

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 9 | № 2 | 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: [sem.journal@mail.ru](mailto:sem.journal@mail.ru)

[www.sem-journal.ru](http://www.sem-journal.ru)

[www.morpholhum.ru](http://www.morpholhum.ru)

Тираж 500 экземпляров

Издательство

«Группа МДВ»

[www.mdv-group.ru](http://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

*Коршунов 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

*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 | № 2 | 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

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

*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

- Е.И. Воронина, Т.А. Агеева, М.В. Рыжова*  
Особенности микроокружения и возможности  
иммунотерапии злокачественных глиальных  
опухолей 5 *E.I. Voronina, T.A. Ageeva, M.V. Ryzhova*  
Features of microenvironment and possibility  
of immunotherapy for malignant gliomas
- А.М. Борбат*  
Нейронные сети в морфологической диагностике 11 *A.M. Borbat*  
Neural networks for morphological diagnostics
- М.Р. Оразов, Л.М. Михалева, П.А. Семенов*  
Хронический эндометрит: патогенез, диагностика,  
лечение и его связь с бесплодием 16 *M.R. Orazov, L.M. Mikhaleva, P.A. Semenov*  
Chronic endometritis: pathogenesis, diagnosis,  
management and associated infertility
- Т.И. Шевченко, Д.С. Швороб*  
Клинико-морфологические факторы  
прогнозирования метастатического потенциала  
колоректального рака 26 *T.I. Shevchenko, D.S. Shvorob*  
Clinical and morphological factors in predicting  
the metastatic potential of colorectal cancer

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCHES

- Ю.А. Дергунова, В.В. Родионов, Л.М. Михалева,  
В.В. Кометова, Е.А. Кудинова, В.К. Боженко*  
Корреляция молекулярно-биологического  
подтипа первичной опухоли и регионарных  
метастазов у пациенток с раком молочной железы 33 *Yu.A. Dergunova, V.V. Rodionov, L.M. Mikhaleva,  
V.V. Kometova, E.A. Kudinova, V.K. Bozhenko*  
Correlation of the molecular biological subtype  
of primary tumor and regional metastases in breast  
cancer patients

Ю.И. Османов, Е.А. Коган,  
Г.А. Демяшкин, Р.Г. Нугуманов  
Морфологическая характеристика  
и иммунофенотип светлоклеточных почечно-  
клеточных карцином

40 Y.I. Osmanov, E.A. Kogan,  
G.A. Demyashkin, R.G. Nugumanov  
Morphological characteristics and immunophenotype  
of clear cell renal cell carcinomas

А.В. Федотов, А.Ф. Астраханцев,  
Н.М. Крупнов, М.П. Мазурова  
Морфогенез изменений эпителио-  
сперматогенного слоя мужских половых желез  
после тяжелой черепно-мозговой травмы

52 A.V. Fedotov, A.F. Astrakhantsev,  
N.M. Krupnov, M.P. Mazurova  
Epithelial-spermatogenic layer morphogenetic  
changes in the of the male sex glands after severe  
traumatic brain injury

Д.А. Отлыга, О.А. Юнеман, Е.Г. Цветкова,  
А.С. Харламова, Н.В. Бесова, С.В. Савельев  
Сонный гломус, мозговое вещество надпочечника  
и орган Цукеркандля  
как единая симпатoadреналовая система  
в пренатальном развитии человека

61 D.A. Otylga, O.A. Junemann, E.G. Tsvetkova,  
A.S. Kharlamova, N.V. Besova, S.V. Saveliev  
Carotid body, adrenal medulla and Zuckerkandl organ  
as an integrated sympathoadrenal system in human  
prenatal development

С.Д. Антонов, Г.В. Брюхин  
Роль экспериментального сахарного  
диабета 1-го типа матери в нарушении  
морфофункционального становления  
эндокриноцитов семенников  
у потомства крыс

70 S.D. Antonov, G.V. Bryukhin  
The effect of experimental maternal type 1 diabetes  
on the disturbances of the morphofunctional  
formation of testicular endocrinocytes  
in rat offspring

## Особенности микроокружения и возможности иммунотерапии злокачественных глиальных опухолей

*Е.И. Воронина<sup>1</sup>, Т.А. Агеева<sup>1</sup>, М.В. Рыжова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, Москва, Россия

В статье представлен обзор литературы, посвященный изучению микроокружения злокачественных глиальных опухолей, характеризующихся неблагоприятным прогнозом течения заболевания и низкой выживаемостью. Рассматриваются особенности формирования противоопухолевого иммунитета при опухолях центральной нервной системы (ЦНС), взаимодействия злокачественной глиомы и ее микроокружения в связи с отличительной чертой строения ЦНС – наличием гематоэнцефалического барьера. Описаны иммунологические механизмы, вовлеченные в формирование супрессорного (толерогенного) микроокружения, благоприятного для роста и прогрессирования опухолей. В обзоре представлены основные применяемые методы иммунотерапии опухолей и дана оценка возможности их использования для лечения злокачественных глиом. Несмотря на то, что в последние десятилетия накоплен большой массив сведений о молекулярных механизмах канцерогенеза, опухолевой прогрессии и противоопухолевого иммунитета, многие аспекты «ускользания» опухолей ЦНС от иммунного надзора остаются неясными. Это диктует необходимость дальнейших исследований для разработки более эффективных методов лечения данной сложной группы пациентов онкологического профиля.

**Ключевые слова:** глиобластома, микроокружение, противоопухолевый иммунный ответ, иммуносупрессия, иммунотерапия.

**Для корреспонденции:** Евгения Игоревна Воронина. E-mail: vorev@inbox.ru

**Для цитирования:** Воронина Е.И., Агеева Т.А., Рыжова М.В. Особенности микроокружения и возможности иммунотерапии злокачественных глиальных опухолей. Клини. эксп. морфология. 2020;9(2):5–10. DOI:10.31088/CEM2020.9.2.5-10

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

Статья поступила 16.12.2019. Получена после рецензирования 24.01.2020. Принята в печать 11.02.2020.

## Features of microenvironment and possibility of immunotherapy for malignant gliomas

*E.I. Voronina<sup>1</sup>, T.A. Ageeva<sup>1</sup>, M.V. Ryzhova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk

<sup>2</sup> N.N. Burdenko Research Center for Neurosurgery, Moscow

The article reviews the literature on the microenvironment in malignant glial tumors that are characterized by unfavorable prognosis and low survival rate. The features of the formation of antitumor immunity in tumors of the central nervous system (CNS) are considered as well as the interactions of malignant glioma and its microenvironment associated with the presence of the blood-brain barrier, the distinctive feature of the CNS. The immunological mechanisms involved in the formation of a suppressor (tolerogenic) microenvironment favorable for the growth and progression of tumors are described. The review presents the main methods used for immunotherapy of tumors and assesses the possibility of their use for the treatment of malignant gliomas. Many aspects of the escape of the tumors from immune surveillance in the CNS remain unclear despite the fact that in recent decades a large body of information has been accumulated on the molecular mechanisms of carcinogenesis, tumor progression, and antitumor immunity. This necessitates further research to develop more effective treatments for this complex group of cancer patients.

**Keywords:** glioblastoma, microenvironment, antitumor immune response, immunosuppression, immunotherapy.

**Corresponding author:** Evgeniya I. Voronina. E-mail: vorev@inbox.ru

**For citation:** Voronina E.I., Ageeva T.A., Ryzhova M.V. Features of microenvironment and possibility of immunotherapy in malignant gliomas. Clin. exp. morphology. 2020;9(2):5–10 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.5-10

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

Received 16.12.2019. Received in revised form 24.01.2020. Accepted 11.02.2020.

В последнее десятилетие протоколы и методы лечения злокачественных новообразований любой локализации значительно изменились. Наиболее современным и активно изучаемым методом является иммунотерапия – создание и применение препаратов, влияющих на ключевые точки иммунного противоопухолевого ответа. В данный момент иммунотерапия – вспомогательный метод лечения онкологических заболеваний, но, учитывая результаты клинических исследований, она не менее значима, чем терапия цитостатиками, и в ближайшем будущем, очевидно, будет включена в основные протоколы лечения [1].

Основой изучения и внедрения этого нового направления было исследование микроокружения злокачественных опухолей. Как известно, иммунный надзор в организме осуществляется в течение всей жизни, но, к сожалению, с помощью различных механизмов опухолевые клетки способны от него уклоняться, формируя эффект иммунологической толерантности. Особое значение это имеет для злокачественных опухолей центральной нервной системы (ЦНС), принимая во внимание «особенные» взаимоотношения иммунной системы с ЦНС, имеющей гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что определяет широкий круг вопросов в понимании взаимодействия опухоли в данной «забарьерной» локализации с ее микроокружением и нормальными структурными элементами головного мозга [2, 3]. В настоящей работе представлен обзор литературы, посвященной этой непростой проблеме.

Согласно статистическим данным Всемирной организации здравоохранения, наиболее часто встречающейся злокачественной опухолью в пределах ЦНС является глиобластома (синоним: злокачественная глиома). Несмотря на все имеющиеся в настоящий момент методы комплексного лечения, качество жизни и выживаемость пациентов с указанной патологией остаются очень низкими (по разным источникам, до 90% пациентов с диагнозом «глиобластома» умирают в течение 18–24 месяцев). Тем не менее отмечено, что есть пациенты, так называемые «долгожители», у которых наблюдается более эффективный ответ на лечение и выше показатели безрецидивной выживаемости. Этой теме посвящено много исследований, установивших наличие значимых в формировании глиальных опухолей молекулярных маркеров, показано их прогностическое значение, и часть из них внесена в стандарты диагностики (IDH1/2, MGMT, 1p19q и т.д.). Однако особый интерес представляют механизмы и эффекты взаимодействия опухолей нервной системы с их иммунным микроокружением, которые могут быть использованы для улучшения результатов лечения глиобластом [4].

### **Противоопухолевый иммунный ответ и формирование толерогенного микроокружения опухолей**

Иммунный ответ в ЦНС имеет свои особенности: в норме в ткани головного мозга присутствует большое

количество микроглии, представленной глиальными макрофагами (клетки Ортеги), гистогенетически схожими с моноцитарными клетками костномозгового происхождения, которые мигрируют в ЦНС на ранних стадиях эмбриогенеза и играют важную роль в формировании и поддержании контактов между нервными клетками. Исторически ЦНС рассматривали как иммунопривилегированный орган благодаря ГЭБ, ограничивающему миграцию иммунных клеток и цитокинов в мозг, наличию иммуносупрессорных факторов и отсутствию экспрессии молекул I класса главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) на клетках ЦНС.

Тем не менее, согласно данным современных исследований, доказано, что ЦНС не является иммунопривилегированной, описывается несколько путей возможного проникновения иммунных клеток через ГЭБ. Первый путь – цитокиновая модуляция ГЭБ при патологических состояниях (опухоль, воспаление, аутоиммунные заболевания), в результате чего барьер становится проходимым для иммунных клеток [5]. Второй путь – возможный переход лимфоидных клеток в ГЭБ через структуры мембран эндотелиальных клеток, называемых кавеолами [6]. Третий путь – через пространство Вирхова–Робина и эпидимальную выстилку, где происходит дренирование интерстициальной жидкости в цереброспинальную, дренаж из которой, в свою очередь, осуществляется в шейные лимфатические узлы [7, 8].

Любой морфолог, занимающийся практической диагностикой опухолей ЦНС, подтвердит наличие многочисленной лимфоидной популяции среди опухолевых клеток, однако в ходе большого количества исследований было показано, что глиобластома отлично справляется со срывом работы противоопухолевого иммунитета [9]. Выделяют локальные и системные факторы подавления противоопухолевой иммунореактивности.

Многие опухоли, включая глиобластома, по мере роста и прогрессирования формируют иммуносупрессорное локальное микроокружение, защищающее новообразование от атаки со стороны иммунной системы. В создании толерогенного для опухоли микроокружения участвуют как опухоль, так и клетки иммунной системы. Существуют многочисленные механизмы локальной иммунорезистентности, позволяющие опухоли избегать иммунного надзора.

Продуцируемые клетками глиобластомы и секретируемые в микроокружение иммуносупрессорные факторы, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), интерлейкин-10 (IL-10), интерлейкин-35 (IL-35) и простагландин E2 (PGE2) снижают экспрессию молекул ГКГС II класса на клетках глиомы, подавляют пролиферацию и активацию Т- и В-клеток, а также препятствуют созреванию и функционированию профессиональных антигенпредставляющих клеток. IL-10 ингибирует выработку интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) лимфоцитами и фактора некроза опухоли- $\alpha$  моноцитами. PGE2 также усиливает инвазию опухолевых клеток и ангиогенез

в новообразовании. Интерлейкин 35, продуцируемый фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) участвуют в регуляции ангиогенеза в опухоли. Связывание VEGF с его специфическими рецепторами, flt-1 и flk-1, экспрессируемыми только на эндотелии опухоли, индуцирует пролиферацию и миграцию *in situ*. В многочисленных работах показан высокий уровень экспрессии VEGF и его изоформ на клетках глиом.

Важную роль в формировании толерогенного микроокружения опухоли играют клетки-супрессоры, такие как регуляторные Т-клетки (T-reg), которые продуцируют TGF- $\beta$ , IL-10, IL-35, ингибируют пролиферацию и активацию Т-лимфоцитов через снижение продукции IL-2 и IFN- $\gamma$  в клетках-мишенях.

Другим важным клеточным компонентом в микроокружении опухоли являются M2 альтернативно активированные макрофаги, которые под действием цитокинов приобретают супрессорный фенотип.

Апоптоз активированных Т-лимфоцитов, фагоцитов и естественных киллерных клеток, стимулированный Fas лигандом, и активация ингибиторных рецепторов PD-1 (белок 1 программируемой клеточной гибели) и антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4) на Т-клетках их лигандами PD-L1 и B7 (CD80/86), соответственно, приводят к апоптозу активированных Т-клеток, угнетению цитотоксической функции, активации Т-лимфоцитов и ингибированию иммунного ответа на опухолевые антигены.

Кроме того, в опухолевом микроокружении представлены факторы, включая фермент индоламин 2,3-деоксигеназу (IDO), экспрессируемый на клетках различных опухолей, включая глиомы. Показано, что IDO<sup>+</sup> опухоли успешно уклоняются от иммунного надзора. Галектин-1 – гомодимерная молекула адгезии – способствует малигнизации опухолей ЦНС. Этот белок участвует в ангиогенезе, усиливает апоптоз активированных Т-клеток и химиорезистентность опухоли. Галектин-1 вносит вклад в опухолеиндуцированную иммуносупрессию *in vitro* и *in vivo* [10].

К системным факторам, определяющим опухолевую резистентность, относится общее иммунодефицитное состояние пациента, ассоциированное с угнетением функций клеток гуморального и адаптивного иммунитета, а также иммуносупрессорное действие кортикостероидов, которые назначают пациентам со злокачественной глиомой для уменьшения отека мозговой ткани [5, 11].

Не стоит забывать о внутриопухолевой антигенной гетерогенности как результате клональной эволюции новообразования, которая создает объективные проблемы в плане формирования множественной лекарственной устойчивости и неэффективного ответа на лечение, в том числе иммунотерапии [12]. Учитывая все перечисленные особенности, целью воздействия на микроокружение в злокачественной глиоме прежде всего является препятствование формированию опухоли микроокружения с иммуносупрессивными

свойствами. Согласно данным литературы, исследования по этой проблеме идут в нескольких основных направлениях [5, 13, 14].

### Методы иммунотерапии опухолей и перспективы их использования при злокачественных глиомах

Один из подходов – клеточная терапия, то есть введение высокоактивированных Т-клеток против опухолевых антигенов, как, например, при использовании донорских лимфоцитов для достижения ремиссии у пациентов, перенесших трансплантацию аллогенных стволовых клеток («трансплантат против лейкоза») [15].

Двумя десятилетиями ранее выполнены работы, посвященные адоптивной иммунотерапии Т-клетками пациентов со злокачественными глиомами. Больным внутривенно вводили облученные аутологичные опухолевые клетки как источник опухолевых антигенов в сочетании с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором в качестве адьюванта. Стимулированные таким образом аутологичные Т-лимфоциты, полученные из лимфоузлов, дренирующих сайт вакцинации, переносили пациентам. Осуществляли также локальный перенос аутологичных опухолеспецифических Т-лимфоцитов, размноженных *ex vivo* в присутствии аутологичных опухолевых клеток [16, 17]. Обоснованием для применения поликлональных цитомегаловирус (ЦМВ)-специфических Т-клеток для адоптивной терапии глиобластом является экспрессия антигенов pp65 и IE1 ЦМВ в большинстве этих опухолей. Оценивают целесообразность использования размноженных *ex vivo* аутологичных ЦМВ-специфических Т-клеток от ЦМВ-серопозитивных пациентов с глиобластомой для Т-клеточной терапии больных с глиобластомой, инфицированной ЦМВ.

Встречаются исследования, в которых применяют даже технологии биоселекции и получения рекомбинантных вирусов, чтобы создать штаммы вирусов, обладающих мощными онколитическими свойствами в отношении глиальных опухолей [18, 19].

Терапия с помощью переноса Т-клеток нового поколения включает генетически модифицированные Т-клетки, сконструированные для повышения реактивности против опухолевых антигенов. С помощью создания химерного рецептора (CAR – chimeric antigen receptor) Т-клетки перепрограммируются для экспрессии моноклональных антителосвязывающих доменов, которые запускают активацию Т-клеток и их эффекторную функцию при связывании опухолевого антигена. Т-клетки второго и третьего поколения CAR находятся в стадии разработки, которая включает дополнительные модульные генетические модификации для повышения эффекторной функции и персистенции *in vivo* [20–22]. Они также помогут обойти ограничения по ГКГС благодаря их прямой антигенсвязывающей способности.

Второй путь – терапия с использованием ингибиторов иммунных контрольных точек. Это подход, который изменил результаты клинического лечения некоторых видов злокачественных новообразований за счет блокирования ряда белков, приводящих к ослаблению иммунных клеточных реакций против опухоли. Например, антитела могут быть использованы против белка PD-1, экспрессированного на Т-лимфоцитах [23, 24]. Ингибиторы иммунных контрольных точек показали хорошие результаты в лечении меланомы, характеризующейся высоким уровнем генетических мутаций. Подмножество данных мутаций генерирует большое количество измененных опухолевых антигенов, которые уникальным образом продуцируются в опухолевых клетках, распознаются иммунной системой как чужеродные, инициируя активный иммунный ответ. Именно в перифокальной зоне меланомы формируется плотная лимфоидная инфильтрация, являющаяся одним из признаков злокачественного потенциала меланоцитарного образования [25, 26].

К сожалению, данный подход эффективен не для всех опухолей. Существует группа злокачественных новообразований с низким уровнем мутаций, экспрессирующих мало опухолевых антигенов, то есть они имеют иммуносупрессивную «холодную» опухолевую среду. Именно к этому типу опухолей, не способных привлечь Т-клетки, относится глиобластома, поэтому поиск путей для усиления иммунного ответа является актуальной проблемой.

Для таких опухолей, возможно, подойдет третий путь индукции иммунного ответа, результаты исследования которого представлены во многих работах, включая статью D.B. Keskin et al., – это введение индивидуальной вакцины, содержащей опухолевые антигены, специфичные для индивидуального новообразования [27–31]. В статье изложены результаты клинических испытаний I/II фазы, в которых пациенты, перенесшие операцию по удалению злокачественной глиомы и получившие лучевую терапию, далее иммунизировались вакциной, содержащей до 20 фрагментов белков, соответствующих опухолевым антигенам, идентифицированным и экспрессируемым в опухоли конкретного человека, удаленной во время операции.

Анализ образцов крови вакцинированных пациентов показал, что вакцина не вызывает устойчивый Т-клеточный ответ, опосредованный хелперными CD4<sup>+</sup> и цитотоксическими CD8<sup>+</sup> Т-клетками, у пациентов, получивших стероидный иммунодепрессант дексаметазон для уменьшения отека мозговой ткани. Напротив, у пациентов, которые не получали дексаметазон, наблюдался опухолеспецифический Т-клеточный ответ, опосредуемый преимущественно CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. Кроме того, у них были обнаружены клетки памяти, что предполагает более быстрый и эффективный иммунный ответ, в том числе при рецидивах болезни. Тем не менее все вакцинированные пациенты, даже те, которые имели противоопу-

холевый иммунный ответ, в конечном счете умерли от злокачественной глиомы. Один из ключевых выводов этого исследования состоит в том, что в итоге у всех пациентов Т-лимфоциты вступили в дисфункциональное состояние, называемое истощением, с пониженной способностью распознавать и уничтожать опухолевые клетки [9, 32].

По данным литературы, истощенные Т-лимфоциты иногда можно активировать с помощью ингибиторов иммунных контрольных точек [23]. Также имеется работа N. Hilf et al. [33], авторы которой использовали два типа вакцин. Одна из них была персонализированной неоантигенной, подобной той, которую использовали D.B. Keskin et al. [27]. Другая состояла из немутировавших фрагментов белка, соответствующих белкам, присутствующим на опухолевых клетках. Эта последняя вакцина не была персонализирована, ассоциированные с опухолью белки идентифицированы посредством анализа 30 глиобластом с использованием методов для идентификации белков, связанных с данным типом опухоли. Из 15 человек, перенесших операцию по удалению опухоли и прошедших химиотерапию, четверо получили только неперсонифицированную вакцину, а 11 – обе вакцины. Несколько человек по разным причинам выбыли из исследования. В общей сложности у 13 человек, получивших неперсонифицированную вакцину, был зарегистрирован иммунный ответ, и у 12 из этих 13 пациентов выявили CD8<sup>+</sup> Т-клетки, которые могли распознавать по крайней мере один белок в неперсонифицированной вакцине. Персонализированная вакцина у восьми из 10 человек индуцировала CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ против опухолевых антигенов.

В обеих работах сообщается, что вакцинация усиливает иммунный ответ с участием CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, распознающих неоантигены. Тем не менее смерть от опухоли это не предотвратило. Возможно, это связано с тем, что Т-клетки вошли в дисфункциональное состояние, называемое истощением, как сообщало D.B. Keskin et al.

Как уже было сказано, развитие этого состояния может быть опосредовано белком PD-1, хотя не исключено, что существуют и другие пока не изученные ключевые точки. Возможно, будущие исследования покажут, может ли блокирование истощения с помощью антител против PD-1 позволить таким нацеленным на опухоль Т-клеткам оставаться активными и секретировать молекулы цитокинов, которые способствуют разрушению опухолевых клеток. Чтобы получить более успешный результат в будущем, целесообразно проводить комбинированную терапию с использованием мутировавших и немутировавших белков и разработать более эффективные вакцины, особенно для иммунологически «холодных» опухолей, не экспрессирующих много антигенов. Возможно, введение вакцины вместе с ингибиторами контрольных точек может улучшить качество иммунного ответа инфильтрирующих опу-

холь Т-лимфоцитов и решить проблему истощения Т-клеток.

### Заключение

Рассмотренные вопросы о возможностях иммунотерапии злокачественных опухолей, представленные в крупных исследованиях в этой области, дают надежду на получение хороших результатов в ближайшем будущем, хотя большинство исследований находится на ранних стадиях. Несмотря на то, что в медико-биологической отрасли в последние десятилетия накоплен большой массив сведений о молекулярных механизмах канцерогенеза, опухолевой прогрессии и противоопухолевого иммунитета, многие механизмы «ускользания» опухолей от иммунной системы остаются загадкой. Все эти аспекты имеют существенные особенности для опухолей ЦНС и требуют отдельных углубленных исследований для разработки более эффективных методов лечения этой сложной группы пациентов онкологического профиля.

### Литература/References

1. *Apetoh L, Ladoire S, Coukos G, Ghiringhelli F.* Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure? *Ann Oncol.* 2015;26(9):1813–23. DOI:10.1093/annonc/mdv209.
2. *Malkiewicz MA, Szarmach A, Sabisz A, Cubala WJ, Szurowska E, Winkiewski PJ.* Blood-brain barrier permeability and physical exercise. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):15. DOI:10.1186/s12974-019-1403-x.
3. *Chen L, Zeng D, Xu N, Li C, Zhang W, Zhu X et al.* Blood-brain barrier and blood-brain tumor barrier-penetrating peptide-derived targeted therapeutics for glioma and malignant tumor brain metastases. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2019;11(45):41889–97. DOI: 10.1021/acsami.9b14046.
4. *Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803–20. DOI:10.1007/s00401-016-1545-1.
5. *Reardon DA, Wucherpfenning KW, Freeman G, Wu CJ, Chiocca EA, Wen PY et al.* Immunotherapy advances for glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2014;16(11):1441–58. DOI:10.1093/neuonc/nou212.
6. *Lutz SE, Smith JR, Kim DH, Olson CVL, Ellefsen K, Bates JM et al.* Caveolin1 is required for Th1 cell infiltration, but not tight junction remodeling at the blood-brain barrier in autoimmune neuroinflammation. *Cell Rep.* 2017;21(8):2104–17. DOI:10.1016/j.celrep.2017.10.094.
7. *Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G.* Tree or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(7):569–81. DOI: 10.1038/nri1130.
8. *Goldmann J, Kwizinski E, Brandt C, Mahlo J, Richter D, Bechmann I.* T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukoc Biol.* 2006;80(4):797–801. DOI: 10.1189/jlb.0306176.
9. *Woroniecka KI, Rhodin KE, Chongsathidkiet P, Keith KA, Fecci PE.* T-cell Dysfunction in Glioblastoma: Applying a New Framework. *Clin Cancer Res.* 2018;24(16):3792–802. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0047.
10. *Albesiano E, Han JE, Lim M.* Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurg Clin N Am.* 2010;21(1):17–29. DOI: 10.1016/j.nec.2009.08.008.
11. *Кобяков Г.Л., Абсолямова О.В., Бекашев А.Х., Коновалов А.Н., Насхлеташвили Д.Р., Потанов А.А. и соавт.* Практические рекомендации по лекарственному лечению первичных опухолей центральной нервной системы: Практические рекомендации RUSSCO. Злокачественные опухоли. 2016; 4(2):64–84.  
*Kobyakov GL, Absolyamova OV, Bekyashev AKh, Konovalov AN, Naschletashvili DR, Potanov AA et al.* Practical guidelines for the drug management in patients with primary tumors of the central nervous system. RUSSCO guidelines. *Malignant tumors.* 2016;4(2):64–84 (In Russ.).
12. *Greaves M, Maley CC.* Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012;481(7381):306–13. DOI:10.1038/nature10762.
13. *Борисов К.Е., Сакаева Д.Д.* Иммуносупрессивное микроокружение злокачественных глиом. *Архив патологии.* 2015;77(6):54–63.  
*Borisov KE, Sakaeva DD.* Immunosuppressive microenvironment of malignant gliomas. *Archiv Patologii.* 2015;77(6):54–63. (In Russ.). DOI: 10.17116/patol201577654-63.
14. *Perng P, Lim M.* Immunosuppressive mechanisms of malignant gliomas: parallels at non CNS sites. *Front Oncol.* 2015;5:153. DOI:10.3389/fonc.2015.00153.
15. *Rossig C.* Graft-versus-Leukemia (GVL) activity in childhood leukemias. *Cell Ther Transplant.* 2009;2(6):e.000049.01. DOI:10.3205/ctt-2009-en-000049.01.
16. *Plautz GE, Barnett GH, Miller DW, Cohen BH, Prayson RA, Krauss JR.* Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas. *J Neurosurg.* 1998;89(1):42–51. DOI: 10.3171/jns.1998.89.1.0042.
17. *Tsuboi K, Saijo K, Ishikawa E, Tsurushima H, Takano S, Morishita Y et al.* Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas. *Clinical Cancer Research.* 2003;9(9):3294–302.
18. *Сосновцева А.О., Гриненко Н.Ф., Липатова А.В., Чумаков П.М., Чехонин В.П.* Онколитические вирусы в терапии злокачественных глиом. *Биомедицинская химия.* 2016;62(4):376–390.  
*Sosnoviseva AO, Grinenko NF, Lipatova AV, Chumakov PM, Chekhonin VP.* Oncolytic viruses in the treatment of malignant gliomas. *Biomedical chemistry.* 2016;62(4):376–390 (In Russ.). DOI: 10.18097/PBMC20166204376.
19. *Ghazi A, Ashoori A, Hanley PJ, Brawley VS, Shaffer DR, Kew Y.* Generation of polyclonal CMV-specific T cells for the adoptive immunotherapy of glioblastoma. *Journal of immunotherapy.* 2012;35(2):159–68. DOI:10.1097/CJI.0b013e318247642f.
20. *Jena B, Dotti G, Cooper LJ.* Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood.* 2010;116(7):1035–44. DOI: 10.1182/blood-2010-01-043737.

21. *Park TS, Rosenberg SA, Morgan RA.* Treating cancer with genetically engineered T cells. *Trends Biotechnol.* 2010;29(11):550–7. DOI:10.1016/j.tibtech.2011.04.009.
22. *Johnson LA.* Model T muscle CARs can treat brain tumors. *Clin Cancer Res.* 2012;18(21):5834–6. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2627.
23. *Pardoll DM.* The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252–64. DOI:10.1038/nrc3239.
24. *Salmaninejad A, Valilou SF, Shabgah AG, Aslani S, Alimardani M, Pasdar A et al.* PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J Cell Physiol.* 2019;234(10):6824–37. DOI: 10.1002/jcp.28358.
25. *Madonna G, Ballesteros-Merino C, Feng Z, Bifulco C, Capone M, Giannarelli D et al.* PD-L1 expression with immune-infiltrate evaluation and outcome prediction in melanoma patients treated with ipilimumab. *Oncoimmunology.* 2018;7(12):e1405206. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1405206.
26. *Munhoz RR, Postow MA.* Clinical development of PD-1/PD-L1 in Advanced Melanoma. *Cancer.* 2018;24(1):7–14. DOI: 10.1097/PP0.0000000000000299.
27. *Keskin DB, Anandappa AJ, Sun J, Tirosh I, Mathewson ND, Li S et al.* Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature.* 2019;565(7738):234–9. DOI:10.1038/s41586-018-0792-9.
28. *Johanns TM, Bowman-Kirigin JA, Liu C, Dunn GP.* Targeting Neoantigens in Glioblastoma: An Overview of Cancer Immunogenomics and Translational Implications. *Neurosurgery.* 2017;64(CN\_suppl\_1):165–76. DOI: 10.1093/neuros/nyx321.
29. *Traylor JL, Satarasinghe P, Kuo JS.* Neoantigen-Targeting Vaccine Promotes T-Cell Response in Glioblastoma. *Neurosurgery.* 2019;85(2):E207–E209. DOI:10.1093/neuros/nyz164.
30. *Schumacher TN, Schreiber RD.* Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348(6230):69–74. DOI:10.1126/science.aaa4971.
31. *Steuer CE, Ramalingam SS.* Tumor Mutation Burden: Leading Immunotherapy to the Era of Precision Medicine? *J Clin Oncol.* 2018;36(7):631–2. DOI:10.1200/JCO.2017.76.8770.
32. *Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM.* Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T-cells. *Nature.* 1993;362(6422):758–61. DOI: 10.1038/362758a0.
33. *Hilf N, Kuttruff-Coqui S, Frenzel K, Bukur V, Stevanović S, Gouttefangeas C et al.* Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature.* 2018;565(7738):240–5. DOI:10.1038/s41586-018-0810-y.

### Информация об авторах

Евгения Игоревна Воронина – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии НГМУ.

Татьяна Августовна Агеева – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии НГМУ.

Марина Владимировна Рыжова – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник, заведующая патологоанатомическим отделением, врач-патологоанатом НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко.

### Author information

Evgeniya I. Voronina – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University. <https://orcid.org/0000-0003-3362-9000>

Tatyana A. Ageeva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pathological Anatomy, Novosibirsk State Medical University. <https://orcid.org/0000-0001-7933-8394>

Marina V. Ryzhova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Senior Researcher, Head of the Department of Pathological Anatomy, Pathologist, N. N. Burdenko Research Center for Neurosurgery. <https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>

© Борбат А.М., 2020

DOI: 10.31088/CEM2020.9.2.11-15

УДК 616-091/616-71

## Нейронные сети в морфологической диагностике

*А.М. Борбат*

ООО «Онкодиагностика Атлас», Москва, Россия

В статье проведен обзор литературы об использовании нейронных сетей в патологической анатомии. Описаны особенности применения нейронных сетей для рутинной диагностической и исследовательской работы. Представлена информация о нозологических формах и диагностической ценности искусственного интеллекта с разделением на опухолевую и неопухолевую патологию. Освещены ключевые достижения в морфометрических методах для исследовательских целей и высказано предположение о новом этапе развития этого направления. Рассмотрены вопросы технического и программного обеспечения, а также наиболее значимые методологические аспекты обучения нейронной сети. Предложены практические рекомендации по выбору инструментов для начинающих исследователей. Отдельно изучен вопрос минимально необходимого количества микропрепаратов для обучения нейронной сети. Сформулированы выводы о потенциале развития и основных подходах использования нейронных сетей в патологической анатомии.

**Ключевые слова:** патологическая анатомия, диагностика, морфометрия, нейронные сети.

**Для корреспонденции:** Артем Михайлович Борбат. E-mail: aborbat@yandex.ru

**Для цитирования:** Борбат А.М. Нейронные сети в морфологической диагностике. Клини. эксп. морфология. 2020;9(2):11–15. DOI:10.31088/CEM2020.9.2.11-15

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

**Статья поступила** 18.11.2019. **Получена после рецензирования** 31.01.2020. **Принята в печать** 11.02.2020.

## Neural networks for morphological diagnostics

*A.M. Borbat*

Oncology Diagnostics Atlas LLC, Moscow, Russia

The article reviews the literature on the use of neural networks in pathological anatomy. The features of the application of neural networks for routine diagnostic and research work are described. Information is presented on the nosological forms and diagnostic value of artificial intelligence separately in tumor and non-tumor pathologies. The key achievements in morphometric methods for research purposes are highlighted and an assumption is made about a new stage in the development of this area. The issues of hardware and software, as well as the most significant methodological aspects of training a neural network are considered. Practical recommendations for the selection of tools for early stage researchers are offered. The issue of the minimum required number of micropreparations for training a neural network was separately studied. The conclusions are formulated on the development of potential and the main approaches to the use of neural networks in pathological anatomy.

**Keywords:** pathological anatomy, diagnosis, morphometry, neural networks.

**Corresponding author:** Artyom M. Borbat. E-mail: aborbat@yandex.ru

**For citation:** Borbat A.M. Neural networks for morphological diagnostics. Clin. exp. morphology. 2020;9(2):11–15 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.11-15

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

**Received** 18.11.2019. **Received in revised form.** 31.01.2020. **Accepted** 11.02.2020.

### Введение

Методы глубокого обучения разработаны еще в 1990-е годы, но из-за высоких требований к производительности компьютеров не нашли массового применения и вновь проявили себя уже только в 2012 году, когда сверточная нейронная сеть выиграла конкурс алгоритмов распознавания изображений.

Работу нейронной сети нередко сравнивают с работой нейронов мозга. В нейронной сети нейроны

получают, как и нейроны нервной системы, сигналы от множества источников, а потом отправляют результирующий сигнал по аксону следующему нейрону. В компьютерных нейросетях каждый нейрон также принимает информацию из разных источников, а затем передает ее следующему нейрону. Разница в том, что компьютерные нейроны выстроены рядами (слои нейронной сети) и получают и передают сигналы только от предыдущего к следующему ряду (слою),

но не внутри и не обратно. Сам нейрон – это функция, уравнение.

Цель данной работы – провести обзор литературы и оценить значение нейронных сетей в патологической анатомии на современном этапе и в среднесрочной перспективе.

Наиболее интересным аспектом данного направления представляется практическая роль искусственного интеллекта. Диагностика опухолей имеет множество вариантов реализации: ставим ли мы задачу нейронной сети научиться отличать злокачественные опухоли от, например, нормальной ткани или доброкачественных опухолей, интересует ли нас определение степени злокачественности или конкретного гистологического типа опухоли, идет ли речь о редких и поэтому сложных для диагностики опухолях или о широко распространенных.

Наиболее простая задача – отличить опухолевую ткань от нормальной. Даже не имеющий специальной подготовки человек в состоянии уловить разницу между микрофотографией с однозначно злокачественным процессом и нормальной тканью всего лишь после нескольких примеров. В большинстве случаев исследователи не формулируют задачу именно таким образом, но почти всегда при дифференциальной диагностике опухолевых процессов приводят и результаты дискриминации опухолевой ткани от неопухолевой.

J. Ker et al. продемонстрировали, что нейронная сеть без ошибок различает нормальную ткань мозга от глиобластомы и допускает менее 10% ошибок при разделении нормальной ткани молочной железы от рака *in situ* [1]. Z. Alom et al. добились уровня ошибок менее 3% для доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы [2]. R. Yan et al. получили схожие результаты: ошибки различия злокачественных инвазивных и *in situ* опухолей от нормальных 5% и 3%, соответственно, и несколько выше их уровень при определении доброкачественных опухолей – до 13% [3]. A. Nekler et al. продемонстрировали точность 68% дифференциального диагноза между невусом и меланомой, что было статистически достоверно точнее, чем проведенная на том же материале диагностика, выполненная патологоанатомами (59%) [4]. Таким образом, можно заключить, что с относительно несложными задачами нейронная сеть справляется не хуже квалифицированного специалиста.

Отдельно следует упомянуть о работе В. Ehteshami Bejnordi et al., посвященной выявлению метастазов рака молочной железы в лимфатических узлах. Во-первых, группой исследователей был достигнут результат в 96% для обнаружения метастазов, включая микрометастазы. Во-вторых, авторы предлагают алгоритм практического применения нейронной сети, а именно повысить ее чувствительность в ущерб специфичности, то есть не пропустить ни одного истинного и получить больше, чем хотелось бы, ложноположительных случаев. Этот массив случаев исследует патологоанатом, а все «отрицательные» лимфатические узлы нейросеть отсеивает [5].

Следующий уровень сложности – сопоставление схожих патологических процессов из одной категории или, по крайней мере, расположенных в морфологически близких категориях. Упомянутые ранее J. Ker et al. в своей работе также сравнили глиомы с высокой степенью злокачественности и с низкой (*high grade* и *low grade*) и получили точность 97,5% [1]. В. Korbar et al. с помощью нейронной сети добились точности в 93% при дифференцировке между различными доброкачественными опухолевыми процессами в толстой кишке: гиперпластические полипы, зубчатые аденомы, тубулярные аденомы, тубулярно-ворсинчатые аденомы и нормальная ткань [6]. Z. Alom et al. исследовали материал из восьми различных доброкачественных и злокачественных опухолей и получили точность, превосходящую 95% [2]. S.N. Hart et al. добились 99% точности в диагностике между обычным и шпигель-невусом [7]. T.G. Olsen et al. получили уровень точности больше 98% при дискриминации базальноклеточного рака кожи, меланоцитарного невуса и себорейного кератоза – основных морфологических диагнозов в патологии кожи [8].

Намного реже в научной периодике можно встретить статьи, посвященные диагностике неопухолевой патологии с помощью нейронных сетей. J.J. Wei et al. использовали нейронную сеть для диагностики целиакии по биоптатам двенадцатиперстной кишки. С точностью 87% удалось разделить нормальную слизистую оболочку, неспецифическое воспаление и целиакию [9]. Схожую задачу решали S. Syed et al. и получили дискриминацию между нормой и целиакией в 93% [10]. D.R. Martin et al. в работе, посвященной диагностике хронического гастрита, продемонстрировали, что нейронная сеть способна выявлять с близкой к 100% точностью гастрит, ассоциированный с *Helicobacter pylori*, и с несколько меньшей, около 90%, реактивную гастропатию и нормальную слизистую [11].

В доступной литературе удалось найти не так много работ, посвященных обучению нейронных сетей для исследовательских целей. Единственным исключением является подсчет митозов – исследования на эту тему и публикация датасетов начались в 2012–2013 годы [12, 13]. Так, M. Puri et al. и N. Wahab et al. проводили оценку митотического индекса в меланоме и раке молочной железы, соответственно, и показали, что митотический счет нейронной сетью отличается существенно меньшей вариабельностью по сравнению с произведенным человеком [14, 15]. Y. Feng et al., используя нейронную сеть, проанализировали ядра в опухолевой и нормальной ткани молочной железы и смогли дифференцировать злокачественные клетки от нормальных [16]. Схожий подход применили S. Sornapudi et al. в многослойном плоском эпителии шейки матки и сумели дифференцировать внутриэпителиальные поражения с точностью более 90% [17]. M.G. Hanna et al. по структуре ядра различали клетки злокачественной меланомы от диспластического невуса с точностью 81% [18]. L. Sha et al. обучили нейронную сеть определять PD-L1

статус немелкоклеточного рака легкого по препаратам, окрашенным гематоксилином и эозином [19]. J. Saltz et al. предложили с помощью нейронной сети находить инфильтрирующие опухоль лимфоциты [20].

Основная масса публикаций, которые в данной работе были отнесены к исследовательским, все-таки финальной целью видит именно клиническую роль своих изысканий, что естественно для любой исследовательской работы в медицине. При этом микроскопическая морфология содержит тысячи различных объектов, характеристики которых теперь можно получать и анализировать с помощью современных компьютеров и программного обеспечения с минимальными усилиями. Морфометрия, которая длительное время не находила должного внимания, с помощью нейронных сетей (и вообще искусственного интеллекта) может стать значительным шагом в математизации патологической анатомии. Трудно не вспомнить высказывание К. Маркса: «Наука только тогда достигает совершенства, когда ей удается пользоваться математикой».

Следует признать, что от выбора языка или среды программирования сущность нейронных сетей не меняется, поэтому обзор программного обеспечения скорее призван обозначить наиболее широко применяемые среды разработки и таким образом дать ориентиры для тех, кто только планирует начать исследования в области нейронных сетей.

В 12 из 27 изученных публикаций описано использованное программное обеспечение. Самыми упоминаемыми были язык программирования Python и среда для математических расчетов, то есть язык программирования и набор инструментов для работы с ним, Matlab. Оба были упомянуты по пять раз. Два этих инструмента действительно чаще всего используются при работе с нейронными сетями не только вне патологической анатомии, но и вне медицины в целом. Более того, к этой группе наиболее широко используемых инструментов также относят язык программирования R и, заметен реже, пакет программ для статистического анализа Statistica. Каждый из этих программных продуктов обладает своими особенностями. Matlab и Statistica являются платными, зато содержат полный и относительно удобный набор инструментов для статистической обработки и программирования нейронных сетей. Python относится к современным, в каком-то смысле модным, универсальным языкам программирования. Это означает, что на его освоение придется потратить значительно больше времени, пока через дебри базовых приемов работы удастся добраться непосредственно до программирования нейронных сетей. Язык R также бесплатен, по кругу решаемых задач он ближе всего к Matlab, то есть разработан специально для математических и статистических вычислений, но требует дополнительных настроек.

В девяти статьях было упомянуто использованное оборудование. Для работы с нейронными сетями требуется прежде всего производительная видеокарта.

Обусловлено это тем, что нейронная сеть производит множество несложных параллельных вычислений. На сегодняшний день производитель видеокарт NVIDIA де-факто является монополистом в области нейронных сетей, и его продукцию упоминают в восьми из девяти публикаций. При этом ассортимент их довольно широк и в исследованиях используются как GeForce GTX 1070 [1], 980 [2] и 660 [21], которые можно встретить на домашних компьютерах любителей современных игр, так и специализированные видеокарты серии Titan и Tesla, стоимость которых исчислялась на момент написания обзора сотнями тысяч рублей.

Следует отдельно упомянуть об использовании предварительно обученных нейросетей. Технологически существует возможность доучивать уже обученную нейронную сеть под свои нужды. Так, можно получить хорошие результаты даже с относительно небольшим набором данных. Крупные компании в области информационных технологий уже выпустили и выложили в свободный доступ нейросети, которые обучены различать всевозможные объекты из нашей реальности. Эти нейросети были обучены на значительных мощностях с применением сотен тысяч изображений. Оказалось, что их можно доучить распознавать и другие объекты, при этом неважно, что объекты могут быть из мира микроскопического. Почти все рассмотренные в данной работе публикации использовали либо исключительно, либо в сопоставлении нейросети на базе каких-либо существующих: ResNet, Inception V3, AlexNet и т.д. Во всех сопоставлениях доученная нейросеть существенно превосходит нейросеть, которая изначально была обучена на имеющемся морфологическом материале.

Исходным материалом, что естественно, является микропрепарат. Далее начинаются расхождения. Ранее уже упоминалось, что при создании нейронных сетей для исследовательских целей задачи формулируются таким образом, чтобы находить конкретные элементы или морфологические паттерны в изучаемом материале. Другими словами, некий условный исследователь показывает нейронной сети митозы или эозинофилы и именно их, строго не допуская смешения различных паттернов, категорий или признаков.

Тем не менее для клинической диагностики такой ресурсоемкий подход, как ни странно, не только не обязателен, но и, возможно, ошибочен. Предполагается, что обучение нейронной сети лишь по заданным паттернам не позволит искусственному интеллекту самостоятельно найти какие-либо новые, неизвестные человеку различия между патологическими процессами. В зависимости от степени приверженности этому подходу исследователи по-разному готовят изображения для обучения нейронной сети.

Нейронная сеть обучается на изображениях одинакового размера, поэтому сканированные гистологические изображения нарезают на квадраты или прямоугольники. Если патологоанатом изначально выделил зону с опухолью в препарате, набор квадратов в худшем

случае будет содержать квадраты, где опухоль представлена скромно, а основной объем кадра занимает соседствующая с ней ткань, будь то строма или железы органа, жировая или лимфоидная ткань и т.д. Такой метод, например, использовали Y. Liu et al. [22].

Теперь несложно представить, какой набор данных получится, если изначально гистологические препараты были отобраны по принципу «здесь это есть» без выделения зоны интереса. Он будет в значительной степени зашумлен. Яркий пример – набор данных BreakHis: в категории злокачественных опухолей без труда можно найти изображения, где есть только соединительная ткань и сосуды [23].

После отбора изображений многие исследователи совершают над ними некоторые манипуляции, которые считаются допустимыми и не приводят к ложному обучению. Чаще всего используются вращение изображений вокруг центральной оси с шагом поворота 45° или 90°, искажение изображения, имитируя его наклон в горизонтальной плоскости, отражения в горизонтальной или вертикальной плоскости и т.д. [2]. Такого рода манипуляции позволяют увеличить исходный объем данных в разы. Ключевым становится не финальное число картинок для обучения нейронной сети, поскольку его можно многократно увеличивать, а исходные микропрепараты или клинические случаи.

В исследовании J. Ker et al. [1] используются наборы данных из десятков случаев, а именно 50 фрагментов ткани мозга нормального строения, 45 глиом низкой степени злокачественности и 59 – высокой степени злокачественности, 55 изображений нормальной ткани молочной железы и 63 изображения рака *in situ*. Уже неоднократно упомянутый набор данных BreakHis с восемью категориями доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы [23] содержит четыре случая склерозирующего аденоза, 10 фиброаденом, три листовидные опухоли, семь тубулярных аденом, 38 протоковых, пять дольковых, девять муцинозных и шесть сосочковых карцином, а финальный набор данных составляет более 9000 изображений. M. Puri et al. для идентификации митозов использовали биоптаты от 30 животных [14]. S.N. Hart et al. использовали два набора по 50 невисов [7]. J.W. Wei et al. для диагностики неопухолевой патологии использовали 1230 микропрепаратов от 1018 пациентов [9], но такой значительный объем данных скорее исключение, чем правило.

Привычно декларируемое большое число изображений для обучения нейронной сети не должно останавливать исследователей, поскольку не является реальным препятствием. Имеющаяся в литературе информация свидетельствует о том, что создать полноценный набор данных можно в условиях среднестатистического онкологического диспансера или областной больницы. Более того, для обучения нейронной сети не обязательны и сканер гистологических препаратов, поскольку прямоугольные изображения для обучения можно получить и с помощью фотонасадки для микроскопа.

В заключение необходимо отметить, что публикации о нейронных сетях в патологической анатомии появились еще в 1990-е годы [24], но массовой и доступной эта индустрия становится только сейчас. Мы, если захотим, сможем не только наблюдать ее появление, но и принять в нем непосредственное участие.

Казалось бы, еще совсем не накоплен базовый материал, а уже появляются работы методического характера, где исследователи не столько ставят целью научить нейронную сеть решать какую-то конкретную задачу, сколько пытаются разобраться в работе алгоритма и результативности: какой формат файлов выбрать, насколько сильно влияет объем исходных данных и т.д. [25]. Ассортимент параметров, надстроек, алгоритмов и необходимость выбора из множества векторов может поставить в тупик исследователя, делающего первые шаги в нейронных сетях, и отбить желание соприкоснуться с этой отраслью знаний... Становится очевидным, что в современном быстро меняющемся мире знания не только создаются с огромной скоростью, но и требуют незамедлительного обобщения. Пожалуй, и наши знания о нейронных сетях, их нынешней и потенциальной роли уже накоплены в достаточном объеме, чтобы провести обобщение.

Как мы смогли убедиться, нейронные сети довольно хорошо различают и опухолевую, и неопухолевую патологию, однако доверить им диагностику сложных случаев пока не получается: мнение сети специалист может выслушать, но решение примет с учетом комплекса факторов, то есть осуществляется поддержка диагностического решения (от англ. diagnostic decision support).

В любое патологоанатомическое отделение направляются значительные объемы гастро- и колонобиоптатов, невисов и кератом, биоптатов предстательной железы и соскобов эндометрия, а нейронная сеть может провести морфологический скрининг и все подозрительные случаи передать патологоанатому, чтобы снял подозрения или определил морфологический диагноз.

Еще одним потенциальным направлением развития является морфометрия, которая может быть выполнена нейросетью как в клинической диагностике (митотический индекс, доля окрашенных клеток и т.д.), так и в рамках исследований. Человеческую природу не изменить, и длительные монотонные подсчеты лучше предоставить машинам.

Вероятно, в ближайшие пять лет мы будем наблюдать бум нейронных сетей в патологической анатомии, и самый очевидный вопрос: станем ли мы его частью? Патологоанатомические отделения и кафедры действительно оснащены не лучшим образом для масштабного внедрения цифровых технологий, но вопрос сканирования препаратов, если именно он является препятствием, самый легкий – это технический вопрос, поэтому он легко решается. Существенный фактор – желание специалистов тратить свое личное время и профессиональные навыки на работу с искусственным интеллектом.

## Литература/References

1. Ker J, Bai Y, Lee HY, Rao J, Wang L. Automated brain histology classification using machine learning. *J Clin Neurosci*. 2019;66:239–45. DOI: 10.1016/j.jocn.2019.05.019.
2. Alom MZ, Yakopcic C, Nasrin MS, Taha TM, Asari VK. Breast Cancer Classification from Histopathological Images with Inception Recurrent Residual Convolutional Neural Network. *J Digit Imaging*. 2019;32:605–17. DOI: 10.1007/s10278-019-00182-7.
3. Yan R, Ren F, Wang Z, Wang L, Zhang T, Liu Y et al. Breast cancer histopathological image classification using a hybrid deep neural network. *Methods*. 2019; pii: S1046-2023(19)30034-9. DOI:10.1016/j.ymeth.2019.06.014.
4. Hekler A, Utikal JS, Enk AH, Solass W, Schmitt A, Klode J et al. Deep learning outperformed 11 pathologists in the classification of histopathological melanoma images. *Eur J Cancer*. 2019;118:91–6. DOI: 10.1016/j.ejca.2019.06.012.
5. Ehteshami Bejnordi B, Veta M, Johannes van Diest P, van Ginneken B, Karssemeijer N, Litjens G et al. Diagnostic Assessment of Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer. *JAMA*. 2017;318(22):2199–210. DOI: 10.1001/jama.2017.14585.
6. Korbar B, Olofson AM, Miraflor AP, Nicka CM, Suriawinata MA, Torresani L et al. Deep Learning for Classification of Colorectal Polyps on Whole-slide Images. *J Pathol Inform*. 2017;8:30. DOI: 0.4103/jpi.jpi\_34\_17.
7. Hart SN, Flotte W, Norgan AP, Shah KK, Buchan ZR, Mounajjed T et al. Classification of Melanocytic Lesions in Selected and Whole-slide Images via Convolutional Neural Networks. *J Pathol Inform*. 2019;10:5. DOI: 10.4103/jpi.jpi\_32\_18.
8. Olsen TG, Jackson BH, Feeser TA, Kent MN, Moad JC, Krishnamurthy S et al. Diagnostic Performance of Deep Learning Algorithms Applied to Three Common Diagnoses in Dermatopathology. *J Pathol Inform*. 2018;9:32. DOI: 10.4103/jpi.jpi\_31\_18.
9. Wei JW, Wei JW, Jackson CR, Ren B, Suriawinata AA, Hassanpour S. Automated Detection of Celiac Disease on Duodenal Biopsy Slides: A Deep Learning Approach. *J Pathol Inform*. 2019;10:7. DOI: 10.4103/jpi.jpi\_87\_18.
10. Syed S, Al-Boni M, Khan MN, Sadiq K, Iqbal NT, Moskaluk CA et al. Assessment of Machine Learning Detection of Environmental Enteropathy and Celiac Disease in Children. *JAMA Netw Open*. 2019;2(6):e195822. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2019.5822.
11. Martin DR, Hanson JA, Gullapalli RR, Schultz FA, Sethi A, Clark DP et al. A Deep Learning Convolutional Neural Network Can Recognize Common Patterns of Injury in Gastric Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2019 (Epub ahead of print). DOI: 10.5858/arpa.2019-0004-OA.
12. Roux L, Racoceanu D, Lom'enie N, Kulikova M, Irshad H, Klossa J et al. Mitosis detection in breast cancer histological images An ICPR 2012 contest. *J Pathol Inform*. 2013;4:8. DOI: 10.4103/2153-3539.112693.
13. Veta M, van Diest PJ, Willems SM, Wang H, Madabhushi A, Cruz-Roa A et al. Assessment of algorithms for mitosis detection in breast cancer histopathology images. *Med Image Anal*. 2015;20(1):237–48. DOI: 10.1016/j.media.2014.11.010.
14. Puri M, Hoover SB, Hewitt SM, Wei BR, Adissu HA, Halsey CH et al. Automated Computational Detection, Quantitation, and Mapping of Mitosis in Whole-slide Images for Clinically Actionable Surgical Pathology Decision Support. *J Pathol Inform*. 2019;10:4. DOI: 10.4103/jpi.jpi\_59\_18.
15. Wahab N, Khan A, Lee Y. Transfer learning based deep CNN for segmentation and detection of mitoses in breast cancer histopathological images. *Microscopy*. 2019;68(3):216–33. DOI: 10.1093/jmicro/dfz002.
16. Feng Y, Zhang L, Yi Z. Breast cancer cell nuclei classification in histopathology images using deep neural networks. *Int J CARS*. 2018;13(2):179–91. DOI: 10.1007/s11548-017-1663-9.
17. Sornapudi S, Stanley RJ, Stoecker WV, Almubarak H, Long R, Antani S et al. Deep Learning Nuclei Detection in Digitized Histology Images by Superpixels. *J Pathol Inform*. 2018;9:5. DOI: 10.4103/jpi.jpi\_74\_17.
18. Hanna MG, Liu C, Rohde GK, Singh R. Predictive Nuclear Chromatin Characteristics of Melanoma and Dysplastic Nevi. *J Pathol Inform*. 2017;8:15. DOI: 10.4103/jpi.jpi\_84\_16.
19. Sha L, Osinski BL, Ho IY, Tan TL, Willis C, Weiss H et al. Multi-Field-of-View Deep Learning Model Predicts Non-small Cell Lung Cancer Programmed Death-Ligand 1 Status from Whole-Slide Hematoxylin and Eosin Images. *J Pathol Inform*. 2019;10:24. DOI: 10.4103/jpi.jpi\_24\_19.
20. Saltz J, Gupta R, Hou L, Kurc T, Singh P, Nguyen V et al. Spatial Organization and Molecular Correlation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Using Deep Learning on Pathology Images. *Cell Rep*. 2018;23(1):181–93. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.086.
21. Sharma H, Zerbe N, Klempert I, Hellwich O, Hufnagl P. Deep convolutional neural networks for automatic classification of gastric carcinoma using whole slide images in digital histopathology. *Comput Med Imaging Graph*. 2017;61:2–13. DOI: 10.1016/j.compmedimag.2017.06.001.
22. Liu Y, Kohlberger T, Norouzi M, Dahl GE, Smith JL, Mohtashami-A et al. Artificial Intelligence–Based Breast Cancer Nodal Metastasis Detection. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(7):859–68. DOI: 10.5858/arpa.2018-0147-OA.
23. Spanhol FA, Oliveira LS, Petitjean C, Heutte L. A Dataset for Breast Cancer Histopathological Image Classification. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2016;63(7):1455–62. DOI: 10.1109/TBME.2015.2496264.
24. Becker RL. Computer-assisted image classification: use of neural networks in anatomic pathology. *Cancer Lett*. 1994;77(2–3):111–7. DOI: 10.1016/0304-3835(94)90093-0.
25. Jones AD, Graff JP, Darrow M, Borowsky A, Olson KA, Gandour-Edwards R et al. Impact of pre-analytical variables on deep learning accuracy in histopathology. *Histopathology*. 2019;75(1):39–53. DOI: 10.1111/his.13844.

## Информация об авторе

Артем Михайлович Борбат – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом, научный консультант ООО «Онкодиагностика Атлас».

## Author information

Artyom M. Borbat – Cand. Sci. (Med.), Surgical Pathologist, Scientific Advisor, Atlas Oncology Diagnostics LLC.  
<https://orcid.org/0000-0002-9699-8375>

## Хронический эндометрит: патогенез, диагностика, лечение и его связь с бесплодием

М.Р. Оразов<sup>1</sup>, Л.М. Михалева<sup>2</sup>, П.А. Семенов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

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

Хронический эндометрит (ХЭ) характеризуется постоянным субклиническим воспалением и инфильтрацией плазматических клеток в стромальной зоне эндометрия. Общая распространенность данного заболевания широко варьирует.

Неадекватные процессы пролиферации и дифференцировки, изменение иммунного ответа на уровне эндометрия, а также aberrantная экспрессия медиаторов воспаления определяют проблемы, связанные с фертильностью женщин с ХЭ.

Иммуногистохимический метод обнаружения плазматических клеток в эндометрии является золотым стандартом диагностики. Гистероскопию в сочетании с гистологическим исследованием можно считать благоприятной комбинацией для диагностики ХЭ.

Антибиотикотерапия ХЭ на данный момент считается методом выбора, хотя существует множество противоречивых мнений насчет ее эффективности в преодолении бесплодия на фоне ХЭ.

Цель обзора – охарактеризовать патофизиологию хронического эндометрита и его связи с infertility, а также существующие методы диагностики и лечения ХЭ.

**Заключение.** Несмотря на обилие накопленной информации, все еще требуются качественные клинико-морфологические исследования с сильной доказательной базой для преодоления неясностей этиологии, патофизиологии, диагностики и лечения сниженной фертильности женщин, страдающих ХЭ.

**Ключевые слова:** хронический эндометрит, повторные неудачи имплантации, повторные потери беременности.

**Для корреспонденции:** Оразов Мекан Рахимбердыевич. E-mail: omekan@mail.ru

**Для цитирования:** Оразов М.Р., Михалева Л.М., Семенов П.А. Хронический эндометрит: патогенез, диагностика, лечение и его связь с бесплодием. Клини. экп. морфология. 2020;9(2):16–25. DOI:10.31088/CEM2020.9.2.16-25

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

Статья поступила 06.03.2020. Получена после рецензирования 09.04.2020. Принята в печать 14.05.2020.

## Chronic endometritis: pathogenesis, diagnosis, management and associated infertility

M.R. Orazov<sup>1</sup>, L.M. Mikhaleva<sup>2</sup>, P.A. Semenov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

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

Chronic endometritis (CE) is characterized by continuous subclinical inflammation and plasma cell infiltration in the endometrial stroma. The CE overall prevalence varies widely.

Proliferation and differentiation disorders, immune response alterations in the endometrium, as well as aberrant expression of mediators, lead to CE complications associated with the female fertility. Immunohistochemistry for detecting plasma cells in the endometrium is the gold standard for diagnosis. Hysteroscopy in combination with microscopical analysis may be considered as a favorable combination for the CE diagnostics. Antibiotic therapy of CE is currently considered the method of choice, although there are many conflicting opinions about its effectiveness in overcoming infertility in the presence of CE.

The aim of this work was to characterize the pathophysiology of chronic endometritis (CE) and its relationship with infertility, as well as to discuss existing methods in CE diagnostics and management.

**Conclusion.** Despite the abundance of accumulated information, high-quality clinical and morphological studies with a strong evidence base are still required to overcome the ambiguities of the CE etiology, pathophysiology, diagnostic methods and treatment in women with CE induced fertility.

**Keywords:** chronic endometritis, repeated failure of implantation, repeated implantation failure.

**Corresponding author:** Mekan R. Orazov. E-mail: omekan@mail.ru

**For citation:** Orazov M.R., Mikhaleva L.M., Semenov P.A. Chronic endometritis: pathogenesis, diagnosis, management and associated infertility. Clin. exp. morphology. 2020;9(2):16–25 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.16-25

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

**Received** 06.03.2020. **Received in revised form** 09.04.2020. **Accepted** 14.05.2020.

## Введение

Эндометрий является уникальной тканью, которая ежемесячно подвергается циклическим изменениям, заключающимся в пролиферации, децидуализации, секреции и менструации под влиянием стероидных гормонов, вырабатываемых в яичниках. В норме эндометрий содержит большое количество иммунокомпетентных клеток: естественных киллеров (НК-клеток), макрофагов, Т-лимфоцитов и нейтрофилов, чьи пропорции и численность периодически колеблются. Циклические изменения в этих субпопуляциях лейкоцитов и их медиаторов, предположительно, играют важную роль в процессе имплантации [1]. Напротив, продуцирующие антитела В-лимфоциты и плазматические клетки не обнаруживаются в ткани эндометрия, за исключением всего периода менструации и непосредственно перед ним [2].

Адекватное функционирование эндометрия – необходимый фактор для успешной имплантации и развития беременности [3]. Хронический эндометрит определяется как локализованное воспаление слизистой оболочки эндометрия, характеризующееся наличием отека, повышенной плотностью стромальных клеток, диссоциированным созреванием между эпителиальными клетками и фибробластами стромы, а также наличием плазматических клеток в строме [4]. Это приводит к аномальной экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, многочисленных факторов роста и цитокинов, которые регулируют пролиферацию клеток и апоптоз [5]. Обычно протекает как бессимптомное воспаление, хронический эндометрит (ХЭ) влияет на нормальную дифференцировку, пролиферацию, децидуализацию, а также на рецептивность эндометрия [1]. Если принять во внимание роль плазматических клеток (секреция большого количества антител), ХЭ может описываться как состояние, при котором иммунные клетки контролируют некоторые aberrantные патогены, находящиеся в полости матки длительное время, подавляя их с целью предотвращения интенсификации воспаления [2].

В обзоре проанализированы данные по патофизиологии хронического эндометрита и его связи с бесплодием, а также существующие методы диагностики и лечения ХЭ.

## Факторы риска

Бесспорным фактом является ассоциация нескольких факторов с ХЭ, например аномальных маточных кровотечений (АМК), более одних родов и (или) многоплодия в анамнезе, бактериального вагиноза и эндометриоза [3]. Давно известно, что введение внутриматоч-

ной системы (ВМС) даже на непродолжительное время вызывает в эндометрии воспаление, которое сохраняется после ее удаления [2]. Связь между эндометриозом и ХЭ была впервые обозначена после подробного изучения характеристик эутопического эндометрия при эндометриозе [6]. Эта же связь в том числе показана у пациенток с бесплодием [7, 8].

## Эпидемиология

Неспецифичность симптомов и важность выполнения биопсии эндометрия для подтверждения диагноза затрудняют оценку распространенности этого состояния. Общая распространенность ХЭ в изученной популяции – 24,4% [9]. Недавний обзор показал, что встречаемость хронического воспаления эндометрия у женщин репродуктивного возраста варьирует от 8% до 72%, а у бесплодных пациенток этот показатель достигает 55,7% [2]. В одном из исследований распространенность ХЭ оценивалась на основании биопсии эндометрия пациенток, перенесших впоследствии гистерэктомию по поводу доброкачественного заболевания, и составила 10–11% от общей популяции. Среди пациенток с АМК частота ХЭ была от 3–10% и до 72% у женщин с подозрением на воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ), вызванных инфекциями, передаваемыми половым путем (ИППП) [1].

Взаимосвязь между ХЭ, бесплодием и неблагоприятными исходами беременности, такими как преждевременные роды и аборт, стала важной клинической проблемой относительно недавно [10–12]. Одни исследования показывают увеличение распространенности ХЭ у пациенток с повторными неудачами имплантации (ПНИ) до 30% и повторными потерями беременности (ППБ) до 13% [13]. Согласно данным других авторов, 2,8–56,8% бесплодных женщин [14], 14–67,5% женщин с ПНИ [15] и 9,3–67,6% женщин с ППБ был поставлен диагноз «хронический эндометрит» [2]. Учитывая такие высокие показатели встречаемости, ХЭ является состоянием, которое нельзя игнорировать при лечении бесплодия [16]. Имеются интересные и разноречивые данные, касающиеся результатов обследования пациенток с ХЭ и без ХЭ. Так, в одно из исследований были включены 678 бесплодных женщин без других клинических симптомов на первом цикле лечения методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО)/интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ИКСИ), и сравнили показатели рождаемости (частота живорождения, включая спонтанную беременность) у пациенток с ХЭ и без ХЭ в течение 3 лет после начала их рандомизированного контролируемого исследования (РКИ). Полученные результаты показали низкую

распространенность ХЭ (2,8%) и отсутствие различий в кумулятивной частоте живорождений (включая спонтанные беременности) и частоте клинической беременности (ЧКБ) на перенос эмбриона [10]. Напротив, другая группа авторов продемонстрировала, что у пациенток с гистологически подтвержденным ХЭ, страдающих ПНИ, частота имплантации с ЭКО была ниже, чем у пациенток с ПНИ без ХЭ (11,5 и 32,7%, соответственно) [2]. В другом проспективном исследовании при общем количестве 2190 диагностических гистероскопий, выполненных по разным показаниям, они обнаружили ХЭ у 20% исследуемых (438 пациенток), среди которых 37% страдали бесплодием [1]. Необходимо иметь в виду, что диагностические критерии ХЭ, используемые в исследованиях, различаются, что затрудняет оценку его реальной распространенности [9]. Основываясь на существующих данных, влияние ХЭ на бесплодие остается неясным. Тем не менее лечение хронического воспаления эндометрия может положительно повлиять на фертильность [17].

### Этиология

Хронический эндометрит может быть обусловлен инородными телами или структурной патологией полости эндометрия, например наличием ВМС, подслизистых миом, полипов, задержанных продуктов зачатия, неполного аборта или инфекционных агентов [18, 19]. В течение почти столетия считалось, что в норме полость матки стерильна [20], однако эта гипотеза была опровергнута, и недавние исследования показали, что микроорганизмы обнаруживаются даже в эндометрии полости матки у здоровых женщин [21]. Кроме того, было показано, что слизистая пробка шейки матки не полностью блокирует восходящий путь влагалищных бактерий [22]. Возникает вопрос о появлении бактерий в полости матки. Анализ бактериальные посевов из эндометрия у 438 пациенток с ХЭ выявил патогены только в 73% случаев. Более того, у пациенток, положительных на патогенные бактерии как во влагалище, так и в эндометрии, только в 32,6% случаев культивировались одни и те же виды бактерий. Эти результаты показывают, что высеванные из влагалища культуры микроорганизмов не могут предсказать микробиом эндометрия у пациенток с ХЭ [2, 23]. Так или иначе существование микроорганизмов в полости матки стало общепризнанным, и считается, что именно они являются основной причиной ХЭ, а эффективная в большинстве случаев антибиотикотерапия может служить косвенным тому подтверждением [24, 25].

Острый эндометрит и ВЗОМТ вызывают микроорганизмы, попадающие в полость матки из нижних отделов половых путей (*Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*), поэтому можно было бы считать их ключевыми патогенными микроорганизмами ХЭ. Тем не менее у пациенток с ХЭ эти бактерии обнаруживались реже. В полости матки с хронически воспаленным эндометрием в основном присутствуют

условно патогенные бактерии, такие как *Streptococcus* spp. (27%), *Escherichia coli* (11%), *Enterococcus faecalis* (14%), *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* и *Mycoplasma/Ureaplasma* spp. (11%) [1]. В некоторых регионах мира широко распространена *Mycobacterium tuberculosis* [1]. Инфект считается основной причиной бесплодия в 40–75% случаев, так как вызывает «недостаточность» имплантации за счет изменения иммунного ответа на уровне эндометрия, гормональных нарушений и продукции антифосфолипидных антител [1]. Таким образом, в настоящее время считается, что именно эти бактерии ответственны за развитие ХЭ [2]. С другой стороны, присутствие девяти патогенных микроорганизмов оценивалось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в образцах эндометрия, взятых у пациенток с хроническим эндометритом, диагностированным с помощью иммунного окрашивания с антителом к CD138. Сходные показатели частоты выявления патогенов наблюдались у пациенток с ХЭ и без ХЭ (24/40 против 14/25). Эти результаты свидетельствуют о противоречивости данных о связи между обнаружением определенных микроорганизмов внутри полости матки и ХЭ. Исходя из этого, основным патофизиологическим процессом при ХЭ является взаимодействие между микроорганизмами и иммунными клетками эндометрия, а не просто присутствие микроорганизмов. Дальнейшие исследования необходимы для выяснения путей колонизации микроорганизмами полости матки, механизма возникновения и прогрессирования ХЭ [26].

### Патогенез

Уровни провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6, интерлейкин-1 $\beta$  и фактор некроза опухоли  $\alpha$ , повышены в менструальных выделениях женщин с хроническим воспалением в эндометрии. Это повышение провоспалительных цитокинов может повлиять на клеточную миграцию, пролиферацию и апоптоз [2]. Таким образом, по аналогии с другими хроническими воспалительными заболеваниями, ХЭ изменяет распределение и функцию клеток эндометрия, включая иммунные, эпителиальные и стромальные клетки.

В-лимфоциты обнаруживаются в течение всего менструального цикла и находятся в основном в базальном слое, составляя лишь небольшую часть (<1%) всех иммунных клеток в здоровом эндометрии. При ХЭ множество В-лимфоцитов как присутствует в базальном слое эндометрия, так и проникает и скапливается в стромальной области функционального слоя, в железистом эпителии и в просвете желез эндометрия, мигрируя через железистые эпителиальные клетки [27]. Это явление связано с aberrантной экспрессией молекул адгезии и хемокинов, таких как Е-селектин, CXCL1 и CXCL13, которые принимают участие в миграции В-лимфоцитов из кровеносного русла в ткани. Последние данные свидетельствуют о том, что липополисахарид *E. coli* способен индуциро-

вать *in vitro* экспрессию Е-селектина в качестве адгезина, который способствует прохождению В-лимфоцитов через эндотелий микрососудистой системы эндометрия. Кроме того, Е-селектин способствует экспрессии хемоаттрактанта CXCL13, активируя молекулы адгезии В-лимфоцитов, и CXCL1 на уровне железистого эндометрия. В этом микроокружении грамотрицательные бактерии в эндометрии вызывают иммунный ответ с миграцией циркулирующих В-лимфоцитов в стромальный компартмент эндометрия [28]. В-клеточная инфильтрация дополнительно может быть связана с наличием плазматических клеток в строме функционального слоя эндометрия [2]. В эндометрии плазматические клетки стромы экспрессируют иммуноглобулины разных классов (IgM, IgA1, IgA1, IgG1 и IgG2), и избыток этих антител может отрицательно влиять на имплантацию эмбриона [1, 29].

Т-лимфоциты сосредоточены в основном в базальных лимфоидных скоплениях и распределены по разным участкам стромы и эпителия. В отличие от Т-лимфоцитов периферической крови две трети Т-лимфоцитов эндометрия представлено CD8<sup>+</sup> клетками [27]. Естественные киллерные клетки (NK) эндометрия характеризуются CD16<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> фенотипом в отличие от CD16<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK-клеток в периферической крови. Поскольку CD16<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> NK-клетки обладают низкой цитотоксичностью и их количество увеличивается до 30–40% клеток в стромальном компартменте эндометрия в поздней секреторной фазе, считается, что они играют важную роль в успешной имплантации. Недавние исследования показали, что субпопуляция CD16<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> или CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK-клеток уменьшается с увеличением количества CD3<sup>+</sup> клеток в эндометрии матки у пациенток с ХЭ, что может быть тесно связано с нарушением его рецептивности [2].

Сообщалось, что у женщин с ХЭ изменялась сократительная способность матки как в перiovуляторной, так и в средней лютеиновой фазе, и было высказано предположение, что хронический воспалительный процесс в эндометрии может влиять на сократительную способность, поскольку изменения субпопуляционного состава лимфоцитов и спектра паракринных факторов в эндометрии, по-видимому, влияют на синхронные сокращения эндометрия и миометрия, включая переходную зону [30]. Физиологически в пролиферативной фазе наблюдаются антеградные сокращения от дна до шейки матки, что способствует удалению менструальных выделений, за которым следуют перiovуляторная и лютеиновая фазы, когда преобладают ретроградные сокращения от шейки до дна матки, способствующие миграции сперматозоидов в маточные трубы. При наличии воспаления в эндометрии частота ретроградной сократимости маточных труб уменьшается в 3,3 раза [1]. Эта «измененная перистальтика», вызванная ХЭ, приводит, по крайней мере, к частичному снижению фертильного потенциала и способствует развитию таких симптомов как тазовая боль и дисменорея.

Фиброз матки, который может привести к полной облитерации внутриматочной полости, является тяжелым состоянием, существенно снижающим фертильность. Предполагается, что хроническое воспаление способствует развитию и рецидивированию синдрома Ашермана. Согласно полученным данным, ХЭ был диагностирован у 46,28% пациенток с умеренными и тяжелыми внутриматочными спайками на основании ИГХ исследования образцов эндометрия [31]. В настоящее время механизм возникновения и рецидива внутриматочных синехий неясен. При ХЭ в эндометрии выявляются дисбаланс гомеостаза фиброобразования, нарушение кровообращения и изменение местного иммунитета, увеличение выработки цитокинов, что приводит к фиброзу и хронической гипоксии тканей, усилению воспаления. В частности, активируется сигнальный путь TGF-β1, который участвует в модуляции заживления ран и восстановления тканей и считается классическим в формировании фиброза [32]. TGF-β1 может ингибировать деградацию внеклеточного матрикса, выступая антагонистом MMP-9, протеолитического фермента, способного разлагать компоненты внеклеточного матрикса, уменьшая, таким образом, его отложение [31].

Для успешной имплантации и наступления беременности необходимы адекватная пролиферация и дифференцировка эндометрия, регулируемые половыми стероидными гормонами, а также участие иммунных клеток, медиаторов воспаления, таких как цитокины, хемокины, и других эндометриальных факторов. В случае ХЭ эти процессы и продукция соответствующих молекул нарушаются. Экспрессия Ki-67 – ядерного маркера пролиферации клеток, BCL2 и BCL2-ассоциированного белка X (BAX, регулятор апоптоза) повышена [1]. В экспериментальном исследовании было показано, что хроническое воспаление эндометрия модифицирует децидуализацию посредством aberrантной экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона. Так, культивируемые стромальные клетки эндометрия, полученные у пациенток с диагнозом «хронический эндометрит», после индукции децидуализации *in vitro* воздействием эстрадиола и прогестерона секретировали значительно меньше пролактина и белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста 1 (IGFBP1), по сравнению с группой пациенток без диагноза ХЭ. При этом количество стромальных клеток эндометрия через 13 дней после индукции децидуализации было достоверно выше у пациенток с хроническим воспалением в эндометрии. Таким образом, в условиях ХЭ усиливается пролиферация стромальных клеток, но снижается уровень их дифференцировки, что нарушает процесс децидуализации *in vitro* и ослабляет действие прогестерона на стромальные клетки (индукция устойчивости к прогестерону). Данные результаты объясняют, как именно хроническое воспаление в эндометрии нарушает процесс децидуализации и, следовательно, негативно

влияет на имплантацию и наступление беременности [33]. В другом исследовании сравнивалась экспрессия 25 генов, кодирующих белки, участвующие в воспалении, пролиферации и апоптозе в эндометрии, с помощью ПЦР в реальном времени в интервале имплантации у 16 женщин с гистероскопически и гистологически диагностированным ХЭ и 10 здоровых женщин без эндометрита. Результаты исследования показали, что эндометриальная экспрессия некоторых генов значительно изменена. В частности, обнаружена повышенная экспрессия генов белков IGFBP1, BCL2 и BAX, в то время как экспрессия генов интерлейкина-11 (IL-11), хемокина, лиганда 4 (CCL4), инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) и каспазы 8 (CASP8) была снижена. Таким образом, увеличение экспрессии IGFBP1 и снижение экспрессии IGF1 в эндометрии с наличием воспалительного процесса могут привести к неблагоприятным условиям для имплантации и развития эмбриона [1].

При ХЭ возможно изменение выработки цитокинов, нарушение функции и состава популяции лейкоцитов эндометрия, что приводит к измененной секреции паракринных факторов, принимающих участие в адекватной рецептивности эндометрия. Как сообщалось ранее, снижение продукции IL-11 эпителиальными и стромальными клетками может привести к нарушению регуляции трофобластической инвазии, что, в свою очередь, приводит к бесплодию. Также более низкая активность CCL4 при ХЭ может привести к уменьшению рекрутирования NK-клеток и макрофагов, что объясняет наблюдаемое уменьшение уровня имплантации у данной когорты пациенток. Кроме того, подавление BCL2 и CASP8, связанное с повышением регуляции BAX, вызывает резистентность клеток эндометрия к апоптозу и нарушает правильный процесс имплантации [1].

### **Хронический эндометрит и повторные неудачи имплантации**

Данные о влиянии хронического воспаления эндометрия на имплантацию все еще остаются противоречивыми, несмотря на результаты приведенных исследований, предполагающих негативное воздействие плазматических клеток, иммуноглобулинов, а также изменений в генах, кодирующих белки, участвующих в воспалительной реакции, пролиферации и апоптозе.

Bouet et al. (2016) опубликовали проспективное наблюдательное исследование, в котором приняли участие 46 женщин с ПНИ, определяемой как неспособность достичь беременности после переноса трех эмбрионов хорошего качества в свежем или замороженном виде в цикле женщинам в возрасте до 35 лет или четырех эмбрионов хорошего качества женщинам старше 35 лет. ХЭ был подтвержден иммуногистохимически (ИГХ) и диагностирован в 14% случаев [34].

Используя несколько иную методологию, другие исследователи ретроспективно изучили 33 женщины, опре-

делив ПНИ как неспособность достичь беременности после двух циклов ЭКО с переносом по крайней мере одного эмбриона хорошего качества. Диагноз «хронический эндометрит» также был подтвержден при ИГХ исследовании. Авторы сообщили о наличии хронического воспаления эндометрия в 30,3% случаев [35].

В более широком когортном анализе Cicinelli et al. (2015) включили в исследование пациенток моложе 40 лет с нормальным кариотипом, адекватно отвечавших на стимуляцию овуляции. Повторные неудачи имплантации авторы определяли как неспособность достичь беременности после переноса по меньшей мере шести эмбрионов хорошего качества в трех или более предшествующих циклах ЭКО или ЭКО/ИКСИ. Диагноз «хронический эндометрит» был подтвержден морфологически. Согласно анализу данных, ХЭ диагностирован методом гистероскопии в 66% случаев, гистологическим анализом в 57,5%. Более высокая частота выявления может быть объяснена либо опытом патолога и гистероскописта в отношении диагностики ХЭ, либо предвзятостью выбора женщин с подозрением на ХЭ [36].

Следует отметить, что в обоих исследованиях авторы лечили пациенток антибиотиками. Что касается репродуктивных результатов, Cicinelli et al. (2015) [36] обнаружили, что частота живорождения у пациенток, позитивно отреагировавших на терапию антибиотиками, составила 61%, в то время как у пациенток, не реагировавших на нее, частота живорождения была всего 13%. В исследовании, проведенном Johnston-MacAnanny et al. (2010), показано, что у пациенток с ХЭ и положительным ответом на антибиотикотерапию увеличилась частота наступления беременности, хотя она была ниже, чем у здоровых женщин [35]. Эти различия в результатах, вероятно, могут быть связаны с другими нераспознанными нарушениями в эндометрии, коррекция которых не решалась с помощью антибиотиков.

В целом оба исследования предполагают, что ХЭ оказывает негативное влияние на восприимчивость эндометрия и адекватный ответ на антибактериальную терапию может значительно улучшить репродуктивные результаты, как это было подтверждено в недавнем систематическом обзоре и метаанализе [37]. Тем не менее диагностическая гистероскопия и биопсия эндометрия также могут играть положительную роль [38]. С одной стороны, гистероскопия может физически удалить бактериальные биопленки, участвующие в патогенезе ХЭ, а с другой – биопсия эндометрия и последующий процесс его восстановления могут способствовать секреции цитокинов и факторов роста в эндометрии, участвующих в имплантации эмбрионов [1, 39, 40].

### **Хронический эндометрит и повторные потери беременности**

По данным Европейского и Американского обществ по репродукции человека (ESHRE и ASRM), ППБ определяется как потеря двух или более, даже не последо-

вательных, беременностей, наступающих до 20 недель гестации [41].

В проведенных исследованиях ХЭ с помощью ИГХ был диагностирован всего у 9,3% пациенток с ППБ. Используя тот же подход, другие авторы сообщали о распространенности ХЭ у 42,9% женщин с ППБ. В исследовании 395 женщин с двумя или более выкидышами до 10-й недели или по крайней мере с одной потерей беременности после 10 недель гестации распространенность ХЭ, подтвержденная с помощью биопсии эндометрия, соответствовала 9%. В литературе имеются данные об увеличении частоты живорождения с 7% до лечения до 56% после приема антибиотиков в течение двух недель [1].

Bouet et al. (2016) опубликовали проспективное обсервационное исследование, в котором приняли участие 53 женщины с двумя или более необъяснимыми потерями беременности в сроках до 14 недель гестации. Авторы выявили распространенность ХЭ на уровне 27%, подтвержденную ИГХ [34].

Обсервационное исследование «случай–контроль» было проведено у 107 женщин с двумя или более выкидышами до 20-й недели гестации. В этом исследовании распространенность ХЭ варьировала от 13% до 56% по результатам ИГХ [42]. Авторы также обнаружили тенденцию к более высокой частоте потери беременности у женщин с нелеченым ХЭ по сравнению с пациентками без ХЭ.

### Клинические проявления и диагностика

Хронический эндометрит, как правило, протекает бессимптомно или имеет неспецифические клинические проявления, такие как хроническая тазовая боль, АМК, диспареуния, выделения из влагалища, вагинит, рецидивирующий цистит [13, 43].

Современные данные подтверждают, что ультразвукография и гистеросальпингография недостаточно эффективны для выявления ограниченных внутриматочных поражений. Вместо перечисленных выше методов в этих случаях можно использовать гистероскопию, которая, по оценке некоторых исследователей, может диагностировать такой процесс с частотой от 11% до 45% [44].

Гистероскопию применяют для выявления визуальных признаков воспаления эндометрия, на основании этого были предприняты попытки диагностировать с ее помощью ХЭ. Cicinelli et al. (2019) предложили следующие гистероскопические критерии: гиперемия (усиленный сосудистый рисунок), «клубничный аспект» (обширный гиперемированный эндометрий с белыми точками), стромальный отек (бледный утолщенный эндометрий в пролиферативной фазе) и микрополипы (небольшие внутриматочные новообразования размером <1 мм с отчетливыми соединительнотканными сосудистыми ножками), эндометриальные геморрагические пятна (очаговые красные участки эндометрия с резкими и нечеткими границами). Позиция этой

группы исследователей заключается в том, что ХЭ диагностируется по наличию по крайней мере одного признака, также авторы сообщили о высокой чувствительности и специфичности гистероскопии в выявлении ХЭ [13, 44]. Таким образом, гистероскопическая диагностика ХЭ не всегда согласуется с гистологическим диагнозом. Следовательно, хотя гистероскопия может быть полезной, ее следует использовать только для облегчения гистологической диагностики ХЭ. Действительно, гистероскопия в совокупности с биопсией имеет благоприятную прогностическую ценность для диагностики внутриматочного воспаления и считается лучшим методом диагностики различных внутриматочных нарушений [13].

Тем не менее неспецифическая симптоматика и недостаточная информативность существующих неинвазивных методов диктуют необходимость выполнения биопсии эндометрия, являющейся золотым стандартом диагностики ХЭ [1]. Несмотря на это, неудивительно, что метод встречает сопротивление со стороны пациенток и врачей, предпочитающих использовать менее инвазивные способы диагностики и лечения заболеваний. Следовательно, разработка методик с достаточной диагностической ценностью и малой инвазивностью могла бы стать приемлемым решением для всех [13].

Гистологический диагноз «хронический эндометрит» ставят при идентификации плазматических клеток в строме эндометрия [1]. В дополнение к ним также могут выявляться высокая пролиферативная активность стромальных клеток, диссоциация между созреванием эпителия и стромы и выраженная прецидуальная реакция. Плазматические клетки обычно крупнее, с эксцентричным ядром в обильной базофильной цитоплазме. Общая форма клетки, как правило, напоминает клин или комету, хроматин выражен в виде «колеса со спицами» или «циферблата часов» [2]. Хотя такие патологические признаки могут быть подтверждены с помощью окраски гематоксилином и эозином, даже опытным патологам трудно обнаружить плазматические клетки в эндометрии из-за инфильтрации моноцитов, митозов стромальных клеток, появления плазмцитоподобных стромальных клеток и предраковой реакции, которые морфологически трудно различимы. Использование методов ИГХ для выявления синдекана 1 (CD138), протеогликана поверхности плазматических клеток и кератиноцитов обеспечивает более точную диагностику ХЭ.

Группа исследователей обнаружила, что из 47 случаев только в семи диагнозах ХЭ было поставлено на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, тогда как еще в 13 случаях ХЭ был выявлен методом ИГХ с антителами к CD138. Более того, другими авторами показана значительно более высокая частота выявления ХЭ с помощью ИГХ на CD138 в сравнении с окрашиванием гематоксилином и эозином (56% против 13%). Частоту ложноположительных результатов можно снизить с помощью проведения ИГХ исследования на CD138,

поскольку мононуклеарные и плазмацитоидные стромальные клетки могут быть ошибочно засчитаны как плазматические клетки после окрашивания гематоксилином и эозином [2]. Несмотря на всеобщее признание ИГХ метода обнаружения плазматических клеток в качестве золотого стандарта, международные диагностические критерии для ХЭ еще не установлены. Во-первых, не существует стандартизированной методики иммуноокрашивания образцов эндометрия на CD138 – способа и продолжительности демаскировки антигена, выбора антител и их концентрации, времени инкубации и т.д. Во-вторых, нет единых диагностических критериев в отношении плотности плазматических клеток в ограниченных областях. Фактически, некоторые исследователи считают, что одной плазматической клетки в строме эндометрия достаточно для постановки диагноза, а другие полагают, что требуется более пяти плазматических клеток, по крайней мере, в одном из трех срезов [30]. В-третьих, локализация хронического воспаления в матке является еще одной проблемой. Участок забора материала и объем собранной ткани могут влиять на обнаружение плазматических клеток.

Нестандартизированные протоколы ИГХ исследования приводят к разным результатам количественного определения плотности плазматических клеток, а неоднозначность критериев ХЭ – к различию показателей его распространенности даже в исследованиях аналогичного типа. Это может быть одной из основных причин несовпадения данных о распространенности ХЭ у пациенток с бесплодием [2]. Тем не менее гистологическое подтверждение наличия множественных плазматических клеток в строме эндометрия считается наиболее надежным методом диагностики, однако очень важно установить общепринятое определение «истинного хронического эндометрита» и единые критерии его диагностики [45].

## Лечение

Оральное применение антимикробных препаратов на сегодняшний день является золотым стандартом лечения ХЭ. Для этой цели предложен широкий спектр антибиотиков, таких как доксициклин, цiproфлоксацин, метронидазол, офлоксацин, амоксициллин, клавуланат, джозамицин и миноциклин [46].

Доксициклин, антибиотик широкого спектра действия, является стандартной терапией ХЭ. Kitaya et al. (2017) сообщили, что 92,3% пациенток с ХЭ и ПНИ (108/117) были вылечены доксициклином (200 мг/сут в течение 14 дней). Дополнительное лечение с использованием комбинации офлоксацина (400 мг/сут в течение 14 дней) и метронидазола (500 мг/сут в течение 14 дней) вылечило оставшихся восьмерых из девяти пациенток. В целом показатель выздоровления составил 99,1% (116/117) [47].

Cicinelli et al. (2015) лечили бесплодных пациенток с ХЭ и ПНИ антибиотиками системно, схемами в соответствии с микробными профилями их эндо-

метрия. Пациентки с положительной реакцией на грамтрицательные и грамположительные бактерии получали цiproфлоксацин (1000 мг/сут в течение 10 дней) и амоксициллин + клавуланат (2 г/сут в течение 8 дней), соответственно. Пациенток с *Mycoplasma* и *Ureaplasma urealyticum* лечили джозамицином (2 г/сут в течение 12 дней) и миноциклином (200 мг/сут в течение 12 дней) при резистентном заболевании. Комбинация цефтриаксона (250 мг, однократная доза, внутримышечная инъекция), доксициклина (200 мг/сут в течение 14 дней) и метронидазола (1000 мг/сут в течение 14 дней) вводилась пациенткам с отрицательными посевами. Хотя 28% пациенток с ХЭ (17/61) были, по данным гистопатологического исследования, излечены после первого курса антибиотиков, 23% пациенток (14/61) и 25% (15/61) выздоровели после второго и третьего курса антибиотиков, соответственно. Таким образом, ХЭ сохранялся лишь у 25% пациенток (15/61) после трех последовательных курсов лечения антибиотиками. Эти результаты указывают на эффективность пероральной терапии антибиотиками при ХЭ [36].

Эффективность перорального приема антибиотиков с целью лечения бесплодия на фоне ХЭ активно изучается. Cicinelli et al. (2015) провели ретроспективное исследование и сообщили, что ЧКБ и частота живорождения у пациенток с ЭКО, леченных антибиотиками, были значительно выше, чем у пациенток с персистирующим нелеченым ХЭ (65% против 33% и 60,8% против 13,3%, соответственно) [36].

Напротив, Vitagliano et al. (2018) в проведенном систематическом обзоре и метаанализе влияния терапии ХЭ на исход ЭКО у женщин с ПНИ пришли к выводу, что женщины, получающие антибактериальную терапию, не демонстрируют какое-либо преимущество по сравнению с пациентками, не получавшими такое лечение. Данные литературы также указывают на отсутствие существенной корреляции между антибиотикотерапией и положительными результатами ЭКО [37].

Консенсус о том, что пероральное введение антибиотика не улучшает исходы ЭКО, подталкивает исследователей к поиску новых альтернативных путей решения этой проблемы [25]. В одном из исследований, направленных на изучение эффективности применения мезенхимальных стволовых клеток эндометрия (энМСК) в группе женщин с тонким эндометрием, отсутствием или гипочувствительностью к эстрогену и ПНИ, авторы наблюдали, что в подгруппе с фоновым хроническим воспалением эндометрия энМСК смогли нормализовать изменения в популяции лейкоцитов у четырех из восьми пациенток (50%). В результате указанной терапии эти женщины забеременели и родили живых детей. Среди оставшихся четырех пациенток с хроническим эндометритом у троих имела место повторная потеря беременности [48]. Существуют отдельные работы по использованию богатой тромбоцитами плазмы (БТП) для лечения различных заболеваний,

в том числе ПНИ на фоне ХЭ. БТП получают путем центрифугирования периферической крови с целью достижения высокой концентрации тромбоцитов, обогащенных цитокинами, гормонами, хемоаттрактантами стволовых клеток и т.д. Тромбоциты содержат многочисленные факторы роста, играющие важную роль в контроле воспаления, регенерации тканей, активации ангиогенеза, усилении анаболизма, а также миграции, дифференцировке и пролиферации клеток [49]. В одном из опубликованных клинических случаев описывается применение БТП для лечения ПНИ у женщины с гистологически подтвержденным ХЭ. После лечения антибиотиками пациентке провели новый перенос эмбриона, закончившийся очередной потерей беременности. После второго курса антибиотикотерапии все диагностические процедуры подтвердили стойкий ХЭ. Пациентка перенесла внутриматочное лечение аутологичной БТП с последующим переносом эмбриона. Диагностические процедуры подтвердили отсутствие признаков ХЭ, а перенос эмбриона привел к беременности двойней и последующим родам, из чего авторы работы сделали заключение, что БТП можно использовать в качестве терапии ХЭ первой линии, особенно для пациенток, которые не реагируют на антибиотикотерапию [46].

### Заключение

Хронический эндометрит – это состояние, связанное с нарушением физиологического баланса между микроорганизмами и иммунной системой в эндометрии, распределения лимфоцитов, вовлеченных в имплантацию эмбрионов, и в конечном счете восприимчивости эндометрия вследствие неадекватной секреции различных цитокинов.

В большинстве случаев хронического эндометрита выраженные клинические проявления отсутствуют. Неспецифичность симптомов, необходимость выполнения биопсии эндометрия для подтверждения диагноза и отсутствие общепринятых диагностических критериев для ХЭ затрудняют оценку его действительной распространенности. Считается, что основной причиной развития хронического эндометрита являются микроорганизмы, но конкретные механизмы развития заболевания до конца не ясны и требуют дальнейшего изучения.

Хроническое воспаление в эндометрии связано с неблагоприятными репродуктивными исходами, в том числе неудачей имплантации и повторной потерей беременности. Предполагаемые патогенетические пути многочисленны: изменения в популяциях иммунокомпетентных клеток в эндометрии, выработка провоспалительных цитокинов, негативное влияние на децидуализацию эндометрия. Связь между хроническим эндометритом и бесплодием, повторной имплантационной недостаточностью и повторной потерей беременности лишь не так давно стала предметом активного изучения.

Гистероскопическая диагностика, к сожалению, не всегда согласуется с гистологическим диагнозом, однако в совокупности с биопсией может иметь высокую прогностическую ценность для диагностики хронического эндометрита.

Лечение хронического эндометрита антибиотиками, по данным ряда исследований, улучшает частоту имплантации и снижает частоту выкидышей, но в настоящее время четко спланированных проспективных исследований, подтверждающих эти выводы, недостаточно. Необходимы поиск и разработка новых альтернативных способов лечения данного заболевания.

### Литература/References

1. Puente E, Alonso L, Laganà AS, Ghezzi F, Casarin J, Carugno J. Chronic endometritis: old problem, novel insights and future challenges. *Int J Fertil Steril*. 2020;13(4):250–6. DOI: 10.22074/ijfs.2020.5779.
2. Kimura F, Takebayashi A, Ishida M, Nakamura A, Kitazawa J, Morimune A et al. Review: Chronic endometritis and its effect on reproduction. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(5):951–60. DOI: 10.1111/jog.13937.
3. Volodarsky-Perel A, Badeghiesh A, Shrem G, Steiner N, Tulandi T. Chronic endometritis in fertile and infertile women who underwent hysteroscopic polypectomy. *J Minim Invasive Gynecol*. 2019. pii: S1553-4650(19)30380-2. DOI: 10.1016/j.jmig.2019.08.017.
4. Hoyer BF, Radbruch A. Protective and pathogenic memory plasma cells. *Immunol Lett*. 2017;189:10–2. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.04.014.
5. Kitaya K, Takeuchi T, Mizuta S, Matsubayashi H, Ishikawa T. Endometritis: new time, new concepts. *Fertil Steril*. 2018;110(3):344–50. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.012.
6. Takebayashi A, Kimura F, Kishi Y, Ishida M, Takahashi A, Yamanaka A et al. The association between endometriosis and chronic endometritis. *PLoS One*. 2014;9(2):e88354. DOI: 10.1371/journal.pone.0088354.
7. Cicinelli E, Trojano G, Mastromauro M, Vimercati A, Marinaccio M, Mitola PC et al. Higher prevalence of chronic endometritis in women with endometriosis: A possible etiopathogenetic link. *Fertil Steril*. 2017;108(2):289–95.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.016.
8. Park HJ, Kim YS, Yoon TK, Lee WS. Chronic endometritis and infertility. *Clin Exp Reprod Med*. 2016;43(4):185–92. DOI: 10.5653/cerm.2016.43.4.185.
9. Song D, Feng X, Zhang Q, Xia E, Xiao Y, Xie W et al. Prevalence and confounders of chronic endometritis in premenopausal women with abnormal bleeding or reproductive failure. *Reprod Biomed Online*. 2018;36(1):78–83. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.09.008.
10. Савельева Г.М., Михалев С.А., Коноплянников А.Г., Михалева Л.М., Бабиченко И.И., Болтовская М.Н. Хронический эндометрит – показания для предгравидарной подготовки. *Клиническая практика*. 2018;9(2):36–41. Savelyeva GM, Mikhalev SA, Konoplyannikov AG, Mikhaleva LM, Babichenko II, Boltovskaya MN. Chronic endometritis is an indication for pregravid preparation. *Clinical practice*.

- 2018;9(2):36–41 (In Russ.). DOI: 10.17816/clinpract.09236-41.
11. Михалев С.А., Бабиченко И.И., Шахпазян Н.К., Вандышева Р.А., Лологаева М.С., Нурахова Е.А. Роль урогенитальной инфекции в развитии спонтанных преждевременных родов. Проблемы репродукции. 2019;25(2):93–99. *Mikhalev SA, Babichenko II, Shakhpazyan NK, Vandysheva RA, Lologaeva MS, Nurakhova EA et al.* Role of urogenital infection in the development of preterm delivery. *Reproduction problems.* 2019;25(2):93–99 (In Russ.). DOI: 10.17116/repro20192502193.
  12. Vitagliano A, Noventa M, Gizzo S. Autoimmunity, systemic inflammation, and their correlation with repeated implantation failure and recurrent miscarriage: is chronic endometritis the missing piece of the jigsaw? *Am J Reprod Immunol.* 2017;77(1):e12597. DOI: 10.1111/aji.12597.
  13. Zargar M, Ghafourian M, Nikbakht R, Mir Hosseini V, Moradi Choghakabodi P. Evaluating Chronic Endometritis in Women with Recurrent Implantation Failure and Recurrent Pregnancy Loss by Hysteroscopy and Immunohistochemistry. *J Minim Invasive Gynecol.* 2020;27(1):116–21. DOI: 10.1016/j.jmig.2019.02.016.
  14. Cicinelli E, Matteo M, Trojano G, Mitola PC, Tinelli R, Vitagliano A et al. Chronic endometritis in patients with unexplained infertility: Prevalence and effects of antibiotic treatment on spontaneous conception. *Am J Reprod Immunol.* 2018;79(1):e12782. DOI: 10.1111/aji.12782.
  15. Liu Y, Chen X, Huang J, Wang CC, Yu MY, Laird S et al. Comparison of the prevalence of chronic endometritis as determined by means of different diagnostic methods in women with and without reproductive failure. *Fertil Steril.* 2018;109(5):832–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.01.022.
  16. Михалев С.А., Михалева Л.М., Бархина Т.Г., Черников В.П. Ультроструктурные особенности маточноплацентарной области на раннем сроке беременности с урогенитальной инфекцией. Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2015;23(2):11–18. *Mikhalev SA, Mikhaleva LM, Barkhina TG, Chernikov VP.* Ultrastructural features uteroplacental region in early pregnancy with urogenital infections. *I.P. Pavlov Russian medical biological herald.* 2015;23(2):11–18 (In Russ.).
  17. Vitagliano A, Saccardi C, Litta PS, Noventa M. Chronic endometritis: Really so relevant in repeated IVF failure? *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(6):e12758. DOI: 10.1111/aji.12758.
  18. Cicinelli E, Bettocchi S, de Ziegler D, Loizzi V, Cormio G, Marinaccio M et al. Chronic Endometritis, a Common Disease Hidden Behind Endometrial Polyps in Premenopausal Women: First Evidence From a Case-Control Study. *J Minim Invasive Gynecol.* 2019;26(7):1346–50. DOI: 10.1016/j.jmig.2019.01.012.
  19. Fang RL, Chen LX, Shu WS, Yao SZ, Wang SW, Chen YQ. Bar-coded sequencing reveals diverse intrauterine microbiomes in patients suffering with endometrial polyps. *Am J Transl Res.* 2016;8(3):1581–92.
  20. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Front Immunol.* 2018;9:208. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00208.
  21. Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun.* 2017;8(1):875. DOI: 10.1038/s41467-017-00901-0.
  22. Hansen LK, Becher N, Bastholm S, Glavind J, Ramsing M, Kim CJ et al. The cervical mucus plug inhibits, but does not block, the passage of ascending bacteria from the vagina during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2014;93(1):102–8. DOI: 10.1111/aogs.12296.
  23. Cicinelli E, De Ziegler D, Nicoletti R, Tinelli R, Saliani N, Resta L et al. Poor reliability of vaginal and endocervical cultures for evaluating microbiology of endometrial cavity in women with chronic endometritis. *Gynecol Obstet Invest.* 2009;68(2):108–15. DOI: 10.1159/000223819.
  24. Campos GB, Marques LM, Rezende IS, Barbosa MS, Abrão MS, Timenetsky J. Mycoplasma genitalium can modulate the local immune response in patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 2018;109(3):549–60. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.11.009.
  25. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Nikas Y, Rapani A, Nitsos N, Pierouli K et al. Efficient treatment of chronic endometritis through a novel approach of intrauterine antibiotic infusion: a case series. *BMC Womens Health.* 2018;18(1):197. DOI: 10.1186/s12905-018-0688-8.
  26. Moreno I, Cicinelli E, Garcia-Grau I, Gonzalez-Monfort M, Bau D, Vilella F et al. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(6):602.e1–602.e16. DOI: 10.1016/j.ajog.2018.02.012.
  27. Lee SK, Kim CJ, Kim DJ, Kang JH. Immune cells in the female reproductive tract. *Immune Netw.* 2015;15(1):16–26. DOI: 10.4110/in.2015.15.1.16.
  28. Kitaya K, Matsubayashi H, Yamaguchi K, Nishiyama R, Takaya Y, Ishikawa T et al. Chronic Endometritis: Potential Cause of Infertility and Obstetric and Neonatal Complications. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(1):13–22. DOI: 10.1111/aji.12438.
  29. Bortnick A, Murre C. Cellular and chromatin dynamics of antibody-secreting plasma cells. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2016;5(2):136–49. DOI: 10.1002/wdev.213.
  30. Pinto V, Matteo M, Tinelli R, Mitola PC, De Ziegler D, Cicinelli E. Altered uterine contractility in women with chronic endometritis. *Fertil Steril.* 2015; 103(4):1049–52. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.01.007.
  31. Liu L, Yang H, Guo Y, Yang G, Chen Y. The impact of chronic endometritis on endometrial fibrosis and reproductive prognosis in patients with moderate and severe intrauterine adhesions: a prospective cohort study. *Fertil Steril.* 2019;111(5):1002–1010.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.01.006.
  32. Zhu HY, Ge TX, Pan YB, Zhang SY. Advanced role of hippo signaling in endometrial fibrosis: implications for intrauterine adhesion. *Chin Med J.* 2017;130(22):2732–37. DOI: 10.4103/0366-6999.218013.
  33. Wu D, Kimura F, Zheng L, Ishida M, Niwa Y, Hirata K et al. Chronic endometritis modifies decidualization in human endometrial stromal cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15(1):16. DOI: 10.1186/s12958-017-0233-x.
  34. Bouet PE, El Hachem H, Monceau E, Gariépy G, Kadoch IJ, Sylvestre C. Chronic endometritis in women with recurrent

- pregnancy loss and recurrent implantation failure: prevalence and role of office hysteroscopy and immunohistochemistry in diagnosis. *Fertil Steril.* 2016;105(1):106–10. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.025.
35. *Johnston-MacAnanny EB, Hartnett J, Engmann LL, Nulsen JC, Sanders MM, Benadiva CA.* Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2010;93(2):437–41. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.131.
36. *Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Lepera A, Alfonso R, Indraccolo U et al.* Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. *Hum Reprod.* 2015; 30(2):323–30. DOI: 10.1093/humrep/deu292.
37. *Vitagliano A, Saccardi C, Noventa M, Di Spiezio Sardo A, Saccone G, Cicinelli E et al.* Effects of chronic endometritis therapy on in vitro fertilization outcome in women with repeated implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2018;110(1):103–112.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.03.017.
38. *Elbareg AM, Essadi FM.* Impact of routine hysteroscopy (HS) prior to intrauterine insemination (IUI) on pregnancy rates (PR) among infertile couples at Al-Amal Hospital, Misurata, Libya. *J Pregnancy Reprod.* 2017;1:1–4. DOI: 10.15761/JPR.1000121.
39. *Song D, Li TC, Zhang Y, Feng X, Xia E, Huang X et al.* Correlation between hysteroscopy findings and chronic endometritis. *Fertil Steril.* 2019;111(4):772–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.12.007.
40. *Vitagliano A, Noventa M, Saccone G, Gizzo S, Vitale SG, Lagana AS et al.* Endometrial scratch injury before intrauterine insemination: is it time to re-evaluate its value? Evidence from a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril.* 2018;109(1):84–96.e4. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.09.021.
41. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil Steril.* 2012;98(5):1103–11. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.048.
42. *McQueen DB, Peretto CO, Hazard FK, Lathi RB.* Pregnancy outcomes in women with chronic endometritis and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2015;104(4):927–31. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.044.
43. *Михалева Л.М., Болтовская М.Н., Михалев С.А., Бабиченко И.И., Вандышева Р.А.* Клинико-морфологические аспекты эндометриальной дисфункции, обусловленной хроническим эндометритом. *Архив патологии.* 2017;79(6):22–29. *Mikhaleva LM, Boltovskaya MN, Mikhalev SA, Babichenko II, Vandyшева RA.* Endometrial dysfunction caused by chronic endometritis: clinical and morphological aspects. *Archive of pathology.* 2017;79(6):22–29 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol201779622-29.
44. *Cicinelli E, Vitagliano A, Kumar A, Lasmar RB, Bettocchi S, Haimovich S et al.* Unified diagnostic criteria for chronic endometritis at fluid hysteroscopy: proposal and reliability evaluation through an international randomized-controlled observer study. *Fertil Steril.* 2019;112(1):162–73.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.03.004.
45. *Inoue T, Moran I, Shinnakasu R, Phan TG, Kurosaki T.* Generation of memory B cells and their reactivation. *Immunol Rev.* 2018;283(1):138–49. DOI: 10.1111/imr.12640.
46. *Sfakianoudis K, Simopoulou M, Nitsos N, Lazaros L, Rapani A, Pantou A et al.* Successful implantation and live birth following autologous platelet-rich plasma treatment for a patient with recurrent implantation failure and chronic endometritis. *In Vivo.* 2019;33(2):515–21. DOI: 10.21873/invivo.11504.
47. *Kitaya K, Matsubayashi H, Takaya Y, Nishiyama R, Yamaguchi K, Takeuchi T et al.* Live birth rate following oral antibiotic treatment for chronic endometritis in infertile women with repeated implantation failure. *Am J Reprod Immunol.* 2017;78(5):e12719. DOI: 10.1111/aji.12719.
48. *Tersoglio AE, Tersoglio S, Salatino DR, Castro M, Gonzalez A, Hinojosa M et al.* Regenerative therapy by endometrial mesenchymal stem cells in thin endometrium with repeated implantation failure. A novel strategy. *JBRA Assist Reprod.* 2019. DOI: 10.5935/1518-0557.20190061.
49. *Reghini MF, Ramires Neto C, Segabinazzi LG, Castro Chaves MM, Dell’Aqua Cde P, Bussiere MC et al.* Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology.* 2016;86(2):516–22. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.029.

### Информация об авторах

Мекан Рахимбердыевич Оразов – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН.

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека.

Павел Александрович Семенов – ординатор кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии РУДН.

### Author information

Mekan R. Orazov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology with a course of Perinatology, Peoples’ Friendship University of Russia.

<https://orcid.org/0000-0002-5342-8129>

Liudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of the Research Institute of Human Morphology, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Pavel A. Semenov – Resident, Department of Obstetrics and Gynecology with a course of Perinatology, Peoples’ Friendship University of Russia.

<https://orcid.org/0000-0002-2775-9362>

## Клинико-морфологические факторы прогнозирования метастатического потенциала колоректального рака

*Т.И. Шевченко, Д.С. Швороб*

ГОО ВПО Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького, Донецк

Колоректальный рак занимает ведущие позиции в структуре заболеваемости и смертности среди онкологических заболеваний. Наличие метастатического поражения сильно ухудшает прогноз течения и исхода колоректального рака, являясь непосредственной причиной смерти у большинства пациентов. В обзоре литературы проанализированы имеющиеся в научных публикациях сведения о влиянии на процесс метастазирования колоректального рака таких клинико-морфологических факторов как пол и возраст пациента, макроскопический и гистологический тип опухоли, степень ее дифференцировки и локализация, степень инвазии, наличие изолированных клеток опухоли и опухолевого почкования, перитуморального фиброза и лимфоцитарной инфильтрации, состояние латерального края резекции, использование нео- и адьювантной химиотерапии, наличие осложнений. Результаты показали их значимость для прогнозирования метастатического потенциала опухоли, однако оценка, основанная на статистических показателях, позволяет определить лишь тенденцию развития процесса, интерпретируемую не всегда однозначно, не давая возможности комплексно учесть все факторы и их влияние на прогноз для конкретного пациента. Выход из ситуации видится в создании максимально многофакторной математической модели с использованием байесовского метода, позволяющего на основе «обучающего массива» количественно определить влияние каждого как количественного, так и качественного клинико-морфологического показателя, его информативность и их суммарную прогностическую значимость для оценки метастатического потенциала колоректального рака в конкретном клиническом наблюдении.

**Ключевые слова:** колоректальный рак, метастазирование, прогноз, математическое моделирование.

**Для корреспонденции:** Данил Сергеевич Швороб. E-mail: mcshady@mail.ru

**Для цитирования:** Шевченко Т.И., Швороб Д.С. Клинико-морфологические факторы прогнозирования метастатического потенциала колоректального рака. Клини. эксп. морфология. 2020;9(2):26–32. DOI:10.31088/CEM2020.9.2.26-32

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

Статья поступила 16.03.2020. Получена после рецензирования 14.04.2020. Принята в печать 14.05.2020.

## Clinical and morphological factors in predicting the metastatic potential of colorectal cancer

*T.I. Shevchenko, D.S. Shvorob*

M. Gorky Donetsk National Medical University, Donetsk

Colorectal cancer holds leading positions in the structure of morbidity and mortality among oncological diseases. The presence of metastases greatly worsens the prognosis of the course and outcome of colorectal cancer, being the immediate cause of death in most patients. The literature review analyzes information available in scientific publications on the influence on metastasis process of colorectal cancer such morphological and clinical factors as gender and age of the patient, macroscopic and histological type of tumor, degree of its differentiation and localization, degree of invasion, the presence of isolated tumor cells and tumor budding, peritumoral fibrosis and lymphocytes infiltration, the state of the lateral edge of the resection, the use of neo- and adjuvant chemotherapy, the presence of complications. The results showed their significance for predicting the metastatic potential of the tumor. However, an assessment based on statistical indicators allows us to determine only the development trend of the process, which is not always interpreted unambiguously, making it impossible to comprehensively take into account all factors and their influence on the prognosis for a particular patient. The solution to this problem is apparently to build the most multifactorial, informative and individually oriented mathematical model by using Bayes' theorem in order to assess the metastatic potential of colorectal cancer in a specific clinical observation.

**Keywords:** colorectal cancer, metastasis process, prognosis, math modeling.

**Corresponding author:** Danil S. Shvorob. E-mail: mcshady@mail.ru

**For citation:** Shevchenko T.I., Shvorob D.S. Clinical and morphological factors in predicting the metastatic potential of colorectal cancer. Clin. exp. morphology. 2020;9(2):26–32 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.26-32

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

**Received** 16.03.2020. **Received in revised form** 14.04.2020. **Accepted** 14.05.2020.

## Введение

В настоящее время общепризнанным в науке является прогностический подход, необходимым условием для разработки которого считается наличие достаточного количественного и качественного обеспечения, базирующегося на ретроспективном наблюдении. Результат прогнозирования представлен снижением неопределенности [1].

В онкологии, как и в некоторых других отраслях медицины, имеется потребность в научно обоснованных предсказаниях таких показателей как заболеваемость, течение заболевания, пятилетняя выживаемость, поэтому применение прогностического подхода крайне востребованно. По данным Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания в общей структуре смертности занимают второе место во всем мире. Так, в 2018 году от злокачественных опухолей умерли 9 600 000 человек. Ободочная и прямая кишка занимают лидирующие позиции в структуре заболеваемости, являясь третьей наиболее типичной локализацией злокачественной опухоли у мужчин (10,0%) и второй по частоте локализацией рака у женщин (9,4%). Ежегодно во всем мире от колоректального рака умирают около 800 000 человек, и это число постоянно увеличивается, поэтому поиск новых способов ранней диагностики, лечения и прогнозирования данного заболевания, несомненно, актуален [2].

*Этиология и патогенез колоректального рака.* Колоректальный рак – полиэтиологическое заболевание. Считается, что 60–80% опухолей толстой кишки обусловлено влиянием канцерогенных факторов внешней среды, тогда как 10–30% наследственно детерминированы, проявляясь такими заболеваниями как семейный аденоматозный полипоз и синдром Линча, синдромы Гарднера, Пейтца–Егерса, Турко [3]. В механизмах возникновения колоректального рака выделяют два пути. Первый, традиционный, путь описан в 1975 году и подразумевает стадийную прогрессию аденомы в карциному. Генетической основой этого пути и иницирующим фактором является мутация гена APC, что приводит к транскрипции и активации генов KRAS и DCC. Эти изменения обуславливают появление диспластичных крипт, а в последующем и аденом. В малигнизации аденом важнейшую роль играет мутация гена-супрессора p53. Другой, зубчатый, путь был описан в 1983 году и обосновывал модель канцерогенеза из гиперпластических полипов. Из-за своеобразной зубчатости эпителиальной выстилки крипт слизистой оболочки и наличия дисплазии такие образования получили на-

звание «зубчатые аденомы». Иницирующим фактором в зубчатом пути является мутация гена BRAF, которая приводит к избыточной пролиферации клеток, потере контроля за клеточным циклом и микросателлитной нестабильности [4].

Как и любое новообразование, колоректальный рак развивается за счет последовательного накопления генных и хромосомных мутаций. По их количеству карциномы толстой кишки можно разделить на типичные – примерно 60 мутаций и гипермутабельные – около 700 мутаций. Основные мутации представлены в генах APC, P53, BRAF, KRAS. Наличие мутаций в тех или иных генах проявляется в многообразии подтипов колоректального рака, отличающихся клинико-патоморфологическими параметрами и ответом на терапию. Широкая вариация геномного профиля опухоли способствует разработке и внедрению соответствующей классификации рака толстой кишки [5].

*Морфологическая характеристика колоректального рака.* Колоректальный рак при гистологическом исследовании в подавляющем большинстве случаев представлен аденокарциномой. Около 20% карцином продуцирует муцин, который может секретироваться или оставаться внутри клеток. В результате выделяют муцинозную карциному – опухоль, продуцирующую обильное количество внеклеточного муцина (более 50% объема представлено внеклеточной слизью), и перстневидноклеточную карциному – опухоль, в которой муцин не секретировается, а накапливается в клетках, смещая ядро на периферию (более 50% объема представлено внутриклеточной слизью). Также в толстой кишке встречаются нейроэндокринные опухоли, мезенхимальные опухоли, гамартомы и лимфомы [6, 7]. Для гистологической верификации опухолей ободочной и прямой кишки помимо рутинной окраски гематоксилином и эозином принято использовать иммуногистохимический метод. Последний также успешно применяется в диагностике наследственно детерминированных заболеваний толстой кишки. При колоректальном раке специфичными иммуногистохимическими маркерами являются CDX2 (caudal type homeobox 2), виллин, GPA33 (glycoprotein A33). Для оценки метастатического потенциала опухоли используют такие маркеры как SATB2, MOC-31. Маркеры p53, Ki-67, Bcl-2 свидетельствуют об опухолевой прогрессии и, как следствие, приобретения опухолевыми клетками способности к метастазированию [8, 9].

*Метастазирование колоректального рака.* На течение и исход колоректального рака влияет множе-

ство факторов, главным из которых является наличие метастазов, значительно ухудшающих прогноз независимо от стадии заболевания. Также имеют значение распространенность метастатического процесса и локализация поражения [10]. Колоректальный рак метастазирует лимфогенно и гематогенно, а также контактным путем (трансперитонеально). Наиболее часто метастазирование происходит в региональные лимфатические узлы, печень и легкие [11]. Традиционно считается, что метастазирование возможно при пенетрации атипичными клетками базальной мембраны и инвазии в подлежащую строму, однако при колоректальном раке имеется нулевой риск метастатической диссеминации в случае инвазии клеток вплоть до мышечной пластинки слизистой оболочки. При инвазии мышечной пластинки, в которой расположены лимфатические сосуды, есть риск метастазирования в регионарные лимфоузлы. При дальнейшей инвазии стенки кишки опухолевые клетки контактируют с кровеносными сосудами, получая возможность гематогенного метастазирования [12]. Поскольку венозная кровь от толстой кишки через воротную вену направляется в печень, именно этот орган чаще всего поражается при гематогенном метастазировании, в большинстве случаев вовлекается правая доля. Печень должна быть подвергнута особо тщательному обследованию, потому что обнаружение в ней метастазов в 65% случаев свидетельствует о наличии колоректального рака. Опухоли, возникающие в дистальной части прямой кишки, чаще первоначально метастазируют в легкие, так как нижняя ректальная вена впадает непосредственно в нижнюю полую вену, а не в систему воротной вены [13].

Метастатическая болезнь также остается непосредственной причиной смерти у большинства пациентов, перенесших операцию по поводу рака толстой кишки. Пятилетняя выживаемость после удаления метастазов составляет около 40% [14]. Данные показатели требуют широкого изучения метастатического процесса и поиска диагностических методов выявления доклинических и ранних форм злокачественного процесса, прогнозирования течения заболевания и оценки эффективности проводимого лечения. Прогнозируя процесс метастазирования колоректального рака, патоморфолог обязан учитывать все критерии и факторы, приводящие к повышению метастатического потенциала опухоли, а следовательно, ухудшению прогноза для конкретного пациента.

*Клинико-морфологические факторы метастазирования колоректального рака.* К возможным клинико-морфологическим критериям оценки метастатического потенциала опухоли можно отнести пол и возраст пациента, макроскопический и гистологический тип опухоли, степень ее дифференцировки и локализацию, степень инвазии, наличие осложнений. В процессе исследования заболеваемости колоректальным раком были использованы данные, представленные Амери-

канским онкологическим обществом. Оценивая информацию за 2013–2015 годы, можно сделать вывод, что пол пациента не является прогностическим признаком колоректального рака. Частота встречаемости и смертности при данной патологии у лиц женского и мужского пола примерно одинакова и составляет 9% и 4%, соответственно. Тем не менее структура заболеваемости и особенности течения различны в разных возрастных категориях. Так, по данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (США), вероятность развития колоректального рака у лиц до 40 лет составляет 0,08%, у лиц с 60 до 69 лет уже 1,4%, а после 70 лет – 4,19%. Наиболее неблагоприятный прогноз заболевания наблюдается у лиц молодого и среднего возраста. Это связано с наличием наследственно детерминированных аномалий в хромосомном аппарате эпителиальных клеток толстой кишки, большей агрессивностью опухоли и ранним метастазированием [15].

В странах, где отсутствуют программы скрининга колоректального рака, при первичной диагностике у трети пациентов выявляют прогностически неблагоприятные стадии болезни. В связи с этим выполнение радикальной операции коррелирует с высоким риском местного рецидива. Для снижения риска развития рецидива и метастазирования применяют предоперационную (неoadъювантную) химиотерапию. У пациентов с полным или частичным ответом опухоли на неoadъювантную терапию достоверно улучшается прогноз метастазирования относительно пациентов с опухолью, устойчивой к химиотерапии [16].

Локализация опухоли не является значимым критерием прогноза заболевания. И право-, и левосторонние новообразования толстой кишки имеют схожий прогноз при местно распространенных (I–III) стадиях [17], однако при подтвержденном факте метастатического поражения некоторые данные свидетельствуют о худшем прогнозе для пациентов с правосторонней первичной опухолью [18].

Прогностически неблагоприятный вариант – локализация опухоли в дистальной части прямой кишки. Благодаря особенностям кровоснабжения этой области гематогенное метастазирование происходит сравнительно чаще [19].

При синхронном раке толстой кишки, когда определяются две первичные опухоли и более, прогноз следует оценивать по новообразованию, имеющему более позднюю стадию. В целом же прогноз метастазирования не ухудшается независимо от числа первичных опухолей [20], однако снижается прогноз общей выживаемости [21]. При любом количестве первичных опухолей и варианте их локализации наличие осложнений, таких как обтурация просвета кишки и перфорация стенки, в целом ухудшает прогноз заболевания [22, 23].

Имеются противоречивые сведения относительно типа роста опухоли. По некоторым данным, при экзо- и эндофитном росте метастазирование происходит

примерно с одинаковой частотой [24]. По другим источникам, более неблагоприятным фактором является эндофитный рост опухоли. Это объясняется ранней инвазией лимфатических сосудов и метастазированием в регионарные лимфоузлы. Также при эндофитном росте опухоли реже определяются высокодифференцированные формы карцином, что может влиять на прогноз метастазирования [25].

Морфологический тип опухоли имеет важное прогностическое значение. Обнаружение слизистобразующих карцином (муцинозная или перстневидноклеточная) – неблагоприятный прогностический признак. При перстневидноклеточном варианте карциномы намного чаще встречаются ангиолимфатическая инвазия, регионарные метастазы и канцероматоз брюшины [26]. При муцинозном варианте карциномы наблюдаются сниженный ответ на неoadьювантную терапию и худшая общая выживаемость после резекции [27].

Последние исследования зависимости метастазирования от степени дифференцировки показали, что процесс наблюдается одинаково часто как при низко-, так и при высокодифференцированной аденокарциноме. Тем не менее необходимо отметить, что более высокой скоростью инвазии стенки кишки обладают низкодифференцированные опухоли, вследствие чего метастазирование происходит раньше, чем при высокодифференцированных новообразованиях [25]. С увеличением глубины инвазии опухолью стенки кишки отмечается неуклонный рост показателя частоты метастазирования (не встречается при стадиях T1 и T2). Ключевую роль в метастазировании в лимфатические узлы играет ангиолимфатическая инвазия. Обычно это определяется как присутствие опухолевых клеток в лимфатических и/или кровеносных сосудах, поэтому обнаружение такой гистологической картины подразумевает плохой прогноз течения заболевания [28, 29].

Перитуморальный фиброз (наличие вновь образованной коллагеновой ткани, окружающей комплексы опухолевых клеток), вероятно, играет значимую роль в росте и метастазировании колоректального рака. Наличие фиброза и активированных фибробластов является основным фактором канцерогенеза при циррозе печени, легких, почек, кожи. Однако десмоплазия может отображать защитную реакцию организма, призванную ограничить опухолевую экспансию вплоть до возможного полного замещения новообразования соединительной тканью. Прогностическая ценность десмопластической реакции при колоректальном раке окончательно не выяснена, некоторые исследования свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе [30], другие выявляют обратное [31].

Благоприятный прогностический фактор – лимфоцитарная инфильтрация, возникающая в ответ на инвазию злокачественной опухоли. В большинстве исследований показано, что высокая плотность лим-

фоцитов, вплоть до образования лимфоидных фолликулов, связана с отсутствием раннего метастатического поражения и более высокой общей выживаемостью пациентов [32, 33].

В микропрепарате стенки кишки могут встречаться единичные опухолевые клетки или их скопления, находящиеся на определенном удалении от материнской опухоли, также их можно встретить при исследовании пораженных лимфоузлов. Такое явление называют «изолированные клетки опухоли», и их прогностическое значение остается открытым для обсуждения. В последней, восьмой редакции TNM 2017 года только кластеры опухолевых клеток больше 0,2 см в наибольшем измерении оцениваются как отрицательный прогностический фактор. При этом изолированными опухолевыми клетками считают скопление 20 таких клеток или менее [34].

Перспективным морфологическим критерием прогнозирования может являться почкование опухоли. Этим термином обозначают наличие одиночных опухолевых клеток или небольших клеточных кластеров перед инвазивным краем карциномы. Предполагается, что это вариант эпителиально-мезенхимального перехода. Наличие почкования опухоли – крайне неблагоприятный признак, свидетельствующий о ее высоком метастатическом потенциале [35].

Одним из важнейших прогностических факторов локального и отдаленного рецидива считается латеральный край резекции (CRM – circumferential resection margin) – расстояние от опухоли до собственной фасции. CRM рассматривается как положительный, если расстояние от опухоли до собственной фасции равно или менее 1 мм. Положительный CRM считается неблагоприятным прогностическим признаком и обуславливает необходимость проведения послеоперационной лучевой терапии [36].

Поражение регионарных лимфатических узлов является важным прогностическим критерием отдаленного метастазирования и определяет целесообразность и тактику проведения послеоперационной (адьювантной) химиотерапии, что в значительной степени снижает риск появления отдаленных метастазов. Наличие поражения регионарных лимфатических узлов коррелирует с глубиной инвазии опухоли и ее гистологическим классом. Однако прогноз отдаленного метастазирования значительно ухудшается при любой стадии N>0, независимо от стадии T.

Система классификации TNM (tumor, node, metastasis) является основой для прогнозирования при колоректальном раке. Для определения прогноза Американским объединенным комитетом по раку были разработаны группы с I по IV, которые выставлялись с учетом степени инвазии опухоли, наличия регионарных и отдаленных метастазов. Тем не менее в одной группе встречались различные показатели выживаемости, которые влияли на стратегии ведения пациента. В результате этого в седьмом переиздании

клинической классификации TNM от Американского онкологического общества были введены подгруппы в стадиях колоректального рака, чтобы установить прогностическую гетерогенность, наблюдающуюся в этих группах. На данный момент в последнем, восьмом переиздании имеется по три подгруппы во II, III и IV группах. Несмотря на то, что дополнительное деление групп нашло применение в практической онкологии, качество прогноза системы TNM остается неудовлетворительным [12]. Прогноз может быть точнее, если использовать такие характеристики как данные лабораторного и инструментального исследования, особенности течения заболевания, наличие у пациента коморбидного состояния.

Остается открытым вопрос, как объединить найденную информацию о влиянии на прогноз новых факторов с системой классификации TNM, создав единую индивидуализированную оценку течения заболевания. В этом могут помочь инструменты математического прогнозирования [37]. Цель построения математической модели – установление количественных и логических зависимостей между различными элементами, входящими в изучаемый процесс. Для прогностических целей применяются дискриминантные модели и методы корреляционно-регрессионного анализа. Из вероятностных методов широко используются процедура Байеса и методология марковских цепей.

В настоящее время инструменты прогнозирования при колоректальном раке широко распространены и могут применяться при ведении пациента с данной патологией, однако необходимо решить многие ключевые клинические и методологические проблемы в разработке, валидации и практическом применении математических моделей прогнозирования.

## Заключение

Таким образом, можно сделать вывод, что в качестве метода прогнозирования следует отдать предпочтение математическому моделированию. В области онкологии метод используется относительно недавно, но его полезность и перспективность в целом неоспоримы. Проблема в том, что опухолевая прогрессия и метастазирование – сложный процесс, который регулируется на многих уровнях, начиная от окружающей среды, стрессовых факторов, заканчивая мутациями онкогенов. На данном этапе нет модели, учитывающей все параметры. Выходом из ситуации видится создание максимально многофакторной математической модели с использованием байесовского метода, позволяющего на основе «обучающего массива» количественно определить влияние каждого как количественного, так и качественного клинико-морфологического показателя, его информативность и их суммарную прогностическую значимость для оценки метастатического потенциала колоректального рака в конкретном клиническом наблюдении.

## Литература/References

1. *Василенко В.Х.* Врачебный прогноз. Душанбе: Дониш, 1982. 107 с.  
*Vasilenko VKh.* Vrachebnyi prognoz. Dushanbe: Donish, 1982. 107 p. (In Russ.).
2. Cancer. World Health Organization. September 12, 2018. Available from: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (Accessed September 9, 2019).
3. *Kidambi TD, Kohli DR, Samadder NJ, Singh A.* Hereditary Polyposis Syndromes. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2019;17(4):650–65. DOI: 10.1007/s11938-019-00251-4.
4. *Нечипай А.М., Зобнина М.В., Черкасова Л.М., Перфильев И.Б., Кривоусков В.А.* Морфологические и эндоскопические критерии диагностики зубчатых аденом толстой кишки. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2016;26(1):107–115.  
*Nechipay AM, Zobnina MV, Cherkasova LM, Perfilyev IB, Krivopuskov VA.* Morphological and endoscopic diagnostic criteria of serrated adenomas of the colon. *Russian Journal of gastroenterology, hepatology, coloproctology.* 2016;26(1):107–115 (In Russ.). DOI: 10.22416/1382-4376-2016-26-1-107-115.
5. *Янус Г.А.* Методы молекулярно-генетической диагностики наследственного рака толстой кишки: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Санкт-Петербург, 2016.  
*Janus GA.* Metody molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki nasledstvennogo raka tolstoj kishki: Avtoref. Cand. Diss. (Med. Sci.). Sankt-Peterburg, 2016 (In Russ.).
6. *Shia J, Schultz N, Kuk D, Vakiani E, Middha S, Segal NH et al.* Morphological characterization of colorectal cancers in The Cancer Genome Atlas reveals distinct morphology-molecular associations: clinical and biological implications. *Mod Pathol.* 2017;30(4):599–609. DOI: 10.1038/modpathol.2016.198.
7. *Nagtegaal ID, Hugen N.* The Increasing Relevance of Tumour Histology in Determining Oncological Outcomes in Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2015;11(5):259–66. DOI:10.1007/s11888-015-0280-7.
8. Colorectal Cancer Immunohistochemistry Markers. Available from: <https://www.lsbio.com/research-areas/colorectal-cancer-ihc-markers> (Accessed October 3, 2019).
9. *Валиев А.А.* Клинико-иммуноморфологические аспекты диагностики и прогнозирования результатов хирургического лечения больных колоректальным раком: Дисс. ... канд. мед. наук. Казань, 2005.  
*Valiev AA.* Kliniko-immunomorfologicheskie aspekty diagnostiki i prognozirovaniya rezul'tatov khirurgicheskogo lecheniya bol'nykh kolorektal'nykh rakom: Cand. Diss. (Med. Sci.). Kazan, 2005 (In Russ.).
10. *Зорина Е.Ю., Орлова Р.В.* Прогностические факторы опухолевого процесса у больных диссеминированным колоректальным раком. *Онкологическая колопроктология.* 2014;(2):33–40.  
*Zorina YeYu, Orlova RV.* Prognostic factors of tumoral process in patients with disseminated colorectal cancer. *Oncological coloproctology.* 2014;(2):33–40 (In Russ.).
11. В. Кумар, А.К. Аббас, Н. Фаусто, Дж.К. Астер (ред.). Основы патологии заболеваний по Роббинсу и Котрану / пер. с англ. /

- Под ред. Е.А. Коган. В 3 т.. Москва: Логосфера, 2014. Т. 1. С. 337–340.
- V Kumar, AK Abbas, N Fausto, JK Aster (eds.). Robbins and Cotran pathologic basis of disease; transl. into Russian / Edited by EA Kogan. In 3 volumes. Moscow: Logosphaera. 2014. V. 1. P. 337–340 (In Russ.).
12. AJCC Cancer Staging Manual, Eighth Edition. June 05, 2018. Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC%20Cancer%20Staging%20Form%20Supplement.pdf> (Accessed September 14, 2019).
  13. Шакиров П.К., Гатауллин И.Г., Валиев А.А. Критерии прогнозирования метастазов в печень у больных колоректальным раком. Поволжский онкологический вестник. 2015;4:59–62.  
*Shakirov RK, Gataullin IG, Valiev AA.* Criteria for the prediction of liver metastases in patients with colorectal cancer. *Oncology bulletin of the Volga region.* 2015;4:59–62 (In Russ.).
  14. Лебедева Л.Н. Эпидемиологическая характеристика (заболеваемость, смертность и выживаемость) рака ободочной кишки: популяционное регистровое исследование: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Архангельск, 2015.  
*Lebedeva LN.* Epidemiologicheskaya kharakteristika (zabolevaemost', smertnost' i vyzhivaemost') raka obodochnoi kishki: populyatsionnoe registrovое issledovanie: Avtoref. Cand. Diss. (Med. Sci.). Arkhangelsk, 2015 (In Russ.).
  15. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21442.
  16. Копп М.В., Королева И.А. Адьювантная и неoadьювантная терапия опухолей желудочно-кишечного тракта. Злокачественные опухоли. 2013;2:33–42.  
*Kopp MV, Koroleva IA.* Adjuvant and neoadjuvant therapy of tumors of the gastrointestinal tract. *Malignant tumours.* 2013;2:33–42 (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2013-2-33-42.
  17. Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G et al. Mortality by stage for right-versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results. *J Clin Oncol.* 2011;29(33):4401–9. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.4414.
  18. Wang C, Wainberg ZA, Raldow A, Lee P. Differences in Cancer-Specific Mortality of Right- Versus Left-Sided Colon Adenocarcinoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Database Analysis. *JCO Clin Cancer Inform.* 2017;1:1–9. DOI: 10.1200/CCL.17.00099.
  19. Price TJ, Beeke C, Ullah S, Padbury R, Maddern G, Roder D et al. Does the primary site of colorectal cancer impact outcomes for patients with metastatic disease? *Cancer.* 2015;121(6):830–35. DOI: 10.1002/cncr.29129.
  20. Passman MA, Pommier RF, Vetto JT. Synchronous colon primaries have the same prognosis as solitary colon cancers. *Dis Colon Rectum.* 1996;39(3):329–34. DOI: 10.1007/bf02049477.
  21. Thiels CA, Naik ND, Bergquist JR, Spindler BA, Habermann EB, Kelley SR et al. Survival following synchronous colon cancer resection. *J Surg Oncol.* 2016;114(1):80–5. DOI: 10.1002/jso.24258.
  22. Gendler S, Shmilovich H, Aranovich D, Nadler R, Kashtan H, Stein M. Urgent Laparotomy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Presenting as an Acute Abdomen: A Retrospective Analysis. *Isr Med Assoc J.* 2018;20(10):619–22.
  23. Okuda Y, Shimura T, Yamada T, Hirata Y, Yamaguchi R, Sakamoto E et al. Colorectal obstruction is a potential prognostic factor for stage II colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2018;23(6):1101–11. DOI: 10.1007/s10147-018-1307-2.
  24. Karim S, Brennan K, Nanji S, Berry SR, Booth CM. Association Between Prognosis and Tumor Laterality in Early-Stage Colon Cancer. *JAMA Oncol.* 2017;3(10):1386–92. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.1016.
  25. Шакиров П.К. Клинико-иммуноморфологические аспекты прогнозирования метастазов в печень у больных колоректальным раком: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Уфа, 2010.  
*Shakirov RK.* Kliniko-immunomorfologicheskie aspekty prognozirovaniya metastazov v pechen' u bol'nykh kolorektal'nym rakom: Avtoref. Cand. Diss. (Med. Sci.). Ufa, 2010 (In Russ.).
  26. Nissan A, Guillem JG, Paty PB, Wong WD, Cohen AM. Signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: a matched control study. *Dis Colon Rectum.* 1999;42(9):1176–80. DOI: 10.1007/bf02238570.
  27. McCawley N, Clancy C, O'Neill BD, Deasy J, McNamara DA, Burke JP. Mucinous Rectal Adenocarcinoma Is Associated with a Poor Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Dis Colon Rectum.* 2016;59(12):1200–8. DOI: 10.1097/DCR.0000000000000635.
  28. Wang A, Tan Y, Zhang Y, Xu D, Fang Y, Chen X et al. The prognostic role of angiolymphatic invasion in N0 esophageal carcinoma: a meta-analysis and systematic review. *J Thorac Dis.* 2019;11(8):3276–83. DOI: 10.21037/jtd.2019.08.50.
  29. Machado I, Valera-Alberni M, Martínez de Juan F, López-Guerrero JA, García Fadrique A, Cruz J et al. Histological factors predicting loco-regional lymph node metastasis in early invasive colorectal adenocarcinoma pT1. *Gastroenterol Hepatol.* 2016;39(1):1–8. DOI: 10.1016/j.gastrohep.2015.04.006.
  30. Ikuta D, Miyake T, Shimizu T, Sonoda H, Mukaisho KI, Tokuda A et al. Fibrosis in metastatic lymph nodes is clinically correlated to poor prognosis in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018;9(51):29574–86. DOI: 10.18632/oncotarget.25636.
  31. Caporale A, Amore Bonapasta S, Scarpini M, Ciardi A, Vestri A, Ruperto M et al. Quantitative investigation of desmoplasia as a prognostic indicator in colorectal cancer. *J Invest Surg.* 2010;23(2):105–9. DOI: 10.3109/08941930903469417.
  32. Wallace K, Lewin DN, Sun S, Spiceland CM, Rokey DC, Alekseyenko AV et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Colorectal Cancer Survival in African American and Caucasian Patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018;27(7):755–61. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0870.
  33. Rozek LS, Schmit SL, Greenson JK, Tomsho LP, Rennert HS, Rennert G et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes, Crohn's-Like Lymphoid Reaction, and Survival From Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(8). DOI: 10.1093/jnci/djw027.
  34. Sloothaak DA, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, van der Zaag ES, Tanis PJ, Bemelman WA et al. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: a systematic

- review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2014;40(3):263–9. DOI: 10.1016/j.ejso.2013.12.002.
35. *Koelzer VH, Zlobec I, Lugli A*. Tumor budding in colorectal cancer – ready for diagnostic practice? *Hum Pathol*. 2016;47(1):4–19. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.08.007.
36. *Григорьев Е.Г., Шелехов А.В.* Рак прямой кишки (лекция). Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2015;1(101):84–90.
- Grigoryev EG, Shelekhov AV*. Rectal cancer (lecture). Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences. 2015;1(101):84–90 (In Russ.).
37. *Mahar AL, Compton C, Halabi S, Hess KR, Weiser MR, Groome PA*. Personalizing prognosis in colorectal cancer: A systematic review of the quality and nature of clinical prognostic tools for survival outcomes. *J Surg Oncol*. 2017;116(8):969–982. DOI: 10.1002/jso.24774.

### Информация об авторах

Татьяна Ивановна Шевченко – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии ДонНМУ им. М. Горького.  
Данил Сергеевич Швороб – ординатор кафедры патологической анатомии ДонНМУ им. М. Горького.

### Author information

Tatiana I. Shevchenko – Dr. Sci. (Med.), Professor of Pathological Anatomy Department of M. Gorky Donetsk National Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2073-9772>

Danil S. Shvorob – Resident of Pathological Anatomy Department of M. Gorky Donetsk National Medical University. <https://orcid.org/0000-0001-6578-0050>

## Корреляция молекулярно-биологического подтипа первичной опухоли и регионарных метастазов у пациенток с раком молочной железы

Ю.А. Дергунова<sup>1</sup>, В.В. Родионов<sup>2</sup>, Л.М. Михалева<sup>3</sup>,  
В.В. Кометова<sup>2</sup>, Е.А. Кудинова<sup>4</sup>, В.К. Боженко<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, Ульяновск, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России, Москва, Россия

*Введение.* Рецепторы к эстрогенам и прогестерону, рецептор HER2/neu и индекс пролиферативной активности Ki-67 являются ключевыми молекулярно-биологическими маркерами в выборе тактики адъювантного лечения рака молочной железы. Биологические характеристики метастаза в регионарном лимфатическом узле могут быть различными с иммунофенотипом первичного опухолевого узла, что целесообразно учитывать для более адекватного планирования адъювантной терапии. Цель исследования – изучить вариабельность гормонального статуса, уровня экспрессии HER2/neu и индекса пролиферативной активности Ki-67 между первичной опухолью и метастазом в регионарном лимфатическом узле, а также оценить влияние данного феномена на смену биологического фенотипа рака молочной железы.

*Материалы и методы.* В исследование включены 100 пациенток с морфологически верифицированным инвазивным раком молочной железы T1–4N+M0. Уровень экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону, HER2-статус и индекс пролиферативной активности Ki-67 определялись иммуногистохимически в первичной опухоли и в регионарном метастазе.

*Результаты.* Изменение гормонального статуса метастатической опухоли зафиксировано в семи случаях. В двух случаях метастатическая опухоль приобрела экспрессию HER2/neu. Опухолевая ткань метастаза характеризовалась более высокой пролиферативной активностью по сравнению с тканью первичной опухоли. Повышение Ki-67 зафиксировано в 48 случаях, из них в 15 – с преодолением порогового значения (31,25%). По данным корреляционного анализа метастатическая опухоль по сравнению с первичной опухолью молочной железы имеет схожие статусы эстрогеновых ( $r=0,94$ ) и прогестероновых рецепторов ( $r=0,89$ ), уровень экспрессии HER/2 ( $r=0,91$ ) и индекс пролиферативной активности Ki-67 ( $r=0,83$ ). Вместе с тем имеющиеся изменения в биологических характеристиках метастаза привели к смене его молекулярно-биологического подтипа в 21% случаев.

*Выводы.* Первичная опухоль молочной железы и метастазы в регионарные лимфатические узлы демонстрируют сильные прямые корреляции. Вместе с тем имеющиеся изменения в биологических характеристиках метастаза привели к смене его молекулярно-биологического подтипа по сравнению с первичной опухолью у каждой пятой пациентки.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, регионарные метастазы, молекулярно-генетические маркеры, биология опухоли, корреляция.

**Для корреспонденции:** Юлия Анатольевна Дергунова. E-mail: [dergunova.yu@mail.ru](mailto:dergunova.yu@mail.ru)

**Для цитирования:** Дергунова Ю.А., Родионов В.В., Михалева Л.М., Кометова В.В., Кудинова Е.А., Боженко В.К. Корреляция молекулярно-биологического подтипа первичной опухоли и регионарных метастазов у пациенток с раком молочной железы. Клини. эксп. морфология. 2020;9(2):33–39. DOI:10.31088/СЕМ2020.9.2.33-39

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика В.И. Кулакова Минздрава России (НИОКТР АААА-А18-118053190016-7 от 31.05.2018).

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

**Статья поступила** 11.11.2019. **Получена после рецензирования** 21.01.2020. **Принята в печать** 11.02.2020.

## Correlation of the molecular biological subtype of primary tumor and regional metastases in breast cancer patients

Yu.A. Dergunova<sup>1</sup>, V.V. Rodionov<sup>2</sup>, L.M. Mikhaleva<sup>3</sup>,  
V.V. Kometova<sup>2</sup>, E.A. Kudinova<sup>4</sup>, V.K. Bozhenko<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Regional Clinical Oncology Center, Ulyanovsk, Russia

<sup>2</sup> V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Russian Scientific Center of X-ray Radiology of Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

**Introduction.** Estrogen and progesterone receptors, Her2/neu and level of proliferative activity are the key molecular biomarkers guiding the choice of adjuvant therapy in breast cancer patients. Biological characteristics of metastatic regional lymph nodes may differ from the phenotype of the primary tumor node and should be taken into account for more appropriate adjuvant therapy planning. The aim of the study was to evaluate the variability of hormonal receptor status, Her2/neu expression and level of proliferative activity between the primary tumor and regional lymph node metastases and to assess the effect of this phenomenon on the change in the biological phenotype of breast cancer.

**Materials and methods.** The study included 100 patients with morphologically verified invasive breast cancer T1–4N+M0. The estrogen and progesterone receptor expression, HER2 status, and proliferative activity index of Ki-67 were evaluated by immunohistochemistry in the primary tumor and regional metastases.

**Results.** In 7 cases hormonal status of metastatic tumor differed from the primary site. In 2 cases metastatic tumor acquired HER2 expression. Metastatic tumor tissue showed higher proliferative activity than the primary site. An increase in Ki-67 was recorded in 48 cases of which 15, with overcoming the threshold value (31.25%). Correlation analysis revealed that metastatic tumor had similar status of estrogen receptors ( $r = 0.94$ ), progesterone receptors ( $r=0.89$ ), level of HER2 expression ( $r = 0.91$ ) and Ki-67 ( $r=0.83$ ) vs. the primary tumor. However, the existing changes in the biological characteristics of metastatic tumor contributed to changes in its molecular subtype in 21% of cases.

**Conclusion.** Primary tumor and regional lymph node metastases show strong direct correlations. However, existing changes in the biological characteristics of metastasis led to the change in molecular-biological subtype compared with the primary tumor in every fifth patient.

**Keywords:** breast cancer, regional lymph node metastases, molecular biomarkers, tumor biology, correlation.

**Corresponding author:** Yulia A. Dergunova. E-mail: dergunova.yu@mail.ru

**For citation:** Dergunova Yu.A., Rodionov V.V., Mikhaleva L.M., Kometova V.V., Kudinova E.A., Bozhenko V.K. Correlation of the molecular biological subtype of primary tumor and regional metastases in breast cancer patients. Clin. exp. morphology. 2020;9(2):33–39 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.33-39

**Funding.** The work is done in the framework of the state assignment of National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation (НИОКТРАААА-А18-118053190016-7 от 31.05.2018).

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

**Received** 11.11.2019. **Received in revised form** 21.01.2020. **Accepted** 11.02.2020.

### Введение

Рецепторы к эстрогенам и прогестерону (ЭР и ПР), рецептор HER2/neu и индекс пролиферативной активности Ki-67 являются ключевыми молекулярно-биологическими маркерами в выборе тактики адъювантного лечения рака молочной железы (РМЖ). Определение экспрессии ЭР, ПР, HER2/neu и Ki-67 выполняется в ткани первичной опухоли, но этот подход не учитывает потенциальные расхождения между первичной опухолью и метастазами. Вместе с тем в многочисленных исследованиях показано, что опухолевые клетки метастаза могут иметь иные биологические характеристики и более злокачественный фенотип по сравнению с клетками первичной опухоли. По данным некоторых научных работ, посвященных изучению дискордант-

ности иммунофенотипа первичной опухоли молочной железы и синхронного метастаза подмышечного лимфоузла, изменения в экспрессии ЭР достигают уровня 28%, а экспрессия HER2 может меняться в 25% [1–6]. Исходя из этого, биологические особенности метастатического узла, вероятно, необходимо учитывать для более адекватного прогноза заболевания и планирования адъювантной терапии.

**Цель исследования.** Настоящая работа посвящена анализу variability гормонального и HER2-статуса, а также индекса пролиферативной активности Ki-67 между первичной опухолью и синхронным метастазом и оценке влияния данного феномена на изменение молекулярно-биологических подтипов у пациенток с РМЖ.

## Материалы и методы

В исследование были включены 100 пациенток с морфологически верифицированным инвазивным раком молочной железы T1–4N+M0. Всем пациенткам выполнено хирургическое вмешательство в областном клиническом онкологическом диспансере Ульяновска в период с 2012 по 2015 год. Критериями исключения пациенток из исследования стали неoadъювантная терапия и наличие злокачественных новообразований других локализаций до постановки диагноза «рак молочной железы».

Экспрессия эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, индекс пролиферативной активности и HER2-статус определялись иммуногистохимическим методом (ИГХ) в первичной опухоли молочной железы и в метастатически пораженном подмышечном лимфатическом узле.

Исследование проводилось на фиксированных формалином парафинизированных срезах толщиной 4 мкм с использованием антител (Dako, Дания) к рецепторам эстрогена (клон 1D5, RTU); рецепторам прогестерона (клон PgR 636, изотип IgG1 kappa, RTU); к онкопротеину c-erbB-2 (рабочее разведение 1:2000); к Ki-67 (клон MIB-1, изотип IgG1 kappa). Процедура окрашивания проводилась в автоматическом иммуногистостейнере (Thermoscientific, Великобритания) по стандартным протоколам, постановка реакции сопровождалась позитивным и негативным контролем.

Оценка экспрессии ЭР и ПР в опухолевой ткани молочной железы осуществлялась полуколичественным методом по D.C. Allred в баллах [7]. Опухоли со значением от 0 до 2 баллов расценивались как гормонально негативные, от 3 до 8 баллов – как гормонально позитивные. Подсчет Ki-67 осуществлялся визуальным и автоматическим (с помощью программы Immuno Ratio) методами в 10 полях зрения при  $\times 400$ . Индекс пролиферативной активности определялся как процент окрашенных клеточных ядер в опухолевой паренхиме. Пороговым в нашем исследовании принято значение Ki-67, равное 20%. HER2/neu статус оценивался согласно рекомендациям ASCO/CAP Guideline for HER2 Testing in Breast Cancer [8]. При позитивной иммуногистохимической реакции в баллах 2+ производилось количественное определение амплификации гена HER2 с помощью использования двух хромогенных реакций *in situ* гибридизации.

Полученные данные обрабатывались на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010 и Statistica for Windows 8.0. (StatSoft Inc., США). Выбор основных характеристик и статистических критериев осуществляли после изучения распределения признака и его сравнения с распределением Гаусса по критерию Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Для признаков с распределением, значимо отличающимся от нормального, рассчитывали медиану, нижний и верхний квартили. Проводили корреляционный анализ Pearson (Spearman

для непараметрических данных) с расчетом коэффициента корреляции и уровня его значимости. Результаты расценивались как статистически значимые при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Первичная опухоль молочной железы оказалась гормонально позитивной у 83 женщин из 100 (83%). Наличие в опухоли экспрессии ЭР и ПР было выявлено в 64 случаях (ЭР+ПР+), экспрессия только рецепторов эстрогенов, без экспрессии прогестероновых рецепторов (ЭР+ПР–), – в 19 случаях. Гормонально негативные опухоли диагностированы у 17 пациенток (17%).

Сравнение уровня экспрессии ЭР и ПР в первичной опухоли и региональных метастазах обнаружило изменение гормонального статуса метастатической опухоли в семи случаях. Наибольшей вариабельностью обладала экспрессия ПР, изменение рецепторного статуса было выявлено в шести случаях. При этом в четырех случаях произошла утрата экспрессии рецепторов прогестерона метастатической опухолью, а в двух – метастаз в лимфатическом узле, наоборот, приобрел экспрессию ПР. В одном случае опухолевая ткань метастатического узла отличалась отсутствием экспрессии ЭР по сравнению с первичной опухолью молочной железы. Случаи приобретения экспрессии эстрогеновых рецепторов в метастазе при их отсутствии в первичной опухоли выявлены не были.

В 15 первичных опухолях выявлена гиперэкспрессия HER2. Изменение экспрессии HER2 зафиксировано лишь в двух случаях, причем в обоих метастатическая опухоль приобрела экспрессию HER2 при HER2-негативном статусе первичной опухоли. Сопоставление рецепторного и HER2 статуса первичной опухоли и метастаза в лимфатическом узле представлено в таблице 1.

Исследования уровня Ki-67 в первичной опухоли и в ткани метастаза в лимфатический узел показали, что в большинстве случаев значение индекса пролиферативной активности в метастатической опухоли отличалось от значения в первичной опухоли (86%), и только в 14% случаев мы наблюдали идентичные значения индекса Ki-67 в первичной опухоли и в метастазе лимфатического узла.

В 38% случаев произошло снижение значений Ki-67 в метастазе по сравнению с первичной опухолью ( $p < 0,05$ ). В данной группе пациенток медиана значений индекса пролиферативной активности в первичной опухоли составила 22,5 (10%–9; 90%–53%), в метастатической опухоли медиана значений снизилась до 13 (10%–5; 90%–37%). При этом снижение Ki-67 с преодолением порогового значения произошло в пяти случаях из 38 (13,16%).

Увеличение индекса пролиферативной активности в метастатической опухоли по сравнению с первичной выявлено в 48% случаев ( $p < 0,05$ ). Медиана значений Ki-67 в первичной опухоли составила 16 (10%–7; 90%–39%), в метастатической опухоли медиана возросла до

## Сопоставление рецепторного и HER2 статуса первичной опухоли и метастаза в лимфатическом узле

## Comparison of the hormonal receptors expression and HER2/neu status in the primary tumor and in the lymph node metastasis

Экспрессия гормональных рецепторов и онкопротенна HER2/neu   Hormonal receptors expression and HER2/neu status	Первичная опухоль, экспрессия/статус   Primary tumor, expression/status	Метастаз в лимфатическом узле, экспрессия/статус   Lymph node metastasis, expression/status	Число случаев   Number of cases, %
ЭР   ER	Негативная   Negative	Негативная   Negative	17
ЭР   ER	Негативная   Negative	Позитивная   Positive	0
ЭР   ER	Позитивная   Positive	Негативная   Negative	1
ЭР   ER	Позитивная   Positive	Позитивная   Positive	82
ПП   PR	Негативная   Negative	Негативная   Negative	34
ПП   PR	Негативная   Negative	Позитивная   Positive	2
ПП   PR	Позитивная   Positive	Негативная   Negative	4
ПП   PR	Позитивная   Positive	Позитивная   Positive	60
HER2/neu	Негативная   Negative	Негативная   Negative	83
HER2/neu	Негативная   Negative	Позитивная   Positive	2
HER2/neu	Позитивная   Positive	Негативная   Negative	0
HER2/neu	Позитивная   Positive	Позитивная   Positive	15

ЭР – рецепторы к эстрогену, ПР – рецепторы к прогестерону  
ER – estrogen receptors, PR – progesteron receptors

23 (10%–11; 90%–44%). Повышение данного показателя с преодолением порогового значения зафиксировано в 15 случаях из 48 (31,25%).

Нами проведен корреляционный анализ для определения степени взаимосвязи молекулярно-биологических параметров в первичной и метастатической опухоли.

В отношении экспрессии ЭР и ПР в метастатической и первичной опухоли выявлена сильная прямая линейная зависимость, коэффициент корреляции ( $r$ ) для данных значений составил 0,94 и 0,89, соответственно, и был статистически значим ( $p < 0,05$ ). Таким образом, между значениями ЭР и ПР в метастазе лимфатического узла и таковыми значениями в первичной опухоли молочной железы выявлена тесная взаимосвязь, доля объясняемой дисперсии, рассчитанная по формуле:  $r^2 \times 100\%$  (доля вариабельности одного признака, зависящего от вариабельности второго признака), составила 88% и 79% для каждого параметра, соответственно.

Для значений HER2/neu в метастазе и в первичной опухоли молочной железы также выявлена сильная прямая линейная зависимость,  $r = 0,91$  ( $p < 0,05$ ). Доля объясняемой дисперсии равна 82%.

Коэффициент корреляции для значений индекса пролиферативной активности оказался несколько ниже по сравнению с описанными выше параметрами и составил 0,83 ( $p < 0,05$ ). Уравнение регрессии выглядит следующим образом:  $Ki-67$  в метастатической опухоли =  $3,65 + 0,81 \times Ki-67$  в первичной опухоли. Из всего описанного можно сделать вывод, что между значением  $Ki-67$  в метастазе лимфатического узла и зна-

чением  $Ki-67$  в первичной опухоли имеется линейное соотношение, однако доля объясняемой дисперсии составила лишь 68% (рис. 1).

В целом метастатическая опухоль по сравнению с первичной опухолью молочной железы имеет схожий уровень экспрессии гормональных рецепторов и HER2/neu статус. В отношении  $Ki-67$  в большинстве случаев выявлена значительная вариабельность, но изменения (как в сторону увеличения, так и в сторону снижения) индекса пролиферативной активности с преодолением

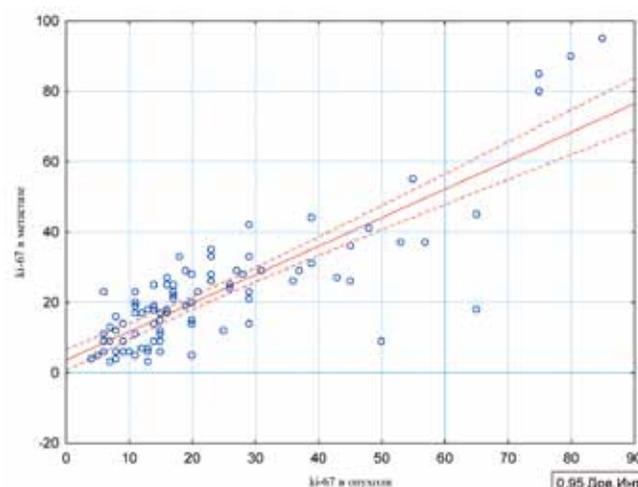


Рис. 1. Диаграмма множественной линейной регрессии зависимости уровня  $Ki-67$  в метастазе от уровня  $Ki-67$  в первичной опухоли

Fig. 1. Diagram of multiple linear regression of the  $Ki-67$  level in metastasis versus  $Ki-67$  in the primary tumor

ем порогового значения были выявлены только в 20 из 86 случаев (23,26%). Все параметры демонстрируют сильные прямые линейные зависимости согласно корреляционному анализу. Наиболее часто диагностируемыми подтипами в исследуемой группе стали люминальный А и люминальный В HER2-негативный подтипы: 54 случая (54%) и 22 случая (22%), соответственно. Трижды негативный РМЖ диагностирован у девяти пациенток (9%). HER2-позитивный нелюминальный вариант РМЖ выявлен у восьми пациенток (8%). Люминальный В HER2-позитивный подтип выявлен в наиболее малочисленной группе пациенток, только у семи из 100 (7%).

Имеющиеся изменения в молекулярных характеристиках метастатической опухоли привели к смене ее молекулярно-биологического подтипа по сравнению с первичной опухолью молочной железы. Преимущественно изменения касались перехода люминального А подтипа в люминальный В HER2-негативный подтип, обусловленного возросшим значением индекса Ki-67. Нами выявлено 11 подобных случаев.

В семи случаях люминального В HER2-негативного рака молочной железы метастатическая опухоль в лимфатическом узле характеризовалась более низким индексом пролиферативной активности и приобрела иммунофенотип люминального А подтипа рака.

Приобретение метастатической опухолью гиперэкспрессии HER2/neu зафиксировано в двух случаях, что привело к изменению люминального В HER2-негативного подтипа первичной опухоли на люминальный В HER-позитивный подтип в ее метастазе.

Утрата в одном из случаев экспрессии ЭР в метастазе лимфатического узла привела к переходу его в категорию трижды негативного подтипа рака при люминальном А подтипе первичной опухоли.

Таким образом, в 21 случае из 100 (21%) биология опухоли в регионарном метастазе изменилась по сравнению с первичным раком молочной железы (табл. 2).

## Обсуждение

Обнаружение метастатических лимфатических узлов при РМЖ является важнейшей диагностической задачей, и ее успешное решение определяет эффективность планируемого лечения [9]. В последнее время наравне с определением наличия метастазов большое значение стали придавать вопросам диагностики генетической и фенотипической гетерогенности метастазов и первичной опухоли. В частности, показано, что частота несоответствия экспрессии ЭР в первичной и метастатической опухоли, по данным литературы, достигает 28,3% [1–3]. Чаще авторы отмечают утрату экспрессии ЭР в метастатических регионарных лимфатических узлах. Разница в HER2-статусе первичного опухолевого узла и синхронного метастаза колеблется от 4,7 до 25,5% [4–6]. При этом выявляется как приобретение, так и утрата экспрессии онкобелка HER2/neu метастатической опухолью по сравнению с первичным опухолевым узлом.

В нашем исследовании утрата экспрессии рецепторов эстрогенов метастатической опухолью зафиксирована лишь в 1% случаев. Частота изменения HER2-статуса также оказалась не такой высокой по сравнению с данными литературы и составила 2%, при этом нами выявлены только случаи приобретения гиперэкспрессии HER2/neu метастатической опухолью при HER-негативном статусе первичного опухолевого узла.

Сравнению экспрессии Ki-67 в первичной опухоли и в ткани регионарного метастаза посвящено не так много работ [10]. Ранее сообщалось, что медиана значений экспрессии Ki-67 в первичных и метастатических опухолях составляет 20% и 15%, соответственно [11]. В ряде исследований было показано, что для метастаза в подмышечном лимфатическом узле характерно более высокое значение Ki-67 по сравнению с первичной опухолью молочной железы [12–15]. Аналогичные результаты получены и в этой работе. По нашим данным, индекс пролиферативной активности оказался самым вариабельным параметром (снижение/увеличение зафиксированы в 86% случаях), что объясняется осо-

Таблица 2 | Table 2

Частота изменения биологических подтипов метастатической опухоли по сравнению с первичной опухолью молочной железы

The frequency of the biological subtype changes of a metastatic tumor compared to the primary breast tumor

Изменение молекулярно-биологического подтипа   Change in molecular biological subtype	Число случаев   Number of cases
Люминальный А → Люминальный В HER2-негативный   Luminal A → Luminal B (HER2-negative)	11
Люминальный В → HER2-негативный Люминальный А   Luminal B (HER2-negative) → Luminal A	7
Люминальный В HER2-негативный → Люминальный В HER2-позитивный   Luminal B (HER2-negative) → Luminal B (HER2-positive)	2
Люминальный А → Трижды негативный   Luminal A → Triple-negative	1

бенностями его подсчета. В общем, пролиферативная активность опухолевых клеток в ткани метастаза оказалась выше по сравнению с первичной опухолью, однако изменения Ki-67 с преодолением порогового значения, равного 20%, были выявлены лишь в 15% случаев.

Корреляционный анализ, проведенный с целью определения степени взаимосвязи молекулярно-биологических характеристик первичной опухоли и ее синхронного метастаза, показал сильные прямые зависимости данных параметров. Однако изменения отдельных параметров метастатической опухоли влияют на смену ее молекулярно-биологического подтипа по сравнению с первичной опухолью молочной железы. В исследованных нами образцах в 21% случаев иммунофенотип метастатической опухоли отличался от такового в первичной опухоли.

### Заключение

В целом метастатическая опухоль молочной железы по сравнению с первичной обладает схожим статусом экспрессии ЭР ( $r=0,94$ ) и ПР ( $r=0,89$ ), HER2/neu статус ( $r=0,91$ ) и индексом пролиферативной активности Ki-67 ( $r=0,83$ ), демонстрируя сильные прямые корреляции. Вместе с тем имеющиеся изменения в биологических характеристиках метастаза привели к смене его молекулярно-биологического подтипа по сравнению с первичной опухолью в 21% случаев. Несмотря на схожесть иммунофенотипа первичной и метастатической опухоли, представляется целесообразным определение экспрессии рецепторов стероидных гормонов, HER2-статуса и индекса пролиферативной активности в метастатическом лимфатическом узле и учитывание этих данных при планировании адъювантного лечения.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.В. Родионов.

Сбор и обработка материала – Ю.А. Дергунова, Е.А. Кудинова, В.В. Кометова.

Написание текста – Ю.А. Дергунова, В.К. Боженко.

Редактирование – Л.М. Михалева, В.В. Кометова.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.V. Rodionov.

Collected the data and performed the analysis – Yu.A. Dergunova, E.A. Kudinova, V.V. Kometova.

Wrote the paper – Yu.A. Dergunova, V.K. Bozhenko.

Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva, V.V. Kometova.

### Литература/References

1. Wu PH, Phillip JM, Khatau SB, Chen WC, Stirman J, Rosseel S et al. Evolution of cellular morpho-phenotypes in cancer metastasis. *Sci Rep*. 2015;5: 18437. DOI: 10.1038/srep18437.
2. Kimbung S, Loman N, Hedenfalk I. Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases. *Semin Cancer Biol*. 2015;35:85–95. DOI: 10.1016/j.semcancer. 2015.08.009.
3. Aitken SJ, Thomas JS, Langdon SP, Harrison DJ, Faratian D. Quantitative analysis of changes in ER, PR and HER2 expression in primary breast cancer and paired nodal metastases. *Ann Oncol*. 2010;21(6):1254–61. DOI: 10.1093/annonc/mdp427.
4. Wang Y, Song KY, Wang JF. Expression of oncogene c-erbB-2 and its relationship with clinicopathologic factors in infiltrating ductal breast cancer and metastatic axillary lymph nodes. *Chin J Curr Adv Gen Surg*. 2009;12(02):123–6. DOI:10.3969/j.issn.1009-9905.2009.02.008.
5. Zhao S, Xu L, Liu W, Lv C, Zhang K, Gao H et al. Comparison of the expression of prognostic biomarkers between primary tumor and axillary lymph node metastases in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):5744–8.
6. Ieni A, Barresi V, Caltabiano R, Cascone AM, Del Sordo R, Cabibi D et al. Discordance rate of HER2 status in primary breast carcinomas versus synchronous axillary lymph node metastases: a multicenter retrospective investigation. *Oncotargets Ther*. 2014;7:1267–72. DOI: 10.2147/OTT.S65294.
7. С.В. Петров, Н.Т. Райхлин, Т.Р. Ахметов, И.А. Букаева, М. Вибберг, Л.Е. Гаганов и др. (ред.). Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. 4-е изд. Казань: DESIGN studio «RED», 2012. С. 402–404. SV Petrov, NT Raikhlin, TR Akhmetov, IA Bukaeva, M Vyberg, LE Gaganov, (eds.). Manual on immunohistochemical diagnostics of human tumors. 4th ed. Kazan: DESIGN studio «RED», 2012. P. 402–404 (In Russ.).
8. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18–43. DOI: 10.1043/1543-2165(2007)131[18:ASOCCO]2.0.CO;2.
9. Рожкова Н.И., Боженко В.К., Фомин Д.К., Плошница А.И., Тацан А.А., Кудинова Е.А. и др. Молекулярно-биологические и радиологические технологии в комплексной диагностике патологии аксиллярной области. Опухоли женской репродуктивной системы. 2009;3–4:25–28. Rozhkova NI, Bozhenko VK, Fomin DK, Ploshnitsa AI, Tashchan AA, Kudinova EA et al. Molecular biological and radiological technologies in the complex diagnosis of axillary pathology. *Tumors of female reproductive system*. 2009;3–4:25–28 (In Russ.).
10. Aboushousha T, Hammam O, Safwat G, Eesa A, Ahmed S, Esamat ME et al. Differential Expression of RAGE, EGFR and Ki-67 in Primary Tumors and Lymph Node Deposits of Breast Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(8):2269–77. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.8.2269.
11. Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O. Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant. *Hum Pathol*. 2013;44(1):39–46. DOI: 10.1016/j.humpath.2012.05.007.
12. Park D, Karesen R, Noren T, Sauer T. Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. *Virchows Arch* 2007;451(1):11–18. DOI: 10.1007/s00428-007-0435-2.
13. Buxant F, Anaf V, Simon P, Fayt I, Noël JC. Ki-67 immunostaining activity is higher in positive axillary lymph nodes than in the

- primary breast tumor. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;75(1):1–3. DOI: 10.1023/a:1016504129183.
14. *Tokes AM, Szasz AM, Geszti F, Lukács LV, Kenessey I, Turányi E et al.* Expression of proliferation markers Ki67, cyclin A, geminin and aurora-kinase A in primary breast carcinomas and corresponding distant metastases. *J Clin Pathol.* 2015;68(4):274–82. DOI: 10.1136/jclinpath-2014-202607.
15. *Коньшев К.В., Сазонов С.В., Бриллиант А.А.* Уровень экспрессии Ki67 в ткани первичной опухоли и регионарных метастазов при раке молочной железы. *Уральский медицинский журнал.* 2015;7(130):51–55.
- Konyshov KV, Sazonov SV, Brilliant AA.* Ki67 level in primary tumor and locoregional metastases of breast cancer. *Ural Medical Journal.* 2015;7(130):51–55 (In Russ.).

### Информация об авторах

Юлия Анатольевна Дергунова – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения Областного клинического онкологического диспансера.

Валерий Витальевич Родионов – доктор медицинских наук, заведующий отделением патологии молочной железы НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека.

Влада Владимировна Кометова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник патологоанатомического отделения НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Владимир Константинович Боженко – доктор медицинских наук, профессор, консультант директора НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова, руководитель отдела молекулярной биологии и экспериментальной терапии НМИЦ рентгенодиагностики.

Елена Александровна Кудинова – доктор медицинских наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией НМИЦ рентгенодиагностики.

### Author information

Yulia A. Dergunova – Pathologist, Pathology Department, Ulyanovsk Regional Clinical Oncology Center. <https://orcid.org/0000-0002-7499-2650>

Valery V. Rodionov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Breast Pathology, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0003-0096-7126>

Lyudmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director of the Research Institute of Human Morphology, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Vlada V. Kometova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Pathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0001-9666-6875>

Vladimir K. Bozhenko – Dr. Sci. (Med.), Adviser to the Director, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Head of the Department of Molecular Biology and Experimental Therapy, RSC of Roentgenradiology. <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>

Elena A. Kudinova – Dr. Sci. (Med.), Head of Clinical Diagnostic Laboratory, RSC of Roentgenradiology. <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>

## Морфологическая характеристика и иммунофенотип светлоклеточных почечно-клеточных карцином

Ю.И. Османов, Е.А. Коган, Г.А. Демяшкин, Р.Г. Нугуманов

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

*Введение.* В общей структуре онкологической патологии почечно-клеточная карцинома занимает 10-е место среди всех злокачественных новообразований. Несмотря на то, что стандартом лечения почечно-клеточных карцином является хирургическое удаление опухоли, до сих пор не решены некоторые вопросы по лечебной тактике, которые напрямую связаны с прогнозом заболевания. Исходя из этого, на сегодняшний день большой клинический интерес представляет изучение зависимости поведения опухоли от ее гистологического варианта. Гетерогенность группы почечно-клеточных карцином со светлой цитоплазмой создает определенные сложности в дифференциальной диагностике и корректной морфологической верификации этих новообразований. Цель исследования – изучить морфологические и иммунофенотипические особенности редких вариантов почечно-клеточной карциномы со светлой цитоплазмой.

*Материалы и методы.* Исследование выполнено на операционном материале, полученном от 264 пациентов с опухолью почки. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах по стандартному протоколу с использованием широкой панели антител.

*Результаты.* На основании морфологического анализа и иммуногистохимического исследования опухоли были распределены на четыре группы: кистозные опухоли почки с низкой ядерной градацией (n=65; 25%); опухоли почки солидного и/или тубуло-папиллярного строения с низкой ядерной градацией (n=98; 37%); опухоли почки с высокой ядерной градацией (n=94; 36%); полифазные почечно-клеточные карциномы (n=7; 2,7%).

*Выводы.* Полученные результаты позволяют утверждать, что среди морфологических форм светлоклеточной почечно-клеточной карциномы существует прямая связь между степенью ядерной градации и гистологической картиной опухоли.

**Ключевые слова:** почечно-клеточная карцинома, атипичная киста почки, иммуногистохимия.

**Для корреспонденции:** Юсиф Исламович Османов. E-mail: osmanovyouseef@yandex.ru

**Для цитирования:** Османов Ю.И., Коган Е.А., Демяшкин Г.А., Нугуманов Р.Г. Морфологическая характеристика и иммунофенотип светлоклеточных почечно-клеточных карцином. Клини. эксп. морфология. 2020;9(2):40–51. DOI:10.31088/CEM2020.9.2.40-51

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

Статья поступила 05.02.2020. Получена после рецензирования 11.03.2020. Принята в печать 14.05.2020.

## Morphological characteristics and immunophenotype of clear cell renal cell carcinomas

Y.I. Osmanov, E.A. Kogan, G.A. Demyashkin, R.G. Nugumanov

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

*Introduction.* In the general structure of oncological pathology, renal cell carcinoma takes the 10th place among all malignant neoplasms. Despite the fact that surgical removal of the tumor is the standard treatment for renal cell carcinomas, some issues regarding therapeutic tactics that are directly related to the prognosis of the disease have not yet been resolved. Based on this, a large clinical interest today is the study of the dependence of tumor behavior on its histological variant. The heterogeneity of the group of renal cell carcinomas with bright cytoplasm creates certain difficulties in the differential diagnosis and correct morphological verification of these tumors. The aim was to study of the morphological and immunophenotypic features of rare variants of the renal cell carcinoma with clear cytoplasm.

*Materials and methods.* Surgical specimens from 264 patients diagnosed with renal neoplasms were investigated. Paraffin sections were immunohistochemically examined using the standard protocol with a wide panel of antibodies.

**Results.** Based on the morphological analysis and immunohistochemical assay, the tumors were divided into 4 groups as follows: renal cystic tumors with low nuclear grading (n=65; 25%); tumors of a kidney of a solid and/or tubulo-papillary structure with low nuclear grading (n=98; 37%); renal tumors with high nuclear grading (n=94; 36%); and polyphase renal cell carcinomas (n=7; 2.7%).

**Conclusion.** The results obtained suggest that there is a direct link between the degree of nuclear grading and the histological pattern of the tumor among the morphological forms of clear cell renal cell carcinoma.

**Keywords:** renal cell carcinoma, atypical renal cyst, immunohistochemistry.

**Corresponding author:** Yoseef I. Osmanov. Email: osmanovyouseef@yandex.ru

**For citation:** Osmanov Y.I., Kogan E.A., Demyashkin G.A., Nugumanov R.G. Morphological characteristics and immunophenotype of clear cell renal cell carcinomas. Clin. exp. morphology. 2020;9(2):40–51 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.40-51

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

**Received** 05.02.2020. **Received in revised form** 11.03.2020. **Accepted** 14.05.2020.

В общей структуре онкологической патологии почечно-клеточная карцинома (ПКК) занимает 10-е место среди всех злокачественных новообразований. Рост заболеваемости наблюдается с возраста 35–40 лет и достигает максимума к 65–70 годам. Мужчины страдают данной патологией в 2 раза чаще, чем женщины. Несмотря на то, что стандартом лечения почечно-клеточной карциномы является хирургическое удаление опухоли, до сих пор не решены некоторые вопросы по лечебной тактике, которые напрямую связаны с ее прогнозом. Исходя из этого, на сегодняшний день большой клинический интерес представляет изучение зависимости поведения опухоли от ее гистологического варианта [1–3]. Оценку прогностической значимости также усложняет высокая гетерогенность группы почечно-клеточных карцином со светлой цитоплазмой. Из-за этого возникают определенные сложности в дифференциальной диагностике и корректной морфологической верификации этих новообразований [4–6].

*Целью* настоящего исследования стало изучение морфологических и иммунофенотипических особенностей редких вариантов почечно-клеточных карцином со светлой цитоплазмой.

## Материалы и методы

*Клинические данные.* Объектом исследования послужил архивный биопсийный материал от 264 больных (138 мужчин и 126 женщин) в возрасте от 18 до 76 лет, проходивших хирургическое лечение в урологической клинике Первого МГМУ им. И.М. Сеченова и урологическом центре Научного клинического центра (НКЦ) ОАО РЖД по поводу опухоли почки в период с 2011 по 2017 год.

*Гистологическое исследование.* Степень злокачественности ПКК (G) оценивали по четырехуровневой системе градации согласно классификации ВОЗ/ISUP 2016 года. Уровень инвазии (pT1–T4) определяли согласно протоколу 8-го издания TNM-классификации опухолей мочевыделительной системы [7–8].

*Иммуногистохимическое исследование (ИГХ).* Серийные срезы толщиной 5 мкм депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. Для де-

маскировки антигенов срезы инкубировали 5 минут с 3% раствором перекиси водорода, подвергали высокотемпературной обработке в цитратном буфере (для каждого антитела в соответствии с рекомендуемым протоколом). Список использованных антител приводится в таблице 1.

Для оценки иммуногистохимической реакции подсчитывали количество антигенположительных клеток в 10 полях зрения микроскопа (×400), затем определяли уровень реакции по формуле: оценка экспрессии маркера = число антигенположительных клеток в 10 полях зрения микроскопа × 100/общее количество клеток. ИГХ реакцию оценивали как негативную – 0 (менее 0,1% окрашенных клеток), слабо позитивную – 1 (10% окрашенных клеток и менее), умеренно позитивную – 2 (11–49% окрашенных клеток), сильно позитивную – 3 (50–89% окрашенных клеток) и выраженно позитивную – 4 (90% окрашенных клеток и более) по J. Rajcani et al. [9].

## Результаты и обсуждение

На основании морфологического анализа и иммуногистохимического исследования опухоли были распределены на четыре группы: кистозные опухоли почки с низкой ядерной градацией; опухоли почки солидного и/или тубуло-папиллярного строения с низкой ядерной градацией; опухоли почки с высокой ядерной градацией; полифазные почечно-клеточные карциномы (табл. 2).

В группу кистозных опухолей почки с низкой ядерной градацией вошли 65 случаев (25%) (39 мужчин и 26 женщин в возрасте от 41 до 72 года, средний возраст 60 лет).

*Мультилокулярная кистозная опухоль почки с низким потенциалом малигнизации (МКОПНПМ).* В 21 наблюдении (8%) отграниченный фиброзный капсулой от окружающей почечной паренхимы узел состоял из разнокалиберных кист, наполненных серозным и/или геморрагическим содержимым. На светооптическом уровне разделенные фиброзными септами кисты были выстланы однослойным кубическим эпителием со светлой цитоплазмой. Во всех образцах в септах

Панель использованных в исследовании антител  
Panel of antibodies used in the study

Антитела  Antibodies	Клон   Clone	Производитель   Manufacturer	Разведение   Dilution	Источник   Source
СК 7	RN7	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
СК 8/18	5D3	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
СК19	B170	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
НМВСК	34βE12	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
ЕМА	E29	Cell Marque	RTU	Мышь   Mouse
Vimentin	V9	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
CD10	56C6	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
CD57	NK-1	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
CD117	T595	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
E-Cadherin	36B5	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
MUC-1	MRQ-17	Cell Marque	RTU	Мышь   Mouse
Caveolin-1	ab18199	Abcam	1:200	Мышь   Mouse
Parvalbumin	2E11	Cell Marque	RTU	Кролик   Rabbit
EpCAM	VU1D9	Novocastra	1:200	Мышь   Mouse
KSC	MRQ33	Cell Marque	1:50	Мышь   Mouse
PAX2	EP235	Cell Marque	RTU	Мышь   Mouse
PAX8	EP298	Cell Marque	RTU	Кролик   Rabbit
DOG1	K9	Novocastra	RTU	Кролик   Rabbit
CAM5.2	CAM5.2	Novocastra	1:50	Мышь   Mouse
МОС31	МОС31	Dako	1:200	Мышь   Mouse
S100A1	EO184	Cell Marque	1:100	Мышь   Mouse
MiTF	D5	Dako	1:50	Кролик   Rabbit
SMA	sm-1α	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
MelanA	A103	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
HMB-45	II-1	Dako	RTU	Мышь   Mouse
CathK	3F9	Cell Marque	1:100	Мышь   Mouse
GST-α	GST.B6	Novocastra	1:100	Мышь   Mouse
RCC	SPM314	Dako	RTU	Мышь   Mouse
AMACR	13H4	Dako	RTU	Кролик   Rabbit
AE1/AE3	AE1+AE3	Novocastra	RTU	Мышь   Mouse
CAIX	M75	Dako	1:200	Мышь   Mouse
ER	6F11	Novocastra	RTU	Кролик   Rabbit
PR	16	Novocastra	RTU	Кролик   Rabbit
TFEB	3E1-G6	Novocastra	1:100	Кролик   Rabbit
NapsinA	IP64	Novocastra	1:200	Мышь   Mouse
TFE3	MRQ-37	Cell Marque	RTU	Мышь   Mouse

RTU – готовые к применению.

RTU – ready-to-use.

Таблица 2 | Table 2

**Распределение случаев в зависимости от гистологического строения**  
**The distribution of cases depending on the histological structure**

Морфология   Morphology	N									
	65	pT <sub>1</sub>	pT <sub>2</sub>	pT <sub>3</sub>	pT <sub>4</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>	
Кистозные опухоли почки с низкой ядерной градацией   Kidney cystic tumors with low nuclear gradation	65	pT <sub>1</sub>	pT <sub>2</sub>	pT <sub>3</sub>	pT <sub>4</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>3</sub>	G <sub>4</sub>	
Мультилокулярная кистозная опухоль почки с низким потенциалом малигнизации   Multilocular cystic kidney tumor with low malignancy potential	21	21				19	2			
СПКК макрокистозного строения с регрессией   Macrocytic structured CCRCC with regression	33	26	7			28	5			
СППКК кистозного строения   Cystic structured CCRCC	1	1				1				
Кистозная нефрома   Cystic nephroma	5									
Атипичная киста почки / Atypical kidney cyst	5									
Опухоли почки солидного и/или тубуло-папиллярного строения с низкой ядерной градацией   Kidney tumors of a solid and/or tubulopapillary structure with low nuclear gradation	98									
ХПКК-подобная СПКК   CRCC-like CCRCC	19	17	2				19			
ХПКК   CRCC	35	34	1							
СПКК с участками папиллярного строения   CCRCC with areas of papillary structure	28	23	5			5	23			
СППКК-подобная СПКК   CCRCC-like CCRCC	12	12				12				
СППКК   CCRCC	4	4				4				
Опухоли почки с высокой ядерной градацией   Kidney tumors with high nuclear gradation	94									
СПКК с многоядерным синцитиальным компонентом   CCRCC with a multinuclear syncytial component	4	1	2	1						4
СПКК с эмпириоплезом и рабдоидной дедифференциацией   CCRCC with empiopiosis and rhabdoid dedifferentiation	7/19	1/5	3/12	2/2	1/0					7/19
СПКК с эозинофильно-клеточным компонентом и участками папиллярного роста   CCRCC with eosinophilic cell component and papillary growth sites	21	6	9	4	2					21
Комбинированная ППКК со светлоклеточным компонентом   Combined PRCC with a clear cell component	25	16	9	0	0					25
ПКК, ассоциированная с приобретенной кистозной болезнью   RCC associated with acquired cystic disease	2	2								2
MiTF-ассоциированная ПКК (TFE3/TFEB-позитивная)   MiTF-associated RCC (TFE3/TFEB-positive)	4/3	0/3	3/0	1/0						4/3
Неклассифицируемая ПКК со светлоклеточным компонентом   Unclassified RCC with clear cell component	3	0	0	2	1					3
Эпителиоидная ангиомиолипома со светлоклеточным компонентом   Epithelioid angiomyolipoma with a clear cell component	6									
Опухоли почки полифазного строения   Polyphase kidney tumors	7									
ПКК с лейомиоматозной стромой   RCC with leiomyomatous stroma	2	2				1	1			
СПКК в сочетании с ангиомиолипомой   CCRCC in combination with angiomyolipoma	2	1	1			1	1			
СПКК в сочетании со смешанной эпителиальной и стромальной опухолью   CCRCC in combination with a mixed epithelial and stromal tumor	1	1				1				
Ангиомиоаденоматозная опухоль почки   Angiomyoadenomatous tumor of kidney	2	2				2				
Всего   Total	264	178	54	12	4	74	51	58		30

СПКК – светлоклеточная почечно-клеточная карцинома; СППКК – светлоклеточная папиллярная почечно-клеточная карцинома; ХПКК – хромофобная почечно-клеточная карцинома; ППКК – папиллярная почечно-клеточная карцинома; ПКК – почечно-клеточная карцинома.  
 CCRCC – clear cell renal cell carcinoma; CCRCC – clear cell papillary cell carcinoma; CRCC – chromophobic renal cell carcinoma; PRCC – papillary renal cell carcinoma; RCC – renal cell carcinoma.

также были обнаружены единичные небольшие кластеры из светлых клеток (рис. 1 А). В 19 наблюдениях степень ядерной градации соответствовала G1, а в двух опухолях – G2. Во всех случаях выявлена стадия pT1. При иммуногистохимическом исследовании во всех новообразованиях выявлена сильно и выражено позитивная цитоплазматическая реакция на CK7, AE1/AE3, CAM5.2, EMA, PAX8 и полная мембранная экспрессия CA9. Положительная реакция на HMWCK доминировала в выражено позитивном диапазоне. Экспрессия CK8/18, CK19, S100A1, MUC-1, PAX2, Vimentin и RCCm варьировала в широком диапазоне, а у одного пациента в опухолевых клетках выявлена умеренно позитивная экспрессия ER. Положительная реакция на CD10 определена во всех образцах на апикальной поверхности опухолевых клеток.

*Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома (СПКК) макрокистозного строения с регрессией.* В 33 случаях (12,5%) узел в почке характеризовался четкими границами, наличием кистозных полостей, очагами кровоизлияний и некроза. Микроскопически опухоль состояла из кистозных полостей различного калибра, выстланных однослойным (местами псевдомногослойным) кубическим эпителием со светлой цитоплазмой. Межкистозные перегородки демонстрировали признаки выраженного фиброза и гиалиноза с ареалами кровоизлияния различной давности и отложения кальция. В отдельных фокусах в септальных пространствах визуализировались группы опухолевых клеток. В 28 случаях степень ядерной градации была оценена как G1, а в остальных опухолях как G2. В 26 образцах опухолевая стадия соответствовала pT1, а в семи наблюдениях pT2. При ИГХ исследовании во всех случаях зафиксированы сильно и выражено позитивная реакция на CK8/18, CD10, GST-α, PAX8 и полная мембранозная экспрессия CA9. Экспрессия EMA, AE1/AE3, CAM5.2, CK19, Vimentin и RCCm варьировала в широком диапазоне преимущественно в сильно и выражено позитивном диапазоне. В шести и трех наблюдениях единичные опухолевые клетки положительно реагировали на HMWCK и AMACR, соответственно. В двух опухолях выявлена умеренно и сильно позитивная экспрессия ER.

*Кистозная светлоклеточная папиллярная почечно-клеточная карцинома (СПКК).* У одного пациента (0,4%) опухоль почки диаметром 2,4 см (pT1) макроскопически была представлена четкими границами и наличием кист разного калибра. На светоптическом уровне кисты инкапсулированной опухоли были выстланы однорядным кубическим эпителием со светлой цитоплазмой. На отдельных участках визуализировались интракистозные истинные сосочки. В межкистозных перегородках в единичных ареалах опухолевые клетки формировали тубулярные структуры. Кроме того, обращало на себе внимание преимущественно апикальное расположение ядер с отсутствием ядрышек при ×400 (G1). При иммунофенотипировании опухоль

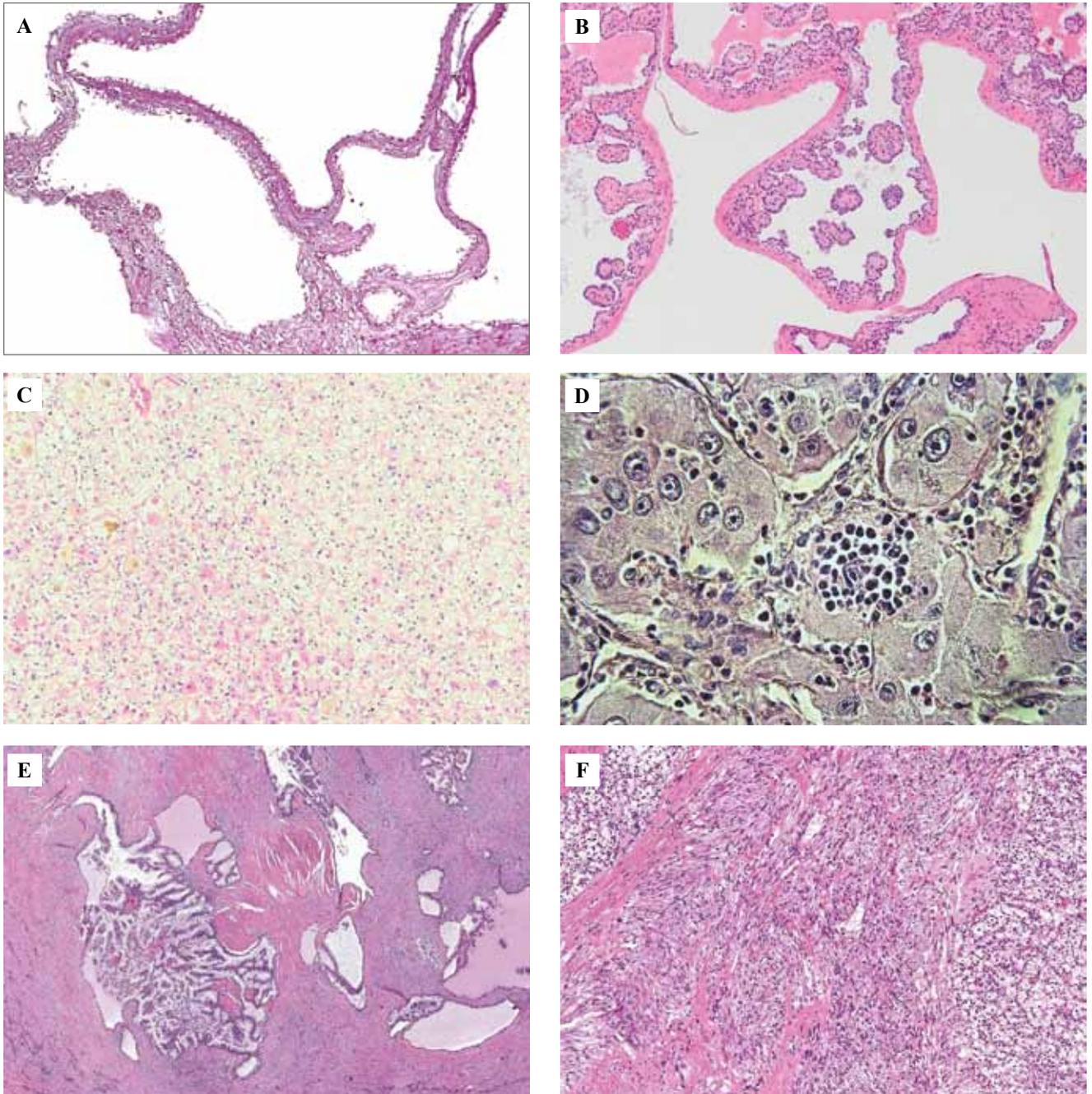
в выражено позитивном диапазоне экспрессировала CA9, CK7, AE1/AE3, CAM5.2, HMWCK, EMA и PAX8. Вместе с тем в отличие от мультилокулярной кистозной опухоли почки с низким потенциалом малигнизации для этой опухоли характерна базолатеральная («чашеобразная») мембранозная экспрессия CA9 (рис. 2 А).

*Кистозная нефрома (КН).* У пяти пациенток (2%) опухоль макроскопически имела вид солитарного узла с наличием множественных мелких и крупных кист, заполненных серозным содержимым. На светоптическом уровне стенки кист были выстланы однослойным кубическим эпителием со светлой цитоплазмой (местами с эозинофильной цитоплазмой в виде шляпок гвоздей). Межкистозные перегородки по строению напоминали строму яичника. При ИГХ исследовании во всех случаях обнаружена выражено позитивная коэкспрессия HMWCK, CK7, AE1/AE3, CAM5.2, CK8/18, CK19, PAX2, PAX8 и AMACR (рис. 2 В). Экспрессия CD10 и EMA варьировала в широком диапазоне. В трех опухолях в строме выявлена положительная экспрессия PR, а в двух образцах ER.

*Атипичная киста почки (АКП).* У пяти пациентов (2%), подвергшихся нефрэктомии по поводу приобретенной кистозной болезни, макроскопически почка была представлена множественными разнокалиберными кортикомедуллярными кистами, заполненными серозным содержимым. На светоптическом уровне в двух случаях отдельные кисты были выстланы однорядным кубическим эпителием со светлой цитоплазмой. При тщательном гистологическом исследовании признаки опухолевой инфильтрации в септальных зонах не определялись. В трех наблюдениях в единичных кистах, выстланных эозинофильными клетками, были обнаружены внутрикистозные микропапиллярные структуры, занимающие площадь диаметром менее 15 мм (рис. 1 В). Ксантомные клетки в субстрате отсутствовали. Во всех образцах при ×400 ядрышки не визуализировались. При иммуногистохимическом исследовании во всех случаях клетки экспрессировали CK7, AE1/AE3, CAM5.2, PAX2 и PAX8. Светлые клетки в обоих наблюдениях позитивно реагировали на CA9, а у одного пациента из них обнаружена экспрессия HMWCK, CD10 и EMA. Эозинофильные клетки в двух образцах положительно реагировали на AMACR, а в одном случае определена экспрессия EMA, Vimentin и RCCm.

Группу опухолей солидного и/или тубуло-папиллярного строения с низкой ядерной градацией составили 98 случаев (37%) (52 мужчины и 46 женщин в возрасте от 53 до 69 лет, средний возраст 61 год).

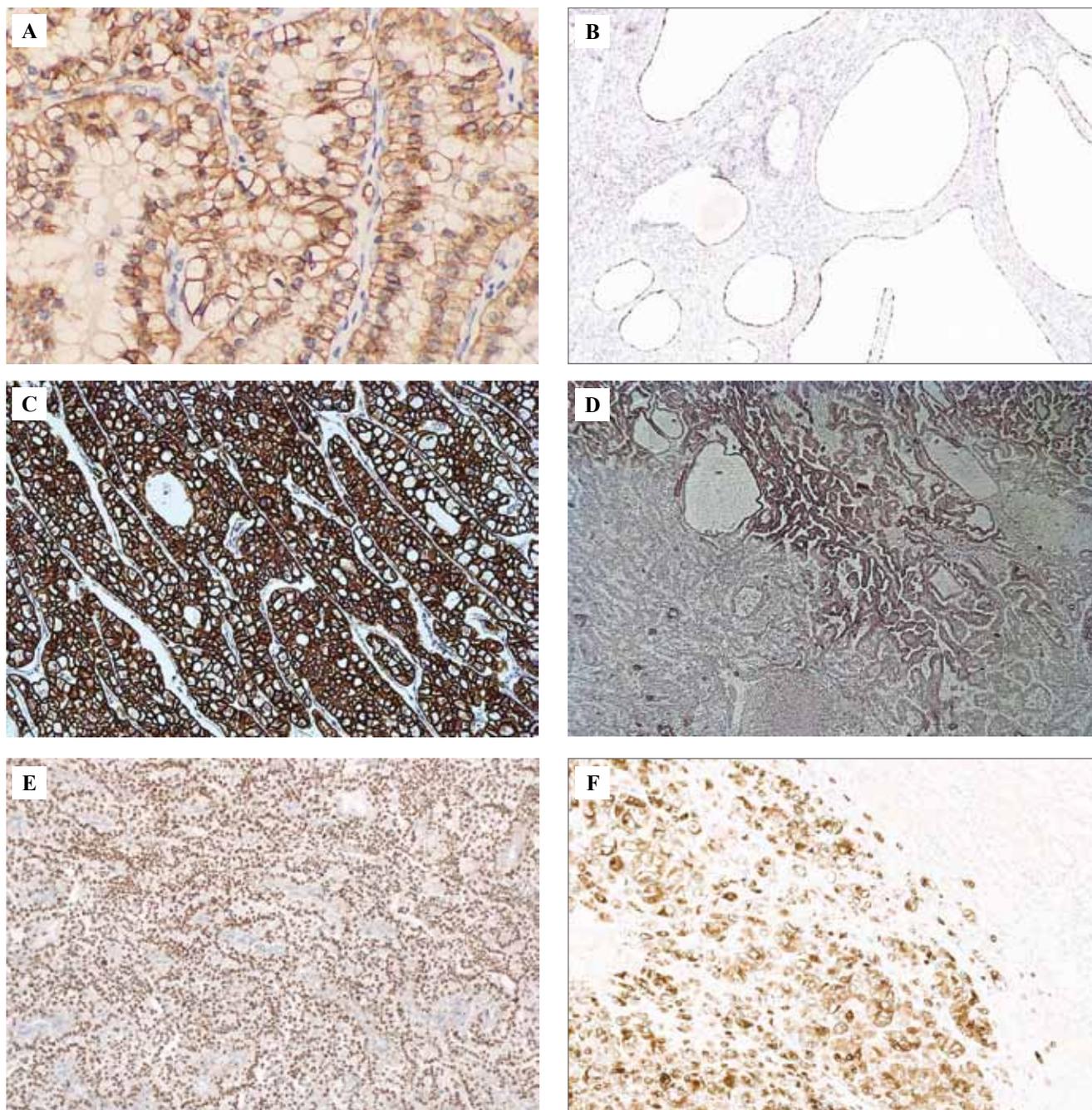
*Хромобная ПКК-подобная, светлоклеточная папиллярная ПКК-подобная светлоклеточная почечно-клеточная карцинома и светлоклеточная почечно-клеточная карцинома с участками папиллярного строения.* Макроскопически все образцы имели форму четко ограниченного псевдокапсулярного узла с желтоватым оттенком. В 19 наблюдениях (7%) на светоптическом



**Рис. 1.** Морфологические варианты почечно-клеточных опухолей со светлой цитоплазмой. Окраска гематоксилином и эозином. А – Мультилокулярная кистозная опухоль почки с низким потенциалом малигнизации,  $\times 200$ ; В – атипичная киста почки с внутрикистозными микрососочками,  $\times 100$ ; С – почечно-клеточная карцинома с t(6;11) транслокацией и слиянием гена TFEB со светлой цитоплазмой,  $\times 200$ ; D – светлоклеточная почечно-клеточная карцинома с рабдоидной дедифференцировкой и эмпириоплезом,  $\times 400$ ; E – ангиомиоаденоматозная опухоль почки,  $\times 40$ ; F – светлоклеточная почечно-клеточная карцинома сочетания с ангиомиолипомой,  $\times 200$

**Fig. 1.** Morphological variants of renal cell tumors with light cytoplasm. H&E stain.

A – multilocular cystic kidney tumor with a low potential for malignancy,  $\times 200$ ; B – atypical kidney cyst with intracystic micropapillae,  $\times 100$ ; C – renal cell carcinoma with t(6;11) translocation and fusion of the TFEB gene with light cytoplasm,  $\times 200$ ; D – clear cell renal cell carcinoma with rhabdoid dedifferentiation and empyriopolesis,  $\times 400$ ; E – angiomyoadenomatous tumor of the kidney,  $\times 40$ ; F – clear cell renal cell carcinoma combined with angiomyolipoma,  $\times 200$



**Рис. 2.** Иммуногистохимическая картина морфологических вариантов почечно-клеточных опухолей со светлой цитоплазмой. А – светлоклеточная папиллярная почечно-клеточная карцинома. Характерная «чашеобразная» (базолатеральная) экспрессия СА9,  $\times 400$ ; В – кистозная нефрома. Экспрессия PAX8.  $\times 40$ ; С – классическая хромофобная почечно-клеточная карцинома. Диффузная экспрессия EpCAM.  $\times 200$ ; D – комбинированная папиллярная почечно-клеточная карцинома со светлоклеточным компонентом. На фоне выражено позитивной экспрессии СК 7 в ареалах папиллярного рака 1-го типа отмечается фокальная реакция на маркер в зонах роста папиллярного рака 2-го типа.  $\times 100$ ; E – почечно-клеточная карцинома с Xp11 транслокацией и слиянием гена TFE3. Диффузная ядерная экспрессия TFE3.  $\times 100$ ; F – почечно-клеточная карцинома с t(6;11) транслокацией и слиянием гена TFEB. Сильно позитивная цитоплазматическая экспрессия HMB-45 в опухолевых клетках.  $\times 100$

**Fig. 2.** Immunohistochemical image of morphological variants of renal cell tumors with light cytoplasm. A – clear cell papillary renal cell carcinoma. Characteristic «cup-shaped» (basal-lateral) expression of CA9,  $\times 400$ ; B – cystic nephroma. Expression of PAX 8.  $\times 40$ ; C – classical chromophobe renal cell carcinoma. Diffuse expression of EpCAM,  $\times 200$ ; D – combined papillary renal cell carcinoma with a clear cell component. Against the background of the clearly positive expression of CK 7 in the areas of type 1 papillary cancer, a focal reaction to the marker in the growth zones of type 2 papillary cancer is noted.  $\times 100$ ; E – renal cell carcinoma with Xp11 translocation and fusion of the TFE3 gene. Diffuse nuclear expression of TFE3.  $\times 100$ ; F – renal cell carcinoma with t (6; 11) translocation and fusion of the TFEB gene. Strongly positive cytoplasmic expression of HMB-45 in tumor cells.  $\times 100$

уровне опухоль была представлена солидными полями крупных полигональных клеток со светлой обильной цитоплазмой, отчетливыми клеточными стенками и неправильными контурами ядерных мембран, напоминающими клетки хромофобной почечно-клеточной карциномы (ХПКК). На отдельных участках популяция опухолевых клеток имела морфологию классической светлоклеточной почечно-клеточной карциномы. Во всех образцах степень ядерной градации была оценена как G2. В большинстве случаев (n=17) стадия опухоли соответствовала pT1 и лишь в двух новообразованиях pT2.

В 12 наблюдениях (4,5%) опухоль микроскопически была представлена солидными, тубулярными, псевдососочковыми структурами клеток с прозрачной цитоплазмой. Преимущественно в тубулярных и псевдопапиллярных формациях ядра имели центральное линейное расположение с незначительным сдвигом в сторону апикальной поверхности клеток, подобно клеткам светлоклеточной папиллярной почечно-клеточной карциномы (СППКК). Во всех случаях степень ядерной градации соответствовала G1, а диаметр опухолевого узла не превышал 6,5 см (pT1).

У 28 пациентов (11%) на светооптическом уровне в опухолевой ткани на фоне солидных структур с характерными морфологическими признаками светлоклеточных почечно-клеточных карцином определялись ареалы псевдососочковых и истинных папиллярных выростов. В семи случаях из них в отдельных зонах в просвете тубуло-ацинарных структур и внутри цитоплазмы клеток определялись эозинофильные гиалиновые депозиты. Степень ядерной градации варьировала от G1 до G2, а опухолевая стадия была оценена в пределах pT1–pT2. Следует отметить, что во всех образцах указанных вариантов светлоклеточных почечно-клеточных карцином в строме опухоли определялась развитая сосудистая сеть, состоящая из мелких синусоидальных капилляров. При ИГХ исследовании во всех случаях была выявлена положительная реакция на CD10, CA9, CK8/18, PAX8 и GST- $\alpha$  с преобладанием экспрессии в сильно и выражено позитивном диапазоне. Экспрессия CAM5.2, CK19, AE1/AE3, EMA, PAX2, RCCm, MUC-1, S100A1 и Vimentin варьировала в широком диапазоне.

*Классическая хромофобная почечно-клеточная карцинома (ХПКК).* В 35 случаях (13%) опухоль почки округлой формы, дольчатого вида, светло-коричневого цвета микроскопически была представлена солидными и тубуло-кистозными структурами крупных полигональных хромофобных клеток со светлой цитоплазмой и клетками с небольшим перинуклеарным гало, слабоокисильной, «хлопьевидной» цитоплазмой. В отдельных зонах в опухолевой популяции встречались относительно более мелкие клетки со слабозернистой эозинофильной цитоплазмой. В отличие от светлоклеточной почечно-клеточной карциномы в строме преобладали сосуды среднего калибра. В одном наблюдении

опухоль формировала псевдососочковые структуры. В 34 случаях диаметр опухоли не превышал 4 см (pT1), а в одном образце стадия соответствовала pT2. При иммуногистохимическом исследовании во всех случаях в клетках преобладала сильно и выражено позитивная коэкспрессия EMA, CK7, CK8/18, EpCAM, Caveolin-1, MOC-31, MUC-1, DOG-1, E-Cadherin, KSC и Parvalbumin (рис. 2 С). Реакция на CK19, CAM5.2, AE1/AE3, CD10, PAX2 и PAX8 варьировала в широком диапазоне. В CD117-позитивных случаях экспрессия преобладала в сильно и выражено позитивном диапазоне.

*Светлоклеточная папиллярная почечно-клеточная карцинома (СППКК).* В четырех наблюдениях (1,5%) опухоль макроскопически была представлена в виде инкапсулированного солитарного узла бледно-желтого цвета с наличием мелких и крупных кист, заполненных серозным содержимым. На светооптическом уровне опухолевая ткань состояла из светлых кубических и цилиндрических клеток, формирующих кистозные, тубулярные, папиллярные и солидные структуры. Опухолевые клетки имели эксцентрично расположенные ядра со сдвигом в сторону апикальной поверхности клеток. В экстрацеллюлярном матриксе отмечались признаки выраженного фиброза и гиалиноза. Во всех образцах степень ядерной градации была оценена как G1, а стадия опухоли соответствовала pT1. При иммунофенотипировании в опухолевых клетках на фоне выраженной базолатеральной мембранозной экспрессии CA9 выявлена положительная цитоплазматическая реакция на CK7, AE1/AE3, CAM5.2, HMWCK, EMA и PAX8.

В группу опухолей почки с высокой ядерной градацией вошли 94 случая (36%) (45 мужчин и 49 женщин в возрасте от 18 до 73 лет, средний возраст 57 лет).

*Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома (СПКК) с эозинофильно-клеточным компонентом и участками псевдопапиллярного роста.* В 21 случае (8%) опухоль микроскопически была представлена солидно-псевдососочковой структурой преимущественно из светлых клеток с незначительной примесью клеток с эозинофильной цитоплазмой, наличием очагов некроза и кровоизлияния. Во всех образцах большинство ядер содержало ядрышки, определяемые при  $\times 100$  (G3). В шести наблюдениях стадия опухоли соответствовала pT1. Преобладали пациенты в стадии pT2 – девять случаев. В четырех и двух новообразованиях были определены стадии pT3 и pT4, соответственно. При иммуногистохимическом исследовании опухоль имела иммунопрофиль светлоклеточной почечно-клеточной карциномы и экспрессировала CD10, CA9, GST- $\alpha$ , Vimentin и PAX8 с преобладанием реакции в сильно и выражено позитивном диапазоне.

*Комбинированная папиллярная почечно-клеточная карцинома (ППКК) со светлоклеточным компонентом.* В 25 наблюдениях (9,5%) опухоль почки округлого вида желто-коричневого цвета с псевдокапсулой микроскопически была представлена папиллярными и тубуляр-

ными структурами классического папиллярного рака 1-го и 2-го типов в разных соотношениях. По данным литературы, эти опухоли имеют худший прогноз по сравнению с «чистыми» папиллярными почечно-клеточными карциномами [10–12]. В отдельных зонах, преимущественно в компоненте папиллярной карциномы 1-го типа, сосочки были сформированы светлыми клетками. Во всех случаях степень ядерной градации в компоненте папиллярного рака 2-го типа соответствовала G3, а опухолевая стадия варьировала в пределах pT1–pT2. При ИГХ исследовании во всех образцах выявлена позитивная реакция на CK7, CK8/18, AE1/AE3, AMACR, CD10, PAX8 и Vimentin. Экспрессия CK19, CAM5.2, HMWCK, EMA, S100A1, RCCm, PAX2, Napsin A, E-Cadherin и CD57 варьировали в широком диапазоне. Следует отметить, что в большинстве случаев диффузная экспрессия CK7, CK19 и EMA обнаружена в клетках папиллярной карциномы 1-го типа, а в зонах роста папиллярной почечно-клеточной карциномы 2-го типа визуализировалась фокальная или негативная реакция (рис. 2 D). Вместе с тем противоположная картина наблюдалась с экспрессией CD10.

*Почечно-клеточная карцинома (ПКК), ассоциированная с приобретенной кистозной болезнью.* У двух пациентов (0,8%), получавших программный гемодиализ, кистозные узлы диаметрами 2,7 и 3 см, соответственно, микроскопически были представлены солидно-альвеолярными, ацинарными, криброзными, микро- и макрокистозными, папиллярными структурами эозинофильных и светлых клеток с определяемыми ядрышками при  $\times 100$  (G3). В некоторых эозинофильных клетках визуализировались внутрицитоплазматические микропросветы. В обоих случаях в строме опухолевой ткани были обнаружены отложения оксалата кальция. При иммунофенотипировании в обоих наблюдениях выявлена коэкспрессия AMACR, CD10, CAM5.2, AE1/AE3 и PAX8. В одном образце опухолевые клетки позитивно реагировали на CK8/18, RCCm и CD57, а в другом на Vimentin, GST- $\alpha$  и PAX2.

*Почечно-клеточные карциномы (ПКК) с Xp11 транслокацией и слиянием гена TFEB.* У четырех пациентов (1,5%) в возрасте от 19 до 33 лет опухоль почки на разрезе имела нечеткие границы, светло- и желто-коричневые оттенки с участками некроза и кровоизлияния. На светооптическом уровне опухоль состояла из солидно-альвеолярных структур дискогезивных светлых и эозинофильных клеток, местами формирующих сосочковые выросты. В двух наблюдениях в опухолевом инфильтрате были обнаружены отложения псаммомных телец. Степень ядерной градации соответствовала G3, а опухолевая стадия варьировала в пределах pT2–pT3. При иммуногистохимическом исследовании в ядрах всех опухолевых клеток была выявлена положительная экспрессия TFEB (рис. 2 E). Помимо этого во всех случаях была обнаружена коэкспрессия AMACR, PAX8, RCCm и Cathepsin K. В двух наблюдениях опухолевые клетки в умеренно позитивном диапазоне

экспрессировали Vimentin, MiTF и CD10, а в одном образце – PAX2 и E-Cadherin.

*Почечно-клеточные карциномы с t(6;11) транслокацией и слиянием гена TFEB.* У трех пациентов (1%) в возрасте от 18 до 26 лет была выявлена опухоль почки солидного строения, в двух случаях на светооптическом уровне имела бифазное клеточное строение. На фоне относительно крупных эпителиодных клеток со светлой цитоплазмой обнаруживались мелкие эозинофильные клетки, формирующие розеткообразные структуры вокруг эозинофильного гомогенного материала, подобного базальной мембране, с единичными по периферии нативными ренальными тубулами и псаммомными тельцами. В одном наблюдении микроскопически опухоль состояла исключительно из светлых клеток (рис. 1 C). Во всех новообразованиях степень ядерной градации была оценена как G3, а стадия опухоли как pT1. При иммуногистохимическом исследовании в ядрах всех опухолевых клеток была выявлена положительная экспрессия TFEB. В то же время в двух образцах обнаружена сильно позитивная коэкспрессия HBM-45 и Melan A, а в одном случае умеренно позитивная реакция с AMACR, Vimentin и MiTF (рис. 2 F). Экспрессия PAX8 и Cathepsin K обнаружена во всех наблюдениях в сильно позитивном диапазоне.

*Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома (СПКК) с многоядерной гигантской опухолевой клеткой синцитиального типа.* В четырех новообразованиях (1,5%) в популяции опухолевых клеток со светлой цитоплазмой визуализировались многоядерные клетки, обозначенные в литературе как гигантские опухолевые клетки синцитиального типа. Согласно рекомендациям ВОЗ/ISUP, степень ядерной градации этих клеток была оценена как G4 [13–14]. В двух наблюдениях стадия опухоли соответствовала pT2, а по одному случаю – стадиям pT1 и pT3.

*Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома (СПКК) с рабдоидной дедифференцировкой и эмбриополозом.* В 26 случаях (10%) опухоль желтого или бледно-коричневого цвета с зонами некроза и кровоизлияния микроскопически была представлена солидной структурой светлых клеток, на фоне которых определялись клетки с рабдоидной дифференцировкой, занимающие площадь от 25% до 75% всего опухолевого ареала. В семи наблюдениях в опухолевом инфильтрате помимо клеток с рабдоидной дифференцировкой визуализировались гистиоцитоподобные гигантские клетки с признаками эмбриополоза и клетки, напоминающие синцитиотрофобласты (рис. 1 D). Согласно рекомендациям ВОЗ/ISUP, степень ядерной градации во всех опухолях была оценена как G4. Преобладали опухоли в стадии pT2 (n=15). В шести новообразованиях стадия опухоли соответствовала pT1, а в четырех образцах pT3. В одном случае опухоль распространялась за пределы фасции Героты (pT4). При ИГХ исследовании в обеих подгруппах во всех случаях опухолевые клетки (клетки с эмбриополозом и гигантские клетки

синцитиального типа включительно) экспрессировали маркерные антигены светлоклеточных почечно-клеточных карцином.

*Неклассифицируемая почечно-клеточная карцинома.* В трех наблюдениях (1%) опухоль почки была без четких границ, без капсулы с участками некроза и кровоизлияния, в двух случаях микроскопически представлена солидной, микротубулярной, трабекулярной и псевдососочковой структурами светлых и эозинофильных клеток. В одном из них обнаруживались ареалы экстрацеллюлярного муцина. В обоих образцах степень ядерной градации была оценена как G3, а стадия опухоли соответствовала pT3. При иммуногистохимическом исследовании в обоих случаях опухоль экспрессировала AE1/AE3 и PAX8, а в одном наблюдении CK19, Vimentin и PAX2. Третья опухоль распространялась за пределы фасции Героты и на светооптическом уровне характеризовалась солидно-папиллярной структурой светлых клеток. Степень ядерной градации соответствовала G3. При иммунофенотипировании на фоне умеренно и сильно позитивной коэкспрессии CA9, PAX2, PAX8 и CK7, в единичных клетках была обнаружена позитивная реакция с AE1/AE3, CD10 и HBM-45.

*Светлоклеточная эпителиоидная ангиомиолиптома.* В шести случаях (2%) опухоль в почке в виде четко ограниченного узла, без капсулы, диаметром от 4,5 до 7 см, белесовато-серого цвета микроскопически была представлена комплексами полигональных крупных клеток преимущественно со светлой цитоплазмой. Наряду с этим в инфильтрате наблюдалось незначительное количество эозинофильных эпителиоидных клеток с единичными многоядерными и гигантскими экземплярами. В фиброзно-мышечной строме был выявлен гиалиноз сосудов. При иммунофенотипировании во всех случаях в опухоли обнаружена умеренно позитивная и сильно позитивная коэкспрессия Cathepsin K, SMA и HBM-45. В трех наблюдениях новообразование позитивно реагировало на MelanA и MiTF преимущественно в умеренном диапазоне.

Группу полифазных почечно-клеточных карцином составили семь случаев (2,7%) (два мужчины и пять женщин в возрасте от 35 до 76 лет, средний возраст 58 лет).

*ПКК с лейомиоматозной стромой (ПККЛС).* В двух наблюдениях (0,8%) микроскопически опухоль была представлена бифазной морфологией в виде солидно-альвеолярной, тубулярной, ацинарной структур из светлых эпителиальных клеток с фибролейомиоматозной стромой. Степень ядерной градации в эпителиальном компоненте была низкой и соответствовала G1, а стадия опухоли оценена как pT1. При иммуногистохимическом исследовании в одном случае опухоль демонстрировала иммунопрофиль светлоклеточных почечно-клеточных карцином и в выраженно позитивном диапазоне экспрессировала CK8/18, AE1/AE3, CA9, CD10, Vimentin, PAX2 и PAX8. На основании

полученных результатов диагноз был верифицирован как светлоклеточная почечно-клеточная карцинома с лейомиоматозной стромой. У другого новообразования на фоне сильно и выраженно позитивной коэкспрессии CK8/18, AE1/AE3, CA9, PAX2 и PAX8 была выявлена умеренно положительная реакция на CK7 и CD10. Морфоиммуногистохимическая картина опухоли соответствовала ПКК с мутацией гена TCEB-1 [15–17]. Вместе с тем для окончательной верификации было рекомендовано проведение молекулярной диагностики с целью идентификации мутации гена TCEB-1.

*Ангиомиоаденоматозная опухоль почки (АМАОП)/ светлоклеточная папиллярная почечно-клеточная карцинома с лейомиоматозной стромой (СППКЛС).* Ряд исследователей рассматривают эти новообразования в рамках одной нозологической единицы [18–19]. В нашей работе в двух наблюдениях (0,8%) четко ограниченная опухоль почки серовато-коричневого цвета диаметром 3 см на светооптическом уровне имела трехфазную структуру. Эпителиоидный компонент был представлен гнездами и тубулами мелких клеток со светлой цитоплазмой, местами формирующих микрокистозные структуры. Истинные сосочковые выросты в обоих случаях отсутствовали. Ядра опухолевых клеток имели базальную ориентацию и низкую степень градации. Мезенхимальный компонент состоял из гладкомышечной ткани и кровеносных сосудов с набухшими эндотелиоцитами и толстыми стенками, вокруг которых визуализировалось скопление перипитоподобных клеток (рис. 1 Е). При ИГХ исследовании был обнаружен аналогичный иммунопрофиль со светлоклеточными папиллярными почечно-клеточными карциномами в виде сильно и выраженно позитивной коэкспрессии CK7, AE1/AE3, HMWCK, CA9, E-Cadherin, PAX8 и EMA. Тем не менее, на наш взгляд, АМАОП и СППКЛС являются разными опухолями, обладающими специфическими морфологическими и ИГХ особенностями. Так, светлоклеточная папиллярная почечно-клеточная карцинома на светооптическом уровне была представлена тубуло-папиллярными структурами крупных светлых клеток. В нашем исследовании в обоих наблюдениях папиллярные структуры отсутствовали, а клетки были относительно мелкими. Более того, характерная «чашеобразная» (базолатеральная) мембранозная экспрессия CA9, обнаруживаемая в СППКК, в этих случаях не наблюдалась.

Следует отметить, что в классификации ВОЗ 2016 года почечно-клеточные карциномы с лейомиоматозной стромой и ангиомиоаденоматозная опухоль/ светлоклеточная папиллярная почечно-клеточная карцинома с лейомиоматозной стромой включены в рубрику провизорных опухолей, требующих дальнейшего изучения [20–22].

*Светлоклеточные почечно-клеточные карциномы в сочетании с ангиомиолипомой.* В двух случаях (0,8%) при гистологическом исследовании в ангиомиолипоматозном матриксеподобном компоненте был пред-

ставлен солидной структурой светлых клеток с низкой ядерной градацией (рис. 1 F). Опухолевая стадия варьировала в пределах pT1–pT2. При иммуногистохимическом исследовании в эпителиальном компоненте выявлены классические антитела светлоклеточной почечно-клеточной карциномы, а в клетках стромы определена положительная экспрессия маркерных антигенов ангиомиолипому.

*Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома в сочетании со смешанной эпителиальной и мезенхимальной опухолью.* В одном наблюдении (0,4%) опухоль размерами 6×5×3 см на светооптическом уровне состояла из двух отдельных узлов, местами разделенных друг от друга тонкой прослойкой почечной паренхимы. У одного из узлов гистологическое строение и иммунопрофиль соответствовали СПКК. Степень ядерной градации опухолевых клеток была оценена как G1. Другой узел был представлен кистозными структурами эпителиальных клеток и мезенхимальным матриксом, напоминающим строму яичника. При ИГХ исследовании в эпителиальном компоненте выявлена коэкспрессия AE1/AE3, CK7, CK8/18, CAM5.2, HMWCK, EMA, PAX2 и PAX8. Клетки стромального компонента позитивно реагировали на Vimentin, ER и PR.

## Заключение

1. Результаты нашего исследования показывают, что среди морфологических форм светлоклеточных почечно-клеточных карцином существует прямая связь между степенью ядерной градации и гистологической картиной опухоли. Установлено, что для макрокистозной светлоклеточной почечно-клеточной карциномы с признаками регрессии характерна низкая степень ядерной градации (G1-2). В эту когорту опухолей входят также СПКК- и ХПКК-подобные светлоклеточные почечно-клеточные карциномы. Эозинофильно-клеточный компонент наблюдается обычно в СПКК с высокой ядерной градацией.

2. Иммунофенотип атипичной кисты почки в зависимости от гистологического строения соответствует иммунопрофилю некоторых морфологических вариантов почечно-клеточных карцином. Так, в светлоклеточной и микропапиллярной атипичной кисте почки наблюдается экспрессия маркерных антигенов МКОПНПМ/СПКК и папиллярной почечно-клеточной карциномы, соответственно. В связи с этим можно предположить, что атипичная киста почки является предшественницей разных гистологических вариантов почечно-клеточных карцином.

3. Многоядерные гигантские опухолевые клетки синцитиального типа наиболее часто встречаются в светлоклеточных почечно-клеточных карциномах с рабдоидной дедифференцировкой и эмпериполезом. В то же время в редких случаях могут наблюдаться в качестве отдельного паттерна. Клетки с эмпериполезом и гигантские клетки синцитиального типа экспрессируют все маркерные антигены СПКК.

4. Почечно-клеточная карцинома с t(6;11) транслокацией и слиянием гена TFEB не всегда имеет диморфный клеточный состав. В нашем исследовании в одном случае опухоль была представлена исключительно светлыми клетками приблизительно одинакового размера. В отличие от ПКК с Xp11 транслокацией и слиянием гена TFE3 в TFEB-позитивной почечно-клеточной карциноме наиболее часто наблюдается экспрессия HBM-45 и Melan A.

5. Полученные нами данные позволяют утверждать, что почечно-клеточная карцинома с лейомиоматозной стромой – гетерогенное заболевание, представленное несколькими гистологическими вариантами почечно-клеточных карцином, и, следовательно, для верификации этих новообразований необходимо оценивать полный спектр патоморфологических, иммуногистохимических и молекулярных характеристик.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Ю.И. Османов, Е.А. Коган.  
Сбор и обработка материала – Ю.И. Османов, Р.Г. Нугуманов.  
Написание текста – Ю.И. Османов, Г.А. Демьяшкин.  
Редактирование – Ю.И. Османов, Г.А. Демьяшкин.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Y.I. Osmanov, E.A. Kogan.  
Collected the data and performed the analysis – Y.I. Osmanov, R.G. Nugumanov.  
Wrote the paper – Y.I. Osmanov, G.A. Demyashkin.  
Edited the manuscript – Y.I. Osmanov, G.A. Demyashkin.

## Литература/References

1. *Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S et al.* The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2011;60(4):615–21. DOI: 10.1016/j.eururo.2011.06.049.
2. *Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893–917. DOI: 10.1002/ijc.25516.
3. *Ridge CA, Pua BB, Madoff DC.* Epidemiology and Staging of Renal Cell Carcinoma. *Semin Intervent Radiol.* 2014;31(1):3–8. DOI: 10.1055/s-0033-1363837.
4. *Goyal R, Gersbach E, Yang XJ, Rohan SM.* Differential diagnosis of renal tumors with clear cytoplasm: clinical relevance of renal tumor subclassification in the era of targeted therapies and personalized medicine. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(4):467–80. DOI: 10.5858/arpa.2012-0085-RA.
5. *Ross H, Martignoni G, Argani P.* Renal cell carcinoma with clear cell and papillary features. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136(4):391–9. DOI: 10.5858/arpa.2011-0479-RA.
6. *Bai X, Wu CL.* Renal cell carcinoma and mimics: pathologic primer for radiologists. *AJR Am J Roentgenol.* 2012;198(6):1289–93. DOI:10.2214/AJR.12.8586.
7. *Liu N, Gan W, Qu F, Wang Z, Zhuang W, Agizamhan S et al.* Does the Fuhrman or World Health Organization/International Society of Urological Pathology Grading System Apply to the Xp11.2 Translocation Renal Cell Carcinoma?: A 10-Year Single-Center Study. *Am J Pathol.* 2018;188(4):929–36. DOI:10.1016/j.ajpath.2017.12.018.

8. *Williamson SR, Taneja K, Cheng L.* Renal cell carcinoma staging: pitfalls, challenges, and updates. *Histopathology.* 2019;74(1):18–30. DOI: 10.1111/his.13743.
9. *Rajcani J, Kajo K, Adamkov M, Moravekova E, Lauko L, Felcanova D et al.* Immunohistochemical characterization of urothelial carcinoma. *Bratisl Lek Listy.* 2013;114(8):431–8. DOI: 10.4149/blil\_2013\_091.
10. *Leone A, Diorio G, Brito J, Zargar K, Pareek G, Renzulli JF et al.* Presence and percentage of type 2 papillary RCC in mixed (type 1 and type 2) papillary renal cell carcinoma does not portend worse prognosis in patients treated by partial/radical nephrectomy in non-metastatic disease. *J Clin Oncol.* 2017;35(15). 2016;34(15). DOI: 10.1200/JCO.2016.34.15\_suppl.e16126.
11. *Chevarie-Davis M, Riazalhosseini Y, Arseneault M, Aprikian A, Kassouf W, Tanguay S et al.* The morphologic and immunohistochemical spectrum of papillary renal cell carcinoma: study including 132 cases with pure type 1 and type 2 morphology as well as tumors with overlapping features. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(7):887–94. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000247.
12. *Alomari AK, Nettey OS, Singh D, Kluger H, Adeniran AJ.* Clinicopathological and immunohistochemical characteristics of papillary renal cell carcinoma with emphasis on subtyping. *Hum Pathol.* 2015;46(10):1418–26. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.06.006.
13. *Williamson SR, Kum JB, Goheen MP, Cheng L, Grignon DJ, Idrees MT.* Clear cell renal cell carcinoma with a syncytial-type multinucleated giant tumor cell component: implications for differential diagnosis. *Hum Pathol.* 2014;45(4):735–44. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.10.033.
14. *Trpkov K, Hes O.* New and emerging renal entities: a perspective post- WHO 2016 classification. *Histopathology.* 2019;74(1):31–59. DOI: 10.1111/his.13727.
15. *Parilla M, Alikhan M, Segal J, Kadri S, Fitzpatrick C, Antic T.* TCEB1-mutated renal cell carcinoma in relation to renal cell carcinoma with smooth muscle stroma in tuberos sclerosis complex. *J Clin Oncol.* 2018;36(6):699. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.6\_suppl.699.
16. *Batavia AA, Schraml P, Moch H.* Clear cell renal cell carcinoma with wild-type von Hippel-Lindau gene: a non-existent or new tumour entity? *Histopathology.* 2019;74(1):60–7. DOI: 10.1111/his.13749.
17. *Hakimi AA, Tickoo SK, Jacobsen A, Sarungbam J, Sfakianos JP, Sato Y et al.* TCEB1-mutated renal cell carcinoma: a distinct genomic and morphologic subtype. *Mod Pathol.* 2015;28(6):845–53. DOI: 10.1038/modpathol.2015.6.
18. *Michal M, Hes O, Nemcova J, Sima R, Kuroda N, Bulimbasic S et al.* Renal angiomyoadenomatous tumor: Morphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of a distinct entity. *Virchows Arch.* 2009;454(1):89–99. DOI: 10.1007/s00428-008-0697-3.
19. *Jayalakshmy PS, Jose M, Feroze M, Kumar RK.* Renal angiomyoadenomatous tumour. *Turk J Urol.* 2017;43(3):378–82. DOI: 10.5152/tud.2017.32067.
20. *Inamura K.* Renal Cell Tumors: Understanding Their Molecular Pathological Epidemiology and the 2016 WHO Classification. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10). pii: E2195. DOI: 10.3390/ijms18102195.
21. *Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE, Ulbright TM.* The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol.* 2016;70(1):93–105. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.02.029.
22. *Udager AM, Mehra R.* Morphologic, Molecular, and Taxonomic Evolution of Renal Cell Carcinoma: A Conceptual Perspective With Emphasis on Updates to the 2016 World Health Organization Classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(10):1026–37. DOI: 10.5858/arpa.2016-0218-RA.

### Информация об авторах

Юсиф Исламович Османов – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом, доцент кафедры патологической анатомии им. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Евгения Алтаровна Коган – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии им. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, член Европейского общества патологов.

Григорий Александрович Демяшкин – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом, доцент кафедры патологической анатомии им. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, член Европейской ассоциации урологов.

Рамиль Гаязович Нугуманов – студент Института клинической медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

### Author information

Yousef I. Osmanov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, A.I. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.

<http://orcid.org/0000-0002-7269-4190>

Eugenia A. Kogan – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the A.I. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, member of the European Association of Pathologists.

<http://orcid.org/0000-0002-1107-3753>

Grigory A. Demyashkin – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, A.I. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, member of the European Association of Urology, section of Andrological Urology (ESAU).

<http://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Ramil G. Nugumanov – Student, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-6076-4107>

## Морфогенез изменений эпителио-сперматогенного слоя мужских половых желез после тяжелой черепно-мозговой травмы

А.В. Федотов<sup>1</sup>, А.Ф. Астраханцев<sup>2</sup>, Н.М. Крупнов<sup>1</sup>, М.П. Мазурова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГБУ РО Бюро судебно-медицинской экспертизы, Рязань, Россия

<sup>2</sup> ЧУЗ Центральная клиническая больница «РЖД-Медицина», Москва, Россия

*Введение.* Успехи современной медицины при оказании экстренной помощи перенесшим тяжелую черепно-мозговую травму, а также реабилитация таких пациентов все чаще заставляют специалистов разного профиля сталкиваться с различными нарушениями в гипоталамо-гипофизарной системе, требующими коррекции. Несмотря на актуальность этой проблемы, а также на многочисленные клинические исследования, несомненно указывающие на нарушения репродуктивной функции у тех, кто перенес тяжелую черепно-мозговую травму, морфологические изменения эпителио-сперматогенного слоя половых желез, а также морфогенез этих изменений остаются мало изученными. В связи с этим целью нашего исследования явилось количественное изучение морфогенеза эпителио-сперматогенного слоя у мужчин в различные сроки после тяжелой черепно-мозговой травмы.

*Материалы и методы.* При помощи разработанного авторами способа морфометрического анализа – цитологического профиля сперматогенеза – проведено изучение эпителио-сперматогенного слоя мужских половых желез на каждой из шести стадий цикла развития сперматогенных клеток у 45 умерших через 1–3 суток после тяжелой черепно-мозговой травмы (n=9), через 6–9 суток (n=10) и через 15 суток и более (n=7). Группу сравнения составили 19 секционных наблюдений практически здоровых лиц, умерших от черепно-мозговой травмы на месте происшествия.

*Выводы.* Результаты проведенного исследования показали, что выраженные морфологические изменения в эпителио-сперматогенном слое выявляются уже на ранних сроках черепно-мозговой травмы. Выраженность данных изменений прямо пропорциональна длительности течения черепно-мозговой травмы и может быть оценена как «пестрая атрофия половых желез» с исходом в герминальную аплазию транзиторного характера.

**Ключевые слова:** черепно-мозговая травма, эпителио-сперматогенный слой, цикл сперматогенных клеток, транзиторная герминальная аплазия.

**Для корреспонденции:** Александр Викторович Федотов. E-mail: fedotovbsme@mail.ru

**Для цитирования:** Федотов А.В., Астраханцев А.Ф., Крупнов Н.М., Мазурова М.П. Морфогенез изменений эпителио-сперматогенного слоя мужских половых желез после тяжелой черепно-мозговой травмы. Клини. эксп. морфология. 2020;9(2):52–60. DOI:10.31088/CEM2020.9.2.52-60

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

Статья поступила 27.03.2020. Получена после рецензирования 06.05.2020. Принята в печать 14.05.2020.

## Epithelial-spermatogenic layer morphogenetic changes in the of the male sex glands after severe traumatic brain injury

A.V. Fedotov<sup>1</sup>, A.F. Astrakhansev<sup>2</sup>, N.M. Krupnov<sup>1</sup>, M.P. Mazurova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ryazan Regional Bureau of Forensic Medical Expertise, Ryazan, Russia

<sup>2</sup> Central Clinical Hospital «RZD-Medicine», Moscow, Russia

*Introduction.* The success of modern medicine in providing emergency care to patients who have suffered a severe traumatic brain injury, as well as the rehabilitation of these patients, is forcing specialists of various fields to face different disorders in the hypothalamic-pituitary system that require correction. Despite the relevance of this problem, as well as numerous clinical studies that undoubtedly indicate violations of reproductive function in patients who have suffered severe craniocerebral trauma, morphological changes in the epithelial-spermatogenic layer of the genital glands, as well as the morphogenesis of these changes remain poorly understood. In this connection, the aim of our study was to quantitatively study the morphogenesis of the epithelial-spermatogenic layer in men at various times after severe traumatic brain injury.

*Materials and methods.* The method of morphometric analysis developed by the authors – cytological profile of spermatogenesis, was used to study the epithelial-spermatogenic layer of the male sex glands at each of the 6 stages of the development cycle of spermatogenic cells in 45 deceased patients 1–3 days after severe traumatic brain injury (n=9), 6–9 days (n=10) and 15 days or more (n=7). The comparison group consisted of 19 autopsy cases of practically healthy individuals who died from traumatic brain injury at the scene.

*Conclusions.* The results of the study showed that pronounced morphological changes in the epithelial-spermatogenic layer are detected already in the early stages of traumatic brain injury. The severity of these changes is directly proportional to the duration of the course of craniocerebral trauma and can be estimated as «variegated atrophy of the sexual glands» with an outcome in germinal aplasia of a transient nature.

**Keywords:** traumatic brain injury, epithelial-spermatogenic layer, spermatogenic cell cycle, transient germinal aplasia.

**Corresponding author:** Alexander V. Fedotov. E-mail: fedotovbsme@mail.ru

**For citation:** Fedotov A.V., Astrakhantsev A.F., Krupnov N.M., Mazurova M.P. Epithelial-spermatogenic layer morphogenetic changes in male sex glands after severe traumatic brain injury. Clin. exp. morphology. 2020;9(2):52–60 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.52-60

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

**Received** 27.03.2020. **Received in revised form** 06.05.2020. **Accepted** 14.05.2020.

## Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) – серьезная социальная проблема. По данным Федеральной службы государственной статистики, ежегодно в Российской Федерации регистрируется свыше 1,5 миллиона пациентов, которым ставят диагноз «черепно-мозговая травма», при этом более 70% данных пациентов – работоспособные мужчины в возрасте от 16 до 59 лет [1]. При оказании экстренной помощи перенесшим тяжелую черепно-мозговую травму, а также реабилитации таких пациентов специалисты разного профиля все чаще сталкиваются с различными нарушениями в гипоталамо-гипофизарной системе, требующими коррекции [2–4]. Морфофункциональные изменения в органах эндокринной системы, в том числе в мужских половых железах (МПЖ), при этом имеют особое значение. Несмотря на очевидную актуальность данной проблемы, а также на многочисленные клинические исследования, несомненно указывающие на нарушения репродуктивной функции у пациентов, перенесших тяжелую ЧМТ, морфологические изменения эпителио-сперматогенного слоя МПЖ, а также морфогенез этих изменений остаются мало изученными [3, 5].

В немалой степени этому способствует и то обстоятельство, что существующие способы анализа состояния эпителио-сперматогенного слоя человека до настоящего времени базируются на поверхностных описательных или полуколичественных методах исследования. Яркая иллюстрация сказанному – хорошо известный морфологам способ оценки состояния репродуктивной функции мужчин Джонсона [6]. Наряду с этим практически в подавляющем большинстве исследований не используются данные о цикличности (стадийности) сперматогенеза человека.

В связи с изложенным выше целью настоящего исследования стало количественное изучение морфогенеза эпителио-сперматогенного слоя у мужчин в различные сроки после тяжелой ЧМТ.

## Материалы и методы

При помощи общепринятых гистологических и морфометрических методов было исследовано 45 мужских половых желез от умерших в различные сроки от тяжелой ЧМТ. Выбор возрастных групп в работе проводился в соответствии с международной классификацией возрастных периодов жизни человека [7]. Группу сравнения составили половые железы 19 здоровых мужчин в возрасте от 22 до 59 лет, умерших от ЧМТ на месте происшествия. Кроме этого исследованы половые железы мужчин того же возрастного диапазона (26 секционных наблюдений), умерших от разных видов черепно-мозговой травмы тяжелой степени в различные временные промежутки после ее получения. Все 45 наблюдений были тщательно отобраны из 130 летальных случаев, причиной смерти которых по анамнестическим, клиническим, патоморфологическим данным (предварительное гистологическое исследование головного мозга и половых желез) или данным судебно-медицинского исследования послужила ЧМТ тяжелой степени в разных ее видах. Все случаи разделены в зависимости от длительности течения ЧМТ на три группы: группа умерших через 1–3 суток после ЧМТ (n=9), через 6–9 суток после ЧМТ (n=10) и через 15 суток и более после ЧМТ (n=7). В исследование были включены только те секционные наблюдения, в которых, по данным медицинской документации и морфологического исследования, отсутствовали признаки эндокринной патологии, хронических интоксикаций, острой алкогольной или наркотической интоксикации, гипертонической болезни, грыжесечения, в анамнезе умерших не имелось венерических заболеваний, а проявления атеросклероза были минимальными: не превышали 6,25% площади поражения аорты в брюшном отделе [8].

Половые железы, извлеченные из окружающих тканей через 5–6 часов, но не позднее 10 часов с момента наступления смерти, освобождали от влагалищных

оболочек, придатка и подвергали разделному взвешиванию и определению объема. Исследуемый материал фиксировали в жидкости Буэна и 10% забуференном формалине. Тканевые фрагменты после обезвоживания в спиртах восходящей концентрации заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Исследованию подвергали поперечные срезы извитых семенных канальцев (30 канальцев в каждом наблюдении). Морфометрическое исследование эпителио-сперматогенного слоя выполняли, используя фоторегистрацию (1350 цифровых фотограмм) при помощи инструментов программы «ВидеоТест – Морфология 5.0» [9]. Проводимые в работе морфометрические исследования сперматогенеза основаны на современных представлениях о цикличности развития мужских половых клеток. Различные типы сперматогенных клеток идентифицировали по месту расположения в той или иной клеточной ассоциации по классификации Y. Clermont [10] и хорошо изученным цитологическим параметрам ядер клеточных элементов: диаметр ядра, характер распределения хроматина и хромосом. В каждом секционном наблюдении определяли цитологический профиль сперматогенеза по методу А.Ф. Астраханцева, М.П. Мазуровой, А.В. Федотова, В.Г. Папкова [11]. Получаемые количественные показатели сопоставляли с общепринятыми сведениями о фазах сперматогенеза: фаза размножения, роста, созревания и формирования [12].

Все числовые данные в настоящем исследовании обработаны методами альтернативной и вариационной статистики при помощи программы Statistica 9.0 с соблюдением рекомендаций биологических и медицинских исследований [13] на персональном компьютере.

## Результаты исследования и обсуждение полученных данных

Проведен комплексный, морфологический и морфометрический анализ яичек мужчин репродуктивного возраста, умерших в различные временные промежутки после тяжелой черепно-мозговой травмы (26 секционных наблюдений). Сроки длительности ЧМТ, по данным медицинских карт пациентов стационаров, составляли от 1 до 85 суток.

Анализ цитологического профиля сперматогенеза в группе лиц, умерших от ЧМТ через 1–3 суток, позволяет обнаружить снижение числа сперматогоний  $A_T$  (тип А темные) в клеточных ассоциациях II, III, V и VI типов (соответственно, на 30%, 32%, 37% и 38%), а также сперматогоний  $A_B$  (тип А бледные) в клеточной ассоциации VI типа на 14% (табл. 1). В то же время в клеточной ассоциации II типа обнаруживается некоторое увеличение количества этих клеток (регистрируемое как по абсолютным числовым значениям, так и по средней взвешенной по отношению к sustentocитам). Факт, возможно указывающий на начальные процессы активации дифференцировки сперматогоний  $A_T$  в сперматогонии  $A_B$ . Количество сперматогоний типа Б умень-

шается (на 38%) в клеточной ассоциации I типа. Данное снижение может являться результатом нарушения процессов дифференцировки сперматогоний  $A_T$  в сперматогонии  $A_B$ . Вероятно, именно этим можно объяснить незначительное повышение взвешенного среднего количества  $A_B$ , которое в данной группе увеличено и на 15% больше аналогичного показателя в группе сравнения (табл. 2). Динамика изменений количественного состава различных сперматогоний может свидетельствовать о начальных десквамативных и деструктивных процессах стадии размножения. Исследование цитологического профиля сперматогенеза также обнаруживает нарушения сперматогенеза в фазе роста первичных и вторичных сперматоцитов. Об этом свидетельствует достоверное уменьшение количества зиготенных, диплотенных сперматоцитов (соответственно, на 35%, 41%), а также вторичных сперматоцитов (на 9%) в клеточной ассоциации VI типа (фаза созревания).

В это же время количество прелептотенных сперматоцитов (клеточная ассоциация III типа) и пахитенных сперматоцитов (клеточные ассоциации I, II, III, IV, V типов) остается практически стабильным. Анализ цитологического профиля сперматогенеза в фазе формирования сперматид демонстрирует, что количество поздних сперматид  $C_D$  на 34% уменьшается в клеточной ассоциации II типа (рис. 1), а количество сперматид  $C_C$  уменьшается (соответственно, на 31% и 29%) в клеточных ассоциациях V и VI типов. Это уменьшение сочетается со снижением (на 43%) количества ранних сперматид типа  $C_A$  в клеточной ассоциации I типа, сперматид типа  $B_O$  (тип Б с округлыми ядрами) (на 36%) в клеточной ассоциации III типа,

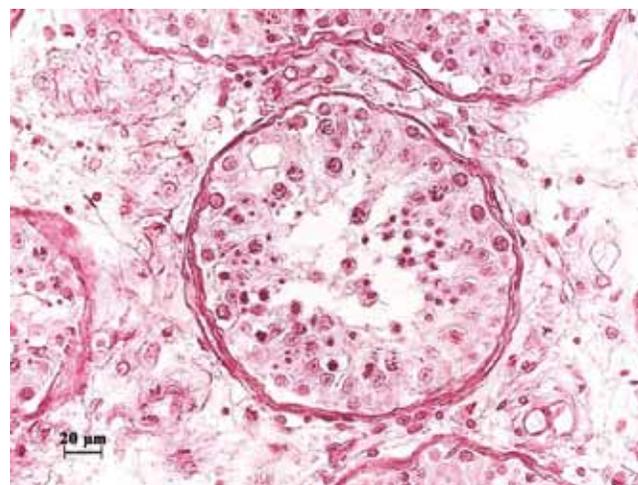


Рис. 1. Клеточная ассоциация I типа, снижение количества сперматогоний Б, ранних сперматид типа А и поздних сперматид  $C_A$ . Возраст пациента 38 лет.

Группа 1–3 суток после черепно-мозговой травмы. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

Fig. 1. Cell association of type I, decrease in the number of spermatogonia B, early spermatids type A and late spermatids  $C_A$ . The patient is 38 years old. 1–3 days after traumatic brain injury. H&E stain,  $\times 400$

Таблица 1 | Table 1

**Цитологический профиль сперматогенеза в яичках мужчин, умерших через 1–3 суток после ЧМТ (M±m)**  
**Cytological profile of spermatogenesis in the testicles of men who died 1–3 days after TBI (M±m)**

	Типы сперматогенных клеток   Types of spermatogenic cells	Типы клеточных ассоциаций   Types of cell associations					
		I	II	III	IV	V	VI
	Сустентоциты   Sustentacular cell		17,9±0,79	17,7±0,91	17,1±1,14	17,7±0,88	17,1±1,24
Спермагонии   Spermatogonia	A темного типа (A <sub>т</sub> )   A dark type (A <sub>д</sub> )	3,26±0,42	3,15±0,28	2,84±0,46	2,21±0,12	2,52±0,41	2,8±0,47
	A бледного типа (A <sub>б</sub> )   A pale type (A <sub>п</sub> )	9,29±0,48	11,1±1,04	11,3±1,04	10,7±1,21	11,8±0,54	10,4±1,06
	Сперматогонии типа Б   Spermatogonia type B	4,46±0,33	4,49±0,45	–	–	–	–
Первичные сперматоциты   Primary spermatocytes	Прелептоненные сперматоциты   Preleptotene spermatocytes	–	–	6,85±0,88	–	–	–
	Лептоненные сперматоциты   Leptotene spermatocytes	–	–	–	6,07±0,49	6,13±0,4	–
	Зиготенные сперматоциты   Zygotene spermatocytes	–	–	–	–	–	6,21±0,72
	Пахитенные сперматоциты   Pachytene spermatocytes	20±2,61	22,1±2,29	20,4±3,45	18,9±2,47	18,8±2,89	–
	Диплотенные сперматоциты   Diplotene spermatocytes	–	–	–	–	–	12,2±2,24
	Митозы   Mitoses	–	–	–	–	–	3,18±0,76
	Сперматоциты II порядка   Secondary spermatocytes	–	–	–	–	–	18,4±4,2
Ранние сперматиды   Early spermatids	Ранние сперматиды типа А   Early spermatids, type A	22,5±3,19	31±5,44	–	–	–	–
	Сперматиды типа Б округлые (B <sub>о</sub> )   Round spermatids, type B (B <sub>о</sub> )	–	–	34,4±4,8	–	–	–
	Сперматиды типа Б удлинённые (B <sub>у</sub> )   Elongated spermatids, type B are (B <sub>у</sub> )	–	–	–	28,6±3,76	–	–
Поздние сперматиды   Late spermatids	Сперматиды типа С   Spermatids, type C	–	–	–	–	39,9±2,43	19,3 ±1,61
	Поздние сперматиды типа Д   Late spermatids, type D	30,3±3,27	16,9±2,54	–	–	–	–

а также B<sub>у</sub> (тип Б с удлинёнными ядрами) (на 47%) в ассоциация IV типа.

Таким образом, анализ цитологического профиля сперматогенеза свидетельствует о том, что уже через 1–3 суток после ЧМТ обнаруживаются нарушения количественного состава сперматогенных клеток на всех стадиях сперматогенеза (размножения, роста, созревания и формирования). При этом наибольшие изменения обнаруживаются в клеточной ассоциации VI типа, цитоархитектоника которой соответствует наиболее важной фазе мейоза – фазе созревания.

При исследовании гистологических срезов половых желез у пациентов, умерших через 6–9 суток после тяжелой черепно-мозговой травмы, визуально обращает на себя внимание появление так называемых недифференцированных клеточных ассоциаций, в которых име-

ются сперматогонии и сперматоциты, но отсутствуют сперматиды. Подобные каналцы составляют до 20% от всех каналцев на площади гистологического среза. Анализ цитологического профиля выявляет более выраженное, чем в группе сравнения, уменьшение сперматогоний A<sub>т</sub> в клеточной ассоциации VI типа (на 42%), а также сперматогоний типа Б в клеточных ассоциациях I и II типов (табл. 3). По нашему мнению, полученные данные, с одной стороны, указывают на глубокие нарушения дифференцировки сперматогоний в период мейоза, а с другой – свидетельствуют о некоторой стабилизации пула сперматогоний, связанной с активацией их регенерационного потенциала, поскольку во всех клеточных ассоциациях (кроме VI типа) количество сперматогоний A<sub>т</sub> и A<sub>б</sub> достоверно не отличается от контрольных величин (табл. 1).

Цитологический профиль сперматогенеза в яичках здоровых мужчин, умерших на месте от ЧМТ (M±m)  
Cytological profile of spermatogenesis in the testicles of healthy men who died at the site of TBI

	Типы сперматогенных клеток   Types of spermatogenic cells	Типы клеточных ассоциаций   Types of cell associations					
		I	II	III	IV	V	VI
	Сустентоциты   Sustentacular cell	18,61±0,74	18,47±1,13	16,8±1,22	14,12±1,96	15,25±1,73	16,29±0,83
Сперматогонии   Spermatogonia	А темного типа (A <sub>т</sub> )   A dark type (A <sub>D</sub> )	4,29±0,53	4,39 ±0,49	4,18±0,42	3,18±0,3	3,99±0,6	3,84±0,28
	А бледного типа (A <sub>б</sub> )   A pale type (A <sub>P</sub> )	10,24±1,87	10,21±1,8	12,72±1,42	9,96±1,54	10,28±1,68	11,18±1,48
	Сперматогонии типа Б   Spermatogonia type B	7,19±0,53	5,98±0,36	–	–	–	–
Первичные сперматоциты   Primary spermatocytes	Прелептотенные сперматоциты   Preleptotene spermatocytes	–	–	6,01±0,65	–	–	–
	Лептотенные сперматоциты   Leptotene spermatocytes	–	–	–	5,69±0,82	6,41±0,69	–
	Зиготенные сперматоциты   Zygotene spermatocytes	–	–	–	–	–	8,37±0,94
	Пахитенные сперматоциты   Pachytene spermatocytes	26,23±2,44	23,73±1,46	24,15±3,06	18,02±3,93	19,45±4,11	–
	Диплотенные сперматоциты   Diplotene spermatocytes	–	–	–	–	–	18,06±2,9
Митозы   Mitoses	Митозы   Mitoses	–	–	–	–	–	5,5±0,73
	Сперматоциты II порядка   Secondary spermatocytes	–	–	–	–	–	19,89±5,77
Ранние сперматиды   Early spermatids	Ранние сперматиды типа А   Early spermatids, type A	41,14±6,58	35,73±5,53	–	–	–	–
	Сперматиды типа Б округлые (B <sub>о</sub> )   Round spermatids, type B (B <sub>o</sub> )	–	–	51,65±7,68	–	–	–
	Сперматиды типа Б удлинённые (B <sub>о</sub> )   Elongated spermatids, type B are (B <sub>o</sub> )	–	–	–	45,18±9,58	–	–
Поздние сперматиды   Late spermatids	Сперматиды типа С   Spermatids, type C	–	–	–	–	44,73±5,64	23,96 ±3,15
	Поздние сперматиды типа Д   Late spermatids, type D	38,85±2,81	25,19±3,72	–	–	–	–

Наряду с этим обнаруживаются более выраженные нарушения сперматогенеза в фазе роста первичных и вторичных сперматоцитов по сравнению с группой без ЧМТ, а также с аналогичными показателями группы лиц, умерших через 1–3 дня после ЧМТ. Так, уменьшено (на 43%) количество зиготенных сперматоцитов в клеточной ассоциации VI типа, а также пахитенных сперматоцитов (рис. 2): в клеточных ассоциациях I, II, III, IV и V типов (соответственно, на 46%, 35%, 39%, 46%, 23%).

Стадия пахитены самая длительная в сперматогенезе и предшествует фазе конденсации и укорочения хромосом в диплотене, поэтому полученные данные свидетельствуют о более глубоких деструктивных изменениях эпителио-сперматогенного слоя. Необходимо отметить и тот факт, что более выраженные изменения

обнаруживаются и в процессе мейоза, так как количество практически всех типов сперматогенных клеток, входящих в состав клеточной ассоциации VI типа, значительно редуцировано (табл. 3).

Анализ фазы формирования сперматид свидетельствует о том, что количество ранних сперматид типа C<sub>A</sub> (клеточная ассоциация I типа), сперматид типов B<sub>о</sub> и B<sub>о</sub> (клеточные ассоциации III и IV типов) значительно уменьшено (соответственно, на 46%, 37% и 31%), в то время как показатель количества всех остальных типов сперматид хотя и имеет тенденцию к снижению, однако демонстрирует определенную стабильность. Это представляет особый интерес, поскольку в некоторых исследованиях нарушения фазы формирования обнаруживают в виде увеличения количества ранних сперматид типа B<sub>о</sub> с удлинёнными ядрами. Количест-

во поздних сперматид  $C_D$  демонстрирует тенденцию к уменьшению в клеточной ассоциации I типа, количество сперматид  $C_C$  – тенденцию к уменьшению в клеточной ассоциации VI типа (табл. 3). Это уменьшение сочетается со снижением количества ранних сперматид типа  $C_A$  в клеточной ассоциации I типа, сперматид типа  $B_O$  (клеточная ассоциация III типа) и  $B_0$  (ассоциация IV типа).

Полученные данные свидетельствуют о более глубоких структурно-функциональных процессах дезорганизации эпителио-сперматогенного слоя, вызванных нарушением регуляции в системе гипофиз–гонады.

В половых железах мужчин, умерших через 15 суток и более после ЧМТ, количество извитых семенных канальцев с недифференцированными клеточными ассоциациями составляет 43% от количества всех каналь-

цев на площади гистологического среза. Наряду с этим в половых железах мужчин данной группы отмечалось появление извитых семенных канальцев и даже групп таких канальцев, в которых полностью отсутствовали все сперматогенные клетки, сохранены были только клетки Сертоли, то есть канальцев с синдромом «только клетки Сертоли». Количество таких канальцев составляет 16% от количества канальцев на площади гистологического среза.

Анализ цитологического профиля сперматогенеза демонстрирует резко выраженное уменьшение количества практически всех сперматогенных клеток на всех шести стадиях цикла сперматогенеза. Так, количество сперматогоний  $A_T$  в клеточных ассоциациях I, II, V и VI типов уменьшено на 51%, 40%, 58% и 71%, соответственно. При этом количество сперматогоний  $A_B$  во

Таблица 3 | Table 3

Цитологический профиль сперматогенеза в яичках мужчин, умерших через 6–9 суток после ЧМТ ( $M \pm m$ )  
Cytological profile of spermatogenesis in the testicles of men who died 6–9 days after TBI ( $M \pm m$ )

	Типы сперматогенных клеток   Types of spermatogenic cells	Типы клеточных ассоциаций   Types of cell associations					
		I	II	III	IV	V	VI
	Сустентоциты   Sustentacular cell	20,6±1,58	19,6±1,03	19,4±0,92	18,9±2,36	20,1±1,76	16,1±0,75
Сперматогонии   Spermatogonia	A темного типа ( $A_T$ )   A dark type ( $A_D$ )	4,81±1,19	4,11±0,83	3,1±0,69	2,79±0,36	4,44±0,68	2,99±0,48
	A бледного типа ( $A_B$ )   A pale type ( $A_p$ )	10,8±1,48	11,7±0,75	12,1±0,73	11,8±1,04	12,7±0,67	9,34±0,81
	Сперматогонии типа B   Spermatogonia type B	3,98±0,52	3,8±0,46	–	–	–	–
Первичные сперматоциты   Primary spermatocytes	Прелептотенные сперматоциты   Preleptotene spermatocytes	–	–	7,67±1,45	–	–	–
	Лептотенные сперматоциты   Leptotene spermatocytes	–	–	–	6,7±0,83	6,57±0,72	–
	Зиготенные сперматоциты   Zygotene spermatocytes	–	–	–	–	–	5,83±0,36
	Пахитенные сперматоциты   Pachytene spermatocytes	15,8±1,94	16,7±1,72	16,2±2,37	12±1,43	15±2,54	–
	Диплотенные сперматоциты   Diplotene spermatocytes	–	–	–	–	–	7,81±0,76
	Митозы   Mitoses	–	–	–	–	–	2,75±0,65
	Сперматоциты II порядка   Secondary spermatocytes	–	–	–	–	–	12,9±3,85
Ранние сперматиды   Early spermatids	Ранние сперматиды типа A   Early spermatids, type A	24,1±2,8	29,7±4,7	–	–	–	–
	Сперматиды типа B округлые ( $B_O$ )   Round spermatids, type B ( $B_O$ )	–	–	37,9±1,77	–	–	–
	Сперматиды типа B удлинённые ( $B_0$ )   Elongated spermatids, type B are ( $B_0$ )	–	–	–	39,1±1,57	–	–
Поздние сперматиды   Late spermatids	Сперматиды типа C   Spermatids, type C	–	–	–	–	52±7,43	21,7±3,26
	Поздние сперматиды типа D   Late spermatids, type D	35,2±4,84	27,6±3,98	–	–	–	–

всех шести типах ассоциаций снижено незначительно либо имеет значения, близкие к показателям группы сравнения (табл. 4). Факт, указывающий на выраженные процессы торможения дифференцировки сперматогоний  $A_T$  в сперматогонии  $A_B$ .

Количество сперматогоний типа Б в клеточных ассоциациях I и II типов снижено на 60% и 49%, что свидетельствует о выраженных нарушениях процессов дифференцировки в фазе размножения (табл. 4).

Значительные нарушения сперматогенеза обнаруживаются в фазе роста первичных и вторичных сперматоцитов. Отмечено достоверное снижение количества лептотенных сперматоцитов (на 38%) в клеточной ассоциации IV типа, а также количества зиготенных, диплотенных сперматоцитов и вторичных сперматоцитов (соответственно, на 46%, 57% и 57%) в клеточной ассоциации VI типа, то есть в фазу созревания (рис. 3). Значительные изменения претерпевает количество прелептотенных сперматоцитов – уменьшение на 33% (клеточная ассоциация III типа) и пахитенных сперматоцитов (клеточные ассоциации I, II, III, IV, V типов), где их количество уменьшено, соответственно, на 79%, 67%, 57%, 49% и 70% (табл. 4).

Еще более существенные изменения наблюдаются в фазе формирования сперматид. Так, в I и II типах клеточных ассоциаций количество поздних сперматид  $C_D$  снижено, соответственно, на 88% и 66%. Количество сперматид  $C_C$  в V и VI типах клеточных ассоциаций уменьшено, соответственно, на 77% и 76%. Указанные изменения сопровождаются значительным снижением количества ранних сперматид, сперматид  $C_A$  в клеточных ассоциациях I и II типов (на 85% и 87%), а также сперматид  $B_0$  и  $B_0$  в клеточных ассоциациях III и IV типов (на 90% и 90%) (табл. 4).

Таким образом, анализ цитологического профиля сперматогенеза свидетельствует о том, что на поздних сроках после тяжелой черепно-мозговой травмы (15 суток и более) обнаруживаются выраженные нарушения количественного состава сперматогенных клеток на всех стадиях сперматогенеза – размножения, роста, созревания и формирования. При этом наибольшие изменения выявляются в фазе созревания и формирования сперматид во всех шести типах клеточных ассоциаций. В целом выявленные изменения на поздних сроках после тяжелой ЧМТ можно охарактеризовать термином «пестрая атрофия половых желез».

## Выводы

1. На ранних сроках после тяжелой черепно-мозговой травмы наибольшие изменения наблюдаются в эпителио-сперматогенном слое извитых семенных канальцев, выраженность дезорганизации которого прямо пропорциональна длительности течения травмы.

2. Начальные проявления нарушения сперматогенеза в остром периоде тяжелой черепно-мозговой травмы

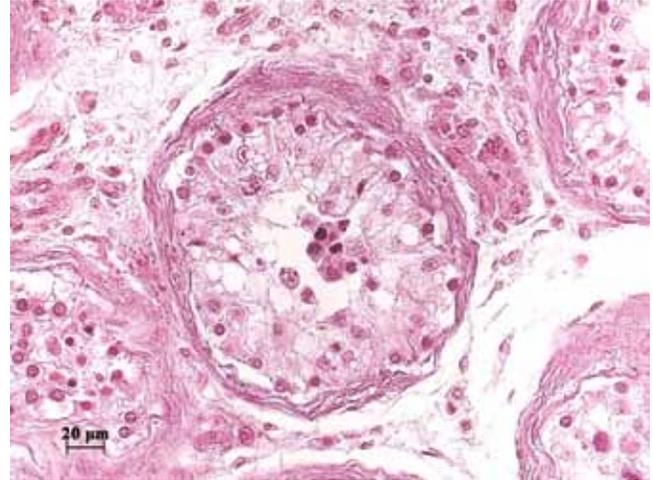


Рис. 2. Уменьшение количества сперматогоний типа Б, пахитенных сперматоцитов и поздних сперматид  $C_D$  в клеточной ассоциации I типа. Вакуолизация эпителио-сперматогенного слоя в виде зон «выпадения» сперматогенных клеток. Возраст пациента 22 года. 6–9 суток после черепно-мозговой травмы. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

Fig. 2. Decrease in the number of B-type spermatogonia, Pachytenny spermatocytes and late  $S_D$  spermatids in the type I cell association. Vacuolation of the epithelial-spermatogenic layer in the form of zones of «loss» of spermatogenic cells. The patient is 22 years old. 6–9 days after traumatic brain injury. H&E stain,  $\times 400$

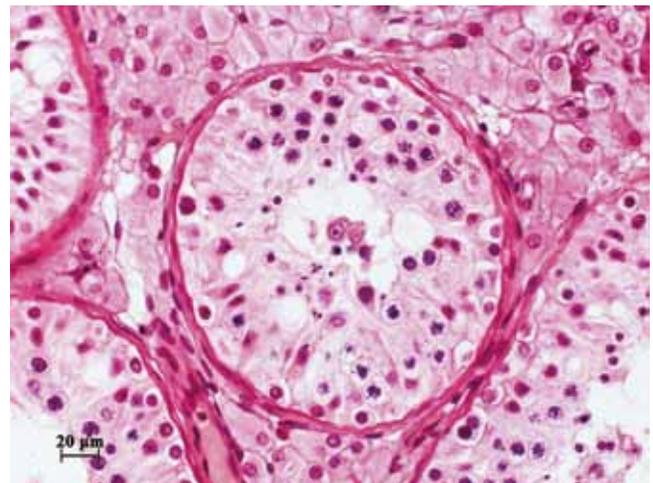


Рис. 3. Клеточная ассоциация VI типа. Уменьшение количества сперматогенных клеток, десквамация сперматоцитов II порядка. Возраст пациента 46 лет. Группа 15 суток и более после черепно-мозговой травмы. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

Fig. 3. Cellular association of type VI. Decrease in the number of spermatogenic cells, desquamation of spermatocytes of the second order. The patient is 46 years old. 15 days or more after traumatic brain injury. H&E stain,  $\times 400$

выявлены в фазе формирования, в виде структурных и количественных изменений сперматид. Морфологическим показателем повреждения эпителио-сперма-

Таблица 4 | Table 4

**Цитологический профиль сперматогенеза в яичках мужчин,  
умерших через 15 суток и более после ЧМТ (M±m)**  
Cytological profile of spermatogenesis in the testicles of men who died 15 days or more after TBI (M±m)

	Типы сперматогенных клеток   Types of spermatogenic cells	Типы клеточных ассоциаций   Types of cell associations					
		I	II	III	IV	V	VI
	Суспендоциты   Sustentacular cell	16,8±0,57	17,4±0,15	20,6±1,19	20,1±0,98	19±0,14	18,1±0,28
Спермагонии   Spermatogonia	А темного типа (A <sub>т</sub> )   A dark type (A <sub>д</sub> )	2,8±0,14	2,77±0,4	6,05±2,18	4,09±1,08	2,8±0	2,35±0,36
	А бледного типа (A <sub>б</sub> )   A pale type (A <sub>р</sub> )	8,4±0,99	8,3±0,21	6,55±0,95	6,25±0,71	9,7±0,21	9,71±1,21
	Спермагонии типа Б   Spermatogonia type B	4,1±0,21	4,23±0,31	–	–	–	–
Первичные сперматоциты   Primary spermatocytes	Прелептотенные сперматоциты   Preleptotene spermatocytes	–	–	4,9±1,06	–	–	–
	Лептотенные сперматоциты   Leptotene spermatocytes	–	–	–	4,83±1,03	7,3±0,64	–
	Зиготенные сперматоциты   Zygotene spermatocytes	–	–	–	–	–	5,07±0,66
	Пахитенные сперматоциты   Pachytene spermatocytes	6±0,57	9,33±0,47	8,3±1,65	7,63±1,56	7,8±0,14	–
	Диплотенные сперматоциты   Diplotene spermatocytes	–	–	–	–	–	7,8±0,26
Митозы   Mitoses	Митозы   Mitoses	–	–	–	–	–	3±0
	Сперматоциты II порядка   Secondary spermatocytes	–	–	–	–	–	5,26±0,29
Ранние сперматиды   Early spermatids	Ранние сперматиды типа А   Early spermatids, type A	6,1±1,91	5,23±1,11	–	–	–	–
	Сперматиды типа Б округлые (B <sub>о</sub> )   Round spermatids, type B (B <sub>о</sub> )	–	–	6±1,37	–	–	–
	Сперматиды типа Б удлиненные (B <sub>д</sub> )   Elongated spermatids, type B are (B <sub>д</sub> )	–	–	–	5,61±0,79	–	–
Поздние сперматиды   Late spermatids	Сперматиды типа С   Spermatids, type C	–	–	–	–	11±0,42	5,89±0,43
	Поздние сперматиды типа Д   Late spermatids, type D	4,8±0,57	6,97±1,67	–	–	–	–

тогенного слоя является уменьшение числа сперматогенных клеток (вплоть до их полного исчезновения из семенных канальцев).

3. С длительностью течения черепно-мозговой травмы имеют наибольшую корреляцию нарушения фазы созревания (зиготенная, диплотенная стадии мейоза, количество фигур митотического деления), а также фазы роста (прелептотенная, лептотенная и пахитенная фазы роста первичных сперматоцитов). Относительной резистентностью к повреждению в фазе размножения обладают спермагонии типа А темные, что может явиться основой перспективы коррекции обнаруженных изменений.

**Вклад авторов**

Концепция и дизайн исследования – А.В. Федотов, А.Ф. Астраханцев, Н.М. Крупнов.  
Сбор и обработка материала – А.В. Федотов, А.Ф. Астраханцев, М.П. Мазурова.  
Написание текста – А.В. Федотов, А.Ф. Астраханцев.  
Редактирование – А.В. Федотов, А.Ф. Астраханцев, Н.М. Крупнов.

**Authors contribution**

Conceived the study and designed the experiment – A.V. Fedotov, A.F. Astrakhantsev, N.M. Krupnov.  
Collected the data and performed the analysis – A.V. Fedotov, A.F. Astrakhantsev, M.P. Mazurova.  
Wrote the paper – A.V. Fedotov, A.F. Astrakhantsev.  
Edited the manuscript – A.V. Fedotov, A.F. Astrakhantsev, N.M. Krupnov.

**Литература/References**

1. Здравоохранение в России – 2019: Статистический сборник. Доступно по адресу: [https://gks.ru/bgd/regl/b19\\_34/Main.htm](https://gks.ru/bgd/regl/b19_34/Main.htm)  
Health in Russia – 2019: The statistical collection. Available from: [https://gks.ru/bgd/regl/b19\\_34/Main.htm](https://gks.ru/bgd/regl/b19_34/Main.htm)
2. *Кравцов Ю.И., Шевченко К.В., Четвертных В.А., Кравцова Е.Ю.* Дисрегуляция вегетативной, гипофизарно-надпочечниковой и иммунной систем у пациентов с тяжелой черепно-мозговой травмой. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013;2(113):4–8.  
*Kravtsov IuI, Shevchenko KV, Chetvertnykh VA, Kravtsova Elu.* Dysregulation of autonomic, hypophysis-adrenal and immune systems in patients with severe brain injury. S.S. Korsakov Journal of neurology and psychiatry. 2013;2(113):4–8 (In Russ.).
3. *Древал А.В.* Репродуктивная эндокринология. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2019. 240 с.  
*Dreval AV.* Reproductivnaya ehndokrinologiya. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 240 p. (In Russ.).
4. *Лихтерман Л.Б., Потанов А.Д., Кравчук В.А., Охлопков В.А.* Классификация последствий черепно-мозговой травмы. Неврологический журнал. 1998;3(3):12–14.  
*Likhberman LB, Potanov AD, Kravchuk VA, Okhlopkov VA.* Klasifikatsiya posledstviy cherepno-mozgovoï travmy. The Neurological journal. 1998;3(3):12–14 (In Russ.).
5. *Карашева Б.Г., Кибрик Н.Д.* Черепно-мозговая травма и сексуальная функция: корреляция особенностей сексуальных расстройств и локализации патологического очага в головном мозге. Андрология и генитальная хирургия. 2013;4(14):53–57.  
*Karasheva BG, Kibrik ND.* Brain injury and sexual function: correlation between the features of sexual disorders and the site of a pathological focus in the brain. Andrology and genital surgery. 2013;4(14):53–57 (In Russ.).
6. *Johnsen SG.* Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones. 1970;1(1):2–25. DOI: 10.1159/000178170.
7. *Миллюков В.Е., Жарикова Т.С.* Критерии формирования возрастных групп пациентов в медицинских исследованиях. Клиническая медицина. 2015;11(93):5–11.  
*Milyukov VE, Zharikova TS.* Criteria for the formation of age groups of patients in clinical studies. Clinical medicine. 2015;11(93):5–11 (In Russ.).
8. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия: Руководство. Москва: Медицина, 1990. 384 с.  
*Avtandilov GG.* Medical morphometry: a guide. Moscow: Medicine, 1990. 384 p. (In Russ.).
9. *Саяпина И.Ю., Целуйко С.С., Доровских В.А.* Использование программы «ВидеоТест – Морфология 5.0» в оценке компенсаторно-приспособительных реакций органов мужской репродуктивной системы крыс. Информатика и системы управления. 2010;2(24):73–76.  
*Sayapina IYu, Tseluiko SS, Dorovskikh VA.* Ispol'zovanie programmy «VideoTesT – Morfologiya 5.0» v otsenke kompensatorno-prisposobitel'nykh reaktivnykh organov muzhskoi reproduktivnoi sistemy krysa. Information science and control systems. 2010;2(24):73–76 (In Russ.).
10. *Amann RP.* The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? J of Androl. 2008;29(5):469–87. DOI: 10.2164/jandrol.107.004655.
11. Патент № 2665162 С1 Российская Федерация, МПК G01N 33/483 (2006.01), А61В 5/00(2006.01). Способ диагностики нарушения сперматогенеза путем определения цитологического профиля: № 2017123419: заявл. 03.07.2017: опубл. 28.08.2018/Астраханцев А.Ф., Мазурова М.П., Федотов А.В., Папков В.Г.; заявитель РязГМУ. 7 с.  
Patent No. 2665162 C1 Russian Federation, IPC G01N 33/483 (2006.01), A61B 5/00 (2006.01). A method for diagnosing spermatogenesis disorders by determining the cytological profile: No. 2017123419: decl. 07/03/2017: publ. 08/28/2018/Astrakhansev AF, Mazurova MP, Fedotov AV, Papkov VG; applicant Ryazan State Medical University. 7 p.
12. *Афанасьев Ю.И., Юрина Н.А.* (ред.). Гистология, эмбриология, цитология: Учебник. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 800 с.  
*Afanas'ev YuI, Yurina NA.* (eds.). Gistologiya, embriologiya, tsitologiya: Uchebnik. Moscow: GEOTAR-Media, 2018. 800 p. (In Russ.).
13. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика. Москва: Практика, 1999. 459 с.  
*Glantz S.* Medical and biological statistics. Moscow: Praktika, 1999. 459 p. (In Russ.).

**Информация об авторах**

Александр Викторович Федотов – судебно-медицинский эксперт, заведующий медико-криминалистическим отделением ГБУ РО Бюро судебно-медицинской экспертизы.

Александр Федорович Астраханцев – доктор медицинских наук, профессор, заведующий патологоанатомическим отделением Центральной клинической больницы «РЖД-Медицина».

Николай Михайлович Крупнов – кандидат медицинских наук, начальник ГБУ РО Бюро судебно-медицинской экспертизы.

Мария Павловна Мазурова – кандидат медицинских наук, врач-патологоанатом Центральной клинической больницы «РЖД-Медицина».

**Author information**

Aleksandr V. Fedotov – Forensic Medical Expert, Head of the Forensic Medical Department of the Ryazan Regional Bureau of Forensic Medical Expertise.

<https://orcid.org/0000-0001-8262-4439>

Aleksandr F. Astrakhansev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, Central Clinical Hospital «RZD-Medicine».

<https://orcid.org/0000-0002-6385-0745>

Nikolai M. Krupnov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Ryazan Regional Bureau of Forensic Medical Expertise.

<https://orcid.org/0000-0002-5162-1662>

Mariya P. Mazurova – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, Central Clinical Hospital «RZD-Medicine».

<https://orcid.org/0000-0003-1693-0053>

## Сонный гломус, мозговое вещество надпочечника и орган Цукеркандля как единая симпатoadренальная система в пренатальном развитии человека

Д.А. Отлыга, О.А. Юнеман, Е.Г. Цветкова, А.С. Харламова, Н.В. Бесова, С.В. Савельев

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

*Введение.* Клетки мозгового вещества надпочечника, сонного гломуса и органа Цукеркандля имеют общее происхождение из нервного гребня. Однако, несмотря на схожее гистологическое строение и биохимические характеристики, современная научная парадигма противопоставляет сонный гломус надпочечнику и органу Цукеркандля. Последним отводится эндокринная функция, сонному гломусу – хеморецепторная. Осуществление сонным гломусом эндокринной функции до сих пор остается под вопросом. Цель исследования – методом иммуногистохимии определить возможность осуществления сонным гломусом эндокринной функции в эмбриональный, пренатальный и ранне-фетальный период развития человека и сопоставить ее с функцией органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочечника.

*Материалы и методы.* Работа выполнена на пяти аутопсиях плодов (гестационный возраст 8–20 недель) при помощи иммунопероксидазного маркирования антителами к bIII-тубулину, тирозингидроксилазе, синаптофизину и PGP9.5.

*Результаты.* Во всех исследованных образцах сонного гломуса, органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочечника клетки показывали позитивную реакцию на все поставленные маркеры. Во всех исследованных гломусах обнаружилось очень высокое отношение ТН/bIII, приближающееся к единице. В органе Цукеркандля у всех плодов отношение ТН/bIII оказалось значительно выше, чем в сонном гломусе. Еще большее отношение ТН/bIII обнаружилось в надпочечниках на сроках 11–20 недель гестации. В надпочечнике эмбриона на сроке 8 недель это отношение оказалось ниже, чем в сонном гломусе.

*Заключение.* Установлено, что количество ТН-позитивных клеток в сонном гломусе в эмбриональном и раннем фетальном периоде значительно выше, чем в постнатальном периоде развития. Наши данные могут свидетельствовать о наличии эндокринной функции у сонного гломуса в антенатальный период развития. Таким образом, вполне вероятно, что сонный гломус наравне с органом Цукеркандля синтезирует катехоламины в то время, пока мозговое вещество надпочечника является функционально незрелым и не может поддерживать гомеостаз организма.

**Ключевые слова:** симпатoadренальная система, развитие человека, сонный гломус, орган Цукеркандля, надпочечник.

**Для корреспонденции:** Дмитрий Александрович Отлыга. E-mail: otlyga@bk.ru

**Для цитирования:** Отлыга Д.А., Юнеман О.А., Цветкова Е.Г., Харламова А.С., Бесова Н.В., Савельев С.В. Сонный гломус, мозговое вещество надпочечника и орган Цукеркандля как единая симпатoadренальная система в пренатальном развитии человека. Клини. эксп. морфология. 2020;9(2):61–69. DOI:10.31088/CEM2020.9.2.61-69

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

Статья поступила 13.03.2020. Получена после рецензирования 20.04.2020. Принята в печать 14.05.2020.

## Carotid body, adrenal medulla and Zuckerkandl organ as an integrated sympathoadrenal system in human prenatal development

D.A. Otlyga, O.A. Junemann, E.G. Tsvetkova, A.S. Kharlamova, N.V. Besova, S.V. Saveliev

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

*Introduction.* The cells in adrenal medulla, carotid body and the organ of Zuckerkandl have the common origin from the neural crest. Nevertheless, despite the similarity in both histological and biochemical characteristics of these organs, contemporary scientific paradigm contrasts the carotid body with the adrenal gland and the organ of Zuckerkandl. The adrenal gland and the organ of Zuckerkandl are considered to function as endocrine

glands whereas carotid body is thought to be a chemoreceptor organ. The endocrine function of the carotid body is still in question. The aim of the work was to evaluate the possibility of the presence of endocrine function by the carotid body in the embryonic, prefetal and early fetal period of human development by immunohistochemistry and compare it with the function of the organ of Zuckerkandl and the adrenal medulla. *Materials and methods.* The study was performed on 5 fetal autopsies (gestational age 8–20 weeks) using immunoperoxidase labeling with antibodies to bIII-tubulin, tyrosine hydroxylase, synaptophysin and PGP9.5. *Results.* In all samples of the carotid body, the organ of Zuckerkandl and the adrenal medulla, the cells showed a positive reaction to all the markers. All carotid bodies showed very high TH/bIII ratio approaching unity. The organ of Zuckerkandl in all fetus showed much higher TH/bIII ratio than that in the carotid body. In the adrenal glands at 11–20 weeks of gestation TH/bIII ratio was even greater. In the adrenal gland in 8-week embryo this ratio was lower than in the carotid body.

*Conclusion.* We have showed that the number of TH-positive cells in the carotid body in the embryonic and early fetal periods is much higher than in postnatal period. Our data may indicate endocrine function of the carotid body during the antenatal period of development. Thus, the carotid body is likely to synthesize catecholamines while the adrenal medulla is functionally immature and cannot support the body's homeostasis.

**Keywords:** sympathoadrenal system, human development, carotid body, organ of Zuckerkandl, adrenal gland.

**Corresponding author:** Dmitry A. Otlyga. E-mail: otlyga@bk.ru

**For citation:** Otlyga D.A., Junemann O.A., Tsvetkova E.G., Kharlamova A.S., Besova N.V., Saveliev S.V. Carotid body, adrenal medulla and Zuckerkandl organ as an integrated sympathoadrenal system in human prenatal development. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(2):61–69 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.61–69

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

**Received** 13.03.2020. **Received in revised form** 20.04.2020. **Accepted** 14.05.2020.

## Введение

Клетки мозгового вещества надпочечника, сонного гломуса и органа Цукеркандля имеют общее происхождение из нервного гребня [1]. Более того, вопреки первоначальным теориям, отрицавшим наличие катехоламинов в сонном гломусе, на данный момент показано, что клетки последнего, аналогично клеткам надпочечника и органа Цукеркандля, синтезируют катехоламины, хотя и в гораздо более низких концентрациях [1–3]. Тем не менее, несмотря на схожее гистологическое строение и биохимические характеристики, современная научная парадигма противопоставляет сонный гломус надпочечнику и органу Цукеркандля. Последним отводится эндокринная функция, сонному гломусу – хеморецепторная [4].

Первоначальное представление о сонном гломусе как эндокринном органе было подвергнуто сомнению в работах известного испанского нейростолога Фернандо де Кастро. Его эксперименты по перерезке нервов органа показали, что в сонном гломусе преобладает в основном афферентная иннервация, обеспечиваемая ветвью языкоглоточного нерва [1, 5]. В дальнейшем бельгийские физиологи Жан-Франсуа и Корней Хеймансы установили, что в области бифуркации общей сонной артерии располагается хеморецепторная зона, ответственная за определение парциального давления газов крови. После ознакомления с работами де Кастро Корней Хейманс с сотрудниками опубликовали работу, показывающую роль сонного гломуса в синокаротидном рефлексе в ответ на изменение химического состава крови. Впоследствии за данное открытие Корней Хейманс получил в 1938 году Нобелевскую премию по физиологии и медицине [6].

С тех пор теория, провозглашающая хеморецепторную функцию сонного гломуса, стала общепризнанной. Согласно этой теории, сонный гломус, определяя изменения парциального давления кислорода и углекислого газа в крови, посредством сложных рефлексов регулирует активность сердечно-сосудистой и дыхательной систем [4]. Основываясь на этом, целый ряд специалистов методом воздействия на орган пытались создать новые пути лечения бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких и артериальной гипертензии. В ход шли как хирургические методы (односторонняя и двухсторонняя резекция сонного гломуса) [7], так и фармакологические (препарат альмитрин) [8].

Однако, несмотря на десятилетия исследований, результаты до сих пор остаются противоречивыми. В связи с этим некоторые исследователи практически отказались от непосредственно воздействующих на сонный гломус методик, перейдя к более тонким методам, направленным на прямую стимуляцию вегетативных нервов [9].

Подобные противоречия, скорее всего, связаны с тем, что все еще не ясны механизмы хеморецепции в сонном гломусе. К примеру, пока нет убедительного ответа на вопрос, какой именно элемент органа ответствен за детекцию изменения парциального давления газов крови.

На наш взгляд, методики, обычно применяемые в изучении данной проблемы, недостаточны для решения поставленных задач. Необходимость комплексного изучения сонного гломуса совместно с нервной, сердечно-сосудистой и симпатoadrenalовой системами показали еще Н.А. Смиттен и Т.А. Григорьева [1, 10].

В связи с этим особый интерес представляет период эмбриогенеза. Изучение развития сонного гломуса, ор-

гана Цукеркандля и мозгового вещества надпочечника как единой симпатoadреналовой системы может помочь лучше разобраться в функциях не только сонного гломуса, но и двух других органов.

Таким образом, цель нашего исследования – определить методом иммуногистохимии возможность осуществления сонным гломусом эндокринной функции в эмбриональный, префетальный и раннефетальный период развития человека и сопоставить ее с функцией органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочечника.

### Материалы и методы

Работа выполнена на трех аутопсиях плодов и двух эмбрионах, гестационный возраст 8–20 недель (табл. 1). Возраст плодов определен по клиническим данным и согласно критериям Милованова и Савельева [11].

Сонные гломусы, надпочечники и органы Цукеркандля фиксировались в 10% забуференном формалине («БиоВитрум», Россия). Ткань органов подвергалась стандартному протоколу проводки через изопреп («БиоВитрум», Россия), заливалась в Histomix («БиоВитрум», Россия). Тотальные серийные срезы толщиной 6 мкм изготавливали на микротоме Leica RM2245 (Германия). Каждый 20-й срез органа наклеивали на предметное стекло, депарафинизировали и окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. Срезы просматривали при помощи светового микроскопа Leica DM2500 (Германия).

Для проведения иммуногистохимических реакций выбирали самые большие по площади срезы. Их депарафинизировали, гидратировали и обрабатывали 3% раствором перекиси водорода для блокировки эндогенной пероксидазы. Затем срезы помещали в раствор Ultra V Block (Thermo Fisher Scientific, США), для демаскировки антигенов предварительно проводили кипячение в цитратном буфере (pH 6,0).

Были проведены иммуногистохимические реакции с первичными антителами (табл. 2). Выбор антител обусловлен необходимостью определить количество активно синтезирующих катехоламины клеток по отношению к общему количеству нейроэндокринных

Таблица 1 | Table 1

Возраст эмбрионов и плодов  
Embryonic and fetal ages

№ случая   No. of the case	Срок гестации   Gestational age	Период   Period
1.	8 недель п.о.   8 PCW	Эмбриональный   Embryonic
2.	10 недель п.о.   10 PCW	Предфетальный   Prefetal
3.	13–14 недель п.м.   13–14 GW	Раннефетальный   Early-fetal
4.	18–19 недель п.м.   18–19 GW	Раннефетальный   Early-fetal
5.	19–20 недель п.м.   19–20 GW	Раннефетальный   Early-fetal

П.о. – после оплодотворения, п.м. – после менструации  
PCW – post conception weeks, GW – gestation weeks

клеток сонного гломуса. В связи с этим анализ соотношения ТН/бП является наиболее адекватным поставленным задачам.

Срезы инкубировали с антителами в течение 60 минут при комнатной температуре. В качестве системы детекции применяли набор UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific, США).

Для позитивного контроля использовали срезы верхнего шейного ганглия и мозга человека. Негативным контролем служили реакции с заменой первых антител на раствор фосфатного буфера.

Для морфометрического анализа срезы органов фотографировали с помощью камеры «ЛОМО ТСА-9.0» (Россия) на  $\times 100$ . Цифровые изображения были сохранены в форматах JPEG и TIFF, морфометрия проводилась при помощи программы Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, США).

### Результаты

Во всех исследованных образцах сонного гломуса, органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочеч-

Таблица 2 | Table 2

Характеристика первичных антител  
Primary antibody characteristics

№	Антиген, вид животного, производитель   Antigen, host species, supplier	Разведение антител   Working dilution
1.	бПН-тубулин, кроличьи поликлональные. Abcam (Великобритания)   bPН-tubulin, rabbit polyclonal. Abcam (UK)	1:500
2.	PGP9.5, мышинные моноклональные. Thermo Fisher Scientific (США)   PGP9.5, murine monoclonal. Thermo Fisher Scientific (USA)	1:300
3.	Тирозингидроксилаза, кроличьи поликлональные. Abcam (Великобритания)   Tyrosine hydroxylase, rabbit polyclonal. Abcam (UK)	1:160
4.	Синаптофизин, мышинные моноклональные. Abcam (Великобритания)   Synaptophysin, murine monoclonal. Abcam (UK)	1:100

ника клетки показывали позитивную реакцию на все поставленные маркеры.

В отличие от гломусов взрослых людей, которые имеют очень низкий уровень экспрессии тирозингидроксилазы, во всех исследованных гломусах обнаружилось очень высокое отношение ТН/бIII, приближающееся к единице (рис. 1). Помимо этого, отношения размеров гломусов к диаметрам общих сонных артерий было гораздо больше относительных размеров гломусов взрослых.

В органе Цукеркандля у всех плодов отношение ТН/бIII оказалось значительно выше, чем в сонном гломусе (рис. 2 А, В, 3, 4). Еще большее отношение ТН/бIII обнаружилось в надпочечниках плодов на сроках 11–20 недель гестации (рис. 2 А, В, 3). В надпочечнике эмбриона на сроке 8 недель это отношение было даже ниже, чем в сонном гломусе (рис. 4). Это связано, скорее всего, с тем, что мозговое вещество надпочечников созревает намного позже.

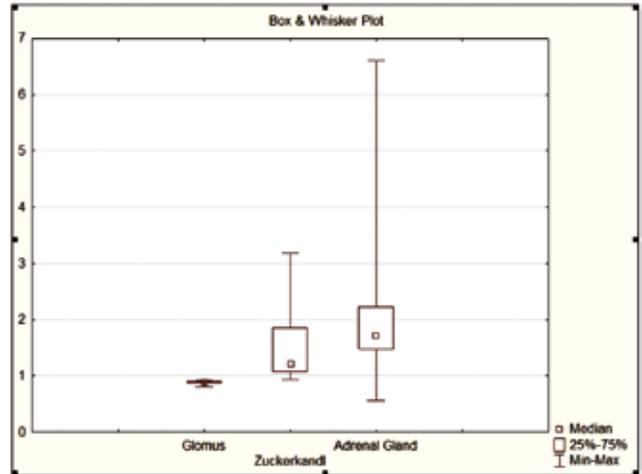


Рис. 1. Отношение ТН/бIII клеток в сонном гломусе, органе Цукеркандля и мозговом веществе надпочечника

Fig. 1. TH/bIII ratio in the carotid body, the organ of Zuckerkandl and the adrenal medulla

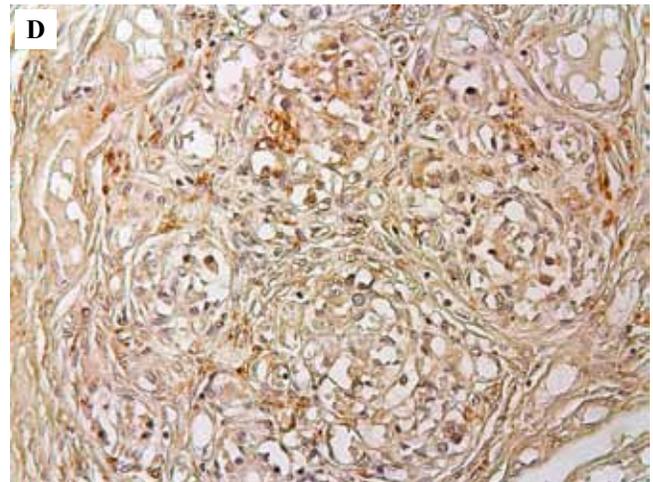
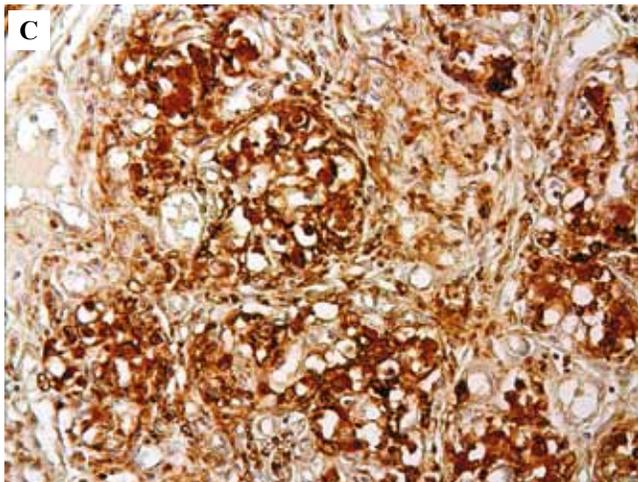
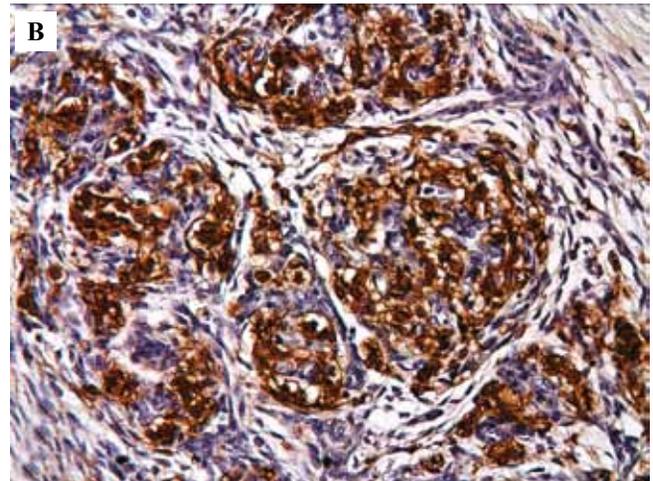
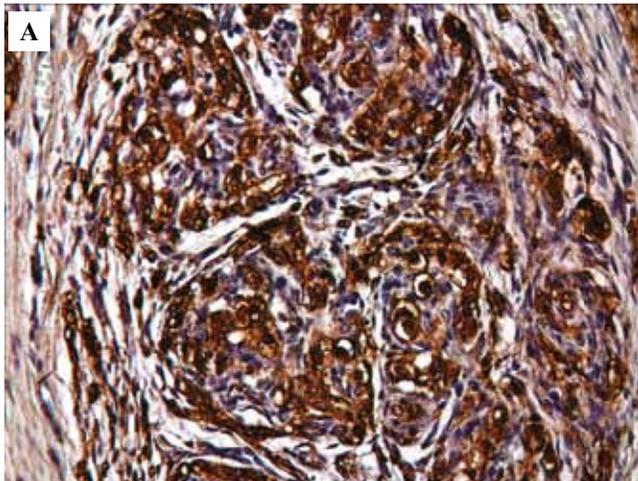


Рис. 2. Сонный гломус плода сроком 19–20 недель (А – бIII-тубулин, В – тирозингидроксилаза) и сонный гломус взрослого человека (С – бIII-тубулин, D – тирозингидроксилаза). Иммуногистохимическая окраска, ядра докрашены гематоксилином,  $\times 200$

Fig. 2. Fetal carotid body at 19–20 gestation weeks (A – bIII-tubulin, B – tyrosine hydroxylase) and mature carotid body (C – bIII-tubulin, D – tyrosine hydroxylase). Immunohistochemical assay, nuclei stained with hematoxylin,  $\times 200$

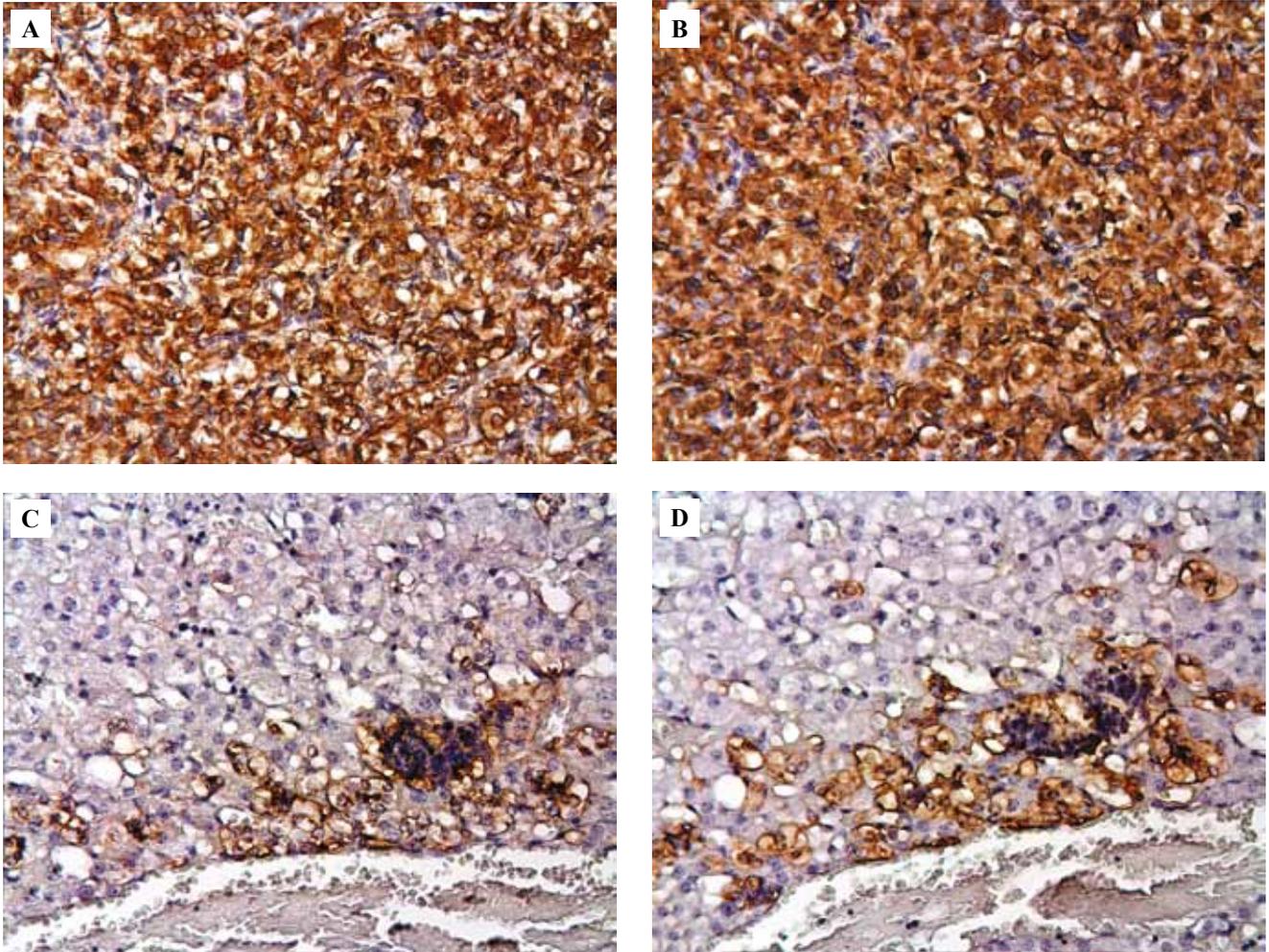


Рис. 3. Орган Цукеркандля (А – bIII-тубулин, В – тирозингидроксилаза) и надпочечник (С – bIII-тубулин, D – тирозингидроксилаза) плода сроком 19–20 недель. Иммуногистохимическая окраска, ядра докрашены гематоксилином,  $\times 200$

Fig. 3. Organ of Zuckerlandl (A – bIII-tubulin, B – tyrosine hydroxylase) and the adrenal gland (C – bIII-tubulin, D – tyrosine hydroxylase) at 19–20 gestation weeks. Immunohistochemical assay, nuclei stained with hematoxylin,  $\times 200$

Мозговое вещество надпочечников всех плодов образовано группами клеток, разбросанными посреди вещества фетальной коры. Большая их часть представлена незрелыми клетками с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, другая часть – зрелыми хромоаффинными клетками.

### Обсуждение

Со времен утверждения парадигмы о хеморецепторной роли сонного гломуса выдвинуто три теории, объясняющие механизмы хеморецепции в органе. Согласно первой, наиболее популярной теории, первичным чувствительным элементом являются клетки I типа [2, 4]. В противовес ей британский гистолог Тим Биско предположил, что роль сенсора парциального давления газов крови выполняют свободные нервные окончания [12]. Третья теория отводила данную роль клеткам II типа [12].

После изучения физиологии и ультраструктурных характеристик этих элементов третья теория была

опровергнута, так как клетки II типа не синтезируют нейромедиаторы, не формируют никакого потенциала действия на своей клеточной мембране, а между ними и другими элементами органа нет синаптических связей [4, 12].

Таким образом, долгое время велась борьба между сторонниками первой и второй теории. Основные аргументы в пользу первой заключаются в следующем.

1. Отсутствие дегенерации нервных окончаний на клетках I типа при перерезке языкоглоточного нерва интракраниально свидетельствует об афферентной роли этих нервных волокон [6, 13].

2. Наличие гранул, содержащих катехоламины, в клетках I типа [5].

3. Способность клеток I типа менять заряд на своей мембране в ответ на изменение парциального давления кислорода и углекислого газа [14].

4. Высвобождение клетками I типа катехоламинов в ответ на гипоксию [15].

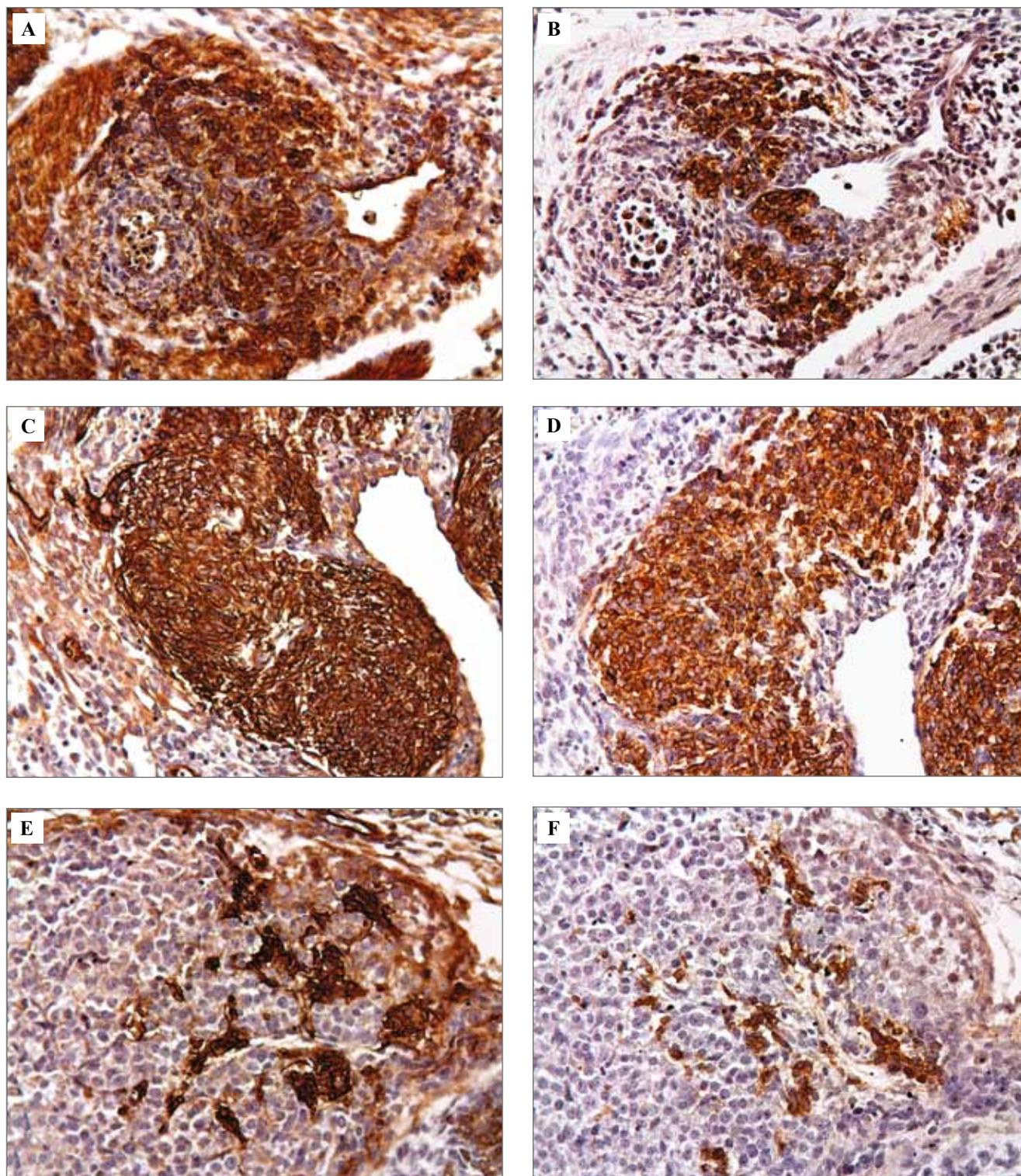


Рис. 4. Сонный гломус (А – bIII-тубулин, В – тирозингидроксилаза), орган Цукеркандля (С – bIII-тубулин, D – тирозингидроксилаза) и надпочечник (Е – bIII-тубулин, F – тирозингидроксилаза) эмбриона сроком 8 недель. Иммуногистохимическая окраска, ядра докрашены гематоксилином,  $\times 200$

Fig. 4. Carotid body (A – bIII-tubulin, B – tyrosine hydroxylase), the organ of Zuckerkandl (C – bIII-tubulin, D – tyrosine hydroxylase) and the adrenal gland (E – bIII-tubulin, F – tyrosine hydroxylase) of embryo at 8 weeks gestation. Immunohistochemical assay, nuclei stained with hematoxylin,  $\times 200$

5. У жителей высокогорья, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями и заболеваниями легких, отмечается увеличение каротидного гломуса [16].

Тем не менее оппонент этой теории Тим Биско с коллегами заново поставили эксперименты с интракраниальной перерезкой нервных волокон. Особенностью их работы стало длительное наблюдение за дегенерацией нервных окончаний. Животные после интракраниальной перерезки выводились из эксперимента в промежутки от 1,5 до 378 дней после операции. При этом оказалось, что на 44-й день после операции статистически значимо снижается количество нервных окончаний на клетках I типа. Также у имеющих окончания отмечены признаки нейродегенерации [17].

Кроме того, авторы отметили, что при этом не наблюдалось никакого изменения в электрофизиологической активности синусного нерва. Это значит, что клетки I типа не могут являться первичным хемочувствительным элементом, а нервные окончания на этих клетках эфферентными. Биско с соавторами предположили, что роль хемосенсора выполняют свободные нервные окончания, расположенные в строме органа вокруг сосудов [12]. Стоит отметить, что помимо этой части нервных окончаний доходит до долек органа, погружается в тело клеток II типа и слепо заканчивается, не образуя синапсы ни с ними, ни с клетками I типа [18].

При этом повторные эксперименты по перерезке языкоглоточного нерва показали, что описанной Биско дегенерации не происходит. Такое противоречие в результатах объясняется, скорее всего, тем, что при перерезке корешков языкоглоточного нерва шло механическое повреждение чувствительного ганглия. Кроме того, у кошек, на которых работал Биско, языкоглоточный нерв имеет ганглионарное расширение до его вхождения в яремное отверстие [18]. В связи с этим полученные результаты отлично объясняются повреждением чувствительного ганглия, находящегося между костями черепа и стволом мозга. Таким образом, становится понятным и сохранение электрических потенциалов синусного нерва, так как они обеспечиваются сохраненными нервными клетками ганглия, находящегося в канале кости. Именно поэтому Биско наблюдал лишь уменьшение количества синапсов на гломусных клетках, но не полное их исчезновение.

После того как теория Биско была опровергнута, обсуждение механизмов хеморецепции в сонном гломусе шло лишь в парадигме первой теории. Велось изолированное изучение клеток гломуса методами молекулярной биологии, но любые эмпирические данные, полученные экспериментаторами, рассматривались в узких рамках первичной роли клеток I типа в хемочувствительности.

Незамеченными для мировой научной общест­венности стали фундаментальные труды двух отечественных ученых – Татьяны Андреевны Григорьевой и Нины Александровны Смиттен. В своих работах они обстоятельно показали, что изучение сонных гломусов нельзя

вести в отрыве от изучения нервной, сердечно-сосудистой и симпатoadренальной системы.

Именно комплексное системное изучение сонного гломуса позволило им откинуть ошибки узконаправленных исследований. Общий вывод работы Григорьевой гласит, что параганглии, и сонный гломус в том числе, являются эндокринными органами, имеющими тесное отношение к регуляции моторики сосудов путем продукции катехоламинов [10].

Дополнив работу Григорьевой большим фактическим материалом различных групп животных (от круглоротых до млекопитающих), Смиттен показала эволюционное развитие сонного гломуса, органа Цукеркандля и мозгового вещества надпочечника. Результатом стало обобщение о работе симпатoadренальной системы в целом.

Согласно ее теории, сами клетки сонного гломуса являются рудиментарными остатками хромаффинной ткани, до этого выполнявшей эндокринные функции. В процессе эволюционного развития произошло объединение хромаффинной ткани в едином органе – надпочечнике, одновременно с этим хромаффинная ткань в других областях организма редуцировалась. Это позволило централизовать хромаффинную ткань в одном месте. Централизация обеспечила лучший контроль со стороны нервной системы, что дало преимущества для более тонкой регуляции гомеостаза [1].

Результаты нашей работы свидетельствуют о высоком уровне синтеза тирозингидроксилазы во всех изученных органах. Приближающееся к единице отношение ТН/bIII в сонном гломусе плодов человека оказалось весьма неожиданным. Согласно нашим пока неопубликованным данным, а также данным литературы [19], количество обнаруживаемых на светооптическом уровне ТН-позитивных клеток в сонном гломусе человека в постнатальный период развития довольно низкое (рис. 2).

Это может свидетельствовать о том, что во внутриутробный период развития сонный гломус выполняет эндокринную функцию наравне с органом Цукеркандля. Оба органа синтезируют катехоламины, компенсируя этим недостаточность функции мозгового вещества надпочечника.

Известно, что уже на четвертом месяце после рождения количество ТН-позитивных клеток в сонном гломусе человека незначительное [19]. В связи с низкой концентрацией катехоламинов в ткани сонного гломуса некоторые авторы посчитали логичным отнести орган к парасимпатическим хемочувствительным параганглиям, чьим основным нейромедиатором является ацетилхолин [5]. Данные, полученные при помощи экспериментов по перерезке нервов, лишь укрепили это воззрение.

Тем не менее наше исследование опровергает эту идею. В эмбриональный и ранний фетальный период сонный гломус человека содержит большое количество ТН-позитивных клеток. Кроме того, у эмбриона сроком 8 недель в сонном гломусе их количество даже больше, чем в надпочечнике.

Из литературы известно, что после рождения мозговое вещество надпочечника остается незрелым, а его функции, вероятно, берет на себя орган Цукеркандля, который достигает максимального развития к трем годам. В дальнейшем наблюдается его инволюция с одновременным ростом и созреванием мозгового вещества надпочечника [20].

Таким образом, точка зрения Н.А. Смиттен о рудиментарном характере клеток сонного гломуса имеет под собой весомые основания. В эволюционном ряду от круглоротых до млекопитающих первой подвергается редукции хромаффинная ткань жаберных артерий. Одновременно с этим мозговое вещество надпочечников является наиболее поздним образованием.

Подобное мы наблюдаем и в индивидуальном развитии человека. Сонный гломус практически сразу после рождения перестает синтезировать тирозингидроксилазу. Затем, после второго года постнатального развития, подвергается инволюции орган Цукеркандля, и функцию выработки катехоламинов берет на себя мозговое вещество надпочечника.

Обнаруживаемые изменения мембранных потенциалов и открытие кальциевых каналов мембран клеток I типа сонного гломуса в ответ на гипоксию не могут быть убедительным доказательством их хемосенсорной функции, так как целый ряд исследований свидетельствует, что такие изменения имеют место в клетках самых разных органов, в том числе и в клетках мозгового вещества надпочечника [21, 22]. Наличие преимущественно афферентной иннервации также не может свидетельствовать в пользу хемочувствительности клеток I типа. Во-первых, известно о наличии немногочисленных эфферентных нервных окончаний на этих клетках [23]. Во-вторых, в процессе эволюции функционально ненагруженная ткань может частично терять ту или иную иннервацию [1].

Более того, увеличение объема ткани сонного гломуса в ответ на хроническую гипоксию тоже не может являться доказательством, так как в результате длительного гипоксического воздействия наблюдается также увеличение коркового и мозгового вещества надпочечников [24]. Следовательно, здесь, возможно, имеет место неспецифическая реакция ткани сонного гломуса в ответ на гипоксию.

Таким образом, принимая во внимание полученные нами результаты, фундаментальные работы Т.А. Григорьевой и сравнительно-анатомические исследования Н.А. Смиттен, можно предположить, что первичным хемочувствительным элементом сонного гломуса являются свободные нервные окончания. Клетки I и II типа, скорее всего, выполняют морфогенетическую роль, способствуя правильному вращению и созреванию нервных окончаний. Кроме того, активно потребляя кислород, клетки I типа могут создавать градиент концентрации газов, который усиливает чувствительность свободных нервных окончаний, располагающихся между сосудами и клетками гломуса.

## Заключение

Установлено, что количество ТН-позитивных клеток в сонном гломусе в эмбриональном и раннем фетальном периоде значительно выше, чем в постнатальном периоде развития. Наши данные могут свидетельствовать о наличии эндокринной функции у сонного гломуса в антенатальный период развития. Следовательно, вполне вероятно, что сонный гломус наравне с органом Цукеркандля синтезирует катехоламины в то время, пока мозговое вещество надпочечника функционально незрело и не может поддерживать гомеостаз организма.

Более того, можно утверждать, что первичным хемочувствительным элементом органа скорее являются свободные нервные окончания, чем гломусные клетки, выполняющие эндокринные функции.

Таким образом, наша работа позволяет иначе взглянуть на роль сонного гломуса в физиологии человека.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.А. Отлыга, С.В. Савельев.  
Сбор и обработка материала – Д.А. Отлыга, А.С. Харламова, Е.Г. Цветкова, О.А. Юнеман, Н.В. Бесова.  
Написание текста – Д.А. Отлыга.  
Редактирование – О.А. Юнеман, Е.Г. Цветкова, С.В. Савельев.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – D.A. Otlyga, S.V. Saveliev.  
Collected the data and performed the analysis – D.A. Otlyga, A.S. Kharlamova, E.G. Tsvetkova, O.A. Junemann, N.V. Besova.  
Wrote the paper – D.A. Otlyga.  
Edited the manuscript – O.A. Junemann, E.G. Tsvetkova, S.V. Saveliev.

## Литература/References

1. *Смиттен Н.А.* Симпатoadренальная система в филогенезе позвоночных. Москва: Наука, 1972. 347 с.  
*Smitten NA.* Sympatho-adrenal system in phylogenesis and ontogenesis. Moscow: Nauka, 1972. 347 p. (In Russ.).
2. *Fagerlund MJ, Kåhlin J, Ebberyd A, Schulte G, Mkrichian S, Eriksson LI.* The human carotid body expression of oxygen sensing and signaling genes of relevance for anesthesia. *Anesthesiology*. 2010;113(6):1270–9. DOI: 10.1097/ALN.0b013e3181fac061.
3. *Pallof DJ.* The mammalian carotid body. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 1987;102:1–91. DOI: 10.1007/978-3-642-71857-1.
4. *Kumar P, Prabhakar NR.* Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol*. 2012;2(1):141–219. DOI: 10.1002/cphy.c100069.
5. *Zak FG, Lawson W.* (eds). The paraganglionic chemoreceptor system: physiology, pathology and clinical medicine. Springer-Verlag, New York, 1982. 583 p. DOI: 10.1007/978-1-4612-5668-7.
6. *De Castro F.* Towards the sensory nature of the carotid body: Hering, De Castro and Heymans. *Front Neuroanat*. 2009;3:23. DOI: 10.3389/neuro.05.023.2009.
7. *Winter B.* Carotid Body Resection. *The Annals of thoracic surgery*. 1973;16(6):648–59. DOI: 10.1016/S0003-4975(10)65048-5.
8. *Heath D, Smith P.* Diseases of the human carotid body. Springer-Verlag, London, 1992. 205 p. DOI: 10.1007/978-1-4471-1874-9

9. Карацуров С.Е., Карацуров Е.С., Гудовский Л.М., Добровольский С.П., Пасечник Т.М., Стояновский А.В. Радиочастотная электростимуляция СКН при лечении бронхиальной астмы. Хирургия. 1999;(12):4–6. Karashurov SE, Karashurov ES, Gudovskii LM, Dobrovolskii SR, Pasechnik TM, Stoianovskii AV. Radiofrequency electrostimulation of carotid sinus nerves for the treatment of bronchial asthma. Khirurgiia. 1999;(12):4–6 (In Russ.).
10. Григорьева Т.А. Иннервация кровеносных сосудов. Москва: Медгиз, 1954. 375 с. Grigoryeva TA. Innervation of blood vessels. Moscow: Medgiz, 1954. 375 p. (In Russ.).
11. Милованов А.П., Савельев С.В. Внутритробное развитие человека: Руководство для врачей. Москва: МДВ, 2006. 384 с. Milovanov AP, Saveliyev SV. Vnutritrobnoe razvitie cheloveka: Rukovodstvo dlya vrachej. Moscow: MDV, 2006. 384 p. (In Russ.).
12. Biscoe TJ. Carotid body: structure and function. *Physiol Rev.* 1971;51(3):437–95. DOI: 10.1152/physrev.1971.51.3.437.
13. Gonzalez C, Conde SV, Gallego-Martín T, Olea E, Gonzalez-Obeso E, Ramirez M et al. Fernando de Castro and the discovery of the arterial chemoreceptors. *Front Neuroanat.* 2014;8:25. DOI: 10.3389/fnana.2014.00025.
14. López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, Pardal R, Pascual A, Piruat JI, Durán R et al. Oxygen sensing in the carotid body. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1177(1):119–31. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05033.x.
15. Prabhakar NR. Neurotransmitters in the carotid body. *Adv Exp Med Biol.* 1994;360:57–69. DOI: 10.1007/978-1-4615-2572-1\_6.
16. Heath D, Edwards C, Harris P. Post-mortem size and structure of the human carotid body: Its relation to pulmonary disease and cardiac hypertrophy. *Thorax.* 1970;25(2):129–40. DOI: 10.1136/thx.25.2.129.
17. Biscoe TJ, Lall A, Sampson SR. Electron microscopic and electrophysiological studies on the carotid body following intracranial section of the glossopharyngeal nerve. *J Physiol.* 1970;208(1):133–52. DOI: 10.1113/jphysiol.1970.sp009110.
18. Nishi K, Stensaas LJ. The ultrastructure and source of nerve endings in the carotid body. *Cell Tissue Res.* 1974;154(3):303–19. DOI: 10.1007/BF00223728.
19. Lazarov NE, Reindl S, Fischer F, Gratzl M. Histaminergic and dopaminergic traits in the human carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009;165(2–3):131–6. DOI: 10.1016/j.resp.2008.10.016.
20. Subramanian A, Maker VK. Organs of Zuckerkandl: their surgical significance and a review of a century of literature. *Am J Surg.* 2006;192(2):224–34. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2006.02.018.
21. Keating DJ, Rychkov GY, Giacomini P, Roberts ML. Oxygen-sensing pathway for SK channels in the ovine adrenal medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(10):882–7. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2010.04279.x.
22. Weir EK, López-Barneo J, Buckler KJ, Archer SL. Acute oxygen-sensing mechanisms. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2042–55. DOI: 10.1056/NEJMra050002.
23. Kondo H. Innervation of the carotid body of the adult rat. A serial ultrathin section analysis. *Cell Tissue Res.* 1976;173(1):1–15. DOI: 10.1007/BF00219262.
24. Gosney JR. Adrenal corticomedullary hyperplasia in hypobaric hypoxia. *J Pathol.* 1985;146(1):59–64. DOI: 10.1002/path.1711460107.

### Информация об авторах

Дмитрий Александрович Отлыга – научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Ольга Андреевна Юнеман – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Екатерина Глебовна Цветкова – лаборант-исследователь лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Анастасия Сергеевна Харламова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Надежда Васильевна Бесова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории развития нервной системы НИИ морфологии человека.

Сергей Вячеславович Савельев – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией развития нервной системы НИИ морфологии человека.

### Author information

Dmitry A. Otylga – Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-6719-3383>

Olga A. Junemann – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0001-5828-5393>

Ekaterina G. Tsvetkova – Histotechnologist, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-7943-7760>

Anastasia S. Kharlamova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology. <http://orcid.org/0000-0003-1163-4132>

Nadezhda V. Besova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-7493-0345>

Sergey V. Saveliyev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Laboratory of Nervous System Development, Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-1447-7198>

## Роль экспериментального сахарного диабета 1-го типа матери в нарушении морфофункционального становления эндокриноцитов семенников у потомства крыс

С.Д. Антонов, Г.В. Брюхин

ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

*Введение.* Актуальность исследования обусловлена повсеместным ростом числа больных сахарным диабетом, в том числе женщин фертильного возраста. В то же время у матерей с сахарным диабетом рождается потомство с признаками диабетической фетопатии. Роль сахарного диабета матери в нарушении морфофункционального состояния органов мужской репродуктивной системы потомства изучена недостаточно. Цель исследования – проанализировать особенности морфофункционального становления эндокриноцитов семенников у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа в различные сроки постнатального развития.

*Материалы и методы.* Сахарный диабет 1-го типа у экспериментальных животных (крыс) моделировали с помощью стрептозотоцина. Объектом исследования явилось потомство самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа в различные сроки постнатального развития. Проводили определение весовых параметров яичек. Оценку морфофункционального состояния эндокринного компартмента семенников проводили на серийных гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, путем определения площади паренхимы и интерстициальной ткани семенников, подсчета суммарного содержания интерстициальных эндокриноцитов и соотношения их морфофункциональных типов с определением содержания активных и неактивных клеток Лейдига с последующим определением их индекса активности.

*Результаты.* Установлено изменение параметров массы семенников, а также площади паренхимы и стромы семенника подопытных животных. Выявлены снижение общего содержания интерстициальных эндокриноцитов и изменение соотношения их морфофункциональных типов.

*Заключение.* Сахарный диабет 1-го типа матери в условиях эксперимента оказывает негативное влияние на морфофункциональное становление эндокринного компартмента семенников потомства крыс.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, потомство, крыса, семенник, клетки Лейдига.

**Для корреспонденции.** Сергей Дмитриевич Антонов. E-mail: s.d.antonov@mail.ru

**Для цитирования:** Антонов С.Д., Брюхин Г.В. Роль экспериментального сахарного диабета 1-го типа матери в нарушении морфофункционального становления эндокриноцитов семенников у потомства крыс. Клини. эксп. морфология. 2020;9(2):70–77. DOI:10.31088/CEM2020.9.2.70-77

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

Статья поступила 10.03.2020. Получена после рецензирования 16.04.2020. Принята в печать 14.05.2020.

## The effect of experimental maternal type 1 diabetes on the disturbances of the morphofunctional formation of testicular endocrinocytes in rat offspring

S.D. Antonov, G.V. Bryukhin

South-Ural State Medical University of Ministry of Health of Russia, Chelyabinsk, Russia

*Introduction.* The relevance of the study is due to the fact of widespread increase in the number of patients with diabetes mellitus, including women of childbearing age. At the same time, mothers with diabetes give birth to offspring with signs of diabetic fetopathy. The impact of maternal diabetes on the disturbances of the morphofunctional status of the male reproductive organs in the offspring is not well understood. *The aim of study* was to analyze the features of the morphological and functional formation of testis endocrinocytes in the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes mellitus at different stages of postnatal development.

*Material and methods.* Type 1 diabetes mellitus was modeled in experimental animals (rats) with streptozotocin. The object of the study was the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes mellitus at different stages of postnatal development. The testicle weight was determined. Morphological and func-

tional status of the endocrine compartment of the testes was assessed in serial histological sections stained by hematoxylin and eosin. The area of the parenchyma and interstitial tissue of the testes was determined; the total content of interstitial endocrinocytes was calculated and correlation of their morphofunctional types was carried out with evaluation of the content of active and inactive Leydig cells with subsequent calculation of their activity index.

*Results.* The weight of the testicles was changed as well as the area of the testicular parenchyma and stroma in the experimental animals. The total content of interstitial endocrinocytes was decreased and their subpopulation composition was altered.

*Conclusion.* Experimental maternal type 1 diabetes mellitus has a negative effect on the morphological and functional formation of the endocrine compartment of the testes in the rat offspring.

**Keywords:** diabetes, offspring, rat, testis, Leydig cells.

**Corresponding author:** Sergei D. Antonov. E-mail: s.d.antonov@mail.ru

**For citation:** Bryukhin G.V., Antonov S.D. The effect of experimental maternal type 1 diabetes on the disturbances of the morphofunctional formation of testicular endocrinocytes in rat offspring. Clin. exp. morphology. 2020;9(2):70–77 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.2.70-77

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

**Received** 10.03.2020. **Received in revised form** 16.04.2020. **Accepted** 14.05.2020.

## Введение

Согласно многочисленным клиническим наблюдениям, у матерей с сахарным диабетом рождается физиологически незрелое потомство с комплексом метаболических и эндокринных нарушений [1]. При этом если влияние сахарного диабета матери на женскую репродуктивную систему потомства в настоящее время активно изучается [2–4], то роль сахарного диабета матери в нарушении мужской репродуктивной системы потомства практически не изучена.

Ранее было установлено, что у половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа имеет место нарушение репродуктивного здоровья, что нашло отражение в снижении жизнеспособности, концентрации и подвижности сперматозоидов, увеличении числа атипичных форм половых клеток [5, 6]. В связи с этим представляется чрезвычайно интересным анализ особенностей становления эндокринного компартмента семенников потомства матерей с сахарным диабетом. Исходя из изложенного выше, целью настоящего исследования явился анализ особенностей морфофункционального становления эндокриноцитов семенников потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа в различные сроки постнатального развития.

## Материалы и методы

Для достижения поставленной цели у взрослых половозрелых самок крыс Вистар моделировали сахарный диабет 1-го типа. Сахарный диабет создавали у крыс до беременности по общепринятой методике с помощью стрептозотоцина (MP Biomedicals, LLC, Франция) [7], который вводили животным трижды с интервалом 7 дней (по 2,5 мг на 100 г массы в первую и в третью недели и 2 мг на 100 г массы во вторую неделю). Всего за весь курс животные получали по 17–19 мг стрептозотоцина. Под влиянием стрептозотоцина у подопытных

животных развивался сахарный диабет, о чем свидетельствовало прежде всего постоянное повышенное содержание глюкозы в крови ( $32,56 \pm 2,44$  ммоль/л), которое сохранялось длительное время (более 3 месяцев). У интактных самок показатели гликемии составляли  $6,25 \pm 0,22$  ммоль/л. Через 1 неделю после последней инъекции самок подсаживали к интактным самцам. В результате родились подопытные крысят. Эту группу (группа «эксперимент») составили 52 крысенка из 21 помета, в том числе 13 новорожденных крысят (в 1-й день постнатального периода), по девять крысят в возрасте 15, 30 и 45 дней, 12 половозрелых 70-дневных крысят. Контрольную группу составили 45 крысят из 19 пометов, а именно 11 новорожденных крысят, по восемь крысят в возрасте 15, 30 и 45 дней, 10 половозрелых 70-дневных крысят.

Работа с лабораторными животными осуществлялась в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18.03.1986. Выведение животных из эксперимента проводили методом декапитации под эфирным наркозом (протокол заседания этического комитета ЮУГМУ № 8 от 11.11.2018).

Объектом исследования явилось потомство самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа в различные сроки постнатального развития. Проводили определение массы тела животных, абсолютной массы правых семенников, вычисляли весовой индекс – отношение массы семенника к массе тела животного, выраженное в процентах. На серийных гистологических срезах левых семенников, окрашенных гематоксилином и эозином, при помощи морфометрической установки MOTIC BA 400 (Германия) проводили определение площади паренхимы и интерстициальной ткани семенников, производили подсчет суммарного содержания эндокриноцитов, среди которых определяли число активных (крупные

или средних размеров, округлые или полигональные клетки) и неактивных (малые веретенообразные, округлые или полигональные клетки) клеток [8, 9]. Клетки Лейдига подсчитывали в 30 полях зрения из расчета на условную единицу площади (35 520 мкм<sup>2</sup>). Индекс активности клеток Лейдига определяли как отношение суммарного числа активных клеток к неактивным, подсчитанных в 30 полях зрения [9].

Полученные результаты были статистически обработаны на компьютере с использованием программы IBM SPSS Statistics 19 и представлены в виде медианы и квартилей. Учитывая небольшую выборку животных, значимость полученных результатов определяли при помощи непараметрического метода – критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми изменения считали при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Прежде всего нами установлено изменение показателей массы семенников подопытных животных. Как видно из таблицы 1, абсолютная масса семенников у экспериментальных животных после рождения

постепенно увеличивалась, достигая максимальной величины к периоду половой зрелости. В то же время масса семенников у подопытных крысят, потомства от матерей с сахарным диабетом, практически на всех сроках исследования была снижена по сравнению с контролем. Весовой индекс семенника у животных контрольной и экспериментальной групп после рождения также постепенно увеличивался, достигая максимального значения в период половой зрелости. Обращает на себя внимание уменьшение весовых индексов органа подопытных животных в период новорожденности (1-й день) и в начале периода полового созревания (30-й день) по сравнению с контролем. Достоверные изменения весового индекса семенников в остальные сроки постнатального развития нам выявить не удалось, что обусловлено, на наш взгляд, существенным снижением массы тела подопытных животных.

На фоне снижения параметров массы семенников произошло изменение площади паренхимы и стромы семенника подопытных животных (табл. 2), что привело к изменению индекса, отражающего отношение

Таблица 1 | Table 1

Весовые параметры экспериментальных животных (Me (Q1; Q3))  
Weight parameters of experimental animals (Me (Q1; Q3))

Показатель   Indicator	Контроль   Control	Опыт   Experiment	p
1-й день   Day 1 Масса крысы (г)   Rat weight (g)	7 (6; 7)	8 (7; 9)*	0,011
Масса правого семенника   Right testis weight Абс. (г)   Abs. (g) Весовой индекс (%)   Weight index (%)	0,007 (0,006; 0,008) 0,10 (0,09; 0,12)	0,004 (0,003; 0,005)* 0,05 (0,05; 0,06)*	<0,001 <0,001
15-й день   Day 15 Масса крысы (г)   Rat weight (g)	26 (24; 31)	20 (20; 23)*	0,036
Масса правого семенника   Right testis weight Абс. (г)   Abs. (g) Весовой индекс (%)   Weight index (%)	0,04 (0,03; 0,05) 0,14 (0,11; 0,16)	0,03 (0,02; 0,04) 0,15 (0,12; 0,17)	0,370 0,673
30-й день   Day 30 Масса крысы (г)   Rat weight (g)	44 (41; 51)	32 (29; 40)*	0,002
Масса правого семенника   Right testis weight Абс. (г)   Abs. (g) Весовой индекс (%)   Weight index (%)	0,15 (0,13; 0,19) 0,33 (0,29; 0,39)	0,09 (0,08; 0,09)* 0,24 (0,23; 0,27)*	0,004 0,015
45-й день   Day 45 Масса крысы (г)   Rat weight (g)	132 (94; 136)	61 (56; 78)*	<0,001
Масса правого семенника   Right testis weight Абс. (г)   Abs. (g) Весовой индекс (%)   Weight index (%)	0,51 (0,49; 0,61) 0,42 (0,38; 0,49)	0,35 (0,28; 0,43)* 0,50 (0,45; 0,58)	0,008 0,139
70-й день   Day 70 Масса крысы (г)   Rat weight (g)	205 (164; 216)	165 (145; 183)*	0,009
Масса правого семенника   Right testis weight Абс. (г)   Abs. (g) Весовой индекс (%)   Weight index (%)	1,18 (1,02; 1,23) 0,59 (0,56; 0,62)	0,86 (0,76; 1,02)* 0,57 (0,44; 0,65)	0,021 0,497

\* – результаты статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

\* – the results are statistically significant compared with the control group ( $p < 0,05$ )

площади паренхимы к площади стромы. Как видно из таблицы, на большинстве сроков эксперимента исследуемый показатель у подопытных животных оказался сниженным по сравнению с таковым в контроле.

У животных группы эксперимента на большинстве сроков исследования суммарное содержание клеток Лейдига снижено по сравнению с контролем (табл. 3). Обращает на себя внимание, что у подопытных

Таблица 2 | Table 2

**Площадь паренхимы и стромы семенников экспериментальных животных (Ме (Q1; Q3))**  
**Area of the parenchyma and stroma of the testes of experimental animals (Me (Q1; Q3))**

Показатели   Indicator	Контроль   Control	Опыт   Experiment	p
1-й день   Day 1			
Площадь паренхимы   Parenchyma area	35 (34; 37)	34 (28; 35)*	0,018
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	59 (58; 62)	57 (48; 58)*	0,018
%			
Площадь стромы   Stroma area			
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	25 (23; 25)	26 (25; 31)*	0,018
%	41 (38; 42)	43 (42; 52)*	0,018
К	1,4 (1,4; 1,6)	1,3 (0,9; 1,4)*	0,018
15-й день   Day 15			
Площадь паренхимы   Parenchyma area	48 (47; 51)	50 (50; 52)*	0,046
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	81 (80; 85)	85 (84; 87)*	0,046
%			
Площадь стромы   Stroma area			
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	12 (8; 12)	90 (75; 98)*	0,046
%	19 (15; 20)	15 (12; 16)*	0,046
К	4,1 (3,9; 5,9)	5,6 (5,1; 6,9)*	0,046
30-й день   Day 30			
Площадь паренхимы   Parenchyma area	53 (53; 54)	51 (51; 51)*	< 0,001
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	90 (90; 91)	86 (86; 87)*	< 0,001
%			
Площадь стромы   Stroma area			
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	5,8 (5,5; 6,0)	8,5 (8,0; 8,6)*	< 0,001
%	10 (9; 10)	14 (14; 15)*	< 0,001
К	9,1 (8,8; 9,7)	6,0 (5,9; 6,4)*	< 0,001
45-й день   Day 45			
Площадь паренхимы   Parenchyma area	52 (51; 53)	52 (52; 53)	0,423
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	87 (86; 89)	88 (87; 90)	0,423
%			
Площадь стромы   Stroma area			
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	7,5 (6,5; 8,4)	6,9 (6,2; 7,5)	0,423
%	13 (11; 14)	12 (10; 13)	0,423
К	7,0 (6,1; 8,1)	7,6 (7,0; 8,6)	0,423
70-й день   Day 70			
Площадь паренхимы   Parenchyma area	52 (51; 54)	49 (46; 51)*	0,007
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	87 (87; 91)	83 (78; 86)*	0,007
%			
Площадь стромы   Stroma area			
Абс. ( $\times 10^4$ мкм <sup>2</sup> )   Abs. ( $\times 10^4$ $\mu\text{m}^2$ )	7,5 (5,4; 7,9)	10 (8,4; 12,9)*	0,007
%	13 (9; 13)	17 (14; 22)*	0,007
К	6,9 (6,5; 10,0)	4,9 (3,6; 6,1)*	0,007

К – коэффициент, отражающий отношение площади паренхимы к площади стромы.

\* – результаты статистически значимы по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

К – coefficient reflecting the ratio of the parenchyma area to the stroma area.

\* – the results are statistically significant compared with the control group ( $p < 0,05$ )

**Характеристика клеток Лейдига потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа  
(из расчета на единицу условной площади) Me (Q1; Q3)**

**Characteristic of Leydig cells of the offspring of female rats with experimental type 1 diabetes mellitus  
(based on a unit of conditional area) Me (Q1; Q3)**

Показатель   Indicator	Контроль   Control	Опыт   Experiment	p
1-й день   Day 1			
Клетки Лейдига   Leydig cells ( $\Sigma$ )	34,2 (32,7; 35,7)	33,8 (31,0; 34,3)	0,252
Активные клетки Лейдига   Active Leydig cells			
Абс.   Abs.	11,1 (10,0; 11,4)	8,1 (7,2; 9,3)*	<0,001
%	31 (30; 33)	25 (23; 27)*	<0,001
Неактивные клетки Лейдига   Inactive Leydig cells			
Абс.   Abs.	23,9 (22,4; 24,2)	24,9 (24,1; 25,3)*	0,006
%	69 (67; 70)	75 (73; 77)*	<0,001
Индекс активности   Activity index	0,46 (0,44; 0,5)	0,33 (0,3; 0,37)*	<0,001
15-й день   Day 15			
Клетки Лейдига   Leydig cells ( $\Sigma$ )	16,2 (15,5; 16,5)	15,8 (15,2; 18,4)	0,743
Активные клетки Лейдига   Active Leydig cells			
Абс.   Abs.	7,5 (6,8; 8,7)	8,13 (7,60; 9,13)	0,321
%	46 (43; 54)	50 (48; 54)	0,321
Неактивные клетки Лейдига   Inactive Leydig cells			
Абс.   Abs.	8,5 (7,5; 8,9)	7,6 (7,1; 9,7)	0,481
%	54 (46; 57)	50 (46; 52)	0,321
Индекс активности   Activity index	0,85 (0,75; 1,16)	1,00 (0,94; 1,15)	0,321
30-й день   Day 30			
Клетки Лейдига   Leydig cells ( $\Sigma$ )	19,4 (18,9; 20,5)	17,7 (17,7; 18,2)*	0,021
Активные клетки Лейдига   Active Leydig cells			
Абс.   Abs.	12,2 (11,5; 13,5)	10,9 (10,4; 11,9)*	0,046
%	62 (59; 66)	64 (59; 67)	0,815
Неактивные клетки Лейдига   Inactive Leydig cells			
Абс.   Abs.	7,4 (6,9; 7,8)	6,0 (5,5; 8,1)	0,321
%	38 (34; 41)	36 (33; 41)	0,815
Индекс активности   Activity index	1,62 (1,45; 1,97)	1,81 (1,42; 2,05)	0,815
45-й день   Day 45			
Клетки Лейдига   Leydig cells ( $\Sigma$ )	25,7 (24,5; 26,5)	23,2 (21,8; 24,4)*	0,006
Активные клетки Лейдига   Active Leydig cells			
Абс.   Abs.	17,4 (16,8; 18,0)	16,7 (15,7; 18,6)	0,481
%	69, (65; 72)	76 (69; 78)*	0,046
Неактивные клетки Лейдига   Inactive Leydig cells			
Абс.   Abs.	8,0 (6,7; 9,2)	5,8 (5,1; 6,7)*	0,011
%	31 (28; 35)	24 (22; 31)*	0,046
Индекс активности   Activity index	2,23 (1,83; 2,64)	3,21 (2,19; 3,47)*	0,046
70-й день   Day 70			
Клетки Лейдига   Leydig cells ( $\Sigma$ )	32,9 (27,1; 35,4)	20,7 (16,8; 25,2)*	<0,001
Активные клетки Лейдига   Active Leydig cells			
Абс.   Abs.	21,7 (17,9; 23,0)	16,3 (12,2; 19,6)*	0,011
%	65 (63; 70)	76 (67; 79)*	0,003
Неактивные клетки Лейдига   Inactive Leydig cells			
Абс.   Abs.	10,8 (9,9; 12,3)	5,9 (4,1; 6,7)*	<0,001
%	35 (30; 37)	24 (21; 33)*	0,003
Индекс активности   Activity index	1,83 (1,71; 2,36)	3,22 (2,05; 3,78)*	<0,001

\* – результаты статистически значимы по сравнению с контролем (p<0,05)

\* – the results are statistically significant compared with the control (p<0,05)

животных наиболее выраженное снижение числа эндокриноцитов выявлено в период половой зрелости.

Наибольший интерес представляют данные, отражающие соотношение различных морфофункциональных типов эндокриноцитов (табл. 3). Как видно из таблицы, у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом на большинстве сроков исследования имеет место снижение абсолютного содержания как активных, так и неактивных клеток Лейдига. При этом относительное содержание активных клеток семенников животных группы эксперимента в более поздние сроки постнатального развития (45-й и 70-й дни) достоверно превышало данный показатель в группе контроля (рис. 1 и 2), что можно рассматривать как проявление компенсаторно-приспособительной реакции, направленной на поддержание выработки тестостерона в период полового созревания и период половой зрелости. Увеличение общего содержания активных клеток Лейдига до уровня более высокого, чем в контроле, выявленное у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом, обусловило рост индекса активности интерстициальных эндокриноцитов, отражающего отношение числа активных клеток Лейдига к числу неактивных (табл. 3).

### Обсуждение

Таким образом, результаты проведенного исследования убедительно свидетельствуют о негативном влиянии сахарного диабета 1-го типа матери на морфофункциональное становление мужской репродуктивной системы потомства, проявляющееся прежде всего в снижении массы семенников, что находится в полном соответствии с данными, полученными другими авторами [5]. Согласно немногочисленным исследованиям [5, 10, 11], экспериментальный сахарный диабет матери обуславливает снижение уровня концентрации сперматозоидов у половозрелого потомства. Результаты нашего исследования позволяют также констатировать снижение концентрации эпидидимальных сперматозоидов у потомства самок крыс с сахарным диабетом [6].

Влияние сахарного диабета матери на уровень концентрации тестостерона в сыворотке крови потомства до конца не изучено. Так, E.M. Amorim et al. показали, что у потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом уровень тестостерона в плазме крови не отличался от такового в группе сравнения [5]. В то же время G. Jelodar et al., напротив, исследовав влияние аллоксанового диабета самок крыс, установили выраженное снижение у потомства концентрации тестостерона в плазме крови [10], что согласуется с нашими данными, указывающими на снижение суммарного содержания клеток Лейдига (основных продуцентов тестостерона) и изменение соотношения их морфофункциональных типов.

Нам представляется, что основными причинными факторами, обуславливающими нарушения эндокрин-

ного компартмента семенников потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа, являются гипергликемия и гиперкетонемия, возникающие ввиду повышенной проницаемости плаценты и нарушающие условия антенатального развития [12]. Наряду с этим нельзя исключить, что определенную роль в патогенезе дисфункции эндокринного аппарата подопытных животных играют продукты перекисного окисления липидов в силу усиления свободнорадикального окисления [11]. Ряд исследований показывает,

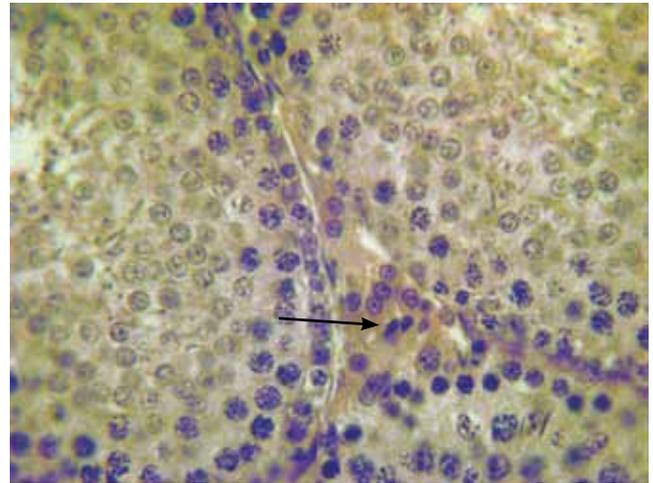


Рис. 1. Яичко 70-дневного крысенка группы контроля. Стрелкой указана неактивная клетка Лейдига. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$

Fig. 1. Testicle of a 70-day-old rat in control group. The arrow indicates an inactive Leydig cell. H&E stain.  $\times 100$

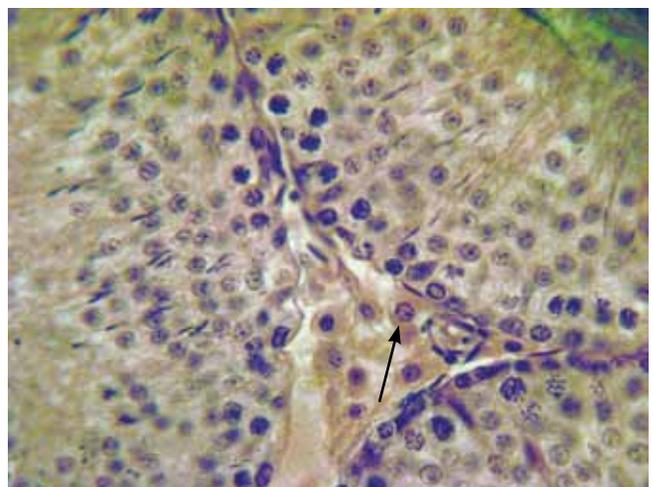


Рис. 2. Яичко 70-дневного крысенка группы эксперимента. Повышено содержание соединительнотканного компонента, снижено количество эндокринных клеток, среди которых преобладают активные клетки Лейдига (указана стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$

Fig. 2. Testicle of a 70-day-old rat of the experimental group. The content of stroma is increased, the number of Leydig cells is reduced, among which active ones prevail (indicated by arrow). H&E stain.  $\times 100$

что избыточное продуцирование плацентой активных форм кислорода (состояние окислительного стресса) наблюдается во время беременности, протекающей с осложнениями, такими как сахарный диабет, и сопровождается перегрузкой системы антиоксидантной защиты [13]. Можно предположить, что данные факторы также вносят свой вклад в изменение субпопуляционного состава клеток Лейдига.

Кроме того, апоптоз рассматривается как один из механизмов ухода от атаки тех или иных воздействий, в том числе окислительного стресса [13]. У животных группы эксперимента на более поздних сроках онтогенеза гибель клеток приводит к снижению их абсолютного количества, в то же время среди сохранившихся немногочисленных эндокриноцитов активные клетки Лейдига значительно преобладают над неактивными, что можно объяснить развитием компенсаторно-приспособительных реакций, направленных на поддержание гормонального гомеостаза.

### Заключение

В целом полученные результаты позволяют сделать вывод, что у матерей с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа рождается потомство с компромированным репродуктивным здоровьем.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.В. Брюхин.  
Сбор и обработка материала – С.Д. Антонов.  
Написание текста – Г.В. Брюхин.  
Редактирование – Г.В. Брюхин, С.Д. Антонов.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – G.V. Bryukhin.  
Collected the data and performed the analysis – S.D. Antonov.  
Wrote the paper – G.V. Bryukhin.  
Edited the manuscript – G.V. Bryukhin, S.D. Antonov.

### Литература/References

1. Потин В.В., Боровик Н.В., Тиселько А.В. Сахарный диабет и репродуктивная система женщины. Пособие для врачей. Санкт-Петербург: Издательство Н-Л, 2008. 40 с.  
*Potin VV, Borovik NV, Tiselko AV. Diabetes mellitus and a woman's reproductive system: A guide for doctors. Saint Petersburg: Izdatel'stvo N-L, 2008. 40 p. (In Russ.).*
2. Фурсенко В.А., Григорян О.Р., Андреева Е.Н. Анализ влияния нарушений жирового и углеводного обмена на течение беременности и здоровье потомства после использования вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2018;24(6):83–90.  
*Fursenko VA, Grigoryan OR, Andreeva EN. Influence of fat/carbohydrate metabolism disorders after ART on pregnancy, as well as mother's and offspring's health. Russian Journal of Human Reproduction (Problemy reproduksii). 2018;24(6):83–90 (In Russ.) DOI: 10.17116/repro20182406183.*
3. Витязева И.И., Боголюбов С.В. Бесплодный брак и вспомогательные репродуктивные технологии при сахарном диабете. В кн.: Сахарный диабет: острые и хронические осложнения. Москва: Медицинское информационное агентство, 2011. С. 410–431.  
*Vityazeva II, Bogolyubov SV. Infertile marriage and assisted reproductive technologies in diabetes mellitus. In: Diabetes mellitus: acute and chronic complications. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2011. P. 410–431 (In Russ.).*
4. Евсюкова И.И. Состояние новорожденных детей в современных условиях лечения их матерей, больных сахарным диабетом. Журнал акушерства и женских болезней. 2006;55(1):17–20.  
*Evsukova II. The Newborns Well-Beings In Modern Conditions Of Treatment Of Their Mothers With Diabetus. Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei. 2006;55(1):17–20 (In Russ.).*
5. Amorim EM, Damasceno DC, Perobelli JE, Spadotto R, Fernandez CD, Volpato GT et al. Short- and long-term reproductive effects of prenatal and lactational growth restriction caused by maternal diabetes in male rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:154. DOI: 10.1186/1477-7827-9-154.
6. Брюхин Г.В., Антонов С.Д. Характеристика двигательной активности сперматозоидов половозрелого потомства самок крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019;168(10):408–410.  
*Bryukhin GV, Antonov SD. Characteristics of the motor activity of spermatozoa of mature offspring of female rats with experimental type 1 diabetes. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2019;168(10):408–410 (In Russ.).*
7. Закирьянов А.Р., Плахотный М.А., Онищенко Н.А., Володина А.В., Клименко Е.Д., Кобозева Л.П. и др. Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2007;(4):21–25.  
*Zakirianov AR, Plakhotny MA, Onischenko NA, Volodina AV, Klimentko ED, Kobozeva LP et al. Diabetic complications in rats in long-term modeling of type I diabetes mellitus. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2007;(4):21–25 (In Russ.).*
8. Ухов Ю.И., Астраханцев А.Ф. Морфометрические методы в оценке функционального состояния семенников. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. 1983;84(3):66–72.  
*Ukhov YuI, Astrakhansev AF. Morphometric methods in assessing the functional state of the testes. Arkhiv anatomii, gistologii i embriologii. 1983; 84(3):66–72 (In Russ.).*
9. Шевлюк Н.Н., Стадников А.А. Клетки Лейдига семенников позвоночных (онтогенез, ультраструктура, цитофизиология, факторы и механизмы регуляции). Оренбург: Издательство ОрГМА, 2010. 484 с.  
*Shevlyuk NN, Stadnikov AA. Leydig cells of vertebrate testes (ontogenesis, ultrastructure, cytophysiology, factors and mechanisms of regulation). Orenburg: Izdatel'stvo OrGMA, 2010. 484 p. (In Russ.).*
10. Jelodar G, Khaksar Z, Pourahmadi M. Endocrine profile and testicular histomorphometry in adult rat offspring of diabetic mothers. *J Physiol Sci.* 2009;59(5):377–382. DOI: 10.1007/s12576-009-0045-7.
11. Türk G, Rişvanlı A, Çeribaşı AO, Sönmez M, Yüce A, Güvenç M et al. Effect of gestational diabetes mellitus on testis and

- pancreatic tissues of male offspring. *Andrologia*. 2018;Feb 7. DOI: 10.1111/and.12976.
12. Капустин Р.В., Оноприйчук А.Р., Аржанова О.Н., Полякова В.О., Алексеенкова В.Н. Патофизиология плаценты и плода при сахарном диабете. Журнал акушерства и женских болезней. 2018;67(6):79–92.  
*Kapustin RV, Onopriyuchuk AR, Arzhanova ON, Polyakova VO, Alekseyenkova EN*. Pathophysiology of the placenta and fetus in diabetes mellitus. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney*. 2018;67(6):79–92 (In Russ.). DOI: 10.17816/jowd67679-92.
13. Доброхотова Ю.Э., Иванова Т.А., Гуляева Н.В., Онуфриев М.В., Джобова Э.М., Гехт А.Б. Окислительный стресс в плаценте при физиологической и патологически протекающей беременности. Российский вестник акушера-гинеколога. 2008;8(6):33–36.  
*Dobrokhotova YuÉ, Ivanova TA, Guliaeva NV, Onufriev MV, Dzhobava ÉM, Gekht AB*. Placental oxidative stress during physiological and abnormal pregnancies. *Russian Bulletin of obstetrician-gynecologist*. 2008;8(6):33–36 (In Russ.).

### Информация об авторах

Геннадий Васильевич Брюхин – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

Сергей Дмитриевич Антонов – соискатель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета.

### Author information

Gennady V. Bryukhin – Dr. Sci. (Med), Professor, Head of the Department of Histology, Embryology and Cytology, South Ural State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-3898-766X>

Sergei D. Antonov – Postgraduate Student, Department of Histology, Embryology and Cytology, South Ural State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-3166-5270>

# АВТОМАТЫ ОКРАСКИ ЭМКОСТЕЙНЕР

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ, ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ,  
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

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

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



ГРУППА КОМПАНИЙ ЭМКО

