1126/science.1207385.

13. *Chakrabarti R, Ji WK, Stan RV, de Juan Sanz J, Ryan TA, Higgs HN.* INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *J Cell Biol.* 2018;217(1):251–68. DOI: 10.1083/jcb.201709111.
14. *Pernas L, Scorrano L.* Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:505–31. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105011.

Информация об авторах

Наталья Валентиновна Яглова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Сергей Станиславович Обернихин – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Валентин Васильевич Яглов – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Екатерина Петровна Тимохина – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Светлана Владимировна Назимова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Дибакхан Асланбековна Цомартова – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека

Author information

Nataliya V. Yaglova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0002-8239-5039>

Sergey S. Obernikhin – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0003-0997-6766>

Valentin V. Yaglov – Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0003-4357-0639>

Svetlana N. Nazimova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0001-5118-7037>

Ekaterina P. Timokhina – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0003-0504-1488>

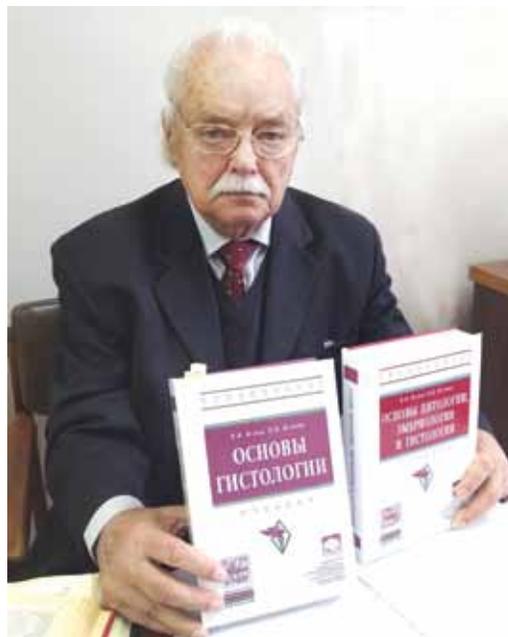
Dibakhan A. Tsomartova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Endocrine System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0002-1381-0200>

Валентин Васильевич Яглов (к 85-летию со дня рождения)

2 февраля исполнилось 85 лет Валентину Васильевичу Яглову – выдающемуся отечественному гистологу, основателю международной школы морфологов-эндокринологов, доктору медицинских наук, профессору, академику Международной академии аграрного образования, члену Всемирной ассоциации ветеринарных анатомов, лауреату второго Всероссийского конкурса «Академус» на лучшую научную и учебную публикацию за создание учебника для медицинских вузов «Основы гистологии», главному научному сотруднику лаборатории развития эндокринной системы НИИ морфологии человека.

Валентин Васильевич Яглов в 1963 году с отличием окончил Курский государственный медицинский институт по специальности «лечебное дело». На протяжении всего периода обучения он активно занимался в научно-студенческом кружке кафедры цитологии, гистологии и эмбриологии, выполнил и опубликовал несколько студенческих работ по нейрогистологии. Руководителем кандидатской диссертационной работы В.В. Яглова была выдающийся нейрогистолог страны Татьяна Андреевна Григорьева – заведующая кафедрой гистологии Второго ордена Ленина Московского медицинского института им. Н.И. Пирогова. Работа была посвящена изучению влияния инсулиновой гипогликемии на органы центральной нервной системы и эндокринных желез (в то время инсулиновую гипогликемию использовали для лечения некоторых психических заболеваний, а морфологические исследования этой проблемы оставались практически мало изученными). Важно отметить, что этот период был временем расцвета функциональной морфологии. В практику морфологов широко вошли гистохимические методы исследования. За время обучения в аспирантуре Валентин Васильевич Яглов набрал огромный экспериментальный материал. Профессор Григорьева с большим интересом просмотрела его и предложила сконцентрировать внимание на структурном обеспечении секреции катехоламинов клетками мозгового вещества надпочечников.

В 1966 году Валентин Васильевич Яглов защитил кандидатскую диссертацию на тему «Цитологическое и гистохимическое исследование секреторной деятельности хромоаффинных клеток мозгового вещества надпочечника». В ней были определены и изучены все этапы секреции железистых клеток и их морфофункциональные выражения. Фундаментальные положения этой работы были положены в основу методологии изучения биологии секреции и опубликованы в коллективной монографии «Железы, их гистофизиология и нервная регуляция» (М.: Наука, 1971), посвященной памяти профессора Т.А. Григорьевой.



После защиты кандидатской диссертации началась педагогическая деятельность В.В. Яглова – он стал ассистентом кафедры гистологии Курского государственного медицинского института (1966–1969 годы). Научный успех молодого исследователя был высоко оценен в родном институте. Ректор института предложил ему стать научным руководителем кандидатской диссертации сотрудника кафедры ЛОР-болезней по изучению секреции желез придаточных пазух.

В 1968 году Валентин Васильевич был направлен на факультет повышения квалификации в Ленинградский педиатрический медицинский институт, кафедрой гистологии которого заведовал выдающийся эмбриолог и гистолог Алексей Георгиевич Кнорре. Он оказал огромное влияние на формирование профессионального мировоззрения В.В. Яглова, обратив внимание на эволюционные аспекты изучения гистологии. В 1969 году Валентин Васильевич Яглов получил приглашение преподавать гистологию на кафедре гистологии лечебного факультета 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова. Здесь его научные интересы сосредоточились на изучении наибольшего отдела эндокринной системы позвоночных животных и человека – диффузной эндокринной системы (ДЭС). Определились и основные направления этой работы: сравнительная и эволюционная морфология самого крупного звена ДЭС – гастроэнтеропанкреатическая эндокринная система. Стажировка на кафедре гистологии Ленинградского педиатрического медицинского института и многочисленные беседы с членом-корреспондентом АМН СССР А.Г. Кнорре оказали серьезное влияние на медико-биологическое мышление В.В. Яглова. Валентин Васильевич стал собирать материал по сравнительной гистологии эндокринной части поджелудочной железы позвоночных животных.

Однако подготовку докторской диссертации и монографии на эту тему пришлось отложить на несколько лет.

Ученый совет 2-го МОЛГМИ им. Н.И. Пирогова с целью повышения качества подготовки будущих врачей принял решение разработать каждой кафедре методологию программированного контроля качества знаний студентов. Ответственным за эту работу по кафедре гистологии лечебного факультета назначили доцента В.В. Яглова. Эта была достаточно трудная, но весьма полезная работа. Было опубликовано два методических пособия. Прошел год их использования в учебном процессе. Результаты этого титанического труда на итоговых экзаменах выявили первые недостатки. Студенты, получив экзаменационный билет, старались воспроизвести ту или иную структурно-логическую схему изученного объекта (графа), но практически не могли последовательно представить его словесную морфологическую характеристику, что не создавало впечатления его знания. Нужна была другая модель современного учебника. Такая модель отсутствовала, и В.В. Яглов решил найти ее. Потребовались годы поиска. За это время В.В. Яглов и Е.А. Шубникова привлекались в качестве научных редакторов единственного в стране учебника «Гистология». Творческая работа по редактированию учебника позволила В.В. Яглову сделать для себя важный вывод – необходимы новая методология изучения гистологии и новые принципы создания учебников. Таковых в педагогической практике не было. Вывод напрашивался один – надо искать. Через годы, наконец, методология была найдена. Результаты превзошли все ожидания, и такие учебные пособия, а затем и учебники были изданы. В профильных журналах появились положительные рецензии.

Настало время проанализировать и обобщить собственный материал, собранный по сравнительной морфологии эндокринной части поджелудочной железы позвоночных. В 1978 году В.В. Яглов успешно защитил докторскую диссертацию на тему «Сравнительная морфология и экспериментальная патология эндокринной части поджелудочной железы позвоночных». В этом же году в издательстве «Наука» незадолго до защиты диссертации вышла его монография «Эволюция структурной организации эндокринной части поджелудочной железы позвоночных». В 1981 году В.В. Яглова избрали по конкурсу руководителем лаборатории патоморфологии с группой электронной микроскопии НИИ гигиены труда и профессиональных заболеваний АМН СССР. Здесь под его руководством был выполнен широкий круг работ по изучению действия вредных факторов производственной среды на живые организмы. Работая в НИИ, В.В. Яглов не прерывал педагогическую деятельность. Он дважды был научным редактором учебника «Гистология» профессоров Ю.И. Афанасьева

и Н.А. Юриной. В 2001 году В.В. Яглова избрали заведующим кафедрой цитологии, гистологии и эмбриологии, а с 2003 года по совместительству и деканом ветеринарно-биологического факультета Московской ветеринарной академии. В 2007 году В.В. Яглов продолжил научную и педагогическую работу в НИИ морфологии человека РАМН во вновь созданной лаборатории развития эндокринной системы. В настоящее время профессор В.В. Яглов принимает активное участие в разработке нового научного направления в морфологии – изучении эндокринных дисрапторов на живые организмы.

За годы работы в лаборатории развития эндокринной системы В.В. Ягловым сделано два научных открытия и получен патент на изобретение. Здесь окончательно завершена работа над созданием методологии индивидуального развивающего обучения и публикация двух вариантов учебника для ветеринарного и медицинского факультетов высших учебных заведений с целью ее реализации. В 2017 году на 2-м Всероссийском конкурсе «Академус» на лучшую научную и учебную публикацию авторы медицинского варианта учебника «Основы гистологии» (В.В. Яглов, Н.В. Яглова) были удостоены звания лауреатов. Разработанная ими методология универсальна и может быть использована при подготовке специалистов и по другим специальностям.

Наряду с научной и педагогической деятельностью В.В. Яглов вел активную общественную работу. Валентин Васильевич был ученым секретарем учебно-методической комиссии по преподаванию медико-биологических дисциплин в медицинских вузах при Главном управлении учебных заведений МЗ СССР, заместителем председателя Московского научного общества анатомов, гистологов и эмбриологов, членом диссертационных советов 2-го МОЛГМИ, Российского университета дружбы народов, Московской ветеринарной академии и НИИ морфологии человека РАМН, народным депутатом Первомайского совета города Москвы.

Валентин Васильевич Яглов награжден знаком «Отличнику здравоохранения» и двумя медалями.

Профессор В.В. Яглов – автор более 200 научных статей, трех учебников, практикума, многих учебных пособий, трех монографий, двух научных открытий и двух изобретений. Под его руководством защищено 17 диссертаций – докторских и кандидатских. География выпускников школы Валентина Васильевича охватывает не только Российскую Федерацию, но и страны ближнего и дальнего зарубежья – Азербайджан, Армению, Ирак, Литву, Сирию, Узбекистан, Украину.

Коллектив НИИ морфологии человека и ученики сердечно поздравляют юбиляра и желают ему здоровья и дальнейших успехов в научной и педагогической деятельности.

Николай Константинович Пермяков (1925–1999)

К 95-летию со дня рождения

Николай Константинович Пермяков – человек, гражданин, врач, ученый и наш учитель – прожил очень яркую и полезную для Отечества, просвещения, медицины и науки жизнь.

Родился он в крайне трудное для страны время, в 1943 году ушел со студенческой скамьи добровольцем на фронт – сопровождал эшелоны с боеприпасами (не был годен к строевой службе), не раз и не два попал под вражеские авиабомбежки, чудом выжил и... не считал себя ветераном Великой Отечественной войны, так как не участвовал в прямых боевых столкновениях. В этом весь Николай Константинович: скромный и на редкость доброжелательный человек.

После демобилизации он продолжил образование, получил диплом с отличием (окончил в 1948 году Московский медицинский институт МЗ РСФСР), закончил аспирантуру на кафедре судебной медицины, под руководством А.В. Русакова, память которого свято чтит, защитил кандидатскую диссертацию «Изменения в поч-

ках при гемолизе», затем докторскую «Общая гнойная инфекция», прошел в НИИСП им. Н.В. Склифосовского путь от прозектора до руководителя научного отдела патологической анатомии. Параллельно с научной и практической деятельностью Николай Константинович преподавал сначала судебную медицину, затем патологическую анатомию в Первом ММИ им. И.М. Сеченова, на кафедре возглавляемой А.И. Струковым, которого с А.В. Смольяниковым считал своими учителями. Развитию природного творческого потенциала Николая Константиновича способствовала сама атмосфера, царившая в то время в «Склифасах» (так он называл НИИ скорой помощи), которую определяли блестящие клиницисты – С.С. Юдин, П.И. Андросов, Б.С. Розанов, С.В. Лобачев, А.Н. Крюков, Д.А. Арапов и Б.А. Петров. Общение (порой и дружба) с этими крупными учеными и определило широту круга научных интересов Н.К. Пермякова (NB: патологоанатом высокого профессионального уровня может вырасти только рядом с высококвалифицированным клиницистом, причем процесс их «огранки» постоянный и обоюдозависимый.)

Тематика научных исследований, обозначенная в диссертационных работах академика РАМН профессора Н.К. Пермякова, нашла свое логическое продолжение и развитие в работах его учеников: «Патологическая анатомия панкреонекроза» (Г.П. Титова), «Патологическая анатомия геморрагического инфаркта миокарда» (И.Е. Галанкина), «Острая почечная недостаточность» (Л.Н. Зиминая). Особое место в научном творчестве Николая Константиновича занимала реанимационная патология. Его книги «Основы реанимационной патологии» и «Патология реанимации и интенсивной терапии» заложили основы нового направления в науке, до сих пор являются настольными для многих реаниматологов. Венцом его чрезвычайно полезной и многогранной научной деятельности стали работы по изучению природы сепсиса и участия эндотоксина кишечного и/или иного происхождения в патогенезе экстремальных состояний и индукции атерогенеза. Н.К. Пермяков – автор более 270 научных публикаций, в том числе семи монографий.

В 1988 году Николай Константинович возглавил Институт морфологии человека АМН СССР, который был создан крупным ученым-энциклопедистом Александром Павловичем Авцыным. Возвращенный им за 27 лет руководства институтом коллектив представлял собой «семью», вхождение в которую в качестве ново-



Академик Н.К.Пермяков за работой



С ученицами –
профессором Ириной Евгеньевной Галанкиной (слева)
и профессором Галиной Павловной Титовой (справа)

го главы было делом нешуточным, требовало таланта, выдержки, такта и немалого чувства юмора, коими наш учитель в полной мере обладал. В то время в институте работала целая плеяда очень успешных ученых (уже создавших собственные научные школы) – Борис Борисович Фукс, Алексей Александрович Жаворонков, Михаил Шнеерович Вербицкий, Анна Георгиевна Бабаева, Владимир Аркадьевич Шахламов, Артур Георгиевич Марачев, Юрий Георгиевич Пархоменко, Ирина Александровна Казанцева и другие. Таким образом, А.П. Авцыну удалось собрать редкий по составу коллектив из специалистов разных медико-биологических специальностей. Отсутствие собственной прозекутуры в институте мешало научно-практическому развитию головного учреждения страны. Н.К. Пермяков, став директором, расширил прозекутуру НИИСП сотрудниками института, что стало началом больших перемен в развитии НИИ морфологии человека.

В начале 1990-х годов была проведена децентрализация ведущих патологоанатомических лабораторий Института морфологии человека: руководитель Центральной патологоанатомической лаборатории института профессор И.А. Казанцева возглавила патологоанатомическое отделение МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, руководитель лаборатории инфекционной патологии профессор Ю.Г. Пархоменко стал заведующим патологоанатомическим отделением КИБ № 2, старший научный сотрудник лаборатории экологической и географической патологии кандидат медицинских наук Л.М. Михалева стала заведовать вновь созданным патологоанатомическим отделением ГКБ № 31, а ведущий научный сотрудник этой лаборатории доктор медицинских наук А.Л. Черняев возглавил патоморфологическую лабораторию НИИ пульмонологии. При этом все перечисленные выше ученые остались навсегда в составе и в сердце сотрудниками института. В этом и проявлялись дальновидность и человечность нашего Николая Константиновича.

Еще одной вехой деятельности директора НИИ морфологии человека Н.К. Пермякова стали организация и руководство лабораторией патологической анатомии экстремальных состояний, ядром которой стали И.А. Аниховская, А.Н. Крупник, Р.А. Уразаев и М.Ю. Яковлев. Уже через год (1990) был проведен Первый Всесоюзный симпозиум по экстремальной патологии, результаты которого были живо обсуждены под руководством Н.К. Пермякова и А.П. Авцына и легли в основу разработки эндотоксиновой теории. Организационно и материально эта работа обеспечивалась ООО «КДО» (в настоящее время является клинической базой НИИОПП). За очень короткий период лаборатория Н.К. Пермякова (совместно с «КДО») создала методологическую и методическую базу изучения эндотоксинового компонента общей патологии и определения роли кишечного липополисахарида в гомеостазе, использование которой позволило сформулировать основные положения эндотоксиновой теории (М.Ю. Яковлев. Системная эндотоксинемия в физиологии и патологии человека, 1993,) и защитить еще три докторские диссертации сотрудниками лаборатории и соискателями – В.А. Анохиным, постулировавшим участие кишечного ЛПС в индукции бронхообструктивного синдрома у детей с ОРВИ (1994), Н.И. Ахминой, обнаружившей важную роль эндотоксина в постнатальной патологии (1995), и Ю.В. Коневым, показавшим патогенетическую роль эндотоксиновой агрессии кишечного происхождения в прогрессировании ишемической болезни сердца (1996). Результаты этих исследований общим собранием РАМН в 1995 году были признаны выдающимися достижениями отечественной науки. Правомочность эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека была подтверждена нобелевскими достижениями зарубежных коллег (номинация 2008 года и премия 2011 года), открывшими ЛПС-рецептор (TLR4) врожденного иммунитета, постулировавших ключевую роль последнего в гомеостазе и общей патологии.



Н.К. Пермяков и сотрудники кафедры патологической анатомии последипломного обучения при ММА им. И.М. Сеченова. 1991 год

Значительным достижением Н.К. Пермякова была организация кафедры патологической анатомии после-дипломного обучения при ММА им. И.М. Сеченова в феврале 1991 года, которой он руководил до 19 апреля 1999 года. Академик РАМН, профессор, лауреат Государственной премии СССР, Заслуженный деятель науки РСФСР Н.К. Пермяков создал мощный коллектив из ведущих профессоров патологической анатомии, специализирующихся по разным направлениям важнейших заболеваний человека (болезни сердечно-сосудистой системы, патология экстремальных состояний, вопросы онкоморфологии различных органов, нейро- и инфекционной патологии, женской половой системы и т.д.). В профессорско-преподавательский состав вошли И.А. Казанцева, Ю.Г. Пархоменко, И.Е. Галанкина, Н.И. Кондриков, Л.В. Кактурский, Г.А. Полякова, С.Ю. Касумова, Т.Д. Канарейцева, Л.М. Михалева и другие. Ученые обладали уникальными знаниями, читали авторские лекции, демонстрировали препараты из собственного архива. В этот период существования кафедры курсанты записывались за несколько месяцев вперед, чтобы оказаться слушателями тематического или сертификационного обучения. После кончины Н.К. Пермякова заведующим кафедрой стал его преемник – профессор Л.В. Кактурский, избранный в феврале 2000 года.

Перечисленными фактами заслуги Николая Константиновича Пермякова перед наукой, патологоанатомической службой, НИИСП им. Н.В. Склифосовского и Институтом морфологии человека АМН СССР (РАМН) не ограничиваются. Он подготовил целую плеяду патологоанатомов, передал и преумножил знания учителей своим ученикам, используя для этого самые разные форматы: кафедру патологической анатомии после-

дипломного обучения при ММА им. И.М. Сеченова, Московское общество патологоанатомов (являлся его председателем), ежедневные клинико-анатомические конференции в «Склифасах», патологоанатомическое отделение ГКБ № 31, ставшей клинической базой для института, и многое другое. Академик РАМН профессор Н.К. Пермяков обладал тонкой интуицией, позволяющей разглядеть в новом человеке его возможности как в личностном плане, так и в профессиональном.

Завершая краткие воспоминания о Николае Константиновиче Пермякове, которые позволили вновь испытать радость общения с этим выдающимся человеком, нельзя не вспомнить еще об одном факте его биографии. Именно он и его друг Донат Семенович Саркисов были инициаторами проведения пленума правления Всесоюзного общества патологоанатомов в Казани (1987), посвященного ятрогенной патологии – проблеме, обсуждаемой в настоящее время на самом высоком уровне. Только выдающиеся люди обладают такой глубокой интуицией – даром предчувствия грядущего.

Николай Константинович Пермяков живет в нашей памяти, помогает двигаться вперед, руководствуясь нашей совестью и знаниями.

И.Е. Галанкина,

доктор медицинских наук, профессор,
НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского

Л.М. Михалева,

доктор медицинских наук, профессор,
НИИ морфологии человека,

М.Ю. Яковлев,

доктор медицинских наук, профессор,
НИИ общей патологии и патофизиологии

АВТОМАТЫ ОКРАСКИ ЭМКОСТЕЙНЕР

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ, МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

- Высококачественная однотипная окраска препаратов
- Открытая система (любые реагенты и методики)
- Высокая производительность
- Реализация сложных методик (окраска по Папаниколау, гистология)
- Безопасные условия труда
- Низкая себестоимость окраски
- Шесть приборов, 6-8-13-16 станций:
АФОМК-6, АФОМК8-Г-01, АФОМК8-В-01, АФОМК-13-ПАП,
АФОМК-16, АФОМК-16-25

129301, г. Москва, ул. Касаткина, д. 11, стр.1;
тел. / факс: +7 (495) 287-81-00, 287-84-00;
www.emco.ru, www.stainer.ru, emco@bk.ru

 
ГРУППА КОМПАНИЙ ЭМКО

