

# КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 9 | № 4 | 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

Журнал представлен  
в информационных базах  
данных Scopus, Russian Science  
Citation Index (RSCI),  
eLIBRARY.ru/РИНЦ (Россия)

Включен в перечень ВАК

## Учредитель

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

## Адрес редакции

117418, Москва,  
ул. Цюрупы, д. 3

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

e-mail: [cem.journal@mail.ru](mailto:cem.journal@mail.ru)

[www.cem-journal.ru](http://www.cem-journal.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

*Новачадов 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 | № 4 | 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

The Journal is indexed  
in the Scopus, Russian Science  
Citation Index (RSCI),  
eLIBRARY.ru (Russia)

The Journal is included in  
the current List of Scientific  
Journals of the Higher Attestation  
Commission of Russia (Vysshaya  
Attestacionnaya Komissiya, VAK)

**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

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 ПИ № 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

П.В. Никитин, М.В. Рыжова, А.А. Потапов,  
С.А. Галстян, Д.С. Ким, Т.Н. Панина, С.В. Шугай,  
Д.В. Старовойтов, Е.А. Хохлова, И.В. Зубова  
Внутриопухолевая молекулярно-генетическая  
гетерогенность глиобластом

5 P.V. Nikitin, M.V. Ryzhova, A.A. Potapov,  
S.A. Galstyan, D.S. Kim, T.N. Panina, S.V. Shugai,  
D.V. Starovoitov, E.A. Khokhlova, I.V. Zubova  
Intratumoral molecular genetic heterogeneity  
of glioblastomas

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCHES

А.М. Ковригина, Е.А. Шаламова, Ю.С. Березовский,  
Д.В. Калинин, Е.М. Грецов, Т.Р. Багдасарян,  
Л.А. Семенова, Д.И. Чеботарев, М.В. Самсонова,  
А.Л. Черняев, Л.М. Михалева, О.Д. Мишнев,  
Э.В. Курилина, О.В. Зайратьянц  
Патоморфологическая и иммуногистохимическая  
характеристика изменений лимфатических узлов  
у умерших от COVID-19 по данным аутопсий

12 A.M. Kovrigina, E.A. Shalamova, Yu.S. Berezovskiy,  
D.V. Kalinin, E.M. Gretsov, T.R. Bagdasaryan,  
L.A. Semenova, D.I. Chebotarev, M.V. Samsonova,  
A.L. Chernyaev, L.M. Mikhaleva, O.D. Mishnev,  
E.V. Kurilina, O.V. Zayratyants  
Pathomorphological and immunohistochemical  
features of lymph nodes in COVID-19 patients  
(autopsy study)

А.В. Асатурова, Н.М. Файзуллина,  
М.В. Бобкова, А.С. Аракелян, А.В. Трегубова,  
Т.Ю. Смольнова, Л.В. Адамян  
Морфологические особенности и состояние  
соединительной ткани маточных рудиментов  
пациенток репродуктивного возраста с синдромом  
Мейера–Рокитанского–Кюстера–Хаузера

24 A.V. Asaturova, N.M. Fayzullina,  
M.V. Bobkova, A.S. Arakelyan, A.V. Tregubova,  
T.U. Smolnova, L.V. Adamyan  
Morphological features and the functional state  
of connective tissue of the uterine rudiments  
in reproductive age patients with Mayer–Rokitansky–  
Küster–Hauser syndrome

Л.Я. Фомина, Л.В. Мехеда, О.С. Собеля,  
Н.К. Шахпазян, Т.Г. Гаспарян, Н.В. Севян  
Комплексное цитологическое  
и иммуноцитохимическое исследование ликвора  
в диагностике интракраниальных метастазов  
рака молочной железы

31 L.Y. Fomina, L.V. Mekheda, O.S. Sobelya,  
N.K. Shakhpazyan, T.G. Gasparyan, N.V. Sevyan  
Complex cytological and immunocytochemical  
study of cerebrospinal fluid in the intracranial breast  
carcinoma metastases diagnosis

Д.А. Гольбин, А.Л. Корочкина, С.В. Шугай,  
Т.В. Цуканова, М.А. Шифрин, А.В. Ревещин,  
А.В. Косырькова, Г.В. Данилов, Е.Ю. Рыбалкина,  
Г.В. Павлова, Г.Л. Кобиakov, А.А. Потапов  
Опыт создания специализированного биобанка  
глиом головного мозга человека

39 D.A. Golbin, A.L. Korochkina, S.V. Shugay,  
T.V. Tsukanova, M.A. Shifrin, A.V. Revishchin,  
A.V. Kosyrkova, G.V. Danilov, E.Y. Rybalkina,  
G.V. Pavlova, G.L. Kobiakov, A.A. Potapov  
Specialized biorepository for human brain glioma:  
project development and operational experience

Н.А. Золотова, И.С. Цветков, Д.Н. Хочанский,  
Д.Ш. Джалилова, А.М. Косырева, А.Л. Михайлова,  
Л.П. Михайлова, О.В. Макарова  
Морфофункциональные изменения ободочной  
кишки и иммунные реакции при холодовом  
стрессе у самцов и самок мышей C57BL/6

50 N.A. Zolotova, I.S. Tsvetkov, D.N. Khochanskiy,  
D.Sh. Dzhaililova, A.M. Kosyreva, A.L. Mikhailova,  
L.P. Mikhailova, O.V. Makarova  
Morphofunctional changes in the colon and immune  
responses during cold stress in male and female  
C57BL/6 mice

## КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

Т.А. Гаркуша, С.В. Гаппоев,  
В.А. Хоржевский, Л.Г. Левкович  
Наблюдение тафтинг-энтеропатии:  
течение, сложности морфологической  
диагностики

65 T.A. Garkusha, S.V. Gappoev,  
V.A. Khorzhevskii, L.G. Levkovich  
Case report of tufting-enteropathy:  
course of the disease, complexity of morphological  
diagnosis

З.В. Гюева, А.А. Епхив  
Кардиопульмональный транстиретиновый  
амилоидоз

71 Z.V. Gioeva, A.A. Ephiev  
Cardiopylmonary transthyretin amyloidosis

## ХРОНИКА EVENTS

Всероссийская научная конференция  
с международным участием  
«Актуальные вопросы морфогенеза  
в норме и патологии»

77 All-Russian scientific conference  
with international participation  
«Current Perspectives on Morphogenesis  
in Norm and Pathology»

## НЕКРОЛОГ OBITUARIE

Константин Аркадьевич Рогов  
(1952–2020)

79 Konstantin Arkadieievich Rogov  
(1952–2020)

## Intratumoral molecular genetic heterogeneity of glioblastomas

*P.V. Nikitin, M.V. Ryzhova, A.A. Potapov, S.A. Galstyan, D.S. Kim,  
T.N. Panina, S.V. Shugai, D.V. Starovoitov, E.A. Khokhlova, I.V. Zubova*

N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Intratumoral molecular genetic heterogeneity is not a less significant challenge in modern oncology than the intertumoral. The presence of cell populations within the same tumor, differing in their molecular properties, translated into phenotypic features of the cells, is one of the reasons for the inefficiency of many developments in the field of tumor therapy and the basis for the progression of malignant neoplasms. The issue under consideration is very relevant for glioblastoma (GBM) – being one of the deadliest human tumors; it practically does not lend itself to even promising experimental treatment methods. Therefore, this paper reviews intratumoral heterogeneity. The review in this aspect examines new experimental data, including those obtained using single-cell technologies, in particular, the key cell populations that make up the pool of tumor cells in glioblastoma, and their molecular metamodules, the presumptive role of some cell populations and their subpopulations in providing tumor malignancy properties. A promising groundwork for fundamentally new approaches to creating personalized diagnostic and therapeutic methods is indicated.

**Keywords:** glioblastoma, intratumoral heterogeneity, glioblastoma genetics, single-cell sequencing

**Corresponding author:** Pavel V. Nikitin. E-mail: nikitinpaulv@yandex.ru

**For citation:** Nikitin P.V., Ryzhova M.V., Potapov A.A., Galstyan S.A., Kim D.S., Panina T.N., Shugai S.V., Starovoitov D.V., Khokhlova E.A., Zubova I.V. Intratumoral molecular genetic heterogeneity of glioblastomas. Clin. exp. morphology. 2020;9(4):5–11. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.5-11.

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

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

**Received** 25.03.2020. **Received in revised form** 12.08.2020. **Accepted** 26.10.2020.

## Внутриопухолевая молекулярно-генетическая гетерогенность глиобластом

*П.В. Никитин, М.В. Рыжова, А.А. Потанов, С.А. Галстян, Д.С. Ким,  
Т.Н. Панина, С.В. Шугай, Д.В. Старовойтов, Е.А. Хохлова, И.В. Зубова*

ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко  
Минздрава России, Москва, Россия

Внутриопухолевая молекулярно-генетическая гетерогенность – не менее важный вызов для современной онкологии, чем межопухолевая. Наличие клеточных популяций внутри одной опухоли, различающихся по своим молекулярным свойствам, транслируемым в фенотипические особенности клеток, является одной из причин неэффективности многих разработок в области терапии опухолей и основой для прогрессирования злокачественных новообразований. Рассматриваемый вопрос весьма актуален для глиобластомы (ГБ), так как, будучи одной из самых смертельных опухолей человека, она практически не поддается даже многообещающим экспериментальным методам лечения. В связи с этим настоящий обзор посвящен внутриопухолевой гетерогенности. В обзоре в указанном аспекте рассматриваются новые экспериментальные данные, в том числе полученные с помощью single-cell технологий, в частности ключевые клеточные популяции, составляющие пул опухолевых клеток в глиобластоме, и их молекулярные метамодули, предположительная роль некоторых клеточных популяций и их субпопуляций в обеспечении свойств злокачественности опухоли. Обозначается перспективный задел для принципиально новых подходов в создании персонализированных диагностических и лечебных методов.

**Ключевые слова:** глиобластома, внутриопухолевая гетерогенность, генетика глиобластом, single-cell секвенирование

**Для корреспонденции:** Павел Владимирович Никитин. E-mail: nikitinpaulv@yandex.ru

**Для цитирования:** Никитин П.В., Рыжова М.В., Потапов А.А., Галстян С.А., Ким Д.С., Панина Т.Н., Шугай С.В., Старовойтов Д.В., Хохлова Е.А., Зубова И.В. Внутриопухольевая молекулярно-генетическая гетерогенность глиобластом. Клини. эксп. морфология. 2020;9(4):5–11. DOI:10.31088/SEM2020.9.4.5-11

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

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

**Статья поступила** 25.03.2020. **Получена после рецензирования** 12.08.2020. **Принята в печать** 26.10.2020

## Introduction

Intratumoral molecular genetic heterogeneity issues are extremely important for a modern comprehensive understanding of the carcinogenesis processes. The variability of genetic, proteomic, and epigenetic parameters not only within the same histological variant of the tumor but within the same tumor with heterogeneous cell populations is attracting more and more attention of researchers [1, 2]. Different cell populations with heterogeneous molecular properties can also have a variable malignant potential, which is essential from a prognostic point of view. Precise assessment of the most active tumor cell population's molecular properties will significantly increase patients' prognosis determination accuracy. In addition, intratumoral heterogeneity can be one of the key reasons for both drug and radiation treatment ineffectiveness [3]. Thus, the determination of the molecular properties of different cell populations within one tumor can allow more efficiently solving clinical and therapeutic problems at once, including the formation of new, genuinely innovative diagnostic, prognostic and therapeutic concepts within the paradigm of personalized medicine.

This approach is also one of the pressing issues for glioblastoma (GBM) research. GBM occupies a leading position among primary malignant tumors of the central nervous system (CNS): it accounts for 15.1% of all primary brain tumors and 46.1% of primary malignant brain tumors [4]. The five-year survival rate for this disease amounts to 5.1% [4]. The high mortality and low efficiency of modern therapeutic approaches, both conventional and experimental, depend largely on the variability and heterogeneity of GBM. We have earlier reviewed the variability and diversity of the GBM molecular profile in the intertumoral aspect [5]. In this paper, we will delve into GBM intratumoral heterogeneity issues due to their importance for the modern understanding of gliomagenesis mechanisms.

Most GBMs demonstrate a significant degree of heterogeneity already at the light-optical level: cells and groups of cells are detected in the tumor, which differ significantly from each other in their morphological properties. Two main types of intratumoral heterogeneity of GBM can be distinguished – histological and molecular heterogeneity.

## Histological intratumoral heterogeneity

Histological heterogeneity of GBM is characterized, first of all, by the presence of many different morphological types of cells. Some of them can even simulate or imitate other tumors, which often explains their naming. Other GBM type names are determined by the tumor cells' key histogenetic and morphological characteristics [6].

Thus, in some cases, we diagnose a small-cell variant, consisting of small monomorphic cells with rounded or slightly elongated hyperchromic nuclei with a minimum amount of cytoplasm, a small nuclear atypia, and high mitotic activity. Simultaneously, this tumor subtype demonstrates a relatively high frequency of *EGFR* mutations and amplifications, reaching 70%, and a relatively low *TP53* gene alteration frequency [7]. In addition, there is the so-called primitive neuronal cytological variant. With this variant, an increased density of the cell layer and a high nuclear-cytoplasmic ratio are observed. Also, positive neuronal marker expression is often revealed. Besides, this subtype is defined by a high frequency (30–40%) of tumor dissemination through the cerebrospinal fluid and a high frequency (~40%) of *MYCN* or *MYC* amplification, which brings this variant closer to embryonic tumors [8, 9]. The oligodendroglial component is represented by medium-sized cells with a centrally located rounded nucleus surrounded by an optically empty cytoplasm in the form of a light rim. Such tumors may have a better prognosis than GBM with conventional histopathology [9]. In some GBMs, hemistocytic, multinucleated giant cell, granular, lipid-rich, and metaplastic components and cytological variants are also found [6, 10, 11]. At the same time, individual cellular components are found in many GBMs, mainly as a minor component.

## Molecular intratumoral heterogeneity

The next step in the GBM molecular characterization was a differentiated assessment of various cell groups' molecular properties within a single tumor. One of the first works on this topic, pronounced heterogeneity was found within one tumor at the transcriptional level [1]. According to A. P. Patel et al. [1], the mosaic nature of the amplification processes of tyrosine kinase receptors (TKR) and excessive activation of signaling pathways contribute

to GBM target therapy resistance. Mosaic expression of *EGFR*, *PDGFRA*, *PDGFA*, fibroblast growth factor receptor type 1 (*FGFR1*), fibroblast growth factor type 1 (*FGFI*), notch receptor type 2 (*NOTCH2*), *JAG1* protein, and other receptors and ligands of signaling pathways involved in the GBM development was found. These data suggest that heterogeneous expression and mutational status of TKR and other signaling molecules in individual GBM tumor cells may interfere with therapy targeting receptors of signaling proliferative cascades or signaling through tyrosine kinase receptors [1].

A population of GBM cells with stem properties, the so-called glioma stem cells (GSCs), was identified in the spirit of the principles of GBM intratumoral functional heterogeneity development [12]. GSCs are similar to neuronal stem cells in their genetic, epigenetic, and proteomic features [13]. Many authors believe that GSCs are the main culprits in tumor insensitivity to chemotherapy and radiation and serve as one of the main reasons for malignant glioma recurrence after surgical treatment [14, 15].

Two different subtypes of GSCs have been identified by whole-genome profiling (ss proneural and mesenchymal) [16]. Mesenchymal GSCs, apparently, mainly arise in primary GBM, which are formed *de novo*, while proneural GSCs can be found in some WHO Grade III gliomas and GBM, although in this case pronounced phenotypic shifts between different subtypes of GSCs during the GBM progression are possible [16–18]. Proneural GSCs can acquire therapeutic resistance and more aggressive characteristics by shifting their molecular and phenotypic subtypes towards mesenchymal GSCs [17]. Mesenchymal GSCs are markedly more resistant to radiation therapy than their proneural counterparts, and the effect of radiation on proneural GSCs activates the expression of molecular markers associated with mesenchymal differentiation [16, 17, 19]. Accordingly, markers associated with the mesenchymal phenotype (e.g., YKL40, CD109, and CD44) correlate with increased radioresistance and lower overall patient survival [20].

A. Sottoriva et al. [20] developed a unique scheme for neurosurgical sampling of GBM tissue from different spatially separated points in the same tumor in 11 patients. Each tumor sample underwent a comprehensive genomic analysis. The authors identified many cytogenetic rearrangements typical for GBM, particularly *EGFR* amplification and addition, and *MET*, *CDK6*, *MDM4*, *AKT3*, *PDGFRA* amplification. At the same time, it was shown that some of these driver chromosomal aberrations differed by pronounced heterogeneity within the same tumor, including an increase in the number of copies/amplification of the *PDGFRA*, *MDM4*, and *AKT3* genes in some cells, as well as the heterogeneous distribution of deletion of

the genomic locus containing the *PTEN* anti-oncogene in cells. Moreover, heterogeneity was not limited to genome regions containing genes previously associated with the GBM development. Fragments of tumor tissue from the same patient had a common genomic profile, indicating a clonal origin, but they demonstrated a remarkable variety of cytogenetic rearrangements present in different fragments of the same tumor. For a more detailed study of the tumor's evolution in each patient, the phylogenetic series of tumor cells were reconstructed based on the chromosomal aberration number. It was found that during the first appearance of a malignant clone, the *CDKN2A/B* gene is deleted, and the *EGFR*, *CDK6*, and *MET* genes are amplified. Later molecular events in GBM cells most often occur in genomic regions containing the *PDGFRA*, *PTEN*, and *TP53* genes. Subsequently, the original tumor clone can divide into several subclones. In particular, the division of one of the GBMs into a subclone with *PDGFRA* amplification and another subclone with *PTEN* and *RBI* deletions was shown. The latter formed three more subclones, one of which demonstrated *AKT3* and *MDM4* gene amplification [20].

In another work, M. Aubry et al. [21] studied changes in the copy number of chromosome fragments in different tumor zones to determine the temporal spectrum of intratumoral clonal evolution. The authors confirmed that changes in the copy number of 7 and 10 chromosomes and, namely, *CDKN2A/B* deletion and *EGFR* amplification are among the earliest events in the GBM development. Other changes, such as *PDGFRA*, *MDM2*, and *MDM4* amplification, have also been identified as important events occurring at different tumor growth stages, depending on the case. The authors found a significant difference in gene expression level between the brain's area infiltrated by the tumor and the macroscopically normal brain. The most significant differences were observed in the VEGF, CD44, GFAP, EZH2, CHI3L1, NES, and IGFBP2 expression [21].

Later, K. Abou-El-Ardat et al. conducted a comprehensive research of 12 growth foci of multifocal GBM from six patients. The authors showed that multifocal GBM genetically resemble primary GBM. Comparison of tumor growth foci of different localization in the same patient confirmed their monoclonal origin. The researchers found that *EGFR* and *CDKN2A/B* gene aberrations occurred in all patients. This unexpectedly high incidence reflects the clear genetic signature of multifocal GBM and may explain their high grade and invasive growth. Surprisingly, the types of mutations in different genes differed in different tumor focus locations in a particular patient. For example, different *PTEN*, *TP53*, *EGFR*, and *CDKN2A/B* mutations and aberrations were found in different tumor nodes, which, therefore, must have occurred independently in the late period of carcinogenesis. Also, chromothripsis (massive

simultaneous multiple rearrangements of cell chromosomes) was identified as a late molecular event in tumor progression in multifocal GBM. In some cases, the *TP53* mutation was an early event. Only the loss of one copy of *PTEN* and point mutations of the *TERT* gene promoter were early molecular events in all patients [22].

### Clustering GBM cells using single-cell technologies

The most important work in understanding intratumoral heterogeneity and assessing the clonal evolution of different populations of tumor cells in GBM was the work of C. Neftel et al. The authors performed single-cell RNA sequencing using biopsy samples of tumors from 28 patients, including both adult and pediatric populations, in a comprehensive study of both intertumoral and intratumoral heterogeneity in GBM, IDH-wild type. A total of 7930 GBM cells were submitted for the analysis [23].

C. Neftel et al. identified expression programs that differ between cells in each tumor and then searched for recurrent programs (“metamodules”) that were detected in different tumors to comprehensively characterize the intratumoral heterogeneity of malignant cells [23]. In this study, a hierarchical clustering of cells was carried out separately for each tumor based on the expression levels of all cellular genes. 44% of transcriptome signatures were associated almost exclusively with genes of the cell cycle. All remaining expression profiles were subjected to further analysis in order to clarify their biological significance. Expression signatures were significantly similar between different tumors, indicating that, despite the global differences between tumors, these intratumoral heterogeneity models reflect the fundamental processes common to most GBMs. Further clustering of expression profiles made it possible to distinguish four main groups of cells in GBM, two of which were additionally subdivided into two subgroups. Thus, six so-called metamodules of tumor cells were found, each consisting of 39-50 genes, and each metamodule was obtained from at least six tumors. In particular, two metamodules with high expression of mesenchymal differentiation genes (for example, vimentin) have been identified. One of these metamodules is closely related to hypoxia genes, stress response, and glycolytic metabolism genes (for example, *ENO2* and *LDHA*). The authors defined them as *mesenchymal-like* (MES) metamodules: hypoxia-independent (MES1) and -dependent (MES2) signatures.

The other four metamodules have been associated with genes of neuronal development and neurogenesis characteristic for neuronal/glial lineages or progenitor cells. They included astrocytic markers in one of the metamodules (*S100B*, *GFAP*, *SLC1A3*, *GLAST*, and *MLC1*), oligodendroglial line markers in another metamodule (*OLIG1*,

*OMG*, *PLP1*, *PLLP*, *TNR*, and *ALCAM*), signatures of stem cells and neuronal progenitors in two other metamodules, including markers of neuronal progenitor cells (*SOX4*, *SOX11*, and *DCX*). It was found by consistently comparing the obtained metamodules with the signatures of neuronal cells from the fetal and adult brain tissue and astrocytic, as well as oligodendroglial tumors, Grade II, that metamodules mimic different types of cellular developmental programs but with significant distortions compared to normal variants. These modules are called astrocyte-like (AC-like), oligodendrocyte-progenitor-like (OPC-like), and neural progenitor-like (NPC-like). NPC-like were further subdivided into two subtypes (NPC1 and NPC2), which differed in the inclusion of OPC-like-related genes in NPC1 (for example, *OLIG1* and *TNR*) compared to NPC2, where neuronal lineage genes exclusively prevailed in transcriptional profiles (for example, *STMN1*). In general, the picture of intratumoral heterogeneity of GBM is primarily described by four cellular conditions and transcriptome signatures, including NPC-like, OPC-like, AC-like, and MES. These conditions were found in most tumors in both adults and children [23].

The authors also classified all tumors' cells by the expression level of metamodules and cell cycle programs. Between 3% and 51% of cells in each tumor were identified as expressing cell cycle genes and entering mitosis. Proliferating cells were especially abundant in OPC-like and NPC-like modules, and they were most actively expressed in tumors in children. These observations are consistent with previous studies of IDH mutant diffuse gliomas, whose cellular drivers are proliferating NPC-like and OPC-like [23]. However, in GBM, unlike other classes of gliomas, other types of cells with different expression modules – AC-like and MES cells – also contain significant subsets of proliferating cells, which may reflect their very aggressive nature in GBM.

Interestingly, although the majority of GBM cells corresponded mainly to one of four states, 15% of cells strongly expressed two different metamodules and, therefore, were defined as “hybrid” states. Some combinations of metamodules were rare, while others (AC-like/MES modules, NPC-like/OPC-like modules, and AC-like/OPC-like modules) were relatively common. Thus, GBM cells are most often in one of four basic cellular states or an intermediate hybrid cellular state, each of which has a proliferative potential but with a higher proliferative activity for NPC-like and OPC-like states [24].

Each of the tumors contained cells in at least two of the four cellular states, with most tumors containing cells in all four states, but the frequencies of cellular states varied between tumors and even to some extent between different regions of the same tumor. Most of the tumors consisted mainly of NPC-like and OPC-like cells, or AC-like and



MES cells. It is noteworthy that a similar picture was observed in adults and children.

The authors also showed that most of the obtained modules and cell types differ in certain driver events, typical for each specific module. For example, CDK4 amplification and overexpression of this gene's product are most common in NPC-like. In OPC-like, the most important driver event is the *PDGFRA* amplification with its significant expression increase. The *EGFR* gene undergoes amplification and overexpression in AC-like, playing a major driver role. In MES, in contrast to the previous subtypes, the primary importance is not an increase in protooncogenes' activity but the deactivation of the *NFI* anti-oncogene due to its mutation followed by a decrease in the neurofibromin expression activity [24].

### Conclusion

Within the framework of this and previous reviews, we analyzed the array of modern molecular biological data on GBM and demonstrated that the variety of molecular properties of this type of tumor has two main dimensions: intertumoral and intratumoral. Methodological peculiarities and progressive development of genomic and post-genomic technologies determined the sequence of data accumulation in each of these directions. Numerous failures in the GBM effective target therapies' development based only on intertumoral heterogeneity assessment indicate the critical importance of developing precisely intratumoral heterogeneity issues. Despite the high level of methodological complexity, this problem is being actively studied. Nowadays the promising results have already been obtained: key cell populations that make up the pool of tumor cells in GBM have been identified, and their molecular metamodules have been characterized, and also the presumptive role of some cell populations and their subpopulations in ensuring the properties of tumor malignancy has been shown. Further research in this area opens up new, interesting perspectives for creating effective personalized diagnostic and treatment concepts.

### Сокращения

GBM – glioblastoma  
 GSCs – glioma stem cells  
 TKR – tyrosine kinase receptors  
 CNS – central nervous system  
 AC – astrocyte-like metamodule  
 AKT3 – RAC-gamma serine/threonine-protein kinase  
 CDK6 – cyclin-dependent kinase 6  
 CDKN2A/B – cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B  
 EGFR – epidermal growth factor receptor  
 FGF1 – fibroblast growth factor type 1  
 FGFR1 – fibroblast growth factor receptor type 1  
 MES – mesenchymal-like metamodules

MES1 – mesenchymal-like metamodule subtype 1 (hypoxia-independent)

MES2 – mesenchymal-like metamodule subtype 1 (hypoxia-dependent)

NOTCH2 – notch receptor type 2

NPC – neural progenitor-like metamodule

NPC1 – neural progenitor-like metamodule subtype 1

NPC2 – neural progenitor-like metamodule subtype 2

OPC – oligodendrocyte-progenitor-like metamodule

PDGFA – platelet-derived growth factor subunit A

PDGFRA – platelet-derived growth factor receptor A

PTEN – phosphatase and tensin homolog

RB1 – retinoblastoma protein type 1

TERT – telomerase reverse transcriptase

### References

1. Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 2014;344(6190):1396–401. DOI: 10.1126/science.1254257.
2. Никитин П.В., Рыжова М.В., Зубова И.В., Панина Т.Н., Шугай С.В. Гетерогенность опухолевых клеток в глиобластомах. *Архив патологии*. 2019;81(3):27–36. DOI: 10.17116/patol20198103127.  
 Nikitin PV, Ryzhova MV, Zubova IV, Panina TN, Shugay SV. Heterogeneity of tumor cells in glioblastomas. *Arkhiv patologii*. 2019;81(3):27–36 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol20198103127.
3. Bedard PL, Hansen AR, Ratain MJ, Siu LL. Tumour heterogeneity in the clinic. *Nature*. 2013;501(7467):355–64. DOI: 10.1038/nature12627.
4. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009–2013. *Neuro Oncol*. 2016;18(suppl\_5):v1–v75. DOI: 10.1093/neuonc/now207.
5. Никитин П.В., Рыжова М.В., Потапов А.А., Галстян С.А., Ким Д.С., Панина Т.Н., Шугай С.В., Старовойтов Д.В., Хохлова Е.А., Зубова И.В. Молекулярная и гистологическая гетерогенность глиобластом. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2020;9(3):5–11. DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.5-11.  
 Nikitin PV, Ryzhova MV, Potapov AA, Galstyan SA, Kim DS, Panina TN, Shugay SV, Starovoitov DV, Khokhlova EA, Zubova IV. Glioblastoma molecular and histological heterogeneity. *Clinical and experimental morphology*. 2020;9(3):5–11 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.3.5-11.
6. Perry A, Aldape KD, George DH, Burger PC. Small cell astrocytoma: an aggressive variant that is clinicopathologically and genetically distinct from anaplastic oligodendroglioma. *Cancer*. 2004;101(10):2318–26. DOI: 10.1002/cncr.20625.
7. Perry A, Miller CR, Gujrati M, Scheithauer BW, Zambrano SC, Jost SC et al. Malignant gliomas with primitive neuroectodermal

- tumor-like components: a clinicopathologic and genetic study of 53 cases. *Brain Pathol.* 2009;19(1):81–90. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2008.00167.x.
8. *Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, Yonekawa Y, Di Patre PL, Franceschi S et al.* Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. *J Neuro-pathol Exp Neurol.* 2006;65(9):846–54. DOI: 10.1097/01.jnen.0000235118.75182.94.
  9. *Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H.* Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab Invest.* 1997;76(2):277–84. PMID: 9042164.
  10. *Schittenhelm J, Psaras T.* Glioblastoma with granular cell astrocytoma features: a case report and literature review. *Clin Neuro-pathol.* 2010;29(5):323–9. DOI: 10.5414/npp29323.
  11. *Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN.* Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 2015;29(12):1203–17. DOI: 10.1101/gad.261982.115.
  12. *Rispoli R, Conti C, Celli P, Caroli E, Carletti S.* Neural stem cells and glioblastoma. *Neuroradiol J.* 2014;27(2):169–74. DOI: 10.15274/NRJ-2014-10028.
  13. *Osuka S, Van Meir EG.* Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest.* 2017;127(2):415–26. DOI: 10.1172/JCI89587.
  14. *Lan X, Jörg DJ, Cavalli FMG, Richards LM, Nguyen LV, Vanner RJ et al.* Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nature.* 2017;549:227–32. DOI: 10.1038/nature23666.
  15. *Mao P, Joshi K, Li J, Kim SH, Li P, Santana-Santos L et al.* Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(21):8644–9. DOI: 10.1073/pnas.1221478110.
  16. *Minata M, Audia A, Shi J, Lu S, Bernstock J, Pavlyukov MS et al.* Phenotypic plasticity of invasive edge glioma stem-like cells in response to ionizing radiation. *Cell Rep.* 2019;26(7):1893–905. e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.01.076.
  17. *Nathanson DA, Gini B, Mottahedeh J, Visnyei K, Koga T, Gomez G et al.* Targeted therapy resistance mediated by dynamic regulation of extrachromosomal mutant EGFR DNA. *Science.* 2014;343(6166):72–6. DOI: 10.1126/science.1241328.
  18. *Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):157–73. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.019.
  19. *Bhat KPL, Balasubramanian V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F et al.* Mesenchymal differentiation mediated by NF- $\kappa$ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell.* 2013;24(3):331–46. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.08.001.
  20. *Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC et al.* Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(10):4009–14. DOI: 10.1073/pnas.1219747110.
  21. *Aubry M, de Tayrac M, Etcheverry A, Clavreul A, Saikali S, Menei P et al.* From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget.* 2015;6(14):12094–109. DOI: 10.18632/oncotarget.3297.
  22. *Abou-El-Ardat K, Seifert M, Becker K, Eisenreich S, Lehmann M, Hackmann K et al.* Comprehensive molecular characterization of multifocal glioblastoma proves its monoclonal origin and reveals novel insights into clonal evolution and heterogeneity of glioblastomas. *Neuro Oncol.* 2017;19(4):546–57. DOI: 10.1093/neuonc/now231.
  23. *Neftel C, Laffy J, Filbin MG, Hara T, Shore ME, Rahme GJ et al.* An integrative model of cellular states, plasticity, and genetics for glioblastoma. *Cell.* 2019. DOI: 10.1016/j.cell.2019.06.024.
  24. *Filbin MG, Tirosh I, Hovestadt V, Shaw ML, Escalante LE, Mathewson ND et al.* Developmental and oncogenic programs in H3K27M gliomas dissected by single-cell RNA-seq. *Science.* 2018;360(6386):331–5. DOI: 10.1126/science.aao4750.

### Author information

Pavel V. Nikitin – Researcher, Laboratory of Neuromorphology and Molecular Diagnostics, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0003-3223-4584>

Marina V. Ryzhova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-7206-6365>

Alexander A. Potapov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Director of the N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-8343-3511>

Suzanna A. Galstyan – Resident, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-9953-6654>

Daria S. Kim – Pathologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0003-2354-6930>

Tatyana N. Panina – Pathologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-6156-0085>

Svetlana V. Shugay – Pathologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-8079-8523>

Dmitry V. Starovoitov – Biologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0002-1879-393X>

Ekaterina A. Khokhlova – Resident, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0003-3330-9779>

Irina V. Zubova – Laboratory Technician, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0003-4210-0360>

## Патоморфологическая и иммуногистохимическая характеристика изменений лимфатических узлов умерших от COVID-19 по данным аутопсий

А.М. Ковригина<sup>1</sup>, Е.А. Шаламова<sup>1</sup>, Ю.С. Березовский<sup>2</sup>, Д.В. Калинин<sup>3</sup>, Е.М. Грецов<sup>2</sup>, Т.Р. Багдасарян<sup>2</sup>, Л.А. Семенова<sup>2</sup>, Д.И. Чеботарев<sup>1</sup>, М.В. Самсонова<sup>4,9</sup>, А.Л. Черняев<sup>4,5,6</sup>, Л.М. Михалева<sup>5,10</sup>, О.Д. Мишнев<sup>6</sup>, Э.В. Курилина<sup>7</sup>, О.В. Зайратьянц<sup>8</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

<sup>4</sup> ФГБУ Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

<sup>5</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

<sup>6</sup> ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>7</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

<sup>8</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, Россия

<sup>9</sup> ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>10</sup> ГБУЗ Городская клиническая больница № 31 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

*Введение.* Патогенез новой коронавирусной инфекции COVID-19 находится в стадии активного изучения. Тем не менее сведения об изменениях лимфоидной ткани во вторичных органах иммунной системы, сопровождающих тяжелое течение заболевания, пока остаются крайне ограниченными. Цель исследования – изучение закономерностей гистологических и иммуноморфологических изменений лимфатических узлов умерших пациентов с COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения.

*Материалы и методы.* С помощью гистологического и иммуногистохимического (с использованием антител к CD4, CD8, CD20, CD30, CD123, CD138, PD-1) методов исследована ткань лимфатических узлов (аутопсийный материал) 17 больных, умерших от COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения.

*Результаты.* Общими особенностями гистоархитектоники исследованных лимфатических узлов являлись редукция лимфоидных фолликулов и расширение паракортикальной зоны с реактивным плазмцитозом, экстрафолликулярная В-клеточная активация, синусный гистиоцитоз, признаки гемофагоцитоза, полнокровие сосудов, в части сосудов лимфатических узлов – формирование гиалиновых тромбов, в строме наблюдались диапедезные, а в отдельных узлах массивные кровоизлияния. При иммуногистохимическом исследовании выявлены преобладание в паракортикальной зоне Т-хелперов CD4<sup>+</sup>, деплегия цитотоксических лимфоцитов CD8<sup>+</sup>, увеличение количества как лимфоцитов, экспрессирующих супрессорный белок PD-1, так и активированных лимфоцитов, экспрессирующих активационный антиген CD30. В значительном количестве в просвете синусов и в паракортикальной зоне обнаружены CD123-позитивные плазмцитоподобные дендритные клетки, секретирующие интерферон 1-го типа.

*Заключение.* В лимфатических узлах пациентов с COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения выявляются редукция В-зависимой зоны и деплегия цитотоксических Т-лимфоцитов с повышением экспрессии PD-1, что говорит об истощении иммунного ответа. В то же время в паракортикальной зоне наблюдается значительный реактивный плазмцитоз с наличием многочисленных Т-хелперов – морфологический субстрат гуморального звена иммунитета, что может свидетельствовать о неэффективности гуморального ответа у пациентов с COVID-19 тяжелого течения при одновременной несостоятельности Т-клеточного иммунитета.

**Ключевые слова:** новая коронавирусная инфекция, SARS-CoV-2, COVID-19, В- и Т-иммунный ответ, лимфатические узлы

**Для корреспонденции:** Алла Михайловна Ковригина. E-mail: kovrigina.alla@gmail.com

**Для цитирования:** Ковригина А.М., Шаламова Е.А., Березовский Ю.С., Калинин Д.В., Грецов Е.М., Багдасарян Т.Р., Семенова Л.А., Чеботарев Д.И., Самсонова М.В., Черняев А.Л., Михалева Л.М.,

Мишнев О.Д., Курилина Э.В., Зайратьянц О.В. Патоморфологическая и иммуногистохимическая характеристика изменений лимфатических узлов у умерших от COVID-19 по данным аутопсий. *Клин. эксп. морфология*. 2020;9(4):12–23. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.12-23.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

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

**Статья поступила** 31.08.2020. **Получена после рецензирования** 29.09.2020. **Принята в печать** 26.10.2020.

## Pathomorphological and immunohistochemical features of lymph nodes in COVID-19 patients (autopsy study)

A.M. Kovrigina<sup>1</sup>, E.A. Shalamova<sup>1</sup>, Yu.S. Berezovskiy<sup>2</sup>, D.V. Kalinin<sup>3</sup>, E.M. Gretsov<sup>2</sup>, T.R. Bagdasaryan<sup>2</sup>, L.A. Semenova<sup>2</sup>, D.I. Chebotarev<sup>1</sup>, M.V. Samsonova<sup>4,9</sup>, A.L. Chernyaev<sup>4,5,6</sup>, L.M. Mikhaleva<sup>5,10</sup>, O.D. Mishnev<sup>6</sup>, E.V. Kurilina<sup>7</sup>, O.V. Zayratyants<sup>8</sup>

<sup>1</sup> National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

<sup>3</sup> A.V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>6</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>7</sup> National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

<sup>8</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of Russia, Moscow, Russia

<sup>9</sup> A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

<sup>10</sup> City Clinical Hospital No. 31 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

**Introduction.** The pathogenesis of the novel coronavirus infection COVID-19 is being actively studied. Nevertheless, our up-to-date knowledge of lymphoid tissue response in the secondary immune organs during severe COVID-19 remains extremely limited. The aim of the study was to evaluate patterns of immunomorphological alterations in lymph nodes in patients with severe COVID-19 and to assess lymphocytes functional activity in them.

**Materials and methods.** Lymph node tissue (autopsy material) from 17 deceased patients with severe COVID-19 was examined by histological and immunohistochemical methods using antibodies to CD4, CD8, CD20, CD30, CD123, CD138, PD-1.

**Results.** Examined lymph nodes demonstrated lymphoid follicles reduction and paracortex expansion with reactive plasmacytosis and extrafollicular B-cell activation as well as sinus histiocytosis, variable hemophagocytic cells, and blood vessel congestion. Red thrombi were observed in some lymph nodes. Hemorrhages in the stroma were frequent, and massive hemorrhages were found in individual nodes. Immunohistochemical study revealed CD4<sup>+</sup> T-helpers predominance in the paracortex and cytotoxic CD8<sup>+</sup> lymphocytes depletion together with an increase in the expression of both the PD-1 suppressor protein and the CD30 activation antigen on the lymphocyte surface. CD123-positive plasmacytoid dendritic cells resided in sinuses in abundance.

**Conclusion.** Demonstrated B-associated zone reduction and cytotoxic T-lymphocytes depletion with an up-regulation of PD-1 expression in the lymph nodes in patients with severe COVID-19 indicate immune response exhaustion. At the same time, observed significant reactive plasmacytosis with the presence of numerous T-helper cells constitutes a morphological substrate of the humoral immunity. These findings might indicate the ineffectiveness of the humoral response at late stages of COVID-19 infection in context of cytotoxic immunity failure.

**Keywords:** novel coronavirus infection, SARS-CoV-2, COVID-19, B- and T- immune response, lymph node

**Corresponding author:** Alla M. Kovrigina. E-mail: kovrigina.alla@gmail.com

**For citation:** Kovrigina A.M., Shalamova E.A., Berezovskiy Yu.S., Kalinin D.V., Gretsov E.M., Bagdasaryan T.R., Semenova L.A., Chebotarev D.I., Samsonova M.V., Chernyaev A.L., Mikhaleva L.M., Mishnev O.D., Kurilina E.V., Zayratyants O.V. Pathomorphological and immunohistochemical features of lymph nodes in COVID-19 patients (autopsy study). *Clin. exp. morphology*. 2020;9(4):12–23 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.4.12-23

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

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

**Received** 31.08.2020. **Received in revised form** 29.09.2020. **Accepted** 26.10.2020.

## Введение

В декабре 2019 года в китайской провинции Ухань была зафиксирована вспышка ранее неизвестной инфекционной болезни. В январе возбудитель иден-

тифицирован как коронавирус, родственный возбудителю тяжелого респираторного синдрома (SARS), и впоследствии назван коронавирусом SARS-CoV-2 [1–3]. Болезнь получила название «новая коронави

русная инфекция (COVID-19)», и уже 11 марта 2020 года Всемирная организация здравоохранения объявила эпидемию COVID-19 пандемией.

По состоянию на 10 августа 2020 года во всем мире было выявлено более 20 000 000 инфицированных и более 700 000 умерших от данного заболевания; в России – более 800 000 случаев COVID-19 и более 14 000 летальных исходов. Несмотря на непрерывающийся поиск тактики терапии, эффективность применяемых в настоящее время схем лечения остается спорной [4–7]. На этом фоне активно изучаются механизмы формирования и стабильности иммунитета, во многих странах мира ведется разработка вакцин [8–10], в настоящее время первая в мире вакцина «Спутник-V» создана и зарегистрирована в Российской Федерации. В то же время наши знания о взаимодействии вируса SARS-CoV-2 с клетками иммунного ответа и его влияние на лимфоидную ткань до сих пор весьма ограничены. Так, на протяжении месяцев исследований основное внимание при изучении патогенеза COVID-19 уделялось механизмам проникновения вируса в клетки-мишени (несут на мембране рецептор – АПФ2), цитопатическому действию вируса на клетки-мишени и местной иммунной дисфункции, а именно развитию синдрома активации макрофагов и нерегулируемого выброса цитокинов и хемокинов («цитокиновый шторм») в органах-мишенях, в первую очередь легких [11–16]. На сегодняшний день доказана важная роль в патогенезе тяжелого течения COVID-19 гиперкоагуляционного и ДВС-синдромов [17–19].

Исследования иммунного ответа при COVID-19 направлены на получение информации, полезной для разработки эффективных схем лечения и вакцин, а также на поиск прогностических факторов тяжелого и крайне тяжелого течения и высокой вероятности летального исхода. В ряде исследований было продемонстрировано, что при тяжелом течении COVID-19 резкое ухудшение состояния пациентов развивается на фоне нарушения иммунного ответа, что проявляется абсолютной или относительной лимфопенией уже на начальных этапах заболевания либо выявляется при его прогрессировании [20–23]. В. Diao et al. показали, что происходит не только деплеция циркулирующих Т-клеток, но и их функциональное истощение, что подтверждается повышенной экспрессией на их мембране PD-1 [24]. Кроме того, получены данные о динамике лимфоидной инфильтрации в легочной ткани на разных этапах развития поражения легких [11, 12, 20]. Вместе с тем детальный анализ морфологического субстрата изменений иммунного статуса, в том числе особенностей лимфоидной ткани в лимфатических узлах, практически не проводился.

Целью настоящего исследования является изучение закономерностей гистологических и иммуноморфологических изменений в лимфатических узлах у пациентов, умерших от COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения, на аутопсийном материале.

## Материалы и методы

В исследование был включен аутопсийный материал внутригрудных (паратрахеальных, бифуркационных) лимфатических узлов от 17 пациентов (12 мужчин и пять женщин), умерших в возрасте от 58 до 93 лет, проходивших лечение в инфекционных стационарах Москвы по поводу COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения в период с апреля по май 2020 года. Патологоанатомические вскрытия с соблюдением норм биобезопасности проводились в ЦНИИ туберкулеза Минздрава России. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование выполнено в патологоанатомическом отделении НМИЦ гематологии Минздрава России.

Характеристика умерших от новой коронавирусной инфекции, вошедших в данное исследование, представлена в таблице 1. Диагноз новой коронавирусной инфекции у пациентов с позитивным результатом как прижизненного, так и повторного посмертного ПЦР исследования на РНК SARS-CoV-2 был установлен на основании клинико-эпидемиологических и патологоанатомических критериев [25]. Степень поражения легочной паренхимы оценивалась морфологически на вскрытии и при помощи КТ органов грудной клетки согласно рекомендациям Научно-практического клинического центра диагностики и телемедицинских технологий Департамента здравоохранения города Москвы (март 2020 года), рекомендациям ВОЗ и Минздрава России [25, 26]. У всех умерших на вскрытии диагностированы характерные для COVID-19 диффузное альвеолярное повреждение и острый респираторный дистресс-синдром (клинически). Нарушения гемостаза (синдром гиперкоагуляции) диагностировали при жизни по следующему параметру с использованием референсных значений соответствующих лабораторий: активированное частичное тромбопластиновое время [АЧТВ] (увеличение), протромбиновое время [ПВ] (увеличение), фибриноген (повышение концентрации), D-димер (повышение концентрации).

*Гистологическое исследование.* Исследованы гистологические препараты ткани лимфатических узлов 17 пациентов, окрашенные гематоксилином и эозином, с оценкой следующих морфофункциональных зон и структур: 1) В-зависимая зона (лимфоидные фолликулы); 2) Т-зависимая зона (паракортикальная зона); 3) синусы (расширены, облитерированы, клеточный состав, включения в цитоплазме макрофагов); 4) кровеносные сосуды (мелкие кровеносные сосуды, вены); 5) строма (наличие кровоизлияний, явлений фиброза).

*Имуногистохимическое (ИГХ) исследование* было выполнено на парафиновых срезах лимфатических узлов с использованием панели антител на иммуногистохимическом оборудовании Leica BOND-MAX (Германия) (табл. 2). Оценку ИГХ препаратов проводили полуколичественным методом в 10 полях зрения ( $\times 200$ ).

Таблица 1 | Table 1

**Характеристика пациентов, вошедших в исследование |  
Clinical and epidemiological characteristics of patients in this study**

| Параметр   Parameter  | Число пациентов   Number of patients |
|---|--------------------------------------|
| Мужской пол   Male  | 12 (70,6%)                           |
| Женский пол   Female  | 5 (29,4%)                            |
| Медиана (диапазон) возраста, лет   Median (range) age, years  | 78 (58–93)                           |
| Медиана (диапазон) длительности стационарного этапа заболевания, дней   Median (range) disease duration, days   | 19 (8–42)                            |
| РНК SARS-CoV-2, ПЦР положительный   RNA SARS-CoV-2, PCR positive  | 17 (100%)                            |
| Медиана и диапазон догоспитального этапа заболевания, дней   Median and range of the disease prehospital phase, days  | 12–16                                |
| Коинфекция бактериальная ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> )   Co-infection ( <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> ) | 6 (35%)                              |
| Внутригрудная лимфаденопатия   Intrathoracic lymphadenopathy  | 10 (58,8%)                           |
| Синдром гиперкоагуляции (по данным коагулограммы)   Hypercoagulopathy (based on coagulation panel)  | 12 (70,6%)                           |
| Абсолютная (< 1,0 тыс/мкл) или относительная (<19%) лимфопения   Absolute (<1.0 x 10 <sup>9</sup> /L) or relative (<19%) lymphocytopenia  |                                      |
| – при поступлении в стационар   at presentation   | 11 (64,7%)                           |
| – при прогрессировании   at progression   | 17 (100%)                            |
| Степень поражения легочной паренхимы   CT grading of COVID-19 severity (extent of lung involvement)   |                                      |
| КТ1–КТ2 (<50%)   CT1–CT2 (<50%)   | 3 (17,7%)                            |
| КТ3–КТ4 (50% и более)   CT3–CT4 (50% or more)   | 14 (82,3%)                           |
| Коморбидные заболевания   Comorbidities   |                                      |
| – ожирение   obesity  | 6 (35,3%)                            |
| – сахарный диабет 2-го типа   type 2 diabetes mellitus  | 4 (23,5%)                            |
| – сердечно-сосудистые заболевания (ИБС, ЦВБ)   cardiovascular disease (IHD, cerebro-vascular diseases)  | 5 (29,4%)                            |
| – гипертоническая болезнь   hypertension disease  | 6 (35,3%)                            |
| – ХОБЛ/эмфизема легких   COPD/lung emphysema  | 2 (11,8%)                            |
| – злокачественное новообразование любой локализации   malignant neoplasms   | 2 (11,8%)                            |
| Получали противовирусную терапию   Received anti-viral agents   | 8 (47,1%)                            |

Таблица 2 | Table 2

**Характеристика антител для ИГХ-исследования | Characteristics of antibodies used in the study**

| Антитело   Antibody | Клон, производитель   Clone, manufacturer | Разведение   Dilution | Функциональная характеристика   Functional activity  |
|---------------------|---|-----------------------|--|
| CD20                | MJ1, Leica                                | RTU                   | В-клетки   |
| CD4                 | 4B12, Leica                               | RTU                   | Т-клетки хелперы (Th1, Th2)   T-helpers (Th1, Th2)   |
| CD8                 | 4B11, Leica                               | RTU                   | Цитотоксические Т-клетки   Cytotoxic T-cells   |
| CD30                | JCM182, Leica                             | 1:50                  | Активационный антиген   Activation antigen   |
| CD123               | BR4MS, Leica                              | 1:20                  | Плазмоцитоподобные дендритные клетки   Plasmacytoid dendritic cells  |
| CD138               | EP201, Epitomics                          | 1:100                 | Плазматические клетки   Plasma cells   |
| CD279 (PD1)         | NAT105, Cell Marque                       | 1:50                  | PD1-корцепторный ингибитор, сопровождающий этапы активации CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> Т-клеток, маркер Т-клеточного истощения   PD1-coreceptor inhibitor accompanying the stages of CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> T-cell activation, marker of T-cell depletion |

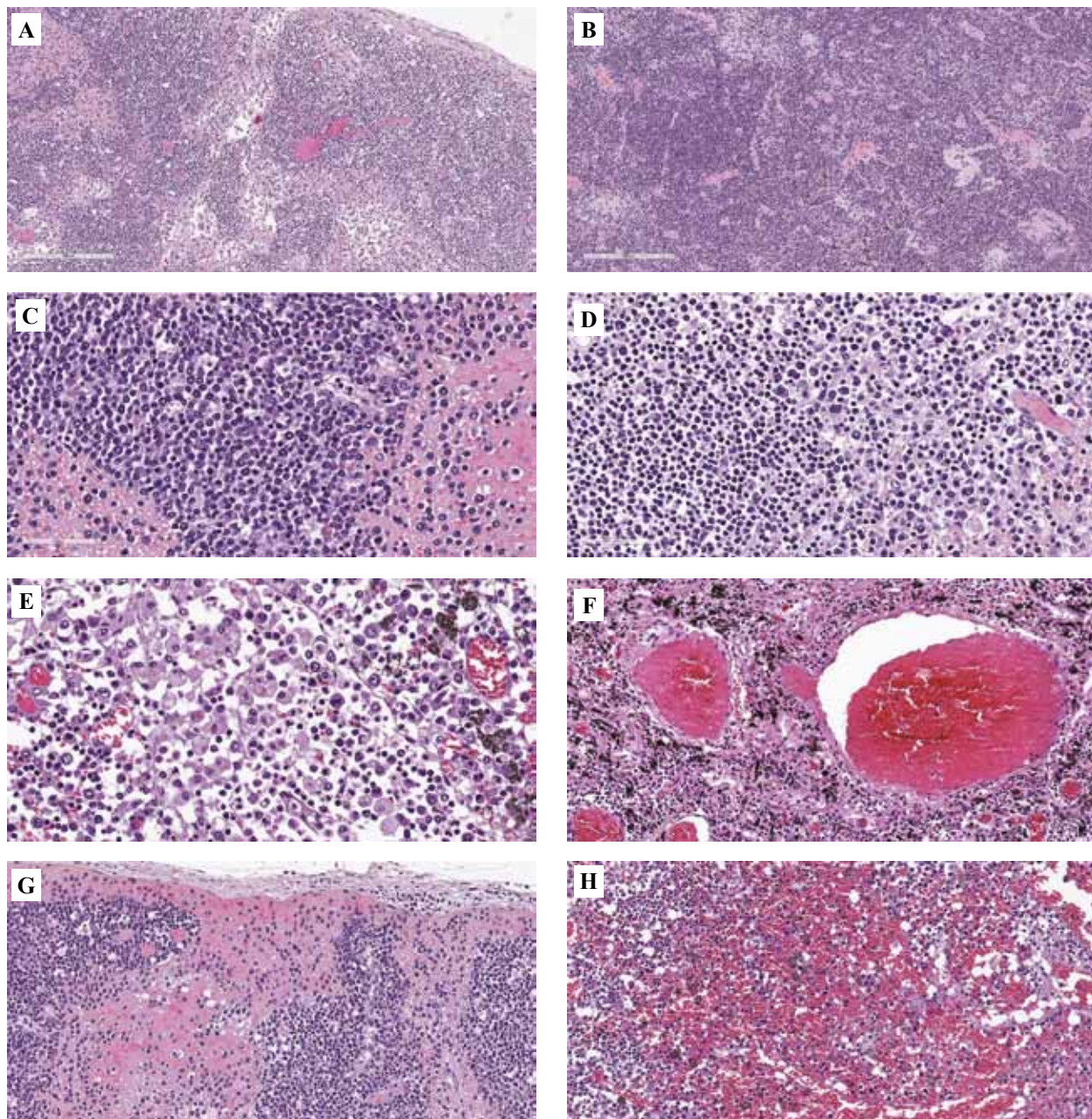
RTU – готовые к применению

RTU – ready-to-use

**Результаты**

*Гистологическое исследование.* В лимфатических узлах выявлен ряд особенностей гистоархитектоники (рис. 1 А–Н): 1) редукция лимфоидных фолликулов (n=12), 2) расширение паракортикальной зоны (n=12), 2) расширение паракортикальной зоны

с реактивным плазмоцитозом (n=14), экстрафолликулярной В-клеточной активацией в виде рассеянных парафолликулярно и в паракортикальной зоне крупных лимфоидных клеток с морфологией центробластов и иммунобластов (n=15); 3) расширение



*Рис. 1.* Морфологические особенности интраторакальных лимфатических узлов при COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения. А – редукция лимфоидных фолликулов,  $\times 200$ , В – расширение паракортикальной зоны,  $\times 200$ , С – пласты плазматических клеток в паракортикальной зоне (реактивный плазмоцитоз),  $\times 400$ , D – активированные крупные лимфоидные клетки в паракортикальной зоне,  $\times 400$ , E – расширенные синусы, в их просвете – гистиоциты с признаками гемофагоцитоза, плазматические клетки, лимфоидные клетки,  $\times 400$ , F – феномен сладжа эритроцитов и формирование красных тромбов в просвете сосудов,  $\times 200$ , G – дилатированные полнокровные синусы,  $\times 200$ , H – массивное кровоизлияние с нарушением гистоархитектоники,  $\times 200$ . Окраска гематоксилином и эозином

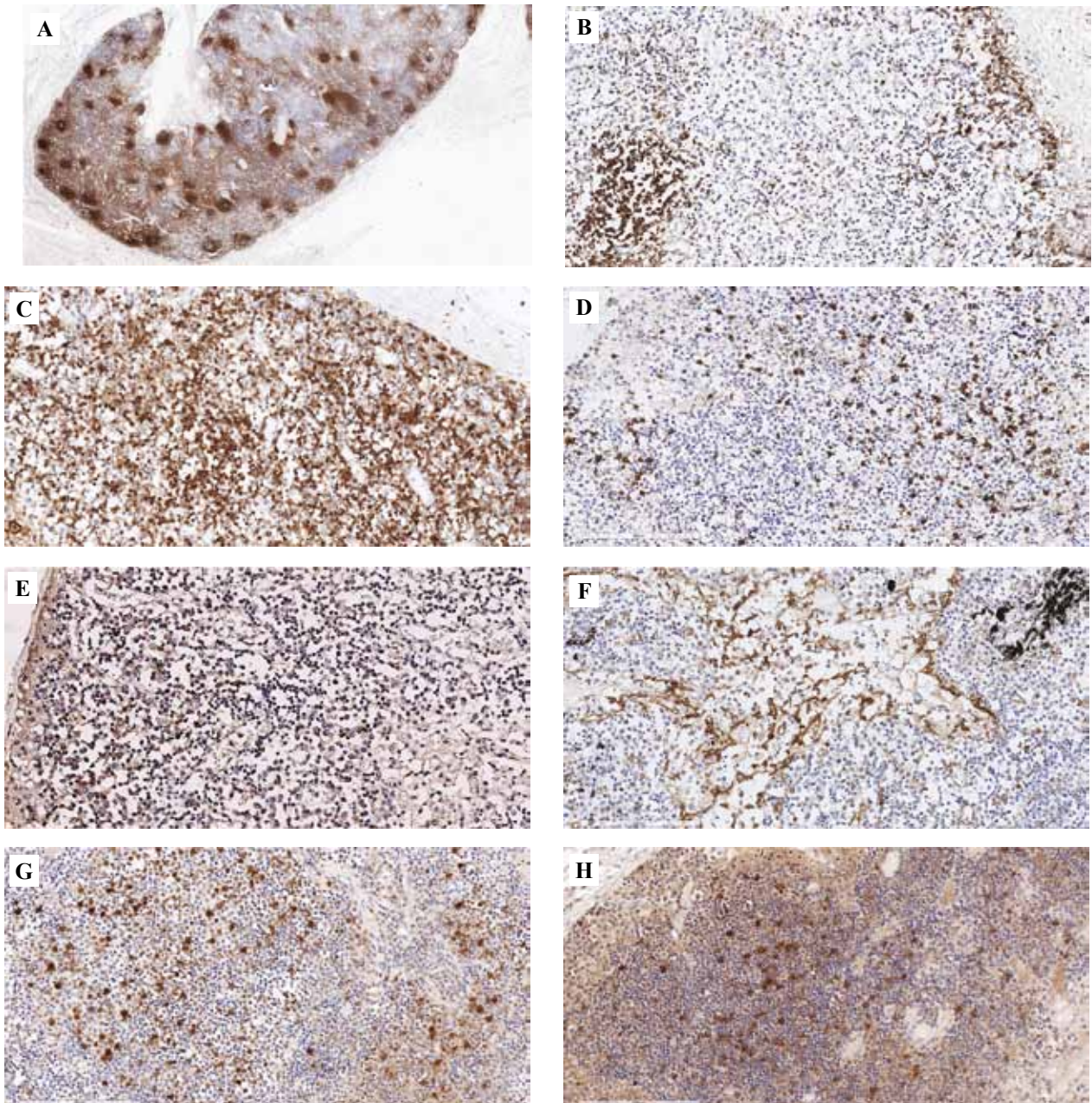
*Fig. 1.* Morphological features of intrathoracic lymph nodes from patients with severe COVID-19.

A – lymphoid follicle reduction,  $\times 200$ , B – paracortex expansion,  $\times 200$ , C – plasma cell sheets in paracortex (reactive plasmacytosis),  $\times 400$ , D – activated large lymphoid cells in paracortex,  $\times 400$ , E – expanded sinuses with histiocytes, hemophagocytic cells, plasma cells, lymphocytes,  $\times 400$ , F – erythrocyte aggregation and red thrombi,  $\times 200$ , G – dilated congested sinuses,  $\times 200$ ; H – lymph node architecture erased by massive hemorrhage,  $\times 200$ . H&E stain



синусов, в их просвете – гистиоциты (n=17), мелкие лимфоидные клетки (n=17), плазмоциты (n=14), иммунобласты (n=12), плазмоцитоидные дендритные клетки (n=13), эритроциты (n=7), отложения фибрина (n=1); 4) полнокровные сосуды (n=15), в части лимфа-

тических узлов – наличие тромбов (организующихся, фибриновых, организованных) в мелких кровеносных сосудах (n=3); в строме – диапедезные или диффузные кровоизлияния (n=9), реже – массивные кровоизлияния (n=3). В большинстве наблюдений (n=12) были



**Рис. 2.** Особенности иммуногистоархитектоники интраторакальных лимфатических узлов при COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения.

A, B – редукция лимфоидных фолликулов, CD20<sup>+</sup>, ×25 и ×200, C – преобладание в паракортикальной зоне CD4<sup>+</sup> лимфоидных Т-клеток, ×200, D – немногочисленные CD8<sup>+</sup> лимфоидные Т-клетки, ×200; E – CD138<sup>+</sup> многочисленные зрелые плазматические клетки расположены в просвете синусов, в паракортикальной зоне, ×200, F – CD123<sup>+</sup> плазмоцитоидные дендритические клетки в просвете синусов, ×200, G – экспрессия активационного антигена CD30 лимфоидными клетками, ×200, H – экспрессия PD-1 на поверхности лимфоидных клеток, ×200. Иммуногистохимический анализ

**Fig. 2.** Immunohistochemical characteristics of intrathoracic lymph nodes in severe COVID-19.

A, B – CD20 immunostaining highlights follicle reduction, ×25 and ×200, C – paracortex is rich with CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes, ×200, D – CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes are sparse ×200, E – CD138<sup>+</sup> immunostaining highlights plasma cells distribution in sinuses and paracortical zone, ×200, F – CD123<sup>+</sup> immunostaining highlights increased number of plasmacytoid dendritic cells in sinuses, ×200, G – expression of activation antigen CD30 in lymphocytes, ×200, H – up-regulated expression of PD-1 in lymphocytes ×200. Immunohistochemical assay

обнаружены признаки гемофагоцитоза разной степени выраженности.

При ИГХ-исследовании выявлена депляция CD20<sup>+</sup> лимфоидных В-клеток, преимущественно расположенных в кортикальной зоне (в пределах лимфоидных фолликулов при их наличии), признаки дезорганизации фолликулов не обнаружены. В паракортикальной зоне среди лимфоидных элементов преобладали CD4<sup>+</sup> Т-клетки, в то время как CD8<sup>+</sup> Т-клетки были немногочисленны. Отмечалось увеличение количества как лимфоидных клеток, экспрессирующих на своей поверхности PD-1 – раздельно, так и активированных лимфоидных клеток разного размера, экспрессирующих активационный антиген CD30. При реакции с антителами к CD123 в просвете краевого и промежуточного синусов визуализировались многочисленные плазмитоидные дендритные клетки, расположенные разрозненно и в виде небольших групп. При реакции с антителами к CD138 отмечалось увеличенное количество зрелых плазматических клеток, расположенных как в паракортикальной зоне, так и в просвете синусов (рис. 2 А–Н).

### Обсуждение

При гистологическом исследовании в паракортикальной зоне регионарных лимфатических узлов определялся выраженный реактивный плазмцитоз в сочетании с тенденцией к редукции В-зависимой зоны, что свидетельствует об активации гуморального иммунитета при COVID-19.

В синусах нами обнаружено увеличенное количество циркулирующих секретирующих интерферон типа I плазмитоидных дендритных клеток, участвующих в противовирусной иммунной защите.

Расширение паракортикальной зоны происходит за счет зрелых плазматических клеток и Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>), наиболее вероятно Т-хелперов типа 2 (Th2-лимфоциты), стимулирующих терминальную дифференцировку В-клеток в плазматические клетки. Прогрессия заболевания и летальный исход, несмотря на наличие выраженного плазмклеточного субстрата гуморального иммунитета, позволяют предположить, что несостоятельность иммунного ответа связана с нарушением функционального взаимодействия между антигенпрезентирующими клетками Th2-лимфоцитами и В-лимфоцитами, дифференцирующимися в плазматические клетки. Данное предположение в некоторой мере подтверждается результатами исследований, посвященных анализу субпопуляций лимфоцитов в периферической крови. Так, С. Qin et al. показали, что у пациентов с тяжелым течением COVID-19 по сравнению с имеющими легкую форму заболевания наблюдается нарушение соотношения наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток и CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти со значительной депляцией последних [27]. Данные результаты могут объяснить функциональную несостоятельность выявленных нами в достаточном количестве CD4<sup>+</sup>

Т-хелперов в лимфатических узлах и недостаточную секреторную активность зрелых плазматических клеток. При сравнении абсолютного количества субпопуляций циркулирующих лимфоцитов у пациентов с тяжелым COVID-19 и пациентов, больных гриппом А(H1N1) 2009, E.T. Giamarellos-Bourboulis et al. выявили сниженное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> лимфоцитов и повышенное количество CD19<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> лимфоцитов при COVID-19. При этом концентрация иммуноглобулинов основных классов (IgM, IgG, IgA) в плазме крови пациентов с COVID-19 сохранялась низкой [28]. Таким образом, выявляемый в лимфатических узлах морфологический субстрат гуморального звена иммунитета при COVID-19 тяжелого течения не транслируется в эффективный гуморальный иммунный ответ с выработкой нейтрализующих анти-SARS-CoV-2 антител. Следует подчеркнуть, что в среднем к 14-м суткам после инфицирования уровень антител IgG должен достигать максимальных значений, однако вирусспецифичные антитела типов IgG1, IgG2, IgG3 могут активировать белок C4 системы комплемента, синтезируемый макрофагами легких, и способствовать повреждению ткани легких, ассоциированному с повреждением сосудистых стенок.

Выявленная депляция цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8<sup>+</sup>) представляет собой морфологический субстрат истощения клеточного иммунного ответа у пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19. Данные изменения в лимфатических узлах соотносятся с выявляемой CD8<sup>+</sup> лимфопенией в крови у пациентов с COVID-19 тяжелого течения, что предлагается использовать в качестве независимого прогностического фактора и маркера эффективности терапии [29, 30]. Эти данные указывают на формирование иммунодефицита у пациентов с тяжелым и крайне тяжелым течением COVID-19, что следует учитывать как фактор риска возникновения или обострения бактериальных инфекционных заболеваний, имеющих высокую тенденцию к хронизации, при возможном изменении эпидемиологической обстановки по ряду бактериальных инфекций. Полученные нами данные соотносятся с описанными Ф.Г. Забозлаевым с соавторами лимфоидными инфильтратами межальвеолярных перегородок, а также периваскулярного интерстиция в разные сроки повреждения легких при COVID-19 и свидетельствуют в пользу быстрого истощения Т-клеточного цитотоксического иммунного ответа. Представляют интерес данные этой группы исследователей о слабой выраженности гуморального ответа при фульминантном течении COVID-19, интерстициальной пневмонии (до 10 суток) наряду с резким снижением CD20<sup>+</sup> В-клеток и отсутствием плазматических клеток в персистирующую фазу повреждения легких (11–20-е сутки), что контрастирует с морфологической картиной выраженного реактивного плазмцитоза в регионарных внутригрудных лимфатических узлах, которую мы наблюдали в нашей группе

пациентов с COVID-19 с медианой длительности заболевания 19 дней. В связи с изложенным выше следует отметить, что выраженный морфологический субстрат гуморального иммунитета в лимфатических узлах не обеспечивает эффективный гуморальный системный (циркулирующие антитела классов М и G) и местный ответ (антитела класса А и их клетки-продуценты в легких) [12, 28].

Общая деплеция лимфоцитов в крови (лимфопения), выявленная у всех пациентов в исследованной нами выборке при прогрессировании заболевания, описывается рядом авторов у значительной части пациентов с COVID-19 тяжелого течения [20–23]. Помимо этого существуют опубликованные данные о выраженной деплеции лимфоцитов во вторичных иммунных органах (лимфатические узлы, селезенка), однако они весьма ограничены. Так, массивные некрозы и поля апоптотически измененных лимфоцитов с нарушением дифференциации лимфоидных фолликулов и паракортикальной зоны лимфатических узлов описаны Y. Chen et al. на выборке из шести пациентов [30]. В нашем исследовании в одном наблюдении выявлен крупноочаговый некроз лимфоидной ткани, скорее вследствие тромбирования сосудов разного калибра. Несмотря на обеднение В-зависимой зоны с тенденцией к выраженной редукции лимфоидных фолликулов, гистоархитектоника лимфатических узлов была в целом сохранна в большинстве случаев, за исключением трех лимфатических узлов с массивными кровоизлияниями в строме и просветах лимфоидных синусов. На светооптическом уровне ни в одном из наблюдений нами не выявлены выраженные признаки апоптоза. При использовании метода трансмиссионной электронной микроскопии, по данным H. Y. Zheng et al. [31], в клетках лимфатических узлов и селезенки можно обнаружить вирусные частицы.

Предполагается важная роль клинически значимой лимфопении в патогенезе тяжелого течения COVID-19, однако механизмы ее развития до сих пор остаются неясными. Рядом авторов выдвинуты гипотезы о различных факторах, приводящих к снижению количества лимфоцитов. Рассматриваются такие механизмы как SARS-CoV-2-индуцированный апоптоз и IL-1 $\beta$ -индуцированный пироптоз в рамках «цитокинового шторма» и синдрома активации макрофагов (вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза) [16, 20, 32–34]. Показано, что цитокиновый профиль пациентов с COVID-19 тяжелого течения соответствует наблюдаемому при синдроме активации макрофагов [28, 32], что соотносится с таковым при туберкулезной инфекции. Необходимо отметить, что в нашем исследовании в большинстве случаев были выявлены морфологические признаки гемофагоцитоза разной степени выраженности (в синусах лимфатических узлов), которые могут наблюдаться при септическом шоке вирусной, бактериальной этиологии, гемотрансфузиях, неопластическом синдроме, а также наиболее заметны при

синдроме активации макрофагов [33, 34]. Подобные изменения были описаны отечественными авторами у пациентов с COVID-19 [34].

Деплеция лимфоцитов не единственный возможный механизм неэффективного иммунного ответа при внедрении SARS-CoV-2 в организм человека. Так, наряду со снижением количества лимфоцитов может наблюдаться их функциональное истощение. Значительное функциональное истощение CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов с высоким уровнем экспрессии антигенов-супрессоров уже описано при инфекциях, вызванных вирусами гепатита В и С, ВИЧ, аденовирусами [35]. Появляются данные о наличии данного фактора в патогенезе нарушения иммунного ответа и при COVID-19 [36, 37]. Согласно результатам исследования B. Diao et al., при COVID-19 тяжелого течения наблюдается повышенная экспрессия маркеров истощения (PD-1 и др.) T-лимфоцитами как в крови, так и в ткани легких [24]. В рамках своего исследования мы провели оценку функционального истощения лимфоцитов в ткани лимфатических узлов с использованием антител к PD-1 и выявили повышение его экспрессии в части лимфоидных клеток, преимущественно в паракортикальной зоне. Интересно, что количество лимфоидных клеток с экспрессией CD30 (маркер активации лимфоцитов) было сопоставимо с количеством лимфоидных клеток, экспрессирующих PD-1. Такая картина может быть связана с первичной избыточной активацией лимфоидных клеток, которая быстро приводит к их истощению, что выражается в одномоментном присутствии увеличенного количества лимфоидных клеток с экспрессией в ткани лимфатического узла этих функционально противоположных маркеров.

Обнаруженные нами изменения в кровеносных сосудах (полнокровие, феномен сладжа эритроцитов, формирование тромбов, набухание стенок) и строме (диапедезные и массивные кровоизлияния) лимфатических узлов сходны с явлениями, описанными отечественными и зарубежными авторами в ткани легких, а также в селезенке и лимфоузлах [11–13, 34], и иллюстрируют эндотелиальные нарушения и изменения системы свертываемости крови, которые определяются лабораторно. Часто наблюдаемое развитие гиперкоагуляционного синдрома у пациентов с COVID-19 непосредственно связано с патогенезом заболевания: одним из основных предполагаемых механизмов считается связывание вирусом рецептора АПФ2 (молекулярная мишень для SARS-CoV-2) при его проникновении в эндотелиоциты и, как следствие, нарушение метаболизма ангиотензина II, приводящее к активации эндотелия, выбросу провоспалительных цитокинов, нарушению проницаемости стенки сосудов разного калибра и их целостности, формированию эндотелиита и тромбоваскулитов [18, 19, 34]. В нашем исследовании на светооптическом уровне набухание эндотелия венул (косвенный признак активации и повреждения эндотелия) было нерезко вы-

раженным. Вероятнее всего, это может быть связано с тем, что была проведена оценка ткани лимфатических узлов на поздних этапах развития заболевания, в то время как предполагаемая активация эндотелия происходит на ранней стадии внедрения вируса в клетки-мишени.

### Заключение

Морфологическая картина и результаты ИГХ исследования в ткани лимфатических узлов пациентов с COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения демонстрируют морфоиммуногистохимический субстрат истощения иммунного ответа, что характеризуется как деплецией В-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, так и значительным реактивным плазмозитозом, возможно, ассоциированным с неэффективной продукцией антител. Другим объяснением может служить отсутствие значимой роли гуморального иммунитета при тяжелых формах COVID-19, при которых активация Т-клеточного звена иммунитета имеет решающее значение. Соотношение экспрессии активационного антигена CD30 и супрессорного белка PD-1 свидетельствует об избыточной активации лимфоцитов с последующим быстрым функциональным истощением. Таким образом, наблюдаются признаки несостоятельности Т-клеточного иммунитета у пациентов, страдающих COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения, что сопровождается неэффективностью гуморального ответа. В совокупности описанные явления позволяют высказать предположение о формировании иммунодефицита у пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19, что обуславливает возможность присоединения либо реактивации инфекций вирусной или бактериальной этиологии, имеющих тенденцию к хронизации.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.М. Ковригина.  
Сбор и обработка материала – Е.А. Шаламова, А.М. Ковригина, Ю.С. Березовский, Д.В. Калинин, Е.М. Грецов, Д.И. Чеботарев.  
Написание текста – Е.А. Шаламова, А.М. Ковригина.  
Редактирование – все авторы.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – А.М. Kovrigina.  
Collected the data and performed the analysis – Е.А. Shalamova, А.М. Kovrigina, Yu.S. Berezovskiy, D.V. Kalinin, Е.М. Gretsov, D.I. Chebotarev.  
Wrote the paper – Е.А. Shalamova, А.М. Kovrigina.  
Edited the manuscript – all authors.

### Литература/References

1. *Lu H, Stratton CW, Tang YW.* Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: the mystery and the miracle. *J Med Virol.* 2020;92(4):401–2. DOI: 10.1002/jmv.25678.
2. *Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020;579(7798):265–9. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
3. *Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020;395(10223):497–506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
4. *Vijayvargiya P, Esquer Garrigos Z, Castillo Almeida NE, Gurram PR, Stevens RW, Razonable RR.* Treatment considerations for COVID-19: acritical review of the evidence (or lack thereof). *Mayo Clin Proc.* 2020;95(7):1454–66. DOI:10.1016/j.mayocp.2020.04.027.
5. *Şimşek Yavuz S, Ünal S.* Antiviral treatment of COVID-19. *Turk J Med Sci.* 2020;50(SI-1):611–9. DOI:10.3906/sag-2004-145.
6. *Cortegiani A, Ingoglia G, Ippolito M, Giarratano A, Einav S.* A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. *J Crit Care.* 2020;57:279–83. DOI:10.1016/j.jcrc.2020.03.005.
7. *Esposito S, Noviello S, Pagliano P.* Update on treatment of COVID-19: ongoing studies between promising and disappointing results. *Infez Med.* 2020;28(2):198–211. PMID: 32335561.
8. *Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet.* 2020;395(10240):1845–54. DOI:10.1016/S0140-6736(20)31208-3.
9. *Ahmed SF, Quadeer AA, McKay MR.* Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies. *Viruses.* 2020;12(3):254. DOI:10.3390/v12030254.
10. *Hotez PJ, Corry DB, Bottazzi ME.* COVID-19 vaccine design: the Janus face of immune enhancement. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(6):347–8. DOI:10.1038/s41577-020-0323-4.
11. *Самсонова М.В., Михалева Л.М., Зайратьянц О.В., Варясин В.В., Быканова А.В., Мишнев О.Д. и др.* Патология легких при COVID-19 в Москве. Архив патологии. 2020;82(4):32–40. DOI:10.17116/patol20208204132.  
*Samsonova MV, Mikhalyova LM, Zairatyants OV, Varyasin VV, Bykanova AV, Mishnev OD et al.* Lung pathology of COVID-19 in Moscow. *Archive of Pathology.* 2020;82(4):32–40 (In Russ.). DOI:10.17116/patol20208204132.
12. *Забозлаев Ф.Г., Кравченко Э.В., Галлямова А.Р., Летуновский Н.Н.* Патологическая анатомия легких при новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Предварительный анализ аутопсийных исследований. Клиническая практика. 2020;11(2):21–37. DOI: 10.17816/clinpract34849.  
*Zabozlaev FG, Kravchenko EV, Gallyamova AR, Letunovskiy NN.* Pulmonary pathology of the new coronavirus disease (COVID-19). The preliminary analysis of post-mortem findings. *Journal of Clinical Practice.* 2020;11(2):21–37 (In Russ.). DOI:10.17816/clinpract34849.
13. *Scendoni R, Marchesani F, Cannovo N, Fedeli P, Cingolani M.* Histopathology of COVID-19 pneumonia in two non-oncological, non-hospitalised cases as a reliable diagnostic bench-

- mark. *Diagn Pathol* 2020;15(1):73. DOI:10.1186/s13000-020-00990-4.
14. Hussain A, Bhowmik B, do Vale Moreira NC. COVID-19 and diabetes: knowledge in progress. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;162:108142. DOI:10.1016/j.diabres.2020.108142.
  15. Li H, Liu L, Zhang D, Xu J, Dai H, Tang N et al. SARS-CoV-2 and viral sepsis: observations and hypotheses. *Lancet*. 2020;395(10235):1517–20. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30920-X.
  16. Vardhana SA, Wolchok JD. The many faces of the anti-COVID immune response. *J Exp Med*. 2020;217(6):e20200678. DOI:10.1084/jem.20200678.
  17. Wang Z, Yang B, Li Q, Wen L, Zhang R. Clinical features of 69 cases with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):769–77. DOI:10.1093/cid/ciaa272.
  18. Franchini M, Marano G, Cruciani M, Mengoli C, Pati I, Masiello F et al. COVID-19-associated coagulopathy. *Diagnosis (Berl)*. 2020;18;7(4):357–63. DOI:10.1515/dx-2020-0078.
  19. Коган Е.А., Березовский Ю.С., Проценко Д.Д., Багдасарян Т.Р., Грецов Е.М., Демуря С.А. и др. Патологическая анатомия инфекции, вызванной SARS-COV-2. Судебная медицина. 2020;6(2):8–30. DOI: 10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30.  
Kogan EA, Berezovsky YuS, Protsenko DD, Bagdasaryan TR, Gretsov EM, Demura SA et al. Pathological anatomy of infection caused by SARS-CoV-2. *Russian Journal of Forensic Medicine*. 2020;6(2):8–30 (In Russ.). DOI: 10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30.
  20. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brügggen MC et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*. 2020;75(7):1564–81. DOI:10.1111/all.14364.
  21. Sun S, Cai X, Wang H, He G, Lin Y, Lu B et al. Abnormalities of peripheral blood system in patients with COVID-19 in Wenzhou, China. *Clin Chim Acta*. 2020;507:174–80. DOI:10.1016/j.cca.2020.04.024.
  22. Tan L, Wang Q, Zhang D, Ding J, Huang Q, Tang YQ et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):33. DOI: 10.1038/s41392-020-0148-4.
  23. Cecere TE, Todd SM, Leroith T. Regulatory T cells in arterivirus and coronavirus infections: do they protect against disease or enhance it? *Viruses*. 2012;4(5):833–46. DOI:10.3390/v4050833.
  24. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L et al. Reduction and functional exhaustion of T Cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11:827. DOI:10.3389/fimmu.2020.00827.
  25. Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)». Версия 7. Утверждены Минздравом России 3 июня 2020 года.  
Interim guidelines «Prevention, diagnosis and treatment of novel coronavirus infection (COVID-19)». Version 7. Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation 03 June 2020 (In Russ.).
  26. Hani C, Trieu NH, Saab I, Dangeard S, Bennani S, Chassagnon G et al. COVID-19 pneumonia: a review of typical CT findings and differential diagnosis. *Diagn Interv Imaging*. 2020;101(5):263–8. DOI:10.1016/j.diii.2020.03.014.
  27. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):762–8. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
  28. Giamarellos-Bourboulis EJ, Netea MG, Rovina N, Akinosoglou K, Antoniadou A, Antonakos N et al. Complex immune dysregulation in COVID-19 patients with severe respiratory failure. *Cell Host Microbe*. 2020;27(6):992–1000.e3. DOI:10.1016/j.chom.2020.04.009.
  29. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis*. 2020;221(11):1762–9. DOI: 10.1093/infdis/jiaa150.
  30. Zheng HY, Zhang M, Yang CX, Zhang N, Wang XC, Yang XP et al. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):541–3. DOI:10.1038/s41423-020-0401-3.
  31. Chen Y, Feng Z, Diao B, Wang R, Wang G, Wang C et al. The novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) directly decimates human spleens and lymph nodes. 2020. DOI: 10.1101/2020.03.27.20045427.
  32. Fathi N, Rezaei N. Lymphopenia in COVID-19: Therapeutic opportunities. *Cell Biol Int*. 2020;44(9):1792–7. DOI:10.1002/cbin.11403.
  33. Gars E, Purington N, Scott G, Chisholm K, Gratzinger D, Martin BA et al. Bone marrow histomorphological criteria can accurately diagnose hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Haematologica*. 2018;103(10):1635–41. DOI:10.3324/haematol.2017.186627.
  34. Зайратьянц О.В., Самсонова М.В., Михалева Л.М., Черняев А.Л., Мишнев О.Д., Крупнов Н.М. и др. / Под ред. О.В. Зайратьянца. Патологическая анатомия COVID-19: Атлас. Москва, ГБУ НИИОЗММ ДЗМ, 2020. 140 с.  
Zayratyants OV, Samsonova MV, Mikhaleva LM, Chernayev AL, Mishnev OD, Krupnov NM et al. / OV Zayratyants (ed.). COVID-19 Anatomical Pathology: Atlas. Moscow, Scientific Research Institute of Health Organization and Medical Management of the Moscow Department of Health, 2020. 140 p. (In Russ.)
  35. Okoye IS, Houghton M, Tyrrell L, Barakat K, Elahi S. Coinhibitory receptor expression and immune checkpoint blockade: maintaining a balance in CD8+ T cell responses to chronic viral infections and cancer. *Front Immunol*. 2017;8:1215. DOI:10.3389/fimmu.2017.01215.
  36. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(5):533–5. DOI:10.1038/s41423-020-0402-2.
  37. Yang L, Liu S, Liu J, Zhang Z, Wan X, Huang B et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduct and Target Ther*. 2020;5(1):128. DOI: 10.1038/s41392-020-00243-2.

**Информация об авторах**

Алла Михайловна Ковригина – доктор биологических наук, заведующая патологоанатомическим отделением НМИЦ гематологии, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии Академии постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России.

Елена Александровна Шаламова – врач-ординатор патологоанатомического отделения НМИЦ гематологии.

Юрий Сергеевич Березовский – заведующий патологоанатомическим отделением Центрального научно-исследовательского института туберкулеза.

Дмитрий Валерьевич Калинин – кандидат медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского.

Евгений Михайлович Грецов – врач-патологоанатом патологоанатомического отделения Центрального научно-исследовательского института туберкулеза.

Татевик Рафиковна Багдасарян – кандидат медицинских наук, заведующая 1-м терапевтическим отделением отдела фтизиатрии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза.

Людмила Алексеевна Семенова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза.

Дмитрий Ильич Чеботарев – аспирант, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения НМИЦ гематологии.

Мария Викторовна Самсонова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологической анатомии НИИ пульмонологии ФМБА России, старший научный сотрудник патоморфологического отделения Московского клинического научно-практического Центра имени А.С. Логинова.

Андрей Львович Черняев – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом фундаментальной пульмонологии НИИ пульмонологии ФМБА России, профессор кафедры патологической анатомии и клинической патологической анатомии РНИМУ имени Н.И. Пирогова, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека.

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека; заведующая патологоанатомическим отделением ГКБ № 31.

Олеко Дмитриевич Мишнев – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Элла Владимировна Курилина – заведующая отделением патологической анатомии НМИЦ кардиологии.

Олег Вадимович Зайратьянц – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии МГМСУ им. А.И. Евдокимова.

**Author information**

Alla M. Kovrigina – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Pathology Department, National Research Center for Hematology; Professor, Department of Clinical Laboratory Diagnostics and Pathological Anatomy, Academy of Postgraduate Education under FSBU FSCC of FMBA of Russia.  
<https://orcid.org/0000-0002-1082-8659>

Elena A. Shalamova – Resident, Pathology Department, National Research Center for Hematology.  
<https://orcid.org/0000-0002-0655-072X>

Yuriy S. Berezovskiy – Head of the Pathology Department, Central Tuberculosis Research Institute.  
<https://orcid.org/0000-0001-5904-0021>

Dmitry V. Kalinin – Cand. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-6247-9481>

Evgeniy M. Gretsov – Pathologist, Pathology Department, Central Tuberculosis Research Institute.  
<https://orcid.org/0000-0002-2337-4692>

Tatevik R. Bagdasaryan – Cand. Sci. (Med.), Head of the First Therapy Department, of Phthisiology Unit, Central Tuberculosis Research Institute.  
<https://orcid.org/0000-0001-9910-1570>

Ludmila A. Semenova – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Division Pathomorphology, Cellular Biology and Biochemistry, Central Tuberculosis Research Institute.  
<https://orcid.org/0000-0002-1782-7763>

Dmitry I. Chebotarev – Postgraduate Student, Pathologist, Pathology Department, National Research Center for Hematology.  
<https://orcid.org/0000-0003-2146-0818>

Maria V. Samsonova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Anatomical Pathology Laboratory, Pulmonology Scientific Research Institute; Senior Researcher, Pathomorphology Department, Loginov Moscow Clinical Scientific Center.  
<https://orcid.org/0000-0001-8170-1260>

Andrey L. Chernayev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Fundamental Pulmonology Department, Research Institute of Pulmonology; Professor, Department of Anatomical Pathology and Clinical Anatomical Pathology, Pirogov Russian National Research Medical University; Leading Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology.  
<https://orcid.org/0000-0003-0973-9250>

Ludmila M. Mikhaleva – Dr. Sci. (Med.), Professor, Director, Head of the Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology; Head of the Pathology Department, City Clinical Hospital No. 31.  
<http://orcid.org/0000-0003-2052-914X>

Oleko D. Mishnev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy, General Medicine faculty, Pirogov Russian National Research Medical University.  
<https://orcid.org/0000-0002-6466-9147>

Ella V. Kurilina – Head of the Pathology Department, National Medical Research Center of Cardiology.  
<https://orcid.org/0000-0002-3208-534X>

Oleg V. Zayratyants – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry.  
<https://orcid.org/0000-0003-3606-3823>

## Morphological features and the functional state of connective tissue of the uterine rudiments in reproductive age patients with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome

A.V. Asaturova, N.M. Faizullina, M.V. Bobkova, A.S. Arakelyan,  
A.V. Tregubova, T.Yu. Smolnova, L.V. Adamyan

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

**Introduction.** Female patients with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome (MRKH) have high stigma scores; the condition severely affects the reproductive system. The study aimed at specification of morphological features and assessment of the maturity of connective tissues of the uterine rudiments in MRKH.

**Patients and methods.** The study included 42 patients with vaginal and uterine aplasia having functioning uterine rudiments and 47 patients of the control group without genital malformations. Age of the patients was 20–24 years in 67.2% of the cases, and 31.2% of the patients were aged ≤ 19, inclusive. Immunohistochemical assay was applied to determine expression levels of collagen I, collagen III, MMP2, MMP9, TIMP1, fibronectin and laminin proteins within the functioning uterine rudiments in comparison with levels of the same proteins in normally developed uterine tissues.

**Results.** Decreased expression of collagen type I and elevated levels of MMP2 and MMP9 proteins in uterine tissues were observed for the group of patients with MRKH.

**Conclusions.** 1) Uterine rudiments in patients with MRKH show variable degree of morphological similarity with the normally developed uterus; 2) The functioning uterine rudiments are subject to the same pathological processes as the normally developed uterus (myoma, endometriosis). 3) The functioning uterine rudiments in patients with MRKH show altered patterns of connective tissue remodeling, with decreased expression of collagen type I and increased expression of matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9.

**Keywords:** Müllerian aplasia, uterine rudiments, metalloproteinases, connective tissue remodeling, MMP2, MMP9

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

**For citation:** Asaturova A.V., Fayzullina N.M., Bobkova M.V., Arakelyan A.S., Tregubova A.V., Smolnova T.U., Adamyan L.V. Morphological features and the functional state of connective tissue of the uterine rudiments in reproductive age patients with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome. Clin. exp. morphology. 2020;9(4):24–30. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.24-30

**Funding.** The work was carried out within the framework of State Assignment to V.I. Kulakov National Research Medical Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (No. AAAA-A18-118053190018-1).

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

**Received** 14.05.2020. **Received in revised form** 19.06.2020. **Accepted** 29.06.2020.

## Морфологические особенности и состояние соединительной ткани маточных рудиментов пациенток репродуктивного возраста с синдромом Мейера–Рокитанского–Кюстера–Хаузера

A.V. Asaturova, N.M. Fayzullina, M.V. Bobkova, A.S. Arakelyan,  
A.V. Tregubova, T.Yu. Smolnova, L.V. Adamyan

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

**Введение.** Пациентки с синдромом Мейера–Рокитанского–Кюстера–Хаузера (МРКХ) имеют высокий порог стигматизации и находятся в зоне риска развития заболеваний женской репродуктивной



системы. Цель исследования – выявить морфологические особенности и оценить зрелость соединительнотканых структур маточных рудиментов при синдроме МРКХ.

**Материалы и методы.** Обследованы 42 пациентки основной группы с аплазией влагалища и матки с функционирующими рудиментами и 47 пациенток группы контроля без пороков развития половых органов, средний возраст которых в 67,2% случаев приходился на возрастную группу 20–24 года, в 31,2% случаев – на группу до 19 лет включительно. Проведены иммуногистохимические исследования функционирующих рудиментов матки для выявления уровня экспрессии белков коллагена I, коллагена III, MMP2, MMP9, TIMP-1, фибронектина, ламинина.

**Результаты.** Выявлено снижение уровня экспрессии коллагена I и повышение уровня экспрессии MMP2 и MMP9 в основной группе пациенток с функционирующим маточным рудиментом.

**Заключение.** 1) Строение маточных рудиментов у пациенток с синдромом МРКХ может быть приближено к строению тела матки с функционирующим эндометрием, а может существенно отличаться. 2) Функционирующие рудименты матки могут подвергаться тем же патологическим процессам, что и нормальная матка (миома, эндометриоз). 3) В функционирующих маточных рудиментах при синдроме МРКХ по сравнению с группой контроля выявлены признаки замедления процессов ремоделирования соединительной ткани: снижение уровня зрелого коллагена I и повышенный уровень экспрессии матриксных металлопротеиназ MMP2 и MMP9.

**Ключевые слова:** аплазия влагалища и матки, маточные рудименты, металлопротеиназы, ремоделирование, MMP2, MMP9

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

**Для цитирования:** Асатурова А.В., Файзуллина Н.М., Бобкова М.В., Аракелян А.С., Трегубова А.В., Смольнова Т.Ю., Адамян Л.В. Морфологические особенности и состояние соединительной ткани маточных рудиментов пациенток репродуктивного возраста с синдромом Мейера–Рокитанского–Кюстера–Хаузера. Клини. эксп. морфология. 2020;9(4):24–30. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.24-30.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Национального исследовательского медицинского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Минздрава России (№ АААА-А18-118053190018-1).

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

**Статья поступила** 14.05.2020. **Получена после рецензирования** 19.06.2020. **Принята в печать** 29.06.2020.

## Introduction

Congenital aplasia of the uterus is pathognomonic for the Mayer-Rokitansky-Küster-Hausler syndrome (MRKH, a.k.a. Müller's aplasia) and testicular feminization syndrome (a.k.a. androgen insensitivity syndrome) [1–3]. Such defects can also be observed in combined malformations of the urinary system and gastrointestinal tract (cloacal malformations and anorectal anomalies) [4] and some other syndromic malformations, e.g. oculo-auriculo-vertebral syndrome, Al-Awadi/Raas-Rothschild syndrome, Klippel-Feil anomalies, etc. [5, 6].

Patients with MRKH have normal female karyotypes and normally functioning ovaries, which ensure proper development of gender-specific traits. Still, the patients either lack the uterus and upper portion of the vagina, or have uterine rudiments. The syndrome occurs with a frequency of 1 in 5000 newborn girls. The etiology of MRKH development is still unknown and is considered by most authors within the framework of embryonic disorders [7–9].

MRKH typically presents with either complete aplasia of the uterus (64%) or the presence of functioning uterine rudiments (24%) and developmental abnormalities of the

fallopian tubes and ovaries in combination with multiple malformations of other organs and systems [10, 11].

Despite the obvious genetic causation associated with increased stigmatization in the patients with genital defects, morphological and molecular mechanisms of MRKH onset remain unclear. Immunohistochemical (IHC) profiles of connective tissues in the uterine rudiments (content of different types of collagen, metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs), fibronectin and laminin) require further investigation [12].

The aim of this study was to identify morphological features and assess the maturity of connective tissue of the functioning uterine rudiments in patients with MRKH.

## Patients and methods

The study included 42 patients with karyotype 46XX, having vaginal and uterine aplasia with a functioning uterine rudiment, admitted to the Department of Operative Gynecology of the V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology for surgical correction of genital malformations during the period 1995-2016. These patients constituted the MRKH group. The control group consisted of 47 patients without

genital malformations admitted for surgical treatment of gynecological conditions during the same period. Age of the patients constituted 20-24 years in 67.2% of the cases, and 31.2% of the patients were aged  $\leq 19$ , inclusive. All patients of the MRKH group complained about the absence of menstruation and the inability to have sex due to vaginal dysplasia. In 23 cases (54.8%), the patients with MRKH complained about cyclical pains in the lower abdomen. Nine patients (21.4%) of the MRKH group had natural colpoptosis as a result of regular attempts at sexual activity.

The methods included anamnestic, physical, genetic (karyotyping) and ultrasound examination of the pelvic cavity and kidneys, complemented with MRI in certain cases to exclude other complex/syndromic malformations and/or excretory urography to assess functional state of the urinary system and the kidneys. Most of the patients were admitted to the V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology with indications for surgical correction (colpoptosis).

Surgical specimens were collected from all patients for routine histological examination and immunohistochemical assessment of connective tissue markers.

For immunohistochemistry, 4  $\mu\text{m}$  paraffin sections were slide-mounted and dried at  $+37^\circ\text{C}$  for 18 hours. Deparaffinized sections were rehydrated in ethanol series ( $95^\circ$ ,  $80^\circ$  and  $70^\circ$ , for 2 minutes each). The epitope retrieval was carried out in a PT Link station (Dako, USA) using 10 mM citrate buffer, pH 6.0, at  $97^\circ\text{C}$  for 20 minutes. The cooled slides were placed in humid chambers (to prevent drying) and incubated for 15 minutes in a 3% hydrogen peroxide solution to block the endogenous peroxidase activity. The reaction with primary antibodies was carried out for 30 minutes at room temperature. The list of primary antibodies used in the study included monoclonal mouse antibodies to MMP2 (clone 6E3F8, 1:200, Abcam, UK) and monoclonal rabbit antibodies to MMP9 (clone EP1254, 1:200, Abcam, UK), as well as polyclonal rabbit antibodies to TIMP1 (1:50, NeoMarkers, USA), Fibronectin (1:50, Dako, Denmark), Laminin alpha-1 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA), Collagen I alpha-1 (1:500, GeneTex, USA), and Collagen III alpha-1 (1:1000, GeneTex, USA).

Visualization of the signals was accomplished with the use of Dako REAL EnVision Detection System (Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse; Dako, Denmark) as secondary antibodies. The oxidation of the 3,3-diaminobenzidine (DAB) substrate by horseradish peroxidase in the presence of hydrogen peroxide yielded the water-insoluble brown final product. For correct interpretation of the IHC data, appropriate controls were included in each series, with negative controls set without the addition of primary antibodies and positive controls for each antibody selected

according to the manufacturer's specifications. Following the IHC reactions, the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin and embedded in Shandon™ synthetic mountant (Thermo Fisher Scientific, USA). Connective tissue structures were characterized based on the appearance of extracellular matrix and cellular elements. The maturity of connective tissue was assessed by expression levels of collagens, fibronectin and laminin, MMP2, MMP9 and TIMP1. The images were characterized by conventional semi-quantitative scoring, with grade 0 for the lack of positive signal, grade 1 for  $\leq 20\%$ , grade 2 for 20-40%, and grade 3 for  $\geq 40\%$  of reactive cells [13].

## Results

The predominant type of surgical treatment was pelvic peritoneal colpoptosis (71.4% of the cases,  $n = 30$ ). Concomitant intraoperative findings included hypoplasia or aplasia of fallopian tubes, congenital unilateral absence of a fallopian tube and ovary ( $n = 2$ ) and an elongated ovary with suspected ovotestis ( $n = 3$ ).

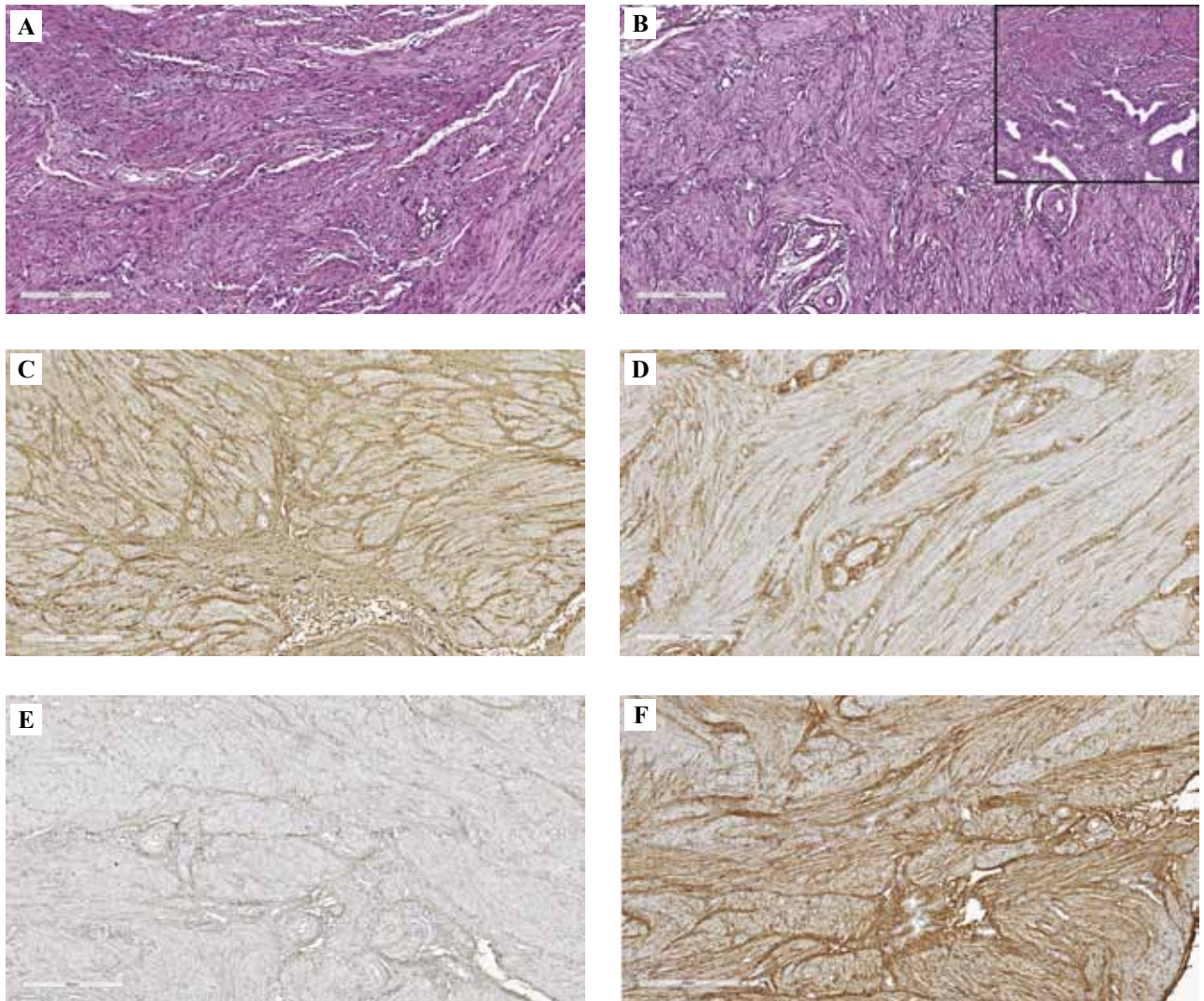
Morphological examination of the rudimentary uterine bodies revealed functionally active focal endometrium in 17 (40.5%) of the cases, with 12 of them comprising proliferative phase and 5 specimens comprising secretory phase. Focal endometrium without signs of functional activity was observed in 9 cases (21.4%). In the rest 16 cases (38.1%), no endometrium was identified. Morphological examination of the rudimentary uterine horns revealed endometrium with the signs of functional activity (most often corresponding to proliferative phase) in 30 cases (71.4%, Fig. 1 B).

In addition, the examination revealed internal endometriosis in seven patients (16.7% of the cases) and thin endometrium with inflammatory changes in five patients (11.9% of the cases).

Control images represent myometrium and endometrium of the normally developed uterus (Fig. 1 A); the material was obtained during laparoscopic management of common uterine pathologies, mostly fibroids. Figure 1 B shows muscle tissue of a functioning rudimentary horn; the insert represents an area with lining endometrium.

IHC study of the resected material revealed expression of collagen type I within endometrial stroma in 37 patients of the MRKH group (88.1% of the cases) and 47 patients of the control group (100% of the cases). Ubiquitous expression of collagen type I in myometrium was observed in both groups (Fig. 1 C, D).

Ubiquitously high expression of collagen type III within endometrial stroma and myometrium was observed in both groups. By contrast, no expression of collagen type III in endometrial glands was detected in any of the specimens examined.



*Fig. 1.* Morphology and immunophenotype of myometrium in women without uterine malformations and patients with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome.  
 A – normal myometrium, B – myometrium of the functioning remnant horn (in the box: endometrium present),  
 C – collagen I expression in normal myometrium, D – collagen I expression in myometrium of the functioning remnant horn muscle tissue, E – MMP9 expression in normal myometrium, F – MMP9 expression in myometrium of the functioning remnant horn muscle tissue. A, B – H&E stain, scale bar 200  $\mu\text{m}$ , C–F – immunohistochemical assay, scale bar 300  $\mu\text{m}$

*Рис. 1.* Морфология и иммунофенотип неизмененного миометрия женщин без пороков развития матки и пациенток с синдромом Мейера–Рокитанского–Кюстера–Хаузера.

A – неизмененный миометрий, B – мышечная ткань функционирующего рудиментарного рога (во врезке – с наличием выстилающего эндометрия), C – экспрессия коллагена I типа в миометрии женщин контрольной группы, D – экспрессия коллагена I типа в мышечной ткани рудиментарного рога, E – экспрессия MMP9 в миометрии женщин контрольной группы, F – экспрессия MMP9 в мышечной ткани рудиментарного рога. A, B – окраска гематоксилином и эозином, масштабный отрезок 200 мкм, C–F – иммуногистохимическое окрашивание, масштабный отрезок 300 мкм

IHC staining for MMP2 (a.k.a. gelatinase A) revealed positive signals in the cytoplasm of endometrial gland cells in all patients of both groups. In the MRKH group, the MMP2 staining intensity was higher than in the control group. Within endometrial stroma, the MMP2 signal was observed in one patient of the MRKH group and none of the patients of the control group. Within myometrium, the MMP2 signal was observed in two patients of the MRKH group and one patient of the control group. The data indicate that (1) expression of MMP2 in the uterus is typically confined to endometrial glands and (2) MMP2 is stronger expressed in uterine rudiments than in normally developed uteruses.

IHC staining for MMP9 (a.k.a. gelatinase B) revealed its expression in endometrial glands in 16 patients of the MRKH group (38.1% of the cases). In endometrial stroma, the corresponding signal was observed in 32 patients of the MRKH group (76.2% of the cases), and its level was increased significantly compared with the control group (Fig. 1 E, F). In myometrium, the distinct MMP9 signal was observed for 26 patients of the MRKH group (61.9% of the cases) and none (0%) of the control group patients.

Thus, expression levels of MMP2 and MMP9 in uterine tissues were higher in the MRKH group compared with the control group. Expression levels of TIMP1, adhesive glycoprotein laminin and fibronectin were detectable in none (0%) of the tissue samples examined.

## Discussion

Histological analysis of the uterine rudiments with confirmed functional activity revealed predominance of proliferative phase (observed in 71.4% of the cases), with secretory phase being less common. This observation is consistent with published evidence indicating that endometrium of the uterine rudiments consists mainly of the basal layer [14]. Certain studies suggest the possibility of proper endometrial differentiation in the uterine rudiments, while also noting that the differentiation is less pronounced in patients with concomitant malformations of other organs and systems [15]. The violation of decidualization processes in the endometrium of uterine rudiments compared with the endometrium of normally developed uteruses has been also confirmed histologically [16]. However, the reported findings on the endometrial cycle in MRKH are incidental, and no systemic efforts can be undertaken as yet due to the lack of uniform criteria for the morphological assessment.

The IHC data obtained by us in this study indicate decreased expression of collagen type I in the myometrium of functioning uterine rudiments compared with the myometrium of normally developed uteruses. A decrease in the levels of mature collagen may indicate decreased rates of connective tissue remodeling associated with abnormal

synthesis/assembly of collagen, as well as its excessive degradation, impaired cross-linking, autoimmune reactivity, etc. As is known, collagen diseases not necessarily represent a consequence of mutations in the collagen-encoding genes *per se*, but may also result from defects in collagen biosynthesis, post-translational modification, secretion, remodeling and self-assembly; all these stages are served and orchestrated by a plethora of genes [17].

The results obtained in this study indicate increased expression of matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9 in the functioning uterine rudiments of patients with MRKH. Metalloproteinases are involved in tissue remodeling, angiogenesis, cell growth, cell migration and differentiation, apoptosis, extracellular matrix turnover, etc. The increased MMP levels observed within the uterine rudiments may reflect the functional failure. It should be noted that, reportedly, these levels may vary, with MMP2 expression in certain cases hardly exceeding the lower detection limit [15].

The obtained results still prevent clear conclusions about the existence of characteristic patterns of distribution, expression and accumulation of metalloproteinases within the uterine rudiments. Further studies in this direction are needed to support and expand these primary IHC profiles of connective tissue structures of the uterine rudiments in MRKH.

## Conclusions

Uterine rudiments in patients with MRKH show varying degree of morphological similarity with the normally developed uterus. The degree of alterations in functional morphology of the uterus (myometrial hypotrophy, endometrial insufficiency) correlates with concomitant malformations of other organs in these patients.

The functioning uterine rudiments in MRKH are subject to the same pathological processes as the normally developed uterus (fibroids, endometriosis).

Decreased rates of connective tissue remodeling were revealed in the group of patients with functioning uterine rudiments compared with the control group, including a decrease in the levels of mature collagen type I and increased expression levels of matrix metalloproteinases MMP2 and MMP9.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiments – A.V. Asaturova, M.V. Bobkova, L.V. Adamyan.

Collected the data and performed the analysis – A.V. Asaturova, A.V. Tregubova, M.V. Bobkova, T.U. Smolnova, A.S. Arakelyan.

Carried out IHC reactions and analysed the results – N.M. Fayzullina, A.V. Asaturova, A.V. Tregubova.

Wrote the paper – A.V. Asaturova, M.V. Bobkova.

Edited the manuscript – A.V. Asaturova, N.M. Fayzullina, L.V. Adamyan., T.U. Smolnova.

## References

1. Schweigmann G, Geley TE, Gassner I. Female genital anomalies and important ovarian conditions. In: M Riccabona (ed). *Pediatric Urogenital Radiology*. Cham: Springer, 2018. P. 317–352. DOI: 10.1007/978-3-319-39202-8\_19.
2. Bombard DS 2nd, Mousa SA. Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser Syndrome: complications, diagnosis and possible treatment options: a review. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30(9):618–23. DOI: 10.3109/09513590.2014.927855.
3. Patnaik SS, Brazile B, Dandolu V, Ryan PL, Liao J. Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser (MRKH) syndrome: a historical perspective. *Gene*. 2015;555(1):33–40. DOI: 10.1016/j.gene.2014.09.045.
4. Адамян Л.В., Даренков С.П., Шельгин Ю.А., Глыбина Т.М., Уварова Е.В., Кумыкова Х.С. и др. Клиническое наблюдение врожденной аномалии тазовых органов клоакального типа. *Акушерство и гинекология*. 2012;8(1):60–63. Adamyan LV, Darenkov SP, Shelygin YuA, Glybina TM, Uvarova EV, Kumykova ZKh et al. A clinical case of congenital cloacal anomaly of pelvic organs. *Obstetrics and Gynecology*. 2012;8(1):60–63 (In Russ.).
5. Connell MT, Owen CM, Segars JH. Genetic syndromes and genes involved in the development of the female reproductive tract: a possible role for gene therapy. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2013;4:127. DOI: 10.4172/2157-7412.1000127.
6. Fontana L, Gentilin B, Fedele L, Gervasini C, Miozzo M. Genetics of Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser (MRKH) syndrome. *Clin Genet*. 2017;91(2):233–46. DOI: 10.1111/cge.12883.
7. Бобкова М.В., Баранова Е.Е., Адамян Л.В. Генетические аспекты формирования аплазии влагалища и матки: история изучения. *Проблемы репродукции*. 2015;21(3):10–15. Bobkova MV, Baranova EE, Adamyan LV. Genetic aspects of vagina and the uterus aplasia: the history. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2015;21(3):10–15 (In Russ.). DOI: 10.17116/repro201521310-15.
8. Londra L, Chuong FS, Kolp L. Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome: a review. *Int J Womens Health*. 2015;7:865–70. DOI: 10.2147/IJWH.S75637.
9. Edmonds DK, Rose GL, Lipton MG, Quek J. Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome: a review of 245 consecutive cases managed by a multidisciplinary approach with vaginal dilators. *Fertil Steril*. 2012;97(3):686–90. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.12.038.
10. Rall K, Eisenbeis S, Henninger V, Henes M, Wallwiener D, Bonin M et al. Typical and atypical associated findings in a group of 346 patients with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2015;28(5):362–8. DOI: 10.1016/j.jpog.2014.07.019.
11. Oppelt PG, Lermann J, Strick R, Dittrich R, Strissel P, Rettig I et al. Malformations in a cohort of 284 women with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome (MRKH). *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:57. DOI: 10.1186/1477-7827-10-57.
12. Herlin MK, Petersen MB, Brännström M. Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser (MRKH) syndrome: a comprehensive update. *Orphanet J Rare Dis*. 2020;15(1):214. DOI:10.1186/s13023-020-01491-9.
13. Schledere M, Mueller KM, Haybaeck J, Heider S, Huttary N, Rosner M et al. Reliable quantification of protein expression and cellular localization in histological sections. *PLoS One*. 2014 Jul 11;9(7):e100822. DOI: 10.1371/journal.pone.0100822.
14. Rall K, Barresi G, Wallwiener D, Brucker SY, Staebler A. Uterine rudiments in patients with Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome consist of typical uterine tissue types with predominantly basalis-like endometrium. *Fertil Steril*. 2013;99(5):1392–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.002.
15. Адамян Л.В., Боровая Т.Г., Макиян З.Н., Бобкова М.В. Результаты микроскопического и иммуногистохимического исследования маточных рудиментов у пациенток с аплазией матки и влагалища (синдром Рокитанского–Кюстера–Майера). *Проблемы репродукции*. 2007;13(6):71–77. Adamyan LV, Borovaia TG, Makiiian ZN, Bobkova MV. Rezul'taty mikroskopicheskogo i immunogistokhimicheskogo issledovaniya matochnykh rudimentov u patsientok s aplaziei matki i vlagalishcha (sindrom Rokitanskogo–Kyustera–Majera). *Russian Journal of Human Reproduction*. 2007;13(6):71–77 (In Russ.).
16. Brucker SY, Eisenbeis S, König J, Lamy M, Salker MS, Zeng N et al. Decidualization is impaired in endometrial stromal cells from uterine rudiments in Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(3):1083–97. DOI: 10.1159/000464116.
17. Клеменов А.В. Недифференцированные дисплазии соединительной ткани. Москва, 2005. 136 с. Klemenov AV. Undifferentiated connective tissue dysplasia: clinical manifestations, diagnostic capabilities and pathogenetic treatment. Moscow, 2005. 136 p. (In Russ.).

## Author information

Alexandra V. Asaturova – Cand. Sci. (Med.), Head of the 1st Pathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0001-8739-5209>

Nafisa M. Fayzullina – Cand. Sci. (Chem.), Senior Researcher, 1st Pathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0003-1804-8523>

Marina V. Bobkova – Cand. Sci. (Med.), Obstetrician-gynecologist, Gynecological Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology. <https://orcid.org/0000-0001-9520-7896>

Alek S. Arakelyan – Cand. Sci. (Med.), Obstetrician-gynecologist, Gynecological Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0002-3217-1141>

Anna V. Tregubova – Junior Researcher, 1st Pathology Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology.

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

Tatyana U. Smolnova – Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher, Surgery Department, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0003-3543-651X>

Leila V. Adamyan – Dr. Sci. (Med.), Head of the Gynecological Surgery Department, Deputy Director for Research, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology.

<https://orcid.org/0000-0002-3253-4512>

## Комплексное цитологическое и иммуноцитохимическое исследование ликвора в диагностике интракраниальных метастазов рака молочной железы

Л.Я. Фомина<sup>1</sup>, Л.В. Мехеда<sup>1</sup>, О.С. Собея<sup>1</sup>,  
Н.К. Шахпазян<sup>1,2</sup>, Т.Г. Гаспарян<sup>1,2</sup>, Н.В. Севян<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ Научный центр неврологии, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

**Введение.** Рак молочной железы является вторым по частоте метастазирования после рака легкого у мужчин – от 5 до 48%, в зависимости от биологического подтипа опухоли. Цитологическое исследование ликвора относится к одним из золотых стандартов диагностики метастатических поражений головного мозга и наряду с другими современными методами позволяет повысить их выявляемость. Обнаружение клеток метастаза рака молочной железы в ликворе является неблагоприятным прогностическим признаком. Для таких пациенток цитологическое исследование имеет предиктивную значимость: отсутствие клеток опухоли в цереброспинальной жидкости можно рассматривать как признак эффективности интратекальной терапии. Точность цитологического заключения напрямую зависит от подробного сбора анамнеза, тем более что гистологически подтвердить диагноз удастся не всегда. Применение иммуноцитохимического исследования увеличивает чувствительность цитологической диагностики. Цель работы – оценить возможности комплексного цитологического и иммуноцитохимического исследования ликвора в диагностике вторичных церебральных поражений при раке молочной железы.

**Материалы и методы.** Проведено 169 цитологических исследований 55 пациенток с раком молочной железы с метастазами в головном мозге. Материал для исследования был получен с помощью люмбальных пункций. С целью уточнения цитологического диагноза 36 пациенткам проведены 44 иммуноцитохимических исследования и 117 иммуноцитохимических реакций.

**Результаты.** Диагностическая чувствительность цитологического метода составила 69,8%. Применение иммуноцитохимического исследования повысило чувствительность цитологической диагностики до 72,3%. У 29 пациенток с помощью иммуноцитохимического исследования был определен гистогенез опухоли.

**Заключение.** Цитологическое исследование ликвора зачастую является единственным методом первичной морфологической диагностики метастазов рака молочной железы в центральной нервной системе. Применение иммуноцитохимических реакций значительно расширяет возможности цитологической диагностики, позволяя обнаружить единичные опухолевые клетки в материале и в большинстве случаев определить гистогенез метастатического новообразования, что повышает чувствительность метода.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, цитологическое и иммуноцитохимическое исследование ликвора

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

**Для цитирования:** Фомина Л.Я., Мехеда Л.В., Собея О.С., Шахпазян Н.К., Гаспарян Т.Г., Севян Н.В. Комплексное цитологическое и иммуноцитохимическое исследование ликвора в диагностике интракраниальных метастазов рака молочной железы. Клини. эксп. морфология. 2020;9(4):31–38. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.31-38.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

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

**Статья поступила** 27.05.2020. **Получена после рецензирования** 19.06.2020. **Принята в печать** 29.06.2020.

## Complex cytological and immunocytochemical study of cerebrospinal fluid in the intracranial breast carcinoma metastases diagnosis

L.Y. Fomina<sup>1</sup>, L.V. Mekheda<sup>1</sup>, O.S. Sobelya<sup>1</sup>,  
N.K. Shakhpazyan<sup>1,2</sup>, T.G. Gasparyan<sup>1,2</sup>, N.V. Sevyan<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research Center of Neurology, Moscow, Russia

<sup>3</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

**Introduction.** Metastases of breast cancer are detected in 5 to 48% cases, depending on the biological tumor subtype, which is the second most common after lung cancer in men. Cytological liquor analysis is one of the “gold standards” for the metastatic brain lesion identification, and, among other modern approaches, it can increase the CNS metastasis detection. Breast cancer cell identification in cerebrospinal fluid is a poor prognostic factor. A cytological examination has a predictive significance for these patients: the absence of tumor cells in the cerebrospinal fluid can be considered the sign of the intrathecal therapy effectiveness. The accuracy of the cytological diagnosis directly depends on the detailed patient’s history. Immunocytochemical assays increase the sensitivity of the cytological diagnostics. The aim of the study was to evaluate the capabilities of comprehensive cytological and immunocytochemical studies in the secondary cerebral lesions diagnosis in breast cancer patients.

**Materials and methods.** We conducted 169 cytological studies in 55 breast cancer patients with brain metastases. Liquor samples were obtained using lumbar punctures. 36 patients underwent 44 immunocytochemical studies and 117 immunocytochemical reactions to clarify the cytological diagnosis.

**Results.** The sensitivity of the cytological method was 69.8%. Immunocytochemistry increased the sensitivity to 72.3%. In 29 patients, the tumor histogenesis was determined using an immunocytochemical assay.

**Conclusion.** The liquor cytological analysis is frequently the only primary morphologic diagnostic method to detect breast cancer metastasis within the central nervous system. Immunocytochemical assay significantly expands the possibilities of cytological study, allowing health care specialists to detect single tumor cells in samples and determine the metastatic neoplasm histogenesis in most cases, which also increases sensitivity.

**Keywords:** breast cancer, cytological and immunocytochemical study of cerebrospinal fluid

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

**For citation:** Fomina L.Y., Mekheda L.V., Sobelya O.S., Shakhpazyan N.K., Gasparyan T.G., Sevyan N.V. Complex cytological and immunocytochemical study of cerebrospinal fluid in the intracranial breast carcinoma metastases diagnosis. Clin. exp. morphology. 2020;9(4):31–38. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.31–38 (In Russ.).

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

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

**Received 27.05.2020. Received in revised form 19.06.2020. Accepted 29.06.2020.**

### Введение

Метастатические поражения головного мозга в среднем встречаются у 3–8,5% пациентов с онкологическими заболеваниями [1–3]. Рак молочной железы (РМЖ) является вторым по частоте метастазирования после рака легкого у мужчин – от 5 до 48%, в зависимости от биологического подтипа опухоли [4]. Ежегодное увеличение числа пациенток с РМЖ с метастазами в головном мозге объясняется несколькими причинами – совершенствованием методов диагностики и более эффективной системной терапией экстракраниального поражения. При условии современного и своевременного системного лечения РМЖ пациентки стали доживать до метастазов в головном мозге [5].

Риск развития РМЖ увеличивается с возрастом: в 0,8% случаев заболевание манифестирует в возрасте до 30 лет, в 6,5% – в 30–40 лет, и более 90% случаев возникает после 40 лет.

Метастатическое поражение головного мозга в 20–48% случаев регистрируют у пациенток с HER2-

гиперэкспрессирующим и тройным негативным подтипами [6–8]. К факторам, повышающим риск развития метастазов в головном мозге у пациенток с РМЖ с тройным негативным подтипом, относят гиперэкспрессию EGFR, цитокератинов 5/6 [9] и мутацию *BRCA1/2* [10, 11].

Рак молочной железы в 80–85% случаев метастазирует в большие полушария головного мозга, в 10–15% – в мозжечок, в 3–5% – в ствол мозга и менее чем в 1% – в спинной мозг. Метастазы в головном мозге в основном имеют гематогенный характер и продуцируют более высокие уровни фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) по сравнению с первичной опухолью РМЖ и экстракраниальными метастазами. Отмечена взаимосвязь между гиперэкспрессией VEGF и HER2, ангиогенезом и метастазированием HER2-позитивного РМЖ в головном мозге [12]. В 5–20% случаев отмечается поражение оболочек мозга и в 1% помимо поражения головного мозга метастазы выявляются в оболочках спинного мозга [13–16]. Выживаемость пациенток с лептоменингеальными метастазами РМЖ составляет в среднем 4 месяца [17].



Манифестируют церебральные метастазы РМЖ частую в виде кистозных образований.

К современным методам диагностики метастатических поражений головного мозга наравне с магнитно-резонансной томографией (МРТ), рентгеновской компьютерной томографией (КТ), позитронно-эмиссионной томографией (ПЭТ), радиоизотопным сканированием оболочек головного мозга и стереотаксической биопсией относится цитологическое и иммуноцитохимическое исследование спинномозговой жидкости (СМЖ), полученной при тонкоигольной аспирационной биопсии, а также содержимого кистозных полостей и объемных образований головного мозга.

Метастатическое поражение головного мозга у пациенток с РМЖ – самый частый из диагнозов, устанавливаемых цитологически по материалу СМЖ.

Материал СМЖ обычно получают посредством люмбальной, субокципитальной или вентрикулярной пункции, из мест подкожного скопления ликвора в области послеоперационных рубцов или во время оперативного вмешательства из боковых желудочков мозга. Также для диагностики метастатических поражений материал можно получить с помощью пункции объемных образований головного мозга, из резервуара Оммаи и отпечатков с биопсийного материала или удаленной опухоли.

Точность цитологического заключения напрямую зависит от подробного сбора анамнеза, тем более что гистологически подтвердить диагноз удастся не всегда.

Клиницисту в направлении на цитологическое исследование ликвора необходимо указать следующее:

- место/способ взятия материала;
- возраст пациентки, клинический диагноз, симптомы;
- результаты других исследований (ПЭТ, КТ, МРТ, маммография, ультразвуковое исследование, предыдущее цитологическое и иммуноцитохимическое исследование и т.д.);
- предшествующее лечение и хирургические манипуляции.

Средняя чувствительность цитологического метода в выявлении опухолей ЦНС невысока и, по данным разных источников литературы, составляет от 41,3 до 60% [18, 19]. При лептоменингеальном распространении опухоли злокачественный процесс может быть диагностирован в 70–90% случаев [19]. Чувствительность морфологической диагностики также возрастает при повторной пункции [20]. Относительно невысокая чувствительность метода объясняется следующим:

- малые объем и клеточность ликвора;
- дегенерация клеток в жидкости;
- удаленность метастатического очага от места пункции;
- зависимость от степени распространения опухоли по мозговым оболочкам.

Доля ложнонегативных цитологических заключений может достигать 75% [21], ложнопозитивные результаты крайне редки. По данным собственных

исследований, диагностическая чувствительность цитологического метода в выявлении метастазов в головной мозг составляет 74,6%. Сложности в оценке цитопрепаратов диктуют необходимость применения дополнительных методов, таких как биохимический, иммуноцитохимический (ИЦХ), проточная цитометрия, однако в современной литературе данные об их использовании малочисленны [22–24].

ИЦХ исследование – это метод молекулярной иммунологической диагностики, применяемый для оценки наличия специфических антигенов (белков) в клетках с использованием специфических антител, которые связываются с антигенами, позволяя визуализировать их и анализировать под микроскопом. Применение ИЦХ метода значительно расширяет возможности цитологического исследования, позволяя определить не только единичные клетки опухоли в материале, но и гистогенез и органопринадлежность опухоли.

По нашим данным, применение ИЦХ увеличивает чувствительность цитологической диагностики до 81,5%. Сочетание морфологического исследования с современными методами визуализации (КТ, МРТ, МР-ангиография и т.д.) также повышает выявляемость метастатических поражений головного мозга у пациенток с карциномами молочной железы [20].

На момент цитологического исследования диагноз «рак молочной железы», как правило, бывает установлен: у большинства пациенток диссеминация опухоли проявляется неврологической симптоматикой. Обнаружение клеток метастаза РМЖ в СМЖ является неблагоприятным прогностическим признаком. Наряду с этим для таких пациенток цитологическое исследование имеет предиктивную значимость: отсутствие клеток опухоли в СМЖ можно рассматривать как признак эффективности интратекальной терапии [5].

Факторы, влияющие на чувствительность цитологического метода в исследовании СМЖ:

- локализация опухоли (степень вовлечения мозговых оболочек);
- природа опухоли (злокачественная первичная или метастатическая);
- место взятия материала;
- объем материала (минимум 3 мл);
- способ и скорость приготовления материала;
- число исследований у одной пациентки.

Цель работы – оценить возможности комплексного цитологического и иммуноцитохимического исследования ликвора в диагностике вторичных церебральных поражений при раке молочной железы.

## Материалы и методы

Проведено 169 цитологических исследований 55 пациенткам с РМЖ с метастазами в головном мозге. Возраст их варьировал от 29 до 67 лет (средний возраст составил 48 лет). Материал для исследования был получен с помощью люмбальных пункций. Объем полученного ликвора составлял от 3 до 9 мл.

Весь объем полученного материала использован для приготовления серии тонкослойных препаратов с помощью цитологической центрифуги Cytospin-3 (Thermo Scientific, США). Для морфологической оценки два цитопрепарата окрашивали по Лейшману. Для ИЦХ исследования препараты фиксировали в растворе ацетона, маркировали и помещали в иммуногистостейнер BenchMark Ultra (Ventana Medical Systems, США) для ИЦХ окрашивания. С целью уточнения цитологического диагноза 36 пациенткам были проведены 44 ИЦХ исследования (некоторым неоднократно) и 117 ИЦХ реакций. В исследовании использовались следующие кроличьи и мышинные моноклональные антитела: CK7 (Cell Marque, США, 0V-TL 12/30, разведение 1:100–1:500), CD45 (Cell Marque, США, 2B11-PD726, разведение 1:100–1:500), Estrogen receptor (ER) (Cell Marque, США, SP1, разведение 1:100–1:500), Progesterone receptor (PR) (Dako, США, PgR636, разведение 1:50), Ki67 (Spring, США, SP6, разведение 1:200), S100 (Cell Marque, США, 4C4.9, разведение 1:50–1:200), Her-EP4 (Dako, США, HerEp4, разведение 1:200–1:400), Her2/neu (Cell Marque, США, C3-11, разведение 1:100), Mammaglobin (Cell Marque, США, 31 A5, разведение 1:100–1:500), GATA3 (Cell Marque, США, L50-823, разведение 1:100–1:500), GCDFP-15 (Cell Marque, США, 23A3, разведение 1:100–1:500).

Морфологическую оценку цитопрепаратов и оценку ИЦХ реакций проводили на микроскопе Nikon Eclipse Ci-S (Nikon Corporation, Япония).

## Результаты

При цитологическом исследовании ликвора клетки опухоли уверенно диагностированы в 47,9% наблюдений (81 из 169), что трактовалось как категория истинно положительных заключений, которые были также подтверждены методами визуализации. В категории сомнительных цитологических заключений в 10,1% случаев (n=17) требовалось проведение дифференциальной диагностики между клетками опухоли и другими клетками ликвора, для чего применяли ИЦХ исследование. В категории ложноотрицательных заключений в 20,7% наблюдений (n=35) клетки опухоли выявить не удалось, хотя наличие метастатического поражения было верифицировано методами визуализации. Еще 23 исследования (13,6% случаев) составили группу истинно отрицательных заключений (пациентки с распространенным опухолевым процессом в анамнезе либо наличием неврологической симптоматики, у которых метастатическое поражение никакими методами подтверждено не было). В отдельных 7,7% случаев (n=13) клеточных элементов было недостаточно для проведения ИЦХ реакций – такой материал расценен как малоинформативный. В категорию ложноположительных заключений ни один случай не вошел. Диагностическая чувствительность цитологического метода составила 69,8%. Все категории цитологических заключений графически представлены на рисунке 1.

Применение ИЦХ исследования позволило перевести пять сомнительных заключений и четыре ложноотрицательных в категорию утвердительных (истинно положительных), что повысило чувствительность цитологической диагностики до 72,3%.

По результатам ИЦХ исследований (рис. 2) в 29 наблюдениях из 36 (80,6%) удалось подтвердить опухолевую природу клеток в ликворе: цитологически клетки опухоли были выявлены в 27 из 29 случаев (93,1%), в остальных заключение дано в предположительной форме в двух из 29 случаев (6,9%). В трех наблюдениях (8,3%) оценить ИЦХ реакции не представлялось возможным ввиду малого количества клеток в материале. В остальных четырех случаях (11,1%) при ИЦХ исследовании клетки опухоли выявлены не были, при этом в 75% случаев (n=3) цитологически высказано предположение о диссеминации опухолевого процесса, в одном наблюдении (25%) клетки метастаза РМЖ

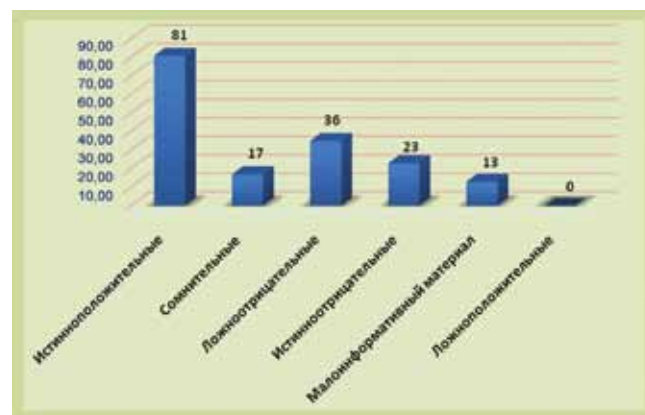


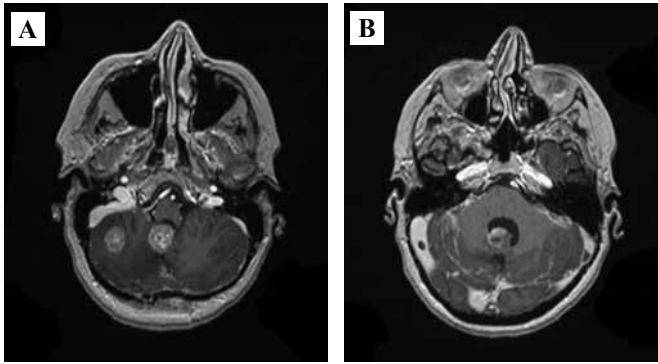
Рис. 1. Категории цитологических заключений ликвора у пациенток с поражением центральной нервной системы метастазами рака молочной железы (n=169)

Fig. 1. Categories of cytological diagnosis made by liquor analysis in patients true with central nervous system metastases of breast cancer (n=169): 81 – truly positive, 17 – doubtful, 36 – false negative, 23 – truly negative, 13 – the material was not informative, 0 – false positive



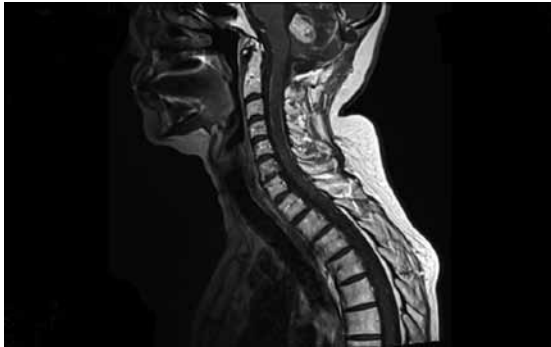
Рис. 2. Результаты иммуноцитохимических исследований ликвора у пациенток с поражением центральной нервной системы метастазами рака молочной железы (n=36)

Fig. 2. Results of liquor immunocytochemical assay in patients with central nervous system metastases of breast cancer (n=36): 81% – breast cancer cells detected; 11% – no tumor cells identified; 8% – the material was not informative



*Рис. 3.* Множественные метастазы рака молочной железы в головном мозге.  
А, В – на МРТ-изображениях с контрастным усилением визуализируется картина канцероматоза вещества и оболочек головного мозга

*Fig. 3.* Multiple metastases of breast cancer in the brain.  
А, В – MRI images with contrast enhancement demonstrating carcinomatosis of the brain and its membranes



*Рис. 4.* Множественные метастазы рака молочной железы в спинном мозге. На МРТ-изображениях с контрастным усилением визуализируется картина канцероматоза вещества и оболочек спинного мозга

*Fig. 4.* Multiple metastases of breast cancer in the spinal cord.  
MRI images with contrast enhancement show the carcinomatosis of the spinal cord and its membranes

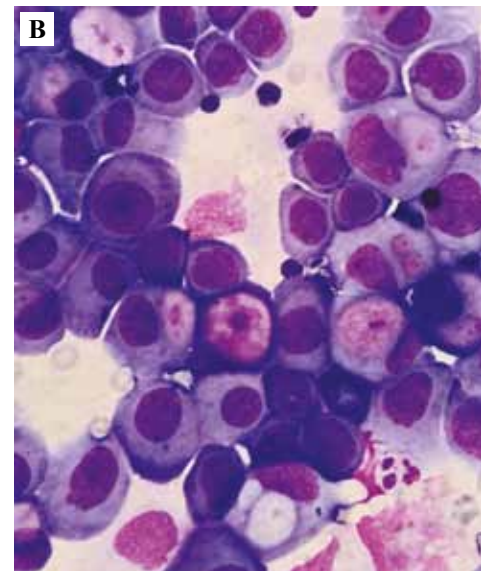
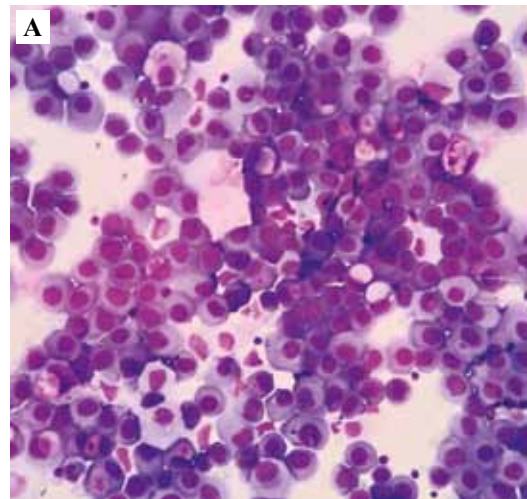
морфологически не были выявлены. У 29 пациенток (80,6%) с помощью ИЦХ также был определен гистогенез опухоли.

*Клинический пример.* Пациентка М., 58 лет. Клинический диагноз: рак левой молочной железы ТхNxM1, метастаз в головном мозге. Носительница мутации *BRCA1*. Состояние после комплексного лечения. Удаление метастаза головного мозга, курс лучевой терапии на весь объем головного мозга. Прогрессирование через 8 месяцев – множественные метастазы в головном мозге, канцероматоз оболочек центральной нервной системы, метастазы в легких, лимфоузлах, теле матки. По данным МРТ с контрастным усилением головного и спинного мозга определяется МР картина множественного метастатического поражения вещества и оболочек головного (рис. 3) и спинного мозга (рис. 4).

Гистологическое заключение по биоптату узла левой височной доли, полученного в результате стереотаксической пункции: полиморфно-эпителиоидноклеточная опухоль.

Заключение иммуногистохимического исследования: инвазивный рак NST молочной железы (метастаз).

Заключение цитологического исследования ликвора: в полученном материале найденные изменения соответствуют метастазу аденогенного рака. Для уточнения гистотипа опухоли рекомендуется ИЦХ исследование (рис. 5).



*Рис. 5.* Клетки метастаза рака молочной железы в ликворе. Цитологические препараты. Цитологическая картина представлена множеством клеток с выраженным полиморфизмом, высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением, с признаками железистой дифференцировки. Отмечаются митозы. Окраска по Лейшману. А –  $\times 400$ , В –  $\times 1000$

*Fig. 5.* Metastatic breast cancer cells in the cerebrospinal fluid. Multiple cells with a pronounced polymorphism, a high nuclear-cytoplasmic ratio, with signs of glandular differentiation and prominent mitoses. Cytological slides. Leishman stain. А –  $\times 400$ , В –  $\times 1000$

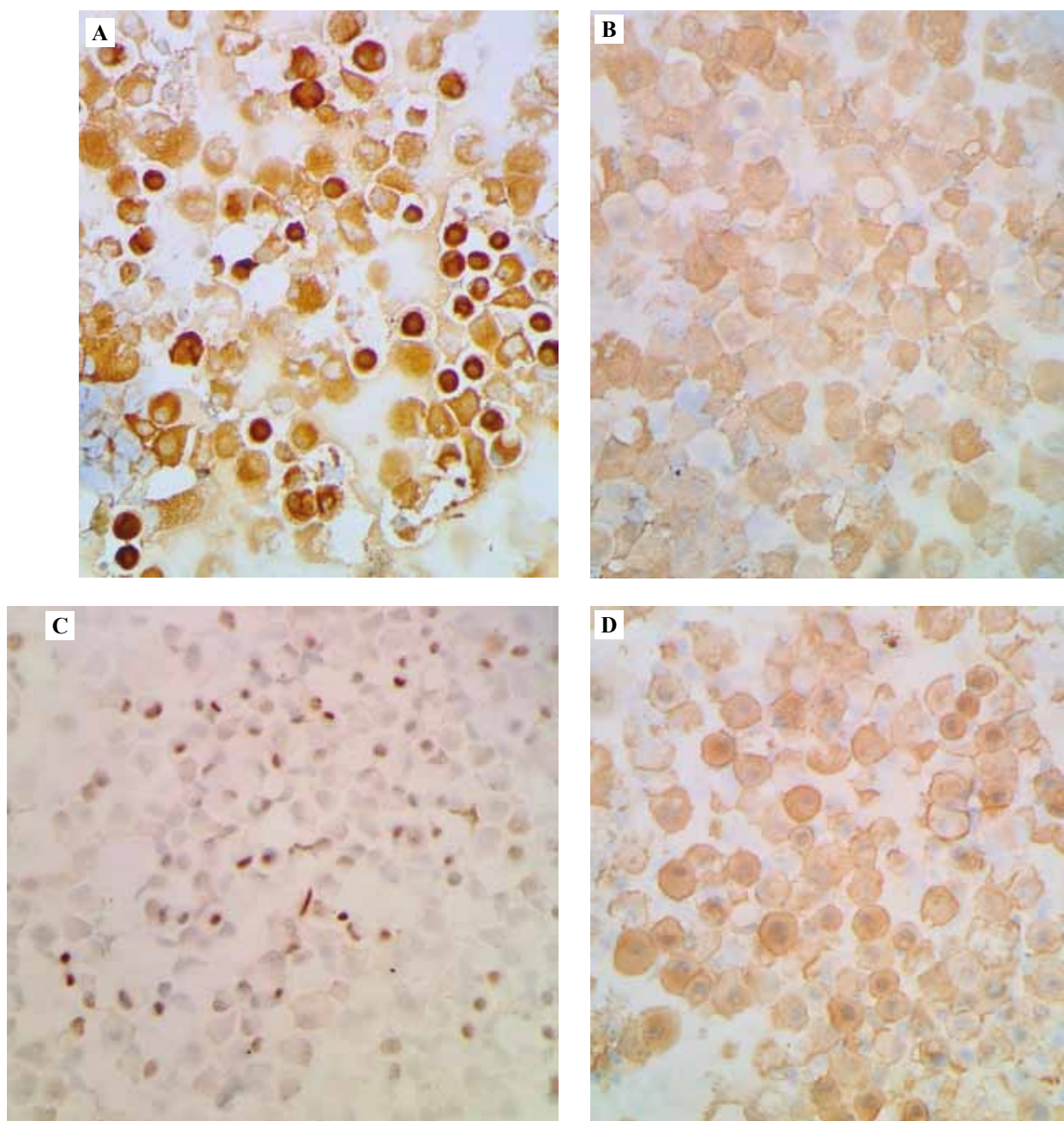


Рис. 6. Клетки метастаза рака молочной железы в ликворе. Цитологические препараты.

Иммуноцитохимическое окрашивание,  $\times 400$ .

А – выраженная экспрессия СК7 во всех опухолевых клетках, В – положительная экспрессия Маммаглобин в большей части клеток опухоли, С – положительная экспрессия Estrogen receptor в части клеток опухоли. D – выраженная экспрессия HER2/neu более чем в 10% клеток опухоли, 3+

Fig. 6. Metastatic breast cancer cells in the cerebrospinal fluid. ICH stain,  $\times 400$ .

A – prominent CK7 reaction in all tumor cells, B – positive Mammaglobin expression in most of the tumor cells, C – positive Estrogen receptor expression in some of the tumor cells, D – pronounced HER2/neu expression in more than 10% of tumor cells, 3+

Заключение ИЦХ исследования ликвора: экспрессия СК7 – выраженная во всех опухолевых клетках; экспрессия Mammaglobin – положительная в большей части клеток опухоли; экспрессия Estrogen receptor – положительная в части клеток опухоли; экспрессия HER2/neu – выраженная более чем в 10% клеток опухоли, 3+. В полученном материале цитоморфология и иммунофенотип клеток опухоли соответствуют метастазу рака молочной железы (рис. 6).

### Заключение

Цитологическое исследование ликвора зачастую является единственным методом первичной морфологической диагностики метастазов рака молочной железы в центральной нервной системе.

В нашем исследовании диагностическая чувствительность цитологического исследования составила 69,8%, а применение иммуноцитохимического исследования повысило ее до 72,3%.

Возможности цитологического метода во многом определяются локализацией метастатического очага в головном мозге и степенью его лептоменингеального распространения.

Соблюдение правил преаналитики обязательно, так как некорректное взятие материала или несвоевременное его поступление в лабораторию приводит к потере клеток в ликворе и их дегенерации.

Увеличение числа пункций и объема получаемого материала, а также обработка образцов в кратчайшие сроки позволяют максимально точно поставить цитологический диагноз и дополнительно провести иммуноцитохимическое исследование.

Применение иммуноцитохимического окрашивания значительно расширяет возможности цитологического исследования, позволяя обнаружить единичные опухолевые клетки в материале и в большинстве случаев определить гистогенез и органопринадлежность метастатического новообразования, что повышает чувствительность метода.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.Я. Фомина, Л.В. Мехеда.  
Сбор и обработка материала – Л.Я. Фомина, О.С. Собея, Т.Г. Гаспарян, Н.В. Севян.  
Написание текста – Л.Я. Фомина.  
Редактирование – Л.В. Мехеда, Н.К. Шахпазян.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.Y. Fomina, L.V. Mekheda.  
Collected the data and performed the analysis – L.Y. Fomina, O.S. Sobelya, T.G. Gasparyan, N.V. Sevyan.  
Wrote the paper – L.Y. Fomina.  
Edited the manuscript – L.V. Mekheda, N.K. Shakhpazyan.

### Литература/References

1. *Beauchesne P.* Intrathecal chemotherapy for treatment of leptomeningeal dissemination of metastatic tumours. *Lancet Oncol.* 2010;11(9):871–9. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70034-6.
2. *Gleissner B, Chamberlain MC.* Neoplastic meningitis. *Lancet Neurol.* 2006;5(5):443–52. DOI: 10.1016/S1474-4422(06)70443-4.
3. *Schouten LJ, Rutten J, Huvneers HAM, Twijnstra A.* Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer.* 2002;94(10):2698–705. DOI: 10.1002/cncr.10541.
4. *Le Rhun E, Taillibert S, Zairi F, Kotecki N, Devos P, Mailliez A et al.* A retrospective case series of 103 consecutive patients with leptomeningeal metastasis and breast cancer. *J Neurooncol.* 2013;113(1):83–92. DOI: 10.1007/s11060-013-1092-8.
5. *Clatot F, Philippin-Lauridant G, Ouvrier MJ, Nakry T, Laberge-Le-Couteux S, Guillemet C et al.* Clinical improvement and survival in breast cancer leptomeningeal metastasis correlate with the cytologic response to intrathecal chemotherapy. *J Neurooncol.* 2009;95(3):421–6. DOI: 10.1007/s11060-009-9940-2.
6. *Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP.* Sites of Distant Recurrence and Clinical Outcomes in Patients With Metastatic Triple-negative Breast Cancer. High Incidence of Central Nervous System Metastases. *Cancer.* 2008; 113:2638–45. DOI: 10.1002/cncr.23930.
7. *Lin NU, Bellon JR, Winer EP.* CNS metastases in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(17):3608–17. DOI: 10.1200/JCO.2004.01.175.
8. *Niwińska A, Murawska M, Pogoda K.* Breast cancer brain metastases: differences in survival depending on biological subtype, RPA RTOG prognostic class and systemic treatment after whole-brain radiotherapy (WBRT). *Annals of Oncology.* 2010;21(5):942–8. DOI: 10.1093/annonc/mdp407.
9. *Hicks DG, Short SM, Prescott NL, Tarr SM, Coleman KA, Yoder BJ et al.* Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(9):1097–104. DOI: 10.1097/01.pas.0000213306.05811.b9.
10. *Albiges L, André F, Balleyguier C, Gomez-Abuin G, Chompret A, Delaloge S.* Spectrum of breast cancer metastasis in BRCA1 mutation carriers: highly increased incidence of brain metastases. *Ann Oncol.* 2005;16(11):1846–7. DOI: 10.1093/annonc/mdi351.
11. *Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N et al.* Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(19):1482–5. DOI: 10.1093/jnci/djg050.
12. *Klos KS, Wyszomierski SL, Sun M, Tan M, Zhou X, Li P et al.* ErbB2 increases vascular endothelial growth factor protein synthesis via activation of mammalian target of rapamycin/p70S6K leading to increased angiogenesis and spontaneous metastasis of human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006;66(4):2028–37. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4559.
13. *Altundag K, Bondy ML, Mirza NQ, Kau SW, Broglio K, Hortobagyi GN et al.* Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 420 metastatic breast cancer patients with central nervous system metastasis. *Cancer.* 2007;110(12):2640–7. DOI: 10.1002/cncr.23088.

14. Grossman SA, Krabak MJ. Leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Treat Rev.* 1999;25(2):103–19. DOI: 10.1053/ctrv.1999.0119.
15. Kim HJ, Im SA, Keam B, Kim YJ, Han SW, Kim TM et al. Clinical outcome of central nervous system metastasis from breast cancer: differences in survival depending on systemic treatment. *J Neurooncol.* 2012;106(2):303–13. DOI: 10.1007/s11060-011-0664-8.
16. Scott BJ, Kesari S. Leptomeningeal metastases in breast cancer. *Am J Cancer Res.* 2013;3(2):117–26.
17. Scott BJ, Oberheim-Bush NA, Kesari S. Leptomeningeal metastasis in breast cancer – a systematic review. *Oncotarget.* 2016;7(4):3740–7. DOI: 10.18632/oncotarget.5911.
18. Bae YS, Cheong J-W, Chang WS, Kim S, Oh EJ, Kim SH. Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid (CSF) cytology in metastatic tumors: an analysis of consecutive CSF samples. *Korean J Pathol.* 2013;47(6):563–8. DOI: 10.4132/KoreanJPathol.2013.47.6.563.
19. Mack F, Baumert BG, Schäfer N, Hattingen E, Scheffler B, Herrlinger U et al. Therapy of leptomeningeal metastasis in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2016;43:83–91. DOI: 10.1016/j.ctrv.2015.12.004.
20. Prömmel P, Pilgram-Pastor S, Sitter H, Buhk JH, Strik H. Neoplastic meningitis: How MRI and CSF cytology are influenced by CSF cell count and tumor type. *Scientific World Journal.* 2013;248072. DOI: 10.1155/2013/248072.
21. Glass JP, Melamed M, Chernik NL, Posner JB. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology.* 1979;29(10):1369–75. DOI: 10.1212/wnl.29.10.1369.
22. Perez-Jaffe LA, Salhany KE, Green RJ, Griffin T, Stadtmauer EA, Gupta PK. Cerebral spinal fluid involvement by Hodgkin's disease diagnosed by CSF cytology and immunocytochemistry. *Diagn Cytopathol.* 1999;20(4):219–23. DOI: 10.1002/(sici)1097-0339(199904)20:4<219::aid-dc7>3.0.co;2-d.
23. Subirá D, Simó M, Illán J, Serrano C, Castañón S, Gonzalo R et al. Diagnostic and prognostic significance of flow cytometry immunophenotyping in patients with leptomeningeal carcinomatosis. *Clin Exp Metastasis.* 2015;32(4):383–91. DOI: 10.1007/s10585-015-9716-3.
24. Thomas JE, Falls E, Velasco ME, Zaher A. Diagnostic value of immunocytochemistry in leptomeningeal tumor dissemination. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(5):759–61. DOI: 10.1043/0003-9985(2000)124<0759:DVOIIL>2.0.CO;2.

### Информация об авторах

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

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

Ольга Сергеевна Собея – научный сотрудник Биобанка отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Николай Константинович Шахпазян – кандидат медицинских наук, заведующий Биобанком отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Тигран Грачикович Гаспарян – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения нейрохирургии Научного центра неврологии, врач-нейрохирург нейрохирургического (нейроонкологического) отделения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Надежда Вагаршаковна Севян – кандидат медицинских наук, врач-нейрохирург и врач-онколог нейрохирургического (нейроонкологического) отделения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, доцент кафедры онкологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

### Author information

Liliya Y. Fomina – Junior Researcher, Cytological Laboratory, Department of Morphological and Molecular Genetic Diagnosis of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.  
<https://orcid.org/0000-0002-9306-5465>.

Larisa V. Mekheda – Cand. Sci. (Med.), Head of the Cytological Laboratory, Department of Morphological and Molecular Genetic Diagnosis of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.  
<https://orcid.org/0000-0002-6445-9983>.

Olga S. Sobelya – Researcher of the Biobank, Department of Morphological and Molecular Genetic Diagnosis of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.  
<https://orcid.org/0000-0003-3585-4332>.

Nikolay K. Shakhpazyan – Cand. Sci. (Med.), Head of the Biobank, Department of Morphological and Molecular Genetic Diagnosis of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.  
<https://orcid.org/0000-0003-3386-7746>.

Tigran G. Gasparyan – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of Neurosurgery, the Scientific Center of Neurology; Neurosurgeon, Department of Neurosurgery (Neuro-Oncology), N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.  
<https://orcid.org/0000-0003-0194-7645>.

Nadezhda V. Sevyan – Cand. Sci. (Med.), Neurosurgeon and Oncologist, Department of Neurosurgery (Neuro-Oncology), N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Associate Professor, Department of Oncology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).  
<https://orcid.org/0000-0001-5841-7480>.

## Опыт создания специализированного биобанка глиом головного мозга человека

Д.А. Гольбин<sup>1</sup>, А.Л. Корочкина<sup>1</sup>, С.В. Шугай<sup>1</sup>, Т.В. Цуканова<sup>1</sup>, М.А. Шифрин<sup>1</sup>, А.В. Ревещин<sup>2</sup>,  
А.В. Косырькова<sup>1</sup>, Г.В. Данилов<sup>1</sup>, Е.Ю. Рыбалкина<sup>3</sup>, Г.В. Павлова<sup>1,2</sup>, Г.Л. Кобяков<sup>1</sup>, А.А. Потапов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

**Введение.** В настоящее время во всем мире отмечается рост частоты опухолей головного мозга, и глиома не является исключением. Несмотря на большое количество исследований в области терапии данного заболевания, опухоли глиального ряда по-прежнему остаются одними из самых часто диагностируемых первичных новообразований центральной нервной системы, и результат лечения не всегда успешен. Для решения данной проблемы необходимо создать единое криохранилище с систематизированной базой данных, которые позволят углубиться в изучение вопроса патогенеза и инвазии глиом. В настоящее время в России функционирует около 20 хранилищ биоматериалов, но, к сожалению, отсутствуют репозитории опухолей глиального ряда. Цель исследования – разработка биобанка глиальных опухолей с наличием единой электронной системы для хранения ассоциированной клинической информации, которая в дальнейшем будет использоваться для исследований.

**Материалы и методы.** В ходе оперативного вмешательства у пациентов с предполагаемым диагнозом «злокачественная глиома головного мозга» проводили забор необходимого объема биологического материала, после чего осуществляли его обработку, криоконсервацию и паспортизацию.

**Результаты.** В период с 1 августа 2018 года по 30 апреля 2020 года накоплено 1452 аликвоты от 358 исследуемых. Каждому образцу из опухоли в криохранилище соответствует парафиновый блок, а также комплекс демографических, клинических, гистологических и катamnестических данных. Вся информация об образцах систематизирована и хранится в электронной информационной системе. В ходе работы был сформулирован формат паспорта глиомы.

**Заключение.** Создание соответствующей организационной структуры может быть использовано для повышения эффективности в ходе дальнейших экспериментальных работ с возможной перспективой применения и внедрения персонализированных методов лечения в будущем после проведения полного цикла клинических исследований.

**Ключевые слова:** нейроонкология, глиома, глиобластома, биобанк, криохранилище

**Для корреспонденции:** Денис Александрович Гольбин. E-mail: denis.golbin@gmail.com

**Для цитирования:** Гольбин Д.А., Корочкина А.Л., Шугай С.В., Цуканова Т.В., Шифрин М.А., Ревещин А.В., Косырькова А.В., Данилов Г.В., Рыбалкина Е.Ю., Павлова Г.В., Кобяков Г.Л., Потапов А.А. Опыт создания специализированного биобанка глиом головного мозга человека. Клини. эксп. морфология. 2020;9(4):39–49. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.39-49.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-01064 мк «Создание биобанка глиом мозга человека с формированием цифрового архива интегрированных клинических, гистологических и молекулярно-генетических данных».

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

Статья поступила 29.06.2020. Получена после рецензирования 26.08.2020. Принята в печать 26.10.2020.

## Specialized biorepository for human brain glioma: project development and operational experience

D.A. Golbin<sup>1</sup>, A.L. Korochkina<sup>1</sup>, S.V. Shugay<sup>1</sup>, T.V. Tsukanova<sup>1</sup>, M.A. Shifrin<sup>1</sup>, A.V. Revishchin<sup>2</sup>,  
A.V. Kosyrkova<sup>1</sup>, G.V. Danilov<sup>1</sup>, E.Y. Rybalkina<sup>3</sup>, G.V. Pavlova<sup>1,2</sup>, G.L. Kobiakov<sup>1</sup>, A.A. Potapov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

**Introduction.** Today we observe an increase in brain tumor incidence around the world, and glioma is no exception. Gliomas are still among the most frequently diagnosed primary central nervous system tumors

despite a large number of glioma management studies. Their control still remains a challenge. It is necessary to create specialized cryogenic storage with a systematized databank that could provide a basis for more profound studies of their pathogenesis and invasion patterns. There are about 20 biorepository facilities in Russia; however, they do not focus on a particular tumor type. The aim of the study was to develop the specific biobank of glial tumors integrated with a dedicated electronic system containing all associated clinical data necessary for the research purposes.

**Materials and methods.** The required amount of material sampling was carried out during the surgical resection in patients with a preliminary diagnosis of “malignant glioma”, followed by processing, cryopreservation, and passportization.

**Results.** Between August 1, 2018, and April 30, 2020, a total of 1,452 aliquots from 358 subjects were accumulated in the biobank. Each frozen sample corresponded to a paraffin block and provided with the whole set of associated demographic, clinical, histological, and follow-up data. All these records were stored in the electronic information system. During this study, the design of the glioma passport was developed.

**Conclusion.** The development of an appropriate facility is necessary for efficient further experimental research. It offers an opportunity for future implementation of personalized treatment methods after a full clinical trial cycle.

**Keywords:** neurooncology, glioma, glioblastoma, biobank, biorepository

**Corresponding author:** Denis A. Golbin. E-mail: denis.golbin@gmail.com

**For citation:** Golbin D.A., Korochkina A.L., Shugay S.V., Tsukanova T.V., Shifrin M.A., Revishchin A.V., Kosyrkova A.V., Danilov G.V., Rybalkina E.Y., Pavlova G.V., Kobiakov G.L., Potapov A.A. Specialized biorepository for human brain glioma: project development and operational experience. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(4):39–49. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.39-49 (In Russ.).

**Funding.** The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No.18-29-01064 mk “Development of human brain glioma biorepository with digital archive of associated clinical, histological, molecular, and genetic data”.

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

**Received** 29.06.2020. **Received in revised form** 26.08.2020. **Accepted** 26.10.2020.

## Введение

Интерес к созданию биобанков, которые занимают сбором тех или иных тканей человека, возрос за последние десятилетия [1]. Биобанкирование тканей животных существует уже более полувека. В США первый банк человеческих образцов для трансплантации был создан еще в 1949 году [2]. Следующим шагом в развитии биобанков стал сбор материала не для трансплантации, а для изучения различных заболеваний.

Развитие современных технологий, молекулярно-биологических методов, секвенирования потребовало концентрации тканевого материала для достижения достаточных выборок, которые позволили бы делать более достоверные выводы. Таким образом, начали появляться специализированные биобанки, в которых аккумулировался биологический материал, взятый от пациентов с определенными заболеваниями. В рамках создания подобных биобанков особое место занимают биобанки онкологических заболеваний.

Цель подобных биобанков – сделать опухолевую ткань и другие биологические материалы человека доступными для большого числа исследований онкогенеза [3]. Сегодня появление персонализированной медицины и разработка индивидуальных протоколов лечения превратили знания об отдельных механизмах формирования и роста опухоли в важнейшую задачу поиска стратегий лечения. Исходно исследование бо-

лезней человека в значительной степени осуществлялось на животных, так как считалось, что образцы тканей животных более доступны. Однако в дальнейшем было показано, что результаты исследований, проведенных на животных, не дают возможности в полной мере проецировать их на болезни человека [4]. В последнее время акцент делается на сборе именно материала тканей человека в качестве источника информации для исследований экспрессии генов, протеомики и изучения сигнальных путей. При этом современные технологии требуют большого количества образцов, чего можно достичь только при развитии биобанков [5].

За последние 20 лет потребность в использовании биобанков выросла в несколько раз и, как ожидается, в дальнейшем будет продолжать расти [6]. При этом проблема с созданием биобанков существует не только в России, но и во всем мире. Следует отметить, что во многих случаях сбор образцов и их полноценная паспортизация до сих пор носят фрагментарный характер, часто нет связи данных об анамнезе и проводимом лечении и катamnестического наблюдения пациента даже в пределах одного учреждения. Отсутствие стандартизации сбора образцов приводит к вариативности собранного материала, что снижает его ценность и возможность делать значимые выводы. Таким образом, в требованиях к биобанкам укореняются как можно более точная характеристика материала, описание его обработки и хранения, что, несомненно,



влияет на качество и надежность любых исследований с использованием таких образцов [7]. Можно сказать, что биобанк глиом головного мозга человека решает проблемы, направленные на обеспечение адекватного предоставления исследователям высококачественного тканевого материала глиальных опухолей. В последние годы стало понятно, что всем этим требованиям может удовлетворять только биобанк, созданный при клиниках, больницах и других медицинских учреждениях, являющихся профильными по нейрохирургии, прежде всего по нейроонкологии. При этом необходимо обеспечить стандартизованность процессов, связанных с биобанкированием тканей.

## Материалы и методы

### *Отбор пациентов*

#### *и обеспечение конфиденциальности данных*

Процедуры сбора личных данных, биологического материала, а также их хранения проводятся в соответствии с законодательством Российской Федерации и происходят после подписания пациентами информированного добровольного согласия. Каждый пациент, который подходит для исследования по определенному перечню критериев, дает письменное согласие на предоставление для анализа удаленной опухолевой ткани, образцов крови, данных клинических и диагностических исследований. Вся соответствующая информация о каждом пациенте хранится в единой электронной базе данных, которая доступна исключительно сотрудникам, участвующим в исследовании. Для сохранения конфиденциальности и анонимизации данных каждого клинического случая ему присваивается индивидуальный порядковый идентификатор (например, BU205), который отличается от номера, используемого в медицинской карте лечебного учреждения.

Нами разработаны следующие критерии включения пациентов в исследование.

1. Возраст пациента не менее 16 лет.
2. Наличие магнитно-резонансных изображений головного мозга в стандартных импульсных последовательностях до и после контрастного усиления.
3. Предполагаемый дооперационный диагноз «злокачественная глиома головного мозга» на основании клинических, анамнестических и нейровизуализационных данных.
4. Локализация опухоли вне критических образований головного мозга (ствол, дисцефальные структуры).
5. Отсутствие гемотрансмиссивных инфекций (сифилис, ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты В и С) по данным рутинного дооперационного скрининга.
6. Планируемое хирургическое удаление опухоли.
7. Объем опухоли, достаточный для получения солидной опухолевой ткани в объеме, необходимом как для постановки гистологического диагноза, так и для консервации образцов в биобанке.

### *Организационная структура*

В ходе обсуждения методов реализации проекта было решено создать в рамках НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко Минздрава России (НМИЦН) лабораторию нейрохирургической анатомии и консервации биологических материалов. Для длительного хранения используются сосуды Дьюара с жидким азотом. Полученные образцы по клиническим случаям необходимо подготовить для исследований и замораживания. Данные манипуляции выполняют два квалифицированных лаборанта-исследователя. В ходе криоконсервации происходит двойная регистрация медицинской документации – в письменном виде в журнале и в электронной базе данных. Для своевременного оповещения о появлении подходящих клинических случаев, извлечения образцов и пополнения базы данных изображений по пациентам в штате биобанка числятся четыре нейрохирурга. В число участников исследования также входит врач-патологоанатом.

### *Коллекция образцов и банк данных*

Биобанк является обширной базой, которая содержит в себе не только материал, полученный в ходе оперативного вмешательства и удаления пораженной области мозга, но и комплекс данных, позволяющих более широко подойти к вопросу исследования заболевания. Формирование коллекции образцов опухолевой ткани, полученных от пациентов с глиомами головного мозга, связано с использованием двух видов консервации биологического материала – быстрого замораживания в жидком азоте и изготовления парафиновых блоков.

Данные о клинических случаях содержатся в систематизированном виде в электронной информационно-аналитической системе, созданной на базе разработанной в НМИЦН платформы e-Med. Индивидуальный внутренний идентификатор BUXXX позволяет получить всю необходимую информацию.

После согласования возможности забора материала с оперирующим нейрохирургом в начале операции проводится забор крови, которая затем подвергается аликвотированию и центрифугированию. Цельную кровь консервируют в криопробирках в объеме  $2 \times 4$  мл в холодильнике при температуре  $-80^\circ\text{C}$ , а также центрифугируют при комнатной температуре при 1500 г в течение 10 минут для создания трех или четырех аликвот плазмы объемом 1 мл и при 1200 г в течение 10 минут для создания четырех аликвот сыворотки объемом 1 мл, которые консервируют в криопробирках в холодильнике при температуре  $-80^\circ\text{C}$ . Опухолевую ткань транспортируют из операционной в лабораторию в пробирке со средой DMEM с добавлением стрептомицина, пенициллина и гентамицина, а затем в стерильных условиях очищают от примесей и разделяют на три аликвоты (или больше, если позволяет объем материала), каждую из которых делят на два фрагмента –  $2/3$  для криоконсервации и  $1/3$  для изготовления парафинового блока (рис. 1). Этот процесс занимает

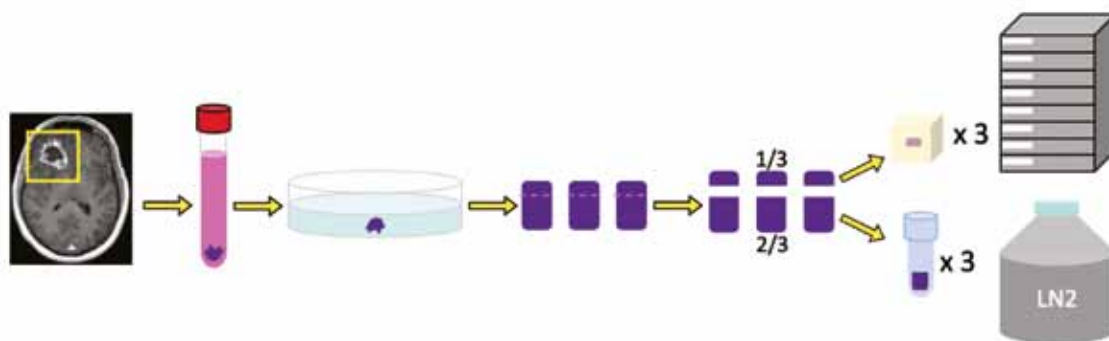


Рис. 1. Схема пути образца опухоли  
Fig. 1. Solid tissue specimen procurement scheme

не более 20 минут. Таким образом, опухолевый образец каждой аликвоты анализируется гистологически и иммуногистохимически в отделении патологической анатомии для подтверждения диагноза и оценки качества ткани. Образцы опухоли помещают в предварительно промаркированные криогенные пробирки и консервируют в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ . Информацию об образцах регистрируют в журнале и электронной базе данных. Фрагменты опухолей для изготовления парафиновых блоков помещают в 10% забуференный формалин и до истечения 6 часов транспортируют в отделение патологической анатомии, где проводятся изготовление парафиновых блоков по стандартной технологии и иммуногистохимическое окрашивание срезов для исследования маркерных факторов. Врач-патологоанатом оценивает качество опухолевого материала, вносит гистологическое заключение и результаты оценки в электронную базу данных и сопоставляет морфологическую картину консервированного опухолевого материала с гистологическими препаратами, полученными из диагностического биопсийного материала конкретного пациента.

## Результаты

### Коллекция образцов и диагностических данных

Сейчас в криохранилище насчитывается 728 случаев и 2736 аликвот (табл. 1). Был выполнен гистологический контроль по 681 образцу, в ходе которого полное соответствие критериям качества выявлено в 418 образцах (61,38%), а частичное в 66 (9,70%). 197 проанализированных образцов (28,92%) не соответствуют критериям положительной оценки качества опухолевого материала в связи с высоким содержанием некротического компонента или малым количеством опухолевых клеточных элементов (материал из перитуморозной зоны).

### Модернизация системы хранения данных

В рамках разработанной в НМИЦН технологии e-Med была создана компонента для управления биобанком (biobank-psi), интегрированная с электронной медицинской картой. Такая интеграция позволяет про-

водить совместный анализ морфологических и молекулярно-генетических данных в связи с клинической картиной заболевания и результатами нейровизуализационных исследований. Кроме того, интеграция с электронной медицинской картой дает возможность исследовать свойства биообразцов в динамике при повторных поступлениях пациента в клинику, и именно эта особенность является основной причиной развития собственной разработки системы информационной поддержки биобанка и отказа от приобретения системы стороннего производителя.

В биобанке была введена международная система преаналитического кодирования биообразцов SPREC 2.0 [8]. Эта система позволяет зафиксировать важнейшие особенности материала, способа его консервации и хранения. Кодирование по системе SPREC необходимо для сопоставимости результатов исследований, проведенных в разных центрах. Система кодирования развивается и поддерживается Международным обществом биологических и экологических репозиториях (International Society for biological and Environmental Repositories, ISBER, <http://www.isber.org>).

Код SPREC 2 семипозиционный и описывает тип образца ткани, время теплой и холодной ишемии и основные сведения о способах его получения, консервации и долгосрочного хранения. Аналогичная спецификация для жидких образцов содержит также сведения о центрифугировании.

В 2019 году система SPREC 2.0 модернизирована до SPREC 3.0, которая благодаря последним техническим разработкам и полученным знаниям о критических диапазонах доаналитического времени включает в себя расширенное количество вариантов времени ишемии тканей [9].

### Гистологическое исследование материала

Установление гистологического диагноза опухоли проводится в соответствии с классификацией опухолей центральной нервной системы Всемирной организации здравоохранения 2016 года (светооптическая микроскопия парафиновых срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, иммуногистохимическое исследование, определение статуса генов *IDH-1* и *IDH-2* методом пря-

Таблица 1 | Table 1

Собранные замороженные образцы за весь срок существования биобанка (с марта 2016 года) и за период выполнения работ по гранту (с 1 августа 2018 года) на 30 апреля 2020 года | Collection of tumor tissue specimens during the complete lifetime of the biobank (since March, 2016) and during the research grant period (since August 1, 2018) by April 30, 2020

| Название опухоли (в алфавитном порядке)  <br>Tumor type  | За весь срок   Total |                      | За период гранта   During the grant |                      |
|--|----------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|
|  | п случаев   cases    | п алиquot   aliquots | п случаев   cases                   | п алиquot   aliquots |
| Анапластическая астроцитома   Anaplastic astrocytoma   | 82                   | 325                  | 46                                  | 216                  |
| Анапластическая олигодендроглиома  <br>Anaplastic oligodendroglioma  | 62                   | 215                  | 32                                  | 126                  |
| Анапластическая олигоастроцитома   Anaplastic oligoastrocytoma   | 1                    | 3                    | –                                   | –                    |
| Анапластическая плеоморфная ксантоастроцитома  <br>Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma                      | 7                    | 29                   | 4                                   | 20                   |
| Анапластическая эпендимомы   Anaplastic ependymoma   | 2                    | 8                    | –                                   | –                    |
| Астробластома   Astroblastoma  | 1                    | 3                    | 1                                   | 3                    |
| Ганглиоглиома   Ganglioglioma  | 2                    | 5                    | 1                                   | 3                    |
| Гемистоцитарная астроцитома   Hemistocytic astrocytoma   | 2                    | 12                   | 2                                   | 12                   |
| Глиобластома   Glioblastoma  | 465                  | 1784                 | 216                                 | 851                  |
| Глиосаркома   Gliosarcoma  | 4                    | 21                   | 5                                   | 12                   |
| Диффузная астроцитома   Diffuse astrocytoma  | 61                   | 203                  | 31                                  | 151                  |
| Олигоастроцитома   Oligoastrocytoma  | 1                    | 3                    | –                                   | –                    |
| Олигодендроглиома   Oligodendroglioma  | 27                   | 95                   | 13                                  | 40                   |
| Пилоидная астроцитома   Pilocytic astrocytoma  | 4                    | 13                   | 5                                   | 12                   |
| Пилоидная астроцитома со злокачественной трансформацией  <br>Pilocytic astrocytoma with malignant transformation | 2                    | 5                    | –                                   | –                    |
| Плеоморфная ксантоастроцитома   Pleomorphic xanthoastrocytoma  | 2                    | 3                    | –                                   | –                    |
| Субэпендимомы   Subependymoma  | 2                    | 6                    | –                                   | –                    |
| Эпителиоидная глиобластома   Epithelioid glioblastoma  | 1                    | 6                    | 1                                   | 6                    |
| Всего  | 728                  | 2739                 | 357                                 | 1452                 |

мого секвенирования по Сэнгеру, определение статуса метилирования промоторной области гена *MGMT* методом метилспецифической ПЦР в режиме реального времени, определение коделеции 1p/19q методом FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*). Критериями положительной оценки качества опухолевого материала являются совокупный процент опухолевой ткани в образце  $\geq 50$ , процент опухолевых ядер в образце  $\geq 50$ , процент некроза в образце  $< 50$ , отсутствие артефактных изменений.

#### Создание паспорта глиомы

С учетом имеющихся диагностических методов возможна паспортизация образцов, включающая комплекс сведений: демографические данные (пол, возраст, регион), характеристика заболевания (первичное или повторное хирургическое вмешательство, локализация опухоли – рисунок 2, дата хирургического вмешательства, код SPREC 3.0), морфологические данные (гистологический диагноз по классификации опухолей ЦНС ВОЗ 2016 года – рисунок 3, доля опухолевой ткани

в гистологическом срезе (в процентах), доля опухолевых клеток (в процентах), доля некроза (в процентах), *IDH-1/2*-профиль, *MGMT*-профиль, *BRAF*-мутации, наличие коделеции 1p/19q для олигодендроглиальных опухолей), молекулярно-генетические характеристики (маркеры стволовости: *NESTIN*, *OCT4*, *CD133*; онко-маркеры: *EGFR*, *PDGFR*; маркеры нейральной дифференцировки: *GFAP* – рисунок 4), катамнестические данные (проведенное адьювантное лечение, факт рецидива, связь материала с образцом от данного донора, ранее зарегистрированным в биобанке при предыдущем хирургическом вмешательстве).

В результате выполненных работ по организации процессинга биоматериалов и сбора ассоциированных данных нами был сформулирован паспорт глиомы (табл. 2).

#### Анализ биомаркеров

Анализ биомаркеров глиальных опухолей выполняется методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) на экспрессию

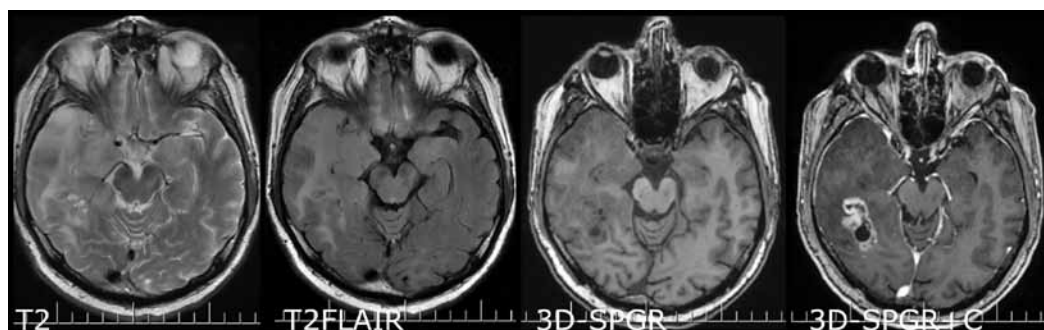


Рис. 2. Дооперационная МРТ. Выявляется опухоль задних отделов правой височной доли с интенсивным накоплением контрастного вещества, гипоинтенсивным некротическим центром и перитуморозным отеком (глиобластома)

Fig. 2. Preoperative MR image of a patient demonstrating an intracerebral tumor (glioblastoma) of the right posterior temporal lobe with prominent contrast enhancement, hyperintensive necrotic center, and peritumoral edema

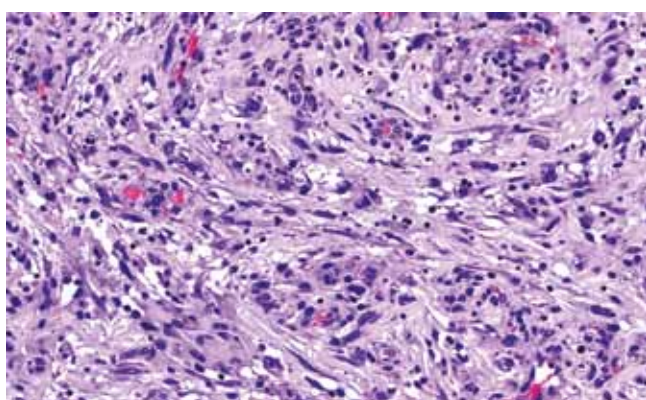


Рис. 3. Гистологический срез ткани удаленной глиобластомы. Обращают внимание выраженный клеточный и ядерный полиморфизм, плотное расположение клеточных элементов. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 200$

Fig. 3 Histological section of resected glioblastoma. Prominent cellular and nuclear polymorphism is present, cells are arranged densely and compactly. H&E stain,  $\times 200$

Таблица 2 | Table 2

Пример паспорта глиомы |  
Example of glioma passport

| Внутренний идентификатор   Internal identification number     | BU562  |
|---|--|
| Пол   Gender  | Мужской   Male                                       |
| Возраст   Age   | 62 года   62 years                                   |
| Регион   Region   | Город Москва   Moscow city                           |
| Характер хирургического вмешательства   Type of surgery       | Первичное   Primary                                  |
| Локализация опухоли   Localization of the tumor               | Правая височная доля   Right temporal lobe           |
| Дата хирургического вмешательства   Date of surgery           | 26.02.2019   02/26/2019                              |
| Код SPREC 3.0   SPREC 3.0 code                                | TIS-SCM-X-C-SNP-A-X                                  |
| Гистологический диагноз   Histological diagnosis              | Глиобластома IGH-мутантная   Glioblastoma IGH-mutant |
| % опухолевой ткани в срезе   % of tumor tissue in the section | 60   |
| % опухолевых клеток   % of tumor cells                        | 80   |
| % некроза   % of necrosis                                     | 0  |
| IDH-1 профиль   IDH-1 profile                                 | Положительный   Positive                             |
| MGMT профиль   MGMT profile                                   | Отрицательный   Negative                             |
| BRAF профиль   BRAF profile                                   | Отрицательный   Negative                             |
| Маркеры   Markers   | BAX, CD133, MELK, TP53, VASH2*                       |

\* BAX – индуктор апоптоза, CD133 – онкомаркер, MELK – маркер стволовости, TP53 – супрессор опухолевой трансформации, VASH2 – ингибитор ангиогенеза.

\* BAX – apoptosis inductor, CD133 – oncomarker, MELK – marker of stem cells, TP53 – supressor of tumor tranformation, VASH2 – inhibitor of angiogenesis.

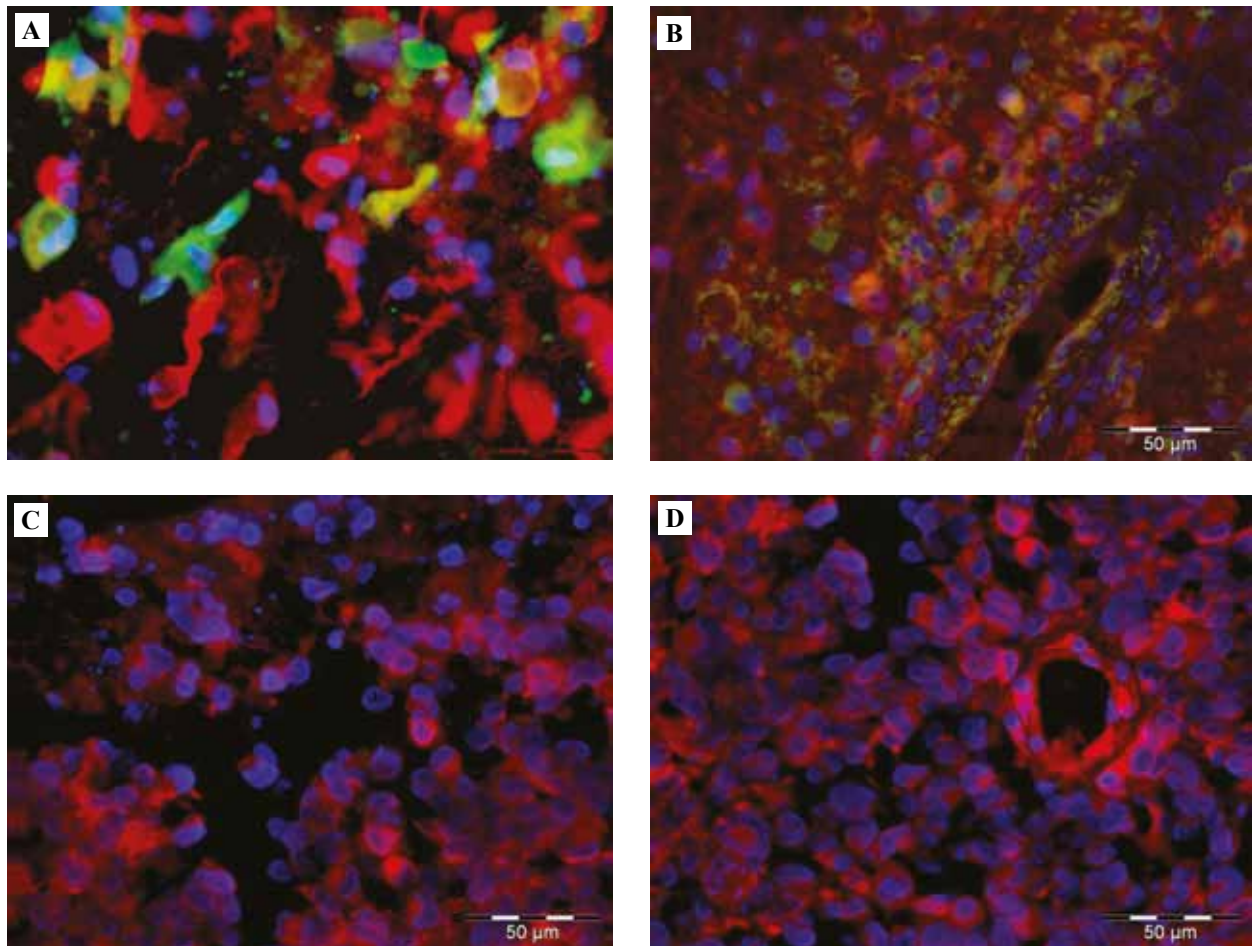


Рис. 4. Примеры иммуногистохимических исследований маркеров в тканях глиобластомы разных пациентов с помощью флуоресцентных меток.

А – *GFAP* – красная флуоресценция, *S100* – зеленая, бисбензими́д – окраска ядер (голубая флуоресценция), В – *Sox2* – зеленая флуоресценция, *Nestin* – красная, бисбензими́д – окраска ядер (голубая флуоресценция),

С, D – *Nestin* – красная флуоресценция, бисбензими́д – окраска ядер (голубая флуоресценция)

Fig. 4. Glioblastoma immunohistochemical assays of the tissue specimens obtained from different patients. Fluorescent labels were used.

А – *GFAP* – red fluorescence, *S100* – green, bisbenzimid – nuclear staining (blue fluorescence), В – *Sox2* – green fluorescence, *Nestin* – red, bisbenzimid – nuclear staining (blue fluorescence); С, D – *Nestin* – red fluorescence, bisbenzimid – nuclear staining (blue fluorescence)

онкомаркеров (*CDK4*, *CDK6*, *FGFR*), маркеров стволовых клеток (*NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *MELK*, *CD133*, *NESTIN*, *NOTCH2*), маркеров нейральной дифференцировки (*GDNF*, *Olig2*, *GFAP*, *MAP2*,  $\beta$ -*III-TUBULIN*). Дополнительно предполагается оценка пролиферативной активности опухолевых клеток путем определения индекса мечения Ki67, а также экспрессии *p53* методом иммуногистохимии. Результаты гистологического, иммуногистологического и молекулярно-генетического исследования опухолевых образцов фиксируются в информационной системе биобанка. Панель генов для исследования клеток глиобластомы также включает следующие гены: *BAX*, *BCL2*, *C3*, *CD133*, *CX1CR1*, *EGFR*, *GDNF*, *GFAP*, *HIF1A*, *MDM2*, *MELK*, *MKI67*, *Olig2*, *PCNA*, *PDGFRa*, *Sox2*, *TEK*, *TIE1*, *TNKR5F1A*, *TP53*, *VASH2*, *VEGFR-2*, *WNT5A* [10]. На

рисунке 5 продемонстрирован пример результатов исследования образцов культуры глиобластомы.

### Обсуждение

Биологический банк является неотъемлемой частью исследования опухолей глиального ряда, так как при обеспечении достаточного числа образцов появляется возможность более подробного изучения распространенности, распределения, а также структуры данного заболевания. Тем не менее в настоящее время есть ряд трудностей, которые препятствуют усовершенствованию подхода к исследованию. Во-первых, многие данные о коллекциях опухолей мозга являются закрытыми и не опубликованы в научных изданиях, что мешает в полной мере ознакомиться с полученными результатами других медицинских учреждений. Во-вторых,

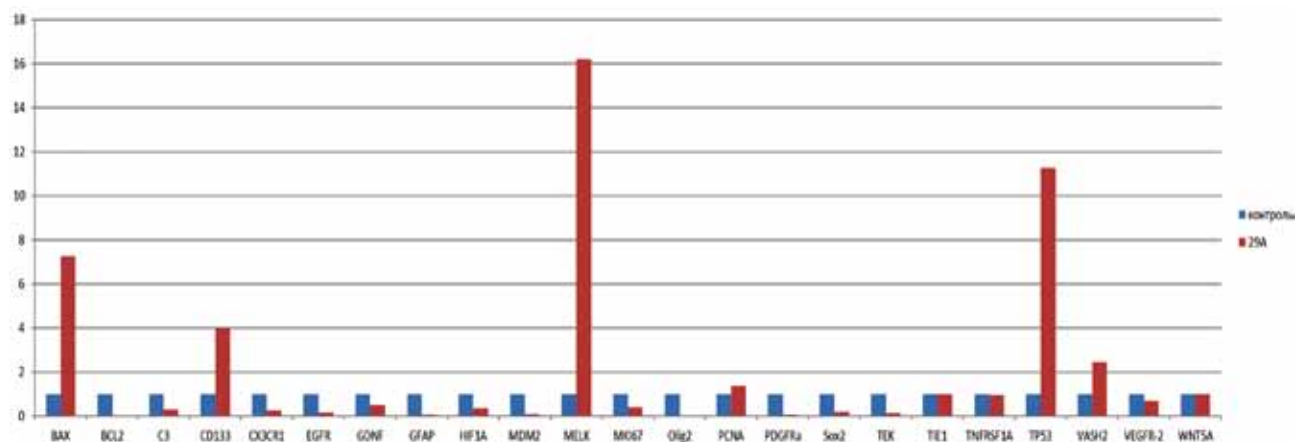


Рис. 5. Пример оценки экспрессии ряда генов выбранной панели, характерной для опухолевых процессов и в особенности для опухолей мозга. Определяется увеличение экспрессии генов *BAX*, *CD133*, *MELK*, *TP53*, *VASH2*

Fig. 5. Example of RT-PCR study of different genes' expression from the selected panel, typical for neoplasms, especially, for brain tumors. Upregulation of genes *BAX*, *CD133*, *MELK*, *TP53*, *VASH2* is demonstrated

большинство нейроонкологических биобанков одно-центровые. Соответственно, результаты исследования, основанные на выборках, предоставленных одним изолированным биобанком, будут искажены критериями отбора пациентов в каждом учреждении.

Преимущества биобанка, созданного в НМИЦН, – процедура деления каждой аликвоты на два фрагмента (для мгновенного замораживания в жидком азоте и для изготовления парафинового блока), проведение максимально точного гистологического контроля качества хранимого опухолевого материала и параллельное создание коллекции парафиновых блоков. Основным источником биоматериала является лечебное учреждение, с которым было согласовано сотрудничество для регулярного предоставления образцов, что облегчает процесс сбора экзemplаров и контроля их качества.

Основная цель проведения гистологических исследований в рамках биобанка – установление взаимосвязи геномных изменений и патогенеза опухолей глиального ряда при помощи статистических данных для конечного прогноза течения заболевания. Например, наличие мутации гена *IDH1* свидетельствует о неблагоприятных исходах для пациента, так как клеточные структуры в таком случае весьма чувствительны к генетическим преобразованиям, но также дают больший ответ на противоопухолевую терапию [11]. Коделеция 1p/19q нередко наблюдается совместно с мутацией *IDH1*, она позволяет диагностировать олигодендроглиому, что сигнализирует о благоприятном прогнозе заболевания и лечения. Ген *MGMT* является своего рода индикатором фермента Об-метилгуанин-метилтрансферазы в опухоли, который отвечает за восстановление поврежденных ДНК [12]. При положительном результате метилирования данного гена повышается вероятность благоприятного исхода лечебных мероприятий.

Технология сбора опухолевых тканевых образцов построена таким образом, что позволяет расширить спектр современных подходов к анализу их особеннос-

тей. В частности, разрабатывается технология получения первичных и перевиваемых клеточных культур из опухолевых тканей, которая позволит индивидуально подходить к терапии у конкретного пациента. Гетерогенность опухолей требует персонализированного анализа каждой из них. Исследование разных схем терапии на клеточных культурах даст возможность более точно подобрать для пациента схему лечения.

Использование накопленных фрагментов тканей глиом способно также обеспечить необходимое число исследований для усовершенствования диагностических технологий. Опухоли глиального ряда являются на данный момент одними из самых часто встречающихся в практике нейрохирургов, но их терапия не всегда успешна. В конце 1980-х годов были разработаны технологии, которые позволили увеличить пропускную способность секвенирования ДНК и гибридизации нуклеиновых кислот. Они положили начало новой эре в области биологических исследований, которые сейчас именуют omics-технологиями [13]. Данный метод позволяет проводить оценку большого объема данных об экспрессии генов, метаболитах биологического объекта и белках средствами многомерной статистики, дисперсным регрессионным анализом, а также программами распознавания образов. Следовательно, при использовании omics-технологий в рамках профессионального стандартизированного банка биообразцов и клинической базы данных появляется возможность приближения к персонализированным методам лечения пациентов и их дальнейшей разработке [14–16].

Продолжительность большинства исследований весьма велика, но благодаря биобанкам биоматериал может храниться длительное время.

В 2011 году аналитическая компания BCCResearch (США) опубликовала отчет о современном состоянии и развитии индустрии биобанков в мире [17], интерес к которым возрос в начале 2000-х вследствие существенного прогресса в расшифровке генома человека.

В настоящее время больше всего биобанков находится в Северной Америке и Европе, что соответствует расположению ключевых фармацевтических и биотехнологических компаний, использующих услуги и ресурсы биобанков. По некоторым оценкам, около 15% всех действующих биобанков специализируется исключительно на онкологии, а значительная их доля имеет смешанный характер и ведет работу, в том числе, в этой специальности. В 2007 году было опубликовано описание французского банка данных об опухолях мозга [18]. В коллекции замороженных опухолей содержались образцы от 2261 пациента с первичными опухолями центральной нервной системы, среди которых глиомы составляли около 50%. Это первый специализированный европейский нейроонкологический биобанк. В клинике Хуашань (Китай) в апреле 2010 года создан специализированный биобанк глиальных опухолей. К сентябрю 2013 года коллекция включала материал от 1326 пациентов, из которых у 73% были астроцитарные опухоли, у 17% – олигодендроглиальные, у 4% – эпендимарные и у 4% – другие опухоли центральной нервной системы, у 2% – олигоастроцитарные [19]. Биологический материал, полученный от пациентов, хранился в замороженном виде. На данный момент существует определенная категория исследований, которые проводятся исключительно с помощью биобанков.

- «Гормональные и репродуктивные факторы и риск развития рака верхней части желудочно-кишечного тракта у мужчин» – проспективное когортное исследование в Великобритании. В исследование были включены 219 425 человек, зарегистрированных в Британском биобанке в 2006–2010 годах [20].
- «Влияние посмертного интервала и лет в хранении на качество РНК ткани в репозитории NIH NeuroBioBank». Мозговую ткань от 1068 доноров анализировали на качество РНК как функцию посмертного интервала (PMI) и лет хранения [21].
- «Сбор и исследование опухолей головного мозга в сотрудничестве с Университетом Майами / Сильвестр Тейсэйшн-Банк Core Facility (UM-TBCF) для обеспечения доступности высококачественных образцов опухолевой ткани центральной нервной системы, а также определения наиболее частых их видов» [22].
- «Создание и поддержание стандартизированного банка тканей глиомы: опыт Хуашань». Одной из основных целей является изучение патогенеза и инвазии глиомы на разных уровнях -омики (таких как протеомика или геномика) и влияния биомаркерного профиля на диагностику, прогнозирование и лечение пациентов с глиомой [19].

На территории Российской Федерации биобанкирование тканей человека только начинает развиваться. Сегодня в России работает около 20 биобанков, а также насчитывается более 200 коллекций биологических материалов (первые отличаются от вторых степенью систематизированности). К наиболее крупным отно-

сятся биобанк НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Национальный БиоСервис, Центр Биобанк СПбГУ, проект МГУ «Ноев ковчег».

### Заключение

Биобанк опухолей глиального ряда, основанный в 2016 году на базе материалов НМИЦН, является первым специализированным нейроонкологическим биобанком на территории Российской Федерации. Таким образом, создание этой организационной структуры может быть использовано для повышения эффективности в ходе дальнейших экспериментальных работ с возможной перспективой применения и внедрения персонализированных методов лечения в будущем, после проведения полного цикла клинических исследований. Кроме того, система биобанкирования тканей построена таким образом, что позволяет внедрять новые подходы для исследований молекулярных особенностей опухолей глиального ряда. В частности, развивается направление по получению из опухолевой ткани первичных и перевиваемых клеточных культур, пригодных для индивидуального подхода к терапии.

### Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Д.А. Гольбин, Г.В. Павлова, Г.Л. Кобыakov, А.А. Потапов.

Сбор и обработка материала – А.Л. Корочкина, А.В. Косырькова, С.В. Шугай, М.А. Шифрин, Т.В. Цуканова, А.В. Ревещин, Г.В. Данилов, Е.Ю. Рыбалкина.

Написание текста – Д.А. Гольбин, Г.В. Павлова, С.В. Шугай, А.Л. Корочкина.

Редактирование – Д.А. Гольбин, Г.В. Павлова, А.В. Ревещин.

### Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – D.A. Golbin, G.V. Pavlova, G.L. Kobiakov, A.A. Potapov.

Collected the data and performed the analysis – A.L. Korochkina, A.V. Kosyrkova, S.V. Shugay, M.A. Shifrin, T.V. Tsukanova, A.V. Revishchin, G.V. Danilov, E.Y. Rybalkina.

Wrote the paper – D.A. Golbin, G.V. Pavlova, S.V. Shugay, A.L. Korochkina.

Edited the manuscript – D.A. Golbin, G.V. Pavlova, A.V. Revishchin.

### Литература/References

1. *Le Page C, Köbel M, de Ladurantaye M, Rahimi K, Madore J, Babinszky S et al.* Specimen quality evaluation in Canadian biobanks participating in the COEUR repository. *Biopreserv Biobank.* 2013;11(2):83–93. DOI: 10.1089/bio.2012.0044.
2. *Ji X, Zhao XM, Jiang JJ, Yin L, Guo YC.* Clinical biobanks, from the world to China. *Biomed Environ Sci.* 2014;27(6):481–3. DOI: 10.3967/bes2014.079.
3. *Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM, Incoronato M, Bevilacqua P, Messina F et al.* Biobanking in health care: evolution and future directions. *J Transl Med.* 2019;17(1):172. DOI: 10.1186/s12967-019-1922-3.
4. *Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT et al.* Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2013;61(1):25–41. DOI: 10.1007/s00005-012-0203-0.

5. Kamenski PA, Sazonov AE, Fedyanin AA, Sadovnichy VA. Biological collections: chasing the ideal. *Acta Naturae*. 2016;8(2):6–9. PMID: 27437135.
6. Трофимов Н.А. Отрасль биобанков в ближайшем будущем. *Наука за рубежом*. 2012;13:1–13. Trofimov NA. Otrasl' biobankov v blizhajshem budushchem. *Nauka za rubezhom*. 2012;13:1–13 (In Russ.).
7. Verlinden M, Nys H, Ectors N, Huys I. Access to biobanks: harmonization across biobank initiatives. *Biopreserv Biobank*. 2014;12(6):415–22. DOI: 10.1089/bio.2014.0034.
8. Lehmann S, Guadagni F, Moore H, Ashton G, Barnes M, Benson E et al. Standard preanalytical coding for biospecimens: review and implementation of the Standard PREanalytical Code (SPREC). *Biopreserv Biobank*. 2012;10(4):366–74. DOI: 10.1089/bio.2012.0012.
9. Betsou F, Bilbao R, Case J, Chuaqui R, Clements JA, De Souza Y et al. Standard PREanalytical Code version 3.0. *Biopreserv Biobank*. 2018;16(1):9–12. DOI: 10.1089/bio.2017.0109.
10. Kiseleva LN, Kartashev AV, Vartanyan NL, Pinevich AA, Samoilovich MP, Filatov MV. Characterization of new human glioblastoma cell lines. *Cell and Tissue Biology*. 2018;12(1):1–6. DOI: 10.1134/S1990519X180101008.
11. Yan W, Zhang W, You G, Bao Z, Wang Y, Liu Y et al. Correlation of IDH1 mutation with clinicopathologic factors and prognosis in primary glioblastoma: a report of 118 patients from china. *PLoS One*. 2012;7(1):e30339. DOI: 10.1371/journal.pone.0030339.
12. Lohkamp LN, Schinz M, Gehlhaar C, Guse K, Thomale UW, Vajkoczy P et al. MGMT promoter methylation and BRAF V600E mutations are helpful markers to discriminate pleomorphic xanthoastrocytoma from giant cell glioblastoma. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156422. DOI: 10.1371/journal.pone.0156422.
13. Kransdorf EP, Kobashigawa JA. Genetic and genomic approaches to the detection of heart transplant rejection. *Per Med*. 2012;9(7):693–705. DOI: 10.2217/pme.12.84.
14. Langreth R, Waldholz M. New era of personalized medicine: targeting drugs for each unique genetic profile. *Oncologist*. 1999;4(5):426–7. PMID: 10551559.
15. Paving the Way for Personalized Medicine. FDA's Role in a New Era of Medical Product Development. FDA Report, October 2013. Available at: <https://www.fdanews.com/ext/resources/files/10/10-28-13-Personalized-Medicine.pdf> (Accessed online 27th October 2020).
16. Salari K. The dawning era of personalized medicine exposes a gap in medical education. *PLoS Med*. 2009;6(8):e1000138. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000138.
17. Highsmith J. Biobanking: technologies and global markets. Market research report. Available at: <https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/biobanking-technologies-markets-report.html> (Accessed online 27th October 2020).
18. Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L et al. French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol*. 2007;84(2):189–99. DOI: 10.1007/s11060-007-9356-9.
19. Aibaidula A, Lu JF, Wu JS, Zou H, Chen H, Wang YQ et al. Establishment and maintenance of a standardized glioma tissue bank: Huashan experience. *Cell Tissue Bank*. 2015;16(2):271–81. DOI: 10.1007/s10561-014-9459-4.
20. McMenamin UC, Kunzmann AT, Cook MB, Johnson BT, Murray LJ, Spence AD et al. Hormonal and reproductive factors and risk of upper gastrointestinal cancers in men: a prospective cohort study within the UK biobank. *Int J Cancer*. 2018;143(4):831–41. DOI: 10.1002/ijc.31375.
21. White K, Yang P, Li L, Farshori A, Medina AE, Zielke HR. Effect of postmortem interval and years in storage on RNA quality of tissue at a repository of the NIH NeuroBioBank. *Biopreserv Biobank*. 2018;16(2):148–57. DOI: 10.1089/bio.2017.0099.
22. Bregy A, Papadimitriou K, Faber DA, Shah AH, Gomez CR, Komotar RJ et al. Banking brain tumor specimens using a university core facility. *Biopreserv Biobank*. 2015;13(4):280–6. DOI: 10.1089/bio.2014.0106.

### Информация об авторах

Денис Александрович Гольбин – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией нейрохирургической анатомии и консервации биологических материалов НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Антонина Леонидовна Корочкина – лаборант-исследователь лаборатории нейрохирургической анатомии и консервации биологических материалов НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Светлана Викторовна Шугай – врач-патологоанатом отделения патологической анатомии НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Татьяна Васильевна Цуканова – ведущий инженер лаборатории биомедицинской информатики и искусственного интеллекта НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Михаил Абрамович Шифрин – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории биомедицинской информатики и искусственного интеллекта НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Александр Владимирович Ревичин – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейrogenетики и генетики развития Института биологии гена.

Александра Вячеславовна Косырькова – лаборант-исследователь лаборатории нейрохирургической анатомии и консервации биологических материалов НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Глеб Валерьевич Данилов – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биомедицинской информатики и искусственного интеллекта, ученый секретарь НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Екатерина Юрьевна Рыбалкина – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина.



Галина Валериевна Павлова – доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейрогенетики и генетики развития Института биологии гена, старший научный сотрудник отделения рентгеновских и радионуклидных методов диагностики НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Григорий Львович Кобяков – доктор медицинских наук, руководитель группы химиотерапии опухолей ЦНС НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Александр Александрович Потапов – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

### Author information

Denis A. Golbin – Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Neurosurgical Anatomy and Biorepository, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0003-0017-2649>

Antonina L. Korochkina – Research Assistant, Laboratory of Neurosurgical Anatomy and Biorepository, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-5235-8037>

Svetlana V. Shugay – Pathologist, Pathology Department, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-8079-8523>

Tatiana V. Tsukanova – Leading Engineer, Laboratory of Biomedical Informatics and Artificial Intelligence, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0002-0046-1312>

Michael A. Shifrin – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Senior Researcher, Laboratory of Biomedical Informatics and Artificial Intelligence, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0002-9606-5559>

Alexander V. Revishchin – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Neurogenetics and Developmental Genetics, Institute of Gene Biology.  
<https://orcid.org/0000-0002-6007-6440>

Alexandra V. Kosyrkova – Research Assistant, Laboratory of Neurosurgical Anatomy and Biorepository, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0002-3019-5203>

Gleb V. Danilov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Biomedical Informatics and Artificial Intelligence, Academic Secretary, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0003-1442-5993>

Ekaterina Y. Rybalkina – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Genetics of Tumor Cells, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.  
<https://orcid.org/0000-0002-3068-0233>

Galina V. Pavlova – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Neurogenetics and Developmental Genetics, Institute of Gene Biology; Senior Researcher, Department of Neuroradiology and Radionuclide Methods of Diagnostics, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0002-6885-6601>

Grigory L. Kobiakov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Chemotherapy of CNS Tumors, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0002-7651-4214>

Alexander A. Potapov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Academic Director, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.  
<https://orcid.org/0000-0001-8343-3511>

## Морфофункциональные изменения ободочной кишки и иммунные реакции при холодовом стрессе у самцов и самок мышей C57BL/6

Н.А. Золотова<sup>1</sup>, И.С. Цветков<sup>1</sup>, Д.Н. Хочанский<sup>1</sup>, Д.Ш. Джалилова<sup>1</sup>,  
А.М. Косырева<sup>1</sup>, А.Л. Михайлова<sup>2</sup>, Л.П. Михайлова<sup>1</sup>, О.В. Макарова<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*Введение.* Стресс является одним из факторов, способствующих развитию и усугубляющих течение заболеваний желудочно-кишечного тракта. Наиболее распространенный стрессорный фактор в России – холод, поэтому в работе была поставлена цель охарактеризовать иммунные реакции и морфофункциональные изменения ободочной кишки при холодовом стрессе у самцов и самок мышей C57BL/6.

*Материалы и методы.* Исследовали изменения субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и морфофункциональные изменения тимуса, селезенки и ободочной кишки в ответ на курсовое интервальное холодовое воздействие в режиме 35-минутных сеансов в течение 14 дней при температуре  $-20^{\circ}$  у половозрелых самцов и самок мышей C57BL/6.

*Результаты.* При холодовом стрессе у животных обоего пола снижались объемная доля ПАЛМ-зоны селезенки и содержание эндокринных клеток в эпителиальной выстилке ободочной кишки. У самок в периферической крови увеличивалось число тромбоцитов и лейкоцитов, снижалась ширина субкапсулярной зоны тимуса и возрастала объемная доля красной пульпы селезенки. У самцов в периферической крови уменьшалось абсолютное и относительное содержание Т-регуляторных лимфоцитов и возрастало относительное содержание активированных Т-хелперов, в селезенке снижалась объемная доля светлых центров лимфоидных узелков, в ободочной кишке возрастала длина крипт. Также был выявлен ряд различий между самцами и самками контрольных групп: в периферической крови у самцов было больше количество тромбоцитов и абсолютное число Т-регуляторных лимфоцитов и меньше содержание цитотоксических Т-лимфоцитов. В ободочной кишке у самцов было выше содержание пролиферирующих эпителиальных клеток и ниже объемная плотность бокаловидных клеток.

*Заключение.* При используемом нами режиме холодового воздействия у животных развивается физиологический стресс. Иммунные реакции и морфофункциональные изменения ободочной кишки при холодовом стрессе самцов и самок различаются.

**Ключевые слова:** холодовой стресс, половые различия, ободочная кишка, иммунная система

**Для корреспонденции:** Наталья Александровна Золотова. E-mail: natashazltv@gmail.com

**Для цитирования:** Золотова Н.А., Цветков И.С., Хочанский Д.Н., Джалилова Д.Ш., Косырева А.М., Михайлова А.Л., Михайлова Л.П., Макарова О.В. Морфофункциональные изменения ободочной кишки и иммунные реакции при холодовом стрессе у самцов и самок мышей C57BL/6. Клини. эксп. морфология. 2020;9(4):50–64. DOI: 10.31088/CEM2020.9.4.50-64.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека (№ АААА-А19-119021490067-4).

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

Статья поступила 24.07.2020. Получена после рецензирования 22.09.2020. Принята в печать 26.10.2020.

## Morphofunctional changes in the colon and immune responses during cold stress in male and female C57BL/6 mice

N.A. Zolotova<sup>1</sup>, I.S. Tsvetkov<sup>1</sup>, D.N. Khochanskiy<sup>1</sup>, D.Sh. Dzhaililova<sup>1</sup>,  
A.M. Kosyрева<sup>1</sup>, A.L. Mikhailova<sup>2</sup>, L.P. Mikhailova<sup>1</sup>, O.V. Makarova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*Introduction.* Stress is one of the factors contributing to the gastrointestinal tract diseases development and exacerbating the course of diseases of the gastrointestinal tract. The cold factor is the most common stress

factor in Russia. Therefore, the aim of our work was to characterize the immune responses and colon morphological and functional changes during cold stress in male and female C57BL/6 mice.

*Materials and methods.* We studied alterations in the subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes and morphofunctional changes in the thymus, spleen, and colon in response to a course intermittent cold exposure during 35-minute sessions for 14 days at  $-20^{\circ}$  in adult male and female C57BL/6 mice.

*Results.* The volume fraction of the PALS zone of the spleen and the content of endocrine cells in the colon decreased in animals of both sexes in the cold stress conditions. In females, the number of platelets and leukocytes in the peripheral blood increased, the width of the subcapsular zone of the thymus decreased, and the volume fraction of the red spleen pulp increased. In males, in the peripheral blood, the absolute and relative content of T-regulatory lymphocytes decreased, and the relative content of activated T-helpers increased, the volume fraction of the light centers of lymphoid nodules in the spleen decreased, the length of the crypts increased in the colon. A number of differences between males and females of control groups were also revealed: in the peripheral blood, males had more platelets and the absolute content of T-regulatory lymphocytes and less absolute content of T-cytotoxic. In the colon of males, the content of proliferating epithelial cells in the colon was higher than the one in females, and the bulk density of goblet cells was lower in males.

*Conclusion.* Under the cold stress factor exposure in animals, physiological stress develops. Immune reactions and colon morphofunctional changes in the colon during cold stress differ between males and females.

**Keywords:** cold stress, sex differences, colon, immune system

**Corresponding author:** Natalia A. Zolotova. E-mail: natashazltv@gmail.com

**For citation:** Zolotova N.A., Tsvetkov I.S., Khochanskiy D.N., Dzhailova D.Sh., Kosyreva A.M., Mikhailova A.L., Mikhailova L.P., Makarova O.V. Morphofunctional changes in the colon and immune responses during cold stress in male and female C57BL/6 mice. *Clin. exp. morphology.* 2020;9(4):50–64 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.4.50-64.

**Funding.** The study was carried out within the framework of State Assignment to Research Institute of Human Morphology (No. AAAA-A19-119021490067-4).

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

**Received** 24.07.2020. **Received in revised form** 22.09.2020. **Accepted** 26.10.2020.

## Введение

Толстая кишка – важный отдел пищеварительной системы: в ней происходят ферментация непереваренных фрагментов пищи комменсальными бактериями с образованием необходимых человеку витаминов, короткоцепочечных жирных кислот и других соединений, всасывание воды, ионов, питательных веществ, формирование каловых масс [1]. Заболевания толстой кишки широко распространены среди населения, разнообразны по этиологии и патогенезу, а лечение их недостаточно эффективно [2]. Одним из факторов, способствующих развитию и более тяжелому течению целого ряда заболеваний кишечника, является стресс. Так, стресс считается основной причиной развития синдрома раздраженной кишки [3]. Стресс способствует возникновению и обострению течения воспалительных заболеваний кишечника – язвенного колита и болезни Крона. Предполагается, что стресс во многом определяет развитие и тяжесть течения инфекционных, воспалительных, опухолевых заболеваний кишечника [4–6]. Показано, что стресс влияет на моторику кишечника, качественный и количественный состав микрофлоры и проницаемость эпителиального барьера толстой кишки [5, 7].

Выявлены половые различия реакций на стрессорные воздействия. Стресс-ассоциированные психи-

ческие расстройства, такие как посттравматическое стрессовое расстройство и депрессия, чаще встречаются у женщин, чем у мужчин [8]. Мужчины в 4–5 раз чаще, чем женщины, совершают суицид [9]. Женщины страдают от социального стресса больше, чем мужчины, и их стиль выживания более ориентирован на эмоции [10]. Также известно, что существуют различия между мужчинами и женщинами в распространенности, проявлениях и исходах инфекционных, аутоиммунных, опухолевых, воспалительных заболеваний, в том числе заболеваний толстой кишки [11]. Тем не менее половые различия изменений ободочной кишки при стрессе не изучены.

При стрессе у людей описывают психоэмоциональные реакции и изменения клеточного и биохимического состава периферической крови, в то время как исследование морфофункциональных изменений внутренних органов на человеческом материале затруднено. Следовательно, необходимо использование экспериментальных моделей на животных. В России наиболее распространенным физическим стрессорным фактором является холод.

В связи с изложенным целью нашей работы было охарактеризовать иммунные реакции и морфофункциональные изменения ободочной кишки при холодном стрессе у самцов и самок мышей C57BL/6.

## Материалы и методы

Исследование выполнено на 16 половозрелых самцах и 14 самцах мышей линии C57BL/6, полученных из филиала «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России. Мышей содержали при температуре +18–25°C, естественном освещении, свободном доступе к воде и комбикорму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОСС RU.П081.В00113, ГОСТ Р50258-92). При работе с экспериментальными животными руководствовались Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 18 марта 1986 года).

Самцов (n=7) и самок (n=8) контрольных групп постоянно содержали в условиях вивария при температуре +18–25°C. Самцов (n=7) и самок (n=8) опытных групп в течение 14 дней ежедневно помещали на 35 минут в морозильную камеру с температурой –20°C в индивидуальных пластиковых контейнерах размером 12×7×5 см с вентиляционными отверстиями в крышках. Животных выводили из эксперимента на 15-й день путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом.

Трем самцам и трем самкам за 6 дней до начала моделирования холодового стресса в брюшную полость имплантировали температурные датчики ДТИЗ-28 ЭМБИ РЕСЕРЧ (Россия), регистрирующие температуру один раз в минуту. В первый день холодового воздействия один из самцов с имплантированным датчиком погиб.

Перед началом моделирования холодового стресса и перед выведением из эксперимента животных всех групп взвешивали. При выведении из эксперимента у животных забирали кровь из шейных вен, использовали пробирки для гематологических исследований с ЭДТА (Greiner Bio-One, Австрия). Проводили определение числа тромбоцитов, лейкоцитов и лимфоцитов с помощью автоматического гематологического анализатора Mindray BC-2800Vet (Китай). Субпопуляционный состав лимфоцитов определяли на приборе Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США). Для выявления В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) и Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) использовали антитела CD19-PE, CD3e-FITC, CD8a-PE-Cy7, CD4-PE-Cy5 (eBioscience, США). Эритроциты лизировали с помощью раствора OptiLyse C Lysis Solution (Beckman Coulter, США). Выявление субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) и активированных Т-хелперов (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>) проводили с помощью набора Mouse Regulatory T Cell Staining Kit#3 (eBioscience, США) согласно инструкции производителя.

Проводили забор дистального отдела ободочной кишки, вскрывали его по брыжейке и промывали фосфатно-солевым буфером pH 7,4, 0.01M («БиолоТ», Россия), расправляли на миллиметровом фильтре, фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 часов. Тимус, селезенку, брыжеечные лимфатические узлы фиксировали в жидкости Буэна в течение

24 часов. Все органы после фиксации заключали в гистомикс, изготавливали срезы толщиной 5–8 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином.

Гистологические срезы ободочной кишки также окрашивали альциановым синим pH 1,0 по Мойри (гистолайн, ООО «Элемент», Россия), проводили ШИК-реакцию («БиоВитрум», Россия) и иммунофлуоресцентное окрашивание с антителами к хромогранину А (Rabbit polyclonal anti-ChromograninA antibody, ab15160, Abcam Inc, Великобритания) и к Ki67 (Rabbit anti-mouse polyclonal anti-Ki67 antibody, ab 264429, Abcam Inc, Великобритания), использовали вторые антитела с флуоресцентной меткой Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488; ab150077, Abcam Inc, Великобритания).

На окрашенных гематоксилином и эозином гистологических срезах оценивали объемную плотность структурно-функциональных зон тимуса, селезенки и брыжеечных лимфатических узлов методом точечного счета под световым микроскопом Leica DM2000 (Германия) при ×100. В тимусе подсчитывали соотношение объемной доли коркового и мозгового вещества. В селезенке оценивали объемную долю красной пульпы, ПАЛМ-зоны, лимфоидных узелков и светлых центров в них. В гистологических срезах тимуса на микроскопе LeicaDM2500 (Leica Microsystems, Германия) при ×400 с помощью программного обеспечения Leica Application Suite измеряли толщину субкапсулярной зоны тимуса (15–20 измерений для каждого животного).

Для исследования стенки дистального отдела ободочной кишки выбирали участки с продольно ориентированными криптами. В программе PhotoM 1.21 (А. Черниговский, 2000–2001) подсчитывали число клеточных элементов на единицу площади соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки (СПСО) на единицу ее площади на фотографиях срезов ободочной кишки, окрашенных гематоксилином и эозином, при ×400. Препараты, окрашенные альциановым синим и реактивом Шиффа, после обработки йодной кислотой фотографировали при ×320 в одинаковых условиях освещения. На бинаризованных снимках препаратов с ШИК-реакцией оценивали объемную долю бокаловидных клеток, на снимках препаратов, окрашенных альциановым синим, определяли число бокаловидных клеток на крипту. На снимках препаратов с ШИК-реакцией и окрашенных альциановым синим в программе ImageJ измеряли среднюю яркость точек бокаловидных клеток и точек фона, рассчитывали оптическую плотность бокаловидных клеток как средний десятичный логарифм отношения средней яркости точек фона к средней яркости точек объекта.

Фотографировали препараты с иммунофлуоресцентным окрашиванием на хромогранин А и белок Ki67 при ×100 и ×200, соответственно. Подсчитывали число окрашенных клеток на 1 мкм<sup>2</sup> площади слизистой оболочки.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США). Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи. Для сравнения групп использовали U-критерий Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В периоды вне холодового воздействия температура теплового ядра мышей значительно колебалась в течение суток – от  $34,5^{\circ}\text{C}$  до  $39,7^{\circ}\text{C}$  и в среднем составляла  $36,9^{\circ}\text{C}$  (рис. 1). По данным литературы, при комнатной температуре температура тела мышей в течение суток колеблется в диапазоне от  $34^{\circ}\text{C}$  до  $39^{\circ}\text{C}$  [12, 13]. По мнению С. J. Gordon [13], мелких млекопитающих, таких как мыши и крысы, следует считать усредненными гомойотермными, так как температура их теплового ядра может значительно и быстро колебаться и является стабильной только при усреднении за большие промежутки времени.

При помещении животных в морозильную камеру ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) за 35 минут температура тела мышей снижалась до  $24,2$  ( $20,6$ ;  $27,9$ )  $^{\circ}\text{C}$ , что более чем на  $10^{\circ}\text{C}$  ниже минимума в условиях вивария. При этом признаки адаптации не наблюдались: температура тела, достигаемая к 35-й минуте холодового воздействия, в первые 3 дня эксперимента ( $25,8$  ( $20,5$ ;  $27,2$ )  $^{\circ}\text{C}$ ) и последние 3 дня ( $24,1$  ( $21,8$ ;  $26,5$ )  $^{\circ}\text{C}$ ) статистически значимо не различалась. Температура тела мышей опускалась ниже минимума нормы ( $34,5^{\circ}\text{C}$ ) за 7–15 минут с момента помещения животного в морозильную камеру. После извлечения из нее температура нормализовывалась через 25–35 минут (рис. 1). Для человека снижение температуры тела ниже  $28^{\circ}\text{C}$  является тяжелой гипотермией, в этом состоянии дрожь отсутствует, кожа холодная и отечная, наблюдаются галлюцинации, арефлексия, олигурия, фиксированные расширенные зрачки, брадикардия, гипотония и отек легких. При снижении температуры тела до  $23^{\circ}\text{C}$  происходит остановка дыхания [14]. Однако у мышей через 30 минут после прекращения холодового воздействия температура тела нормализовывалась, и они внешне не отличались от животных контрольной группы, что указывает на большую устойчивость мышей к холоду по сравнению с человеком. По данным Н. К. Арокиной [15], у крыс Вистар остановка дыхания происходит при снижении ректальной температуры до  $15,1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  и температуры головного мозга до  $19 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ .

По сравнению с самцами снижение температуры тела у самок было более выражено, что, вероятно, связано с меньшей массой тела самок. Женщины по сравне-

нию с мужчинами на одну и ту же внешнюю холодовую нагрузку реагируют более значительным снижением температуры кожи [16].

До начала моделирования холодового стресса и в конце эксперимента животных всех групп взвешивали. Изменения массы тела ни у самок, ни у самцов не выявлены, но масса тела у самцов была выше, чем у самок, как в начале эксперимента (самки 20 ( $20$ ;  $20$ ); самцы 23 ( $21$ ;  $23$ ) г), так и в конце (самки 19 ( $18$ ;  $20$ ) г; самцы 22 ( $22$ ;  $22$ ) г). Как правило, сильный стресс приводит к снижению массы тела. Так, у мышей, подвергавшихся хроническому иммобилизационному стрессу, масса тела была значительно ниже, чем у животных контрольных групп [17]. Тем не менее воздействие холода, напротив, приводит к увеличению массы тела у мышей, что, вероятно, является проявлением механизма адаптации, направленного на снижение потерь тепла [18].

Каждому животному был проведен клинический анализ крови. В контрольных группах содержание тромбоцитов у самок было ниже, чем у самцов, а число лейкоцитов и лимфоцитов статистически значимо не различалось (табл. 1). По данным T. I. Reste et al. [19], в периферической крови у самцов мышей содержание нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов выше, чем у самок. Однако общее число лейкоцитов статистически значимо не различается, содержание эритроцитов выше у самок, чем у самцов, а половые различия количества тромбоцитов не выявлены. Q. He et al. [20] обнаружили в периферической крови у самцов крыс Спрейг–Доули большее количество эритроцитов, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, а у самок – тромбоцитов и эозинофилов. Противоречивость данных, очевидно, связана с разными фазами эстрального цикла у

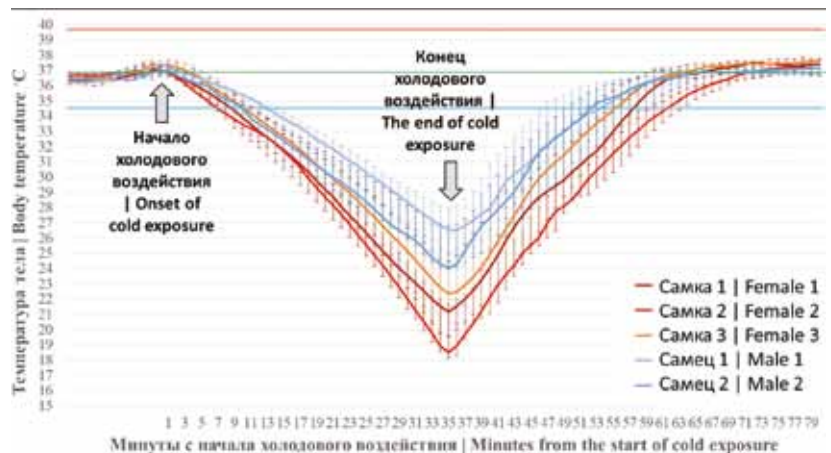


Рис. 1. Динамика температуры тела животных на протяжении 35-минутного холодового воздействия. Данные усреднены по всем дням, для каждой точки времени приведены медиана и межквартильные размахи.

Красная прямая линия – максимальная, зеленая – средняя, голубая – минимальная температура тела мышей в условиях вивария

Fig. 1. Body temperature dynamics over a 35-minute cold exposure. The data are averaged over all days; for each time point, the median and interquartile ranges are given. The red straight line is the maximum body temperature of mice in a vivarium, the green is the middle, the blue is the minimum body temperature.

**Абсолютное количество лейкоцитов, лимфоцитов и тромбоцитов в периферической крови у половозрелых самок и самцов мышей C57Bl/6 в норме и при холодовом стрессе, Me (0,25; 0,75) | The absolute number of leukocytes, lymphocytes and platelets in the peripheral blood of mature female and male C57Bl/6 mice in normal condition and after cold stress, Me (0.25; 0.75)**

| Абсолютное количество, 10 <sup>6</sup> /мл   Absolute amount, 10 <sup>6</sup> /mL | Самки   Female           |                                | Самцы   Male             |                                |
|---|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
|   | контроль   control group | холодовой стресс   cold stress | контроль   control group | холодовой стресс   cold stress |
| Лейкоциты   Leukocytes  | 7,0<br>(6,5–8,1)         | 11,5*<br>(8,5–12,4)            | 8,7<br>(7,8–9,4)         | 10,7<br>(10,1–11,9)            |
| Лимфоциты   Lymphocytes   | 5,8<br>(5,4–6,8)         | 9,0<br>(7,0–10,2)              | 6,9<br>(6,3–7,9)         | 8,6<br>(8,3–9,4)               |
| Тромбоциты   Platelets  | 436,5#<br>(433–593)      | 914*<br>(694–1115)             | 1241#<br>(1200–1384)     | 782,5<br>(573–1343)            |

\* – статистически значимые различия между опытной и соответствующей контрольной группами

# – статистически значимые различия между самцами и самками контрольных групп, критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$

\* – statistically significant differences between the experimental and the corresponding control group

# – statistically significant differences between males and females of control groups, Mann–Whitney U-test,  $p < 0.05$

самок. В нашем исследовании при холодовом стрессе возрастало количество тромбоцитов и лейкоцитов у самок, а число лимфоцитов не изменялось. По сравнению с животными контрольной группы у самцов при холодовом стрессе показатели клинического анализа крови не различались (табл. 1). Н.А. Лычева и И.И. Шахматов [21] также отмечали повышение содержания тромбоцитов в крови у крыс при гипотермии. У самцов увеличение числа тромбоцитов не наблюдалось, вероятно, потому, что содержание их в норме было значительно выше, чем у самок.

Методом проточной цитофлуориметрии определяли субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови. В контрольных группах у самок по сравнению с самцами было выше абсолютное количество Т-цитотоксических и ниже Т-регуляторных лимфоцитов (табл. 2). Сведения о содержании Т-цитотоксических лимфоцитов согласуются с данными литературы [22]. Д.Ш. Джалилова и соавт. [23] и G. Afshan et al. [24] выявили более высокое содержание Т-регуляторных лимфоцитов у самцов крыс и у мужчин по сравнению с самками и с женщинами, соответственно, что согласуется с полученными нами результатами. Однако Ю. Гао и соавт. [22] и M. Walecki et al. [25] показали, что содержание регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови выше у самок мышей и у женщин репродуктивного возраста по сравнению с самцами и с мужчинами, соответственно. Вероятно, противоречивость данных о содержании Т-регуляторных клеток обусловлена исследованиями в разные фазы эстрального цикла у самок грызунов и менструального цикла у женщин. По данным литературы, колебания уровня эстрадиола в течение менструального цикла влияют на количество и супрессорную активность регуляторных Т-клеток [26]. У женщин в секреторную фазу эстрального цикла с высоким содержанием эстрогенов в сыворотке крови

процентное содержание регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови выше, чем в пролиферативную фазу [27]. В нашем исследовании при холодовом стрессе у самок ни одна из субпопуляций лимфоцитов не изменялась, а у самцов снижалось абсолютное и относительное содержание Т-регуляторных лимфоцитов и возрастало относительное содержание активированных Т-хелперов (табл. 2). Снижение содержания регуляторных Т-клеток у самцов косвенно указывает на активацию иммунных реакций. Хронический стресс вызывает иммуносупрессию, лимфоцитопению, уменьшение в крови числа CD4<sup>+</sup> Т-хелперов [28]. E. Freier et al. [29] выявили снижение числа регуляторных Т-лимфоцитов в периферической крови у молодых мужчин при остром психологическом стрессе.

Тимус у животных всех групп имел нормальное строение. Соотношение коркового и мозгового вещества и толщина субкапсулярной зоны между контрольными группами не различались (рис. 2). По данным Е.Ю. Симоновой [30], в тимусе самцов крыс Вистар в норме отношение объемной доли коркового вещества к мозговому выше, чем у самок в фазе проэструса, что, очевидно, связано с усиленной миграцией Т-лимфоцитов из тимуса у самок под влиянием эстрогенов. Субкапсулярная зона тимуса у самок шире, чем у самцов, что обусловлено, вероятно, повышенным уровнем прогестерона, который подавляет апоптотическую гибель тимоцитов. При холодовом стрессе у самок нами отмечалось снижение ширины субкапсулярной зоны (рис. 2). В субкапсулярной зоне тимуса происходит активная пролиферация незрелых тимоцитов; при патологическом стрессе независимо от его природы развивается острая атрофия тимуса, характеризующаяся уменьшением массы органа и опустошением коркового вещества [31]. Хронический иммобилизационный стресс у мышей вызывает в тимусе увеличение апоп-

Таблица 2 | Table 2

**Относительное и абсолютное количество основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у половозрелых самок и самцов мышей C57Bl/6 в норме и при холодовом стрессе, Me (0,25; 0,75) | The relative and absolute number of the main subpopulations of lymphocytes in the peripheral blood in mature female and male C57Bl/6 mice in normal condition and after cold stress, Me (0.25; 0.75)**

| Субпопуляции лимфоцитов   Lymphocyte subpopulations   |   | Самки   Female                   |                                | Самцы   Male                     |                                |
|---|---|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
|   |   | контроль   control group         | холодовой стресс   cold stress | контроль   control group         | холодовой стресс   cold stress |
| В-лимфоциты   B lymphocytes (CD19 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> )                                       | R | 44,1<br>(33,9–47,0)              | 31,4<br>(18,6–46,5)            | 21,4<br>(9,7–26,0)               | 17,4<br>(10,3–29,2)            |
|   | A | 3,4<br>(2,8–3,8)                 | 3,1<br>(1,6–5,0)               | 1,8<br>(0,9–2,3)                 | 1,8<br>(1,1–3,7)               |
| Т-лимфоциты   T lymphocytes (CD3 <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup> )                                       | R | 24,8<br>(23,0–31,4)              | 14,9<br>(9,2–28,4)             | 9,2<br>(3,4–14,1)                | 8,4<br>(4,4–12,6)              |
|   | A | 2,0<br>(1,6–2,4)                 | 1,7<br>(1,0–2,4)               | 0,8<br>(0,3–1,1)                 | 0,9<br>(0,5–1,6)               |
| Т-цитотоксические   Cytotoxic T cells (CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> )                              | R | 13,0<br>(10,9–13,6)              | 6,0<br>(4,2–12,2)              | 4,5<br>(1,3–5,5)                 | 2,9<br>(1,4–5,3)               |
|   | A | 1,0 <sup>#</sup><br>(0,7–1,1)    | 0,7<br>(0,4–1,1)               | 0,3 <sup>#</sup><br>(0,1–0,4)    | 0,3<br>(0,2–0,7)               |
| Т-хелперы   T helper cells (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> )   | R | 13,8<br>(10,9–17,9)              | 8,9<br>(5,3–15,5)              | 6,1<br>(2,5–8,4)                 | 5,6<br>(3,1–8,3)               |
|   | A | 1,1<br>(0,9–1,2)                 | 1,0<br>(0,6–1,4)               | 0,5<br>(0,2–0,7)                 | 0,6<br>(0,3–1,0)               |
| Активированные Т-хелперы   Activated T-helpers (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>-</sup> ) | R | 3,5<br>(1,6–4,0)                 | 3,5<br>(2,9–4,1)               | 1,4<br>(1,0–1,4)                 | 2,3*<br>(1,5–3,2)              |
|   | A | 25,6<br>(17,6–32,0)              | 43,3<br>(30,4–54,7)            | 13,2<br>(11,5–13,2)              | 26,6<br>(12,8–40,1)            |
| Т-регуляторные лимфоциты   T-regulatory (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> )        | R | 2,6<br>(2,3–4,9)                 | 1,4<br>(1,2–1,7)               | 8,8<br>(8,0–9,0)                 | 3,2*<br>(2,6–5,6)              |
|   | A | 19,8 <sup>#</sup><br>(12,7–25,2) | 17,3<br>(16,8–20,5)            | 83,7 <sup>#</sup><br>(83,1–85,7) | 43,2*<br>(25,3–47,8)           |

R – относительное содержание (%), A – абсолютное содержание (млн/мл)

\* – статистически значимые различия между опытной и соответствующей контрольной группами

# – статистически значимые различия между самцами и самками контрольных групп, критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$

R – relative content (%), A – absolute content (10<sup>6</sup>/ml)

\* – statistically significant differences between the experimental and the corresponding control group

# – statistically significant differences between males and females of control groups, Mann–Whitney U-test,  $p < 0.05$

тоза, уменьшение общего количества тимоцитов, доли незрелых тимоцитов [32]. В исследовании Д.К. Гармаевой и соавт. [33] после нескольких сеансов холодового воздействия в течение 2 недель и более отмечалось сокращение содержания клеток в субкапсулярной зоне тимуса, а показатели площадей коркового и мозгового вещества, корково-мозговой индекс не отличались от показателей у интактного контроля, что соответствует полученным нами результатам.

Селезенка животных всех групп имела нормальное строение. Различия объемной доли функциональных зон селезенки между самцами и самками в норме не выявлены (рис. 3). По данным Е.Ю. Симоновой [30], в селезенке объемная доля белой пульпы у самок крыс Вистар выше, чем у самцов, что может быть обуслов-

лено иммуностимулирующим эффектом эстрогенов, индуцирующих пролиферацию лимфоцитов селезенки. Расхождение наших результатов и данных литературы может быть связано как с межвидовыми различиями, так и с фазой эстрального цикла. При холодовом стрессе у самок в селезенке возрастала объемная доля красной пульпы, у самцов снижалась объемная доля светлых центров лимфоидных узелков и у животных обоего пола уменьшалась объемная доля ПАЛМ-зоны (рис. 3). Увеличение объемной доли красной пульпы и уменьшение объемной доли ПАЛМ-зоны косвенно указывают на миграцию лимфоцитов из селезенки. Снижение объемной доли светлых центров лимфоидных узелков может быть обусловлено подавлением пролиферации В-лимфоцитов. Хронический иммобилизационный

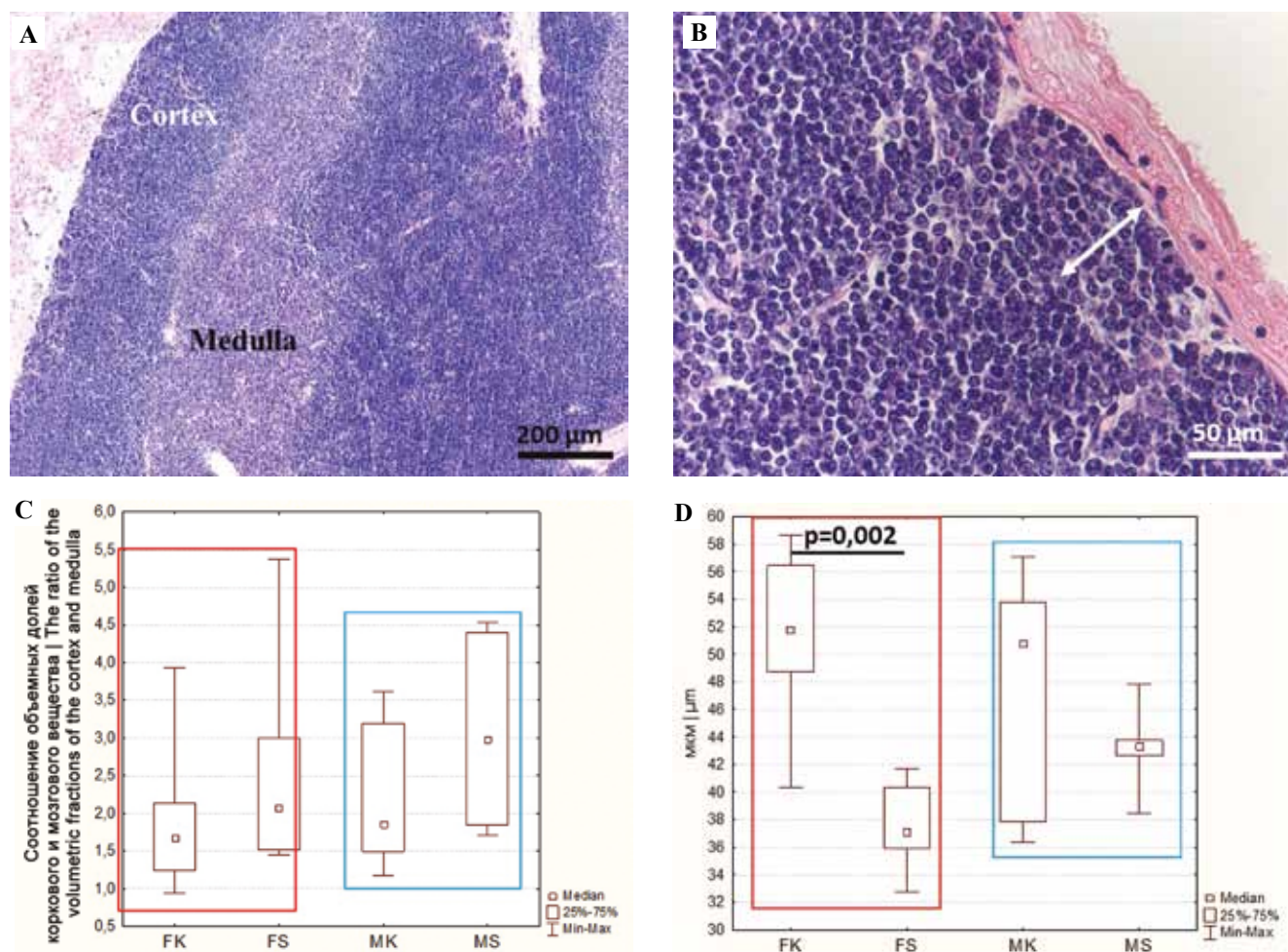


Рис. 2. Изменения тимуса при холодном стрессе.

A – корковое (cortex) и мозговое (medulla) вещество в тимусе интактного самца мыши, B – субкапсулярная зона тимуса, окраска гематоксилином и эозином. C – соотношение объемной доли коркового и мозгового вещества тимуса у самцов и самок мышей в норме и при холодном стрессе, D – ширина субкапсулярной зоны тимуса у самцов и самок мышей в норме и при холодном стрессе. FK – самки контроль, FS – самки стресс, МК – самцы контроль, MS – самцы стресс; черной линией соединены группы, между которыми выявлены статистически значимые различия

Fig. 2. Changes in the thymus after cold stress.

A – the thymic cortex and medulla of an intact male mouse, B – the subcapsular thymic zone, H&E stain. C – the ratio of the volume fraction of the thymic cortex and medulla in male and female mice in normal condition and after cold stress. D – the width of the thymic subcapsular zone in male and female mice in normal condition and after cold stress. FK – females control, FS – females stress, MK – males control, MS – males stress; the black line connects the groups between which statistically significant differences are revealed

стресс у мышей вызывает снижение клеточности и увеличение относительной доли Т-клеток в селезенке [32].

При морфологическом исследовании ободочной кишки различия между исследуемыми группами не выявлены, кишка имела нормальное строение. Статистически значимые различия размеров крипт и содержания клеточных элементов в соединительной ткани СПСО между контрольными группами также не отмечены (рис. 4). По данным Ю. Гао и М.Т. Добрыниной [34], в дистальном отделе ободочной кишки у мышей объемная доля просвета крипт, объемная доля соединительной ткани и сосудов в СПСО выше у самок, а показатель объемной доли клеточных элементов в СПСО выше у самцов. Несоответствие данных, вероятно, об-

условлено разными методиками оценки исследуемых параметров. При холодном стрессе нами было выявлено увеличение длины крипт у самцов, число клеточных элементов в СПСО не изменялось (рис. 4). С.О. Абдулаева [35, 36] не выявила альтеративные и воспалительные изменения ободочной кишки, а также число лимфоцитов в ее СПСО у самцов мышей при ежедневном холодном воздействии в течение 9 дней и 21 дня, что согласуется с полученными нами данными. Увеличение длины крипт толстой кишки наблюдалось при пищевом стрессе у мышей и крыс, которых содержали на полусинтетической диете с повышенным содержанием жиров и фосфатов и пониженным содержанием кальция и витамина D [37].



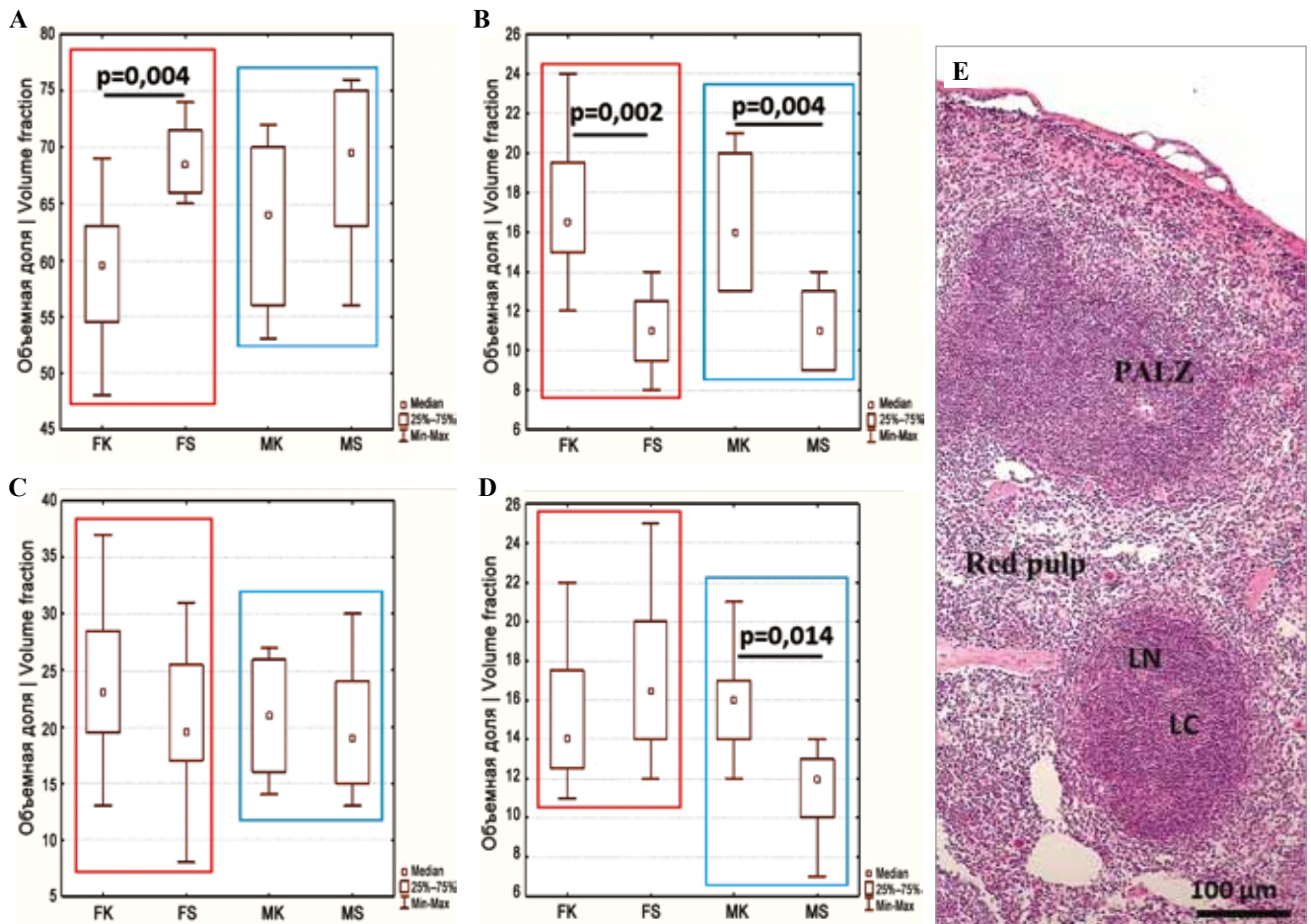


Рис. 3. Объемные доли морфофункциональных зон селезенки у самцов и самок мышей в норме и при холодном стрессе. А – красная пульпа, В – ПАЛМ-зона, С – лимфоидные узелки, D – светлые центры лимфоидных узелков. FK – самки контроль, FS – самки стресс, МК – самцы контроль, MS – самцы стресс; черной линией соединены группы, между которыми выявлены статистически значимые различия. Е – селезенка интактного самца мыши, PALZ – ПАЛМ-зона, Red pulp – красная пульпа, LN – лимфоидный узелок, LC – светлый центр. Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 3. Volume fractions of morphofunctional zones of the spleen in male and female mice in normal condition and after cold stress. A – red pulp, B – PALZ, C – lymphoid nodules, D – light centers of lymphoid nodules. FK – females control, FS – females stress, MK – males control, MS – males stress; the black line connects the groups between which statistically significant differences are revealed. E – spleen of an intact male mouse, LN – lymphoid nodule, LC – light centers. H&E stain

Для оценки пролиферативной активности проведено иммунофлуоресцентное окрашивание срезов ободочной кишки с антителами к Ki67. В контрольных группах число Ki67-положительных клеток в слизистой оболочке было выше у самцов, чем у самок (рис. 5). По данным W. Zhou et al. [38], пролиферация эпителиальных клеток тонкой кишки *in vitro* у мышей выше в криптах, выделенных от самок, по сравнению с криптами, выделенными от самцов. На пролиферативную активность кишечного эпителия значительное влияние оказывают глюкокортикоиды [39]. Для человека и животных установлен 4-суточный инфрадианный биоритм концентрации глюкокортикоидов в периферической крови [40], однако этот биоритм в исследованиях, как правило, не учитывается, что может приводить к расхождениям экспериментальных данных. В нашем исследовании при холодном стрессе ни у самок, ни у самцов содержание Ki67-

положительных клеток не изменялось (рис. 5). У самцов крыс при трехнедельном хроническом холодном стрессе показано снижение активности тимидинкиназы в эпителиальных клетках тонкой кишки [41]. Стресс, индуцированный ограничением движения и погружением в воду на 2 часа в день в течение 5 дней, не вызывал у крыс изменений пролиферативной активности эпителия кишечника [42].

Эндокринные клетки мы выявляли с помощью антител к хромогранину А. В контрольных группах число хромогранин А-положительных клеток в слизистой оболочке не различалось между самками и самцами (рис. 6). Данные о половых различиях содержания эндокринных клеток в кишечнике в литературе отсутствуют. При холодном стрессе мы наблюдали снижение числа хромогранин А-положительных клеток у животных обоего пола (рис. 6). С.О. Абдулаева [35, 36] также выявила повышение числа эндокринных клеток

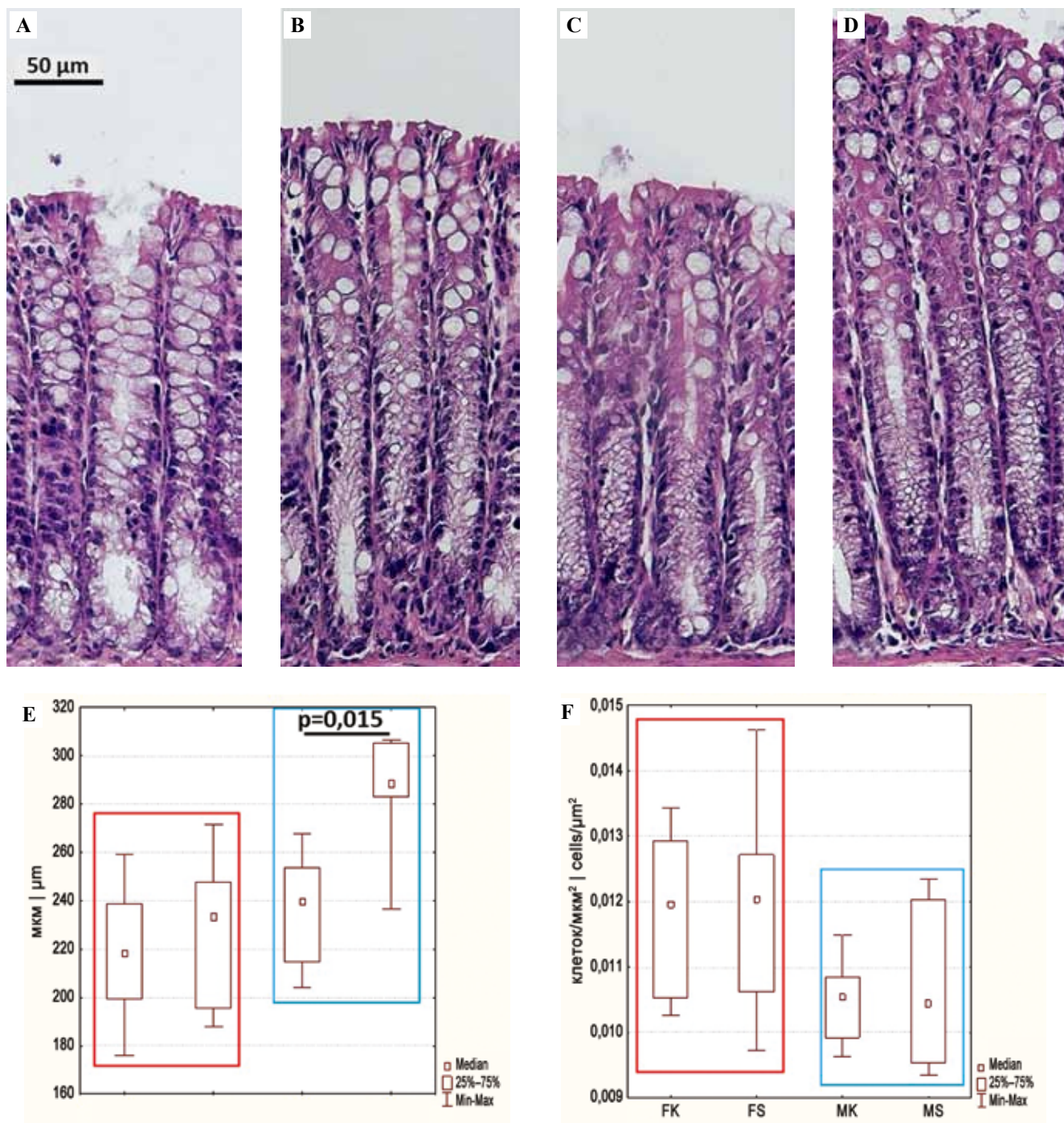
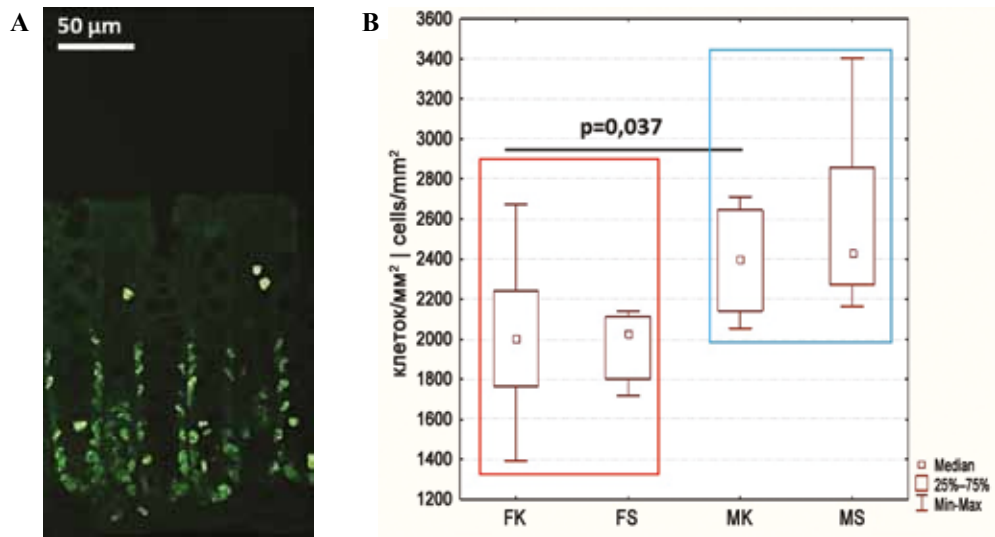


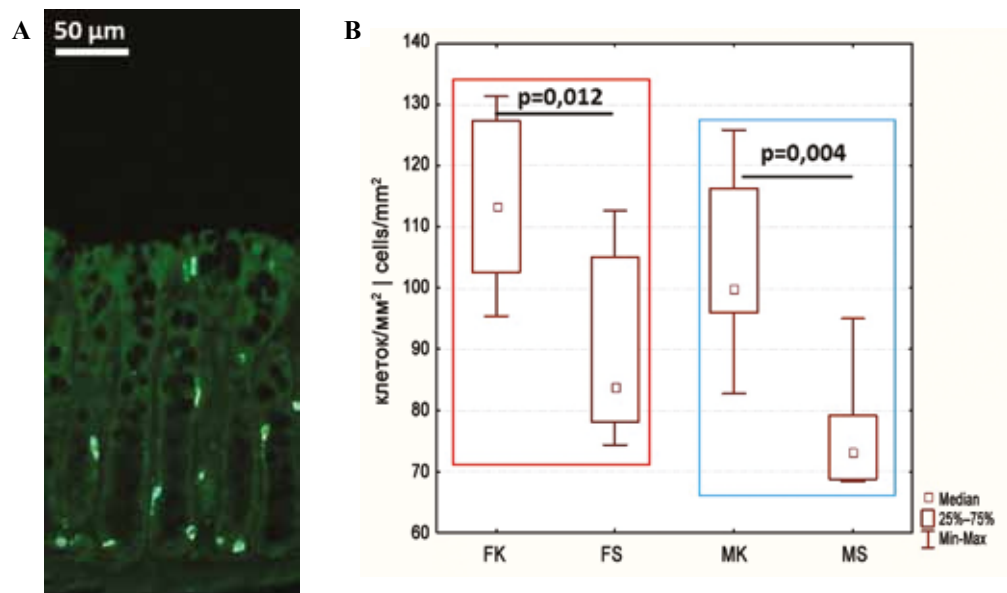
Рис. 4. Слизистая оболочка ободочной кишки самок (А, В) и самцов (С, D) мышей в норме (А, С) и при холодном стрессе (В, D). Окраска гематоксилином и эозином. Высота крипт (Е) и число клеточных элементов (F) на 1  $\mu\text{m}^2$  соединительной ткани собственной пластинки слизистой оболочки у самцов и самок мышей в норме и при холодном стрессе. FK – самки контроль, FS – самки стресс, МК – самцы контроль, MS – самцы стресс; черной линией соединены группы, между которыми выявлены статистически значимые различия

Fig. 4. The mucous membrane of the colon in female (A, B) and male (C, D) mice in normal condition (A, C) and after cold stress (B, D). H&E stain. The height of the crypts (E) and the number of cellular elements (F) per 1  $\mu\text{m}^2$  of the lamina propria connective tissue in male and female mice in normal condition and after cold stress. FK – females control, FS – females stress, MK – males control, MS – males stress; the black line connects the groups which statistically significant differences are revealed



*Рис. 5.* Пролиферирующие Ki67-положительные клетки в слизистой оболочке ободочной кишки интактного самца мыши, иммунофлуоресцентное окрашивание (А). Число Ki67-положительных клеток на 1 мм<sup>2</sup> слизистой оболочки у самцов и самок мышей в норме и при холодном стрессе (В). FK – самки контроль, FS – самки стресс, МК – самцы контроль, MS – самцы стресс; черной линией соединены группы, между которыми выявлены статистически значимые различия

*Fig. 5.* Proliferating Ki67-positive cells in the colon of an intact male mouse, immunofluorescence staining (A). The number of Ki67-positive cells per 1 mm<sup>2</sup> of the mucous membrane in male and female mice in normal condition and after cold stress (B). FK – females control, FS – females stress, MK – males control, MS – males stress; the black line connects the groups between which statistically significant differences are revealed



*Рис. 6.* Эндокринные хромогранин А-положительные клетки в эпителии ободочной кишки интактного самца мыши, иммунофлуоресцентное окрашивание (А). Число хромогранин А-положительных клеток на 1 мм<sup>2</sup> слизистой оболочки у самцов и самок мышей в норме и при холодном стрессе (В). FK – самки контроль, FS – самки стресс, МК – самцы контроль, MS – самцы стресс; черной линией соединены группы, между которыми выявлены статистически значимые различия

*Fig. 6.* Endocrine chromogranin A-positive cells in the colon epithelium of an intact male mouse, immunofluorescence staining (A). The number of chromogranins of A-positive cells per 1 mm<sup>2</sup> of the mucous membrane in male and female mice in normal condition and after cold stress (B). FK – females control, FS – females stress, MK – males control, MS – males stress; the black line connects the groups between which statistically significant differences are revealed

в ободочной кишке у самцов мышей C57BL/6 на 21-е сутки ежедневного холодового воздействия, однако у самцов мышей Balb/c при таком же воздействии их количество снижалось. Уменьшение числа хромогранин А-положительных эндокринных клеток может быть обусловлено либо изменениями путей дифференцировки эпителиальных клеток и уменьшением образования эндокринных клеток, либо повышением секреции, приводящим к опустошению секреторных гранул и потере клетками иммунореактивности.

Высокосульфатированные муцины в бокаловидных клетках выявляли с помощью окраски альциановым синим, pH 1,0, нейтральные – с помощью ШИК-реакции. В норме объемная доля бокаловидных клеток у самок была выше, чем у самцов, а число клеток на крипту не различалось между полами, что указывает на большие размеры клеток у самок. Содержание в бокаловидных клетках нейтральных и высокосульфатированных муцинов между группами не различалось (рис. 7). По данным Ю. Гао и М.Т. Добрыниной [34], объемная доля

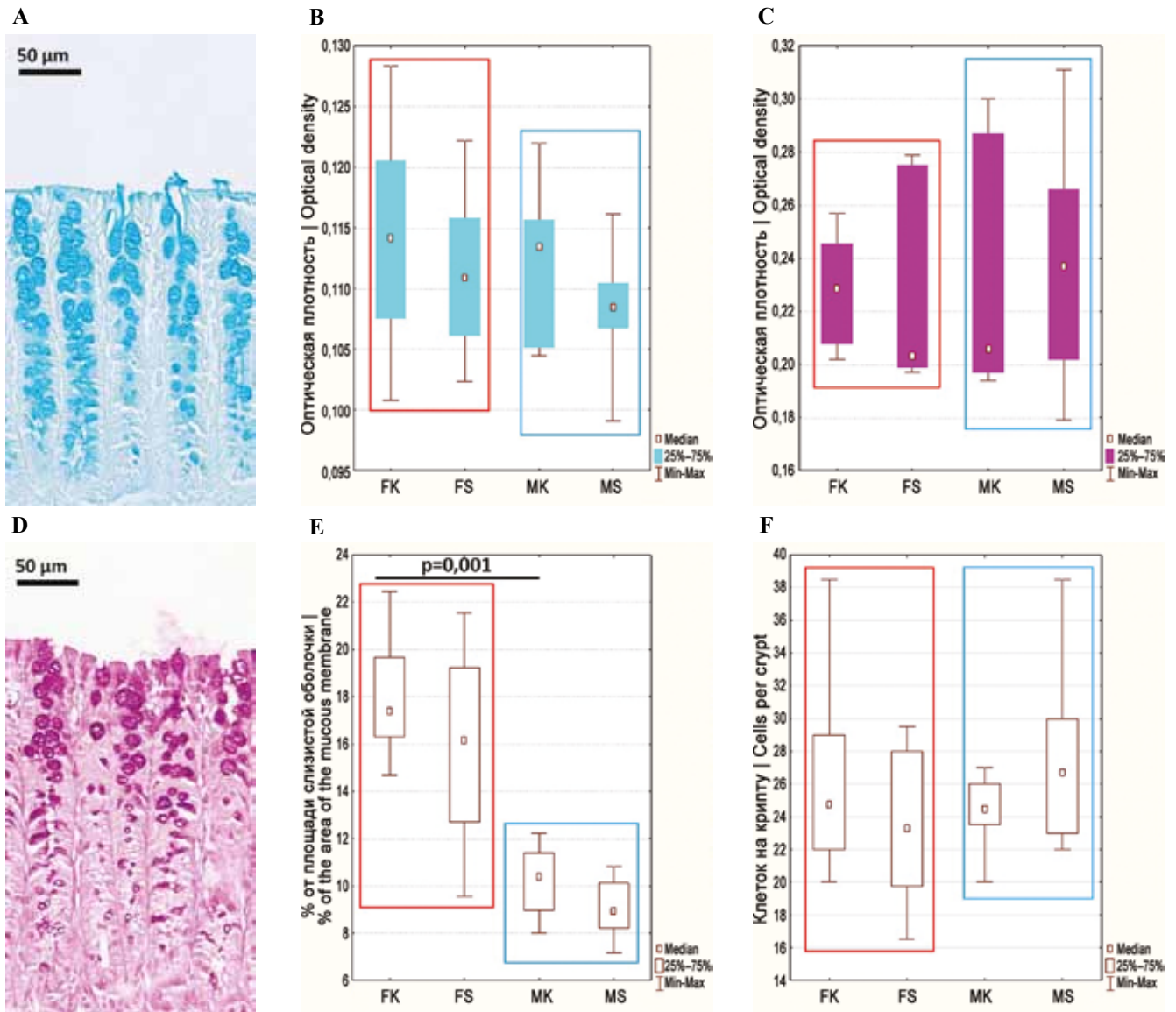


Рис. 7. Бокаловидные клетки в эпителии ободочной кишки мышей, окраска альциановым синим (А) и ШИК-реакция (D). Оптическая плотность бокаловидных клеток на срезах, окрашенных альциановым синим (В), и с ШИК-реакцией (С), объемная доля бокаловидных клеток (Е) и число бокаловидных клеток на крипту (F) у самок и самцов мышей в норме и при холодовом стрессе. FK – самки контроль, FS – самки стресс, МК – самцы контроль, MS – самцы стресс; черной линией соединены группы, между которыми выявлены статистически значимые различия

Fig. 7. Goblet cells in the colon epithelium of mice, Alcian blue stain (A) and PAS-reaction (D). The optical density of goblet cells on sections stained with Alcian blue (B) and with a PAS-reaction (C), the volume fraction of goblet cells (E) and the number of goblet cells per crypt (F) in male and female mice in normal condition and after cold stress. FK – females control, FS – females stress, MK – males control, MS – males stress; the black line connects the groups between which statistically significant differences

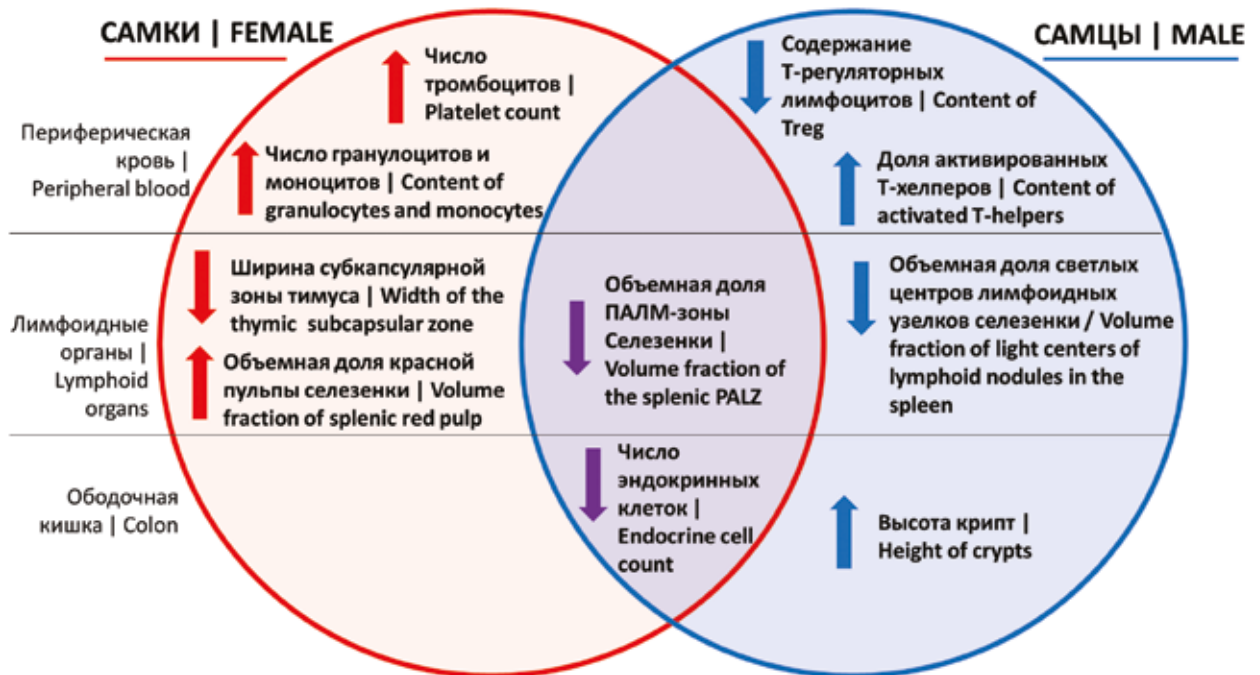


Рис. 8. Изменения в периферической крови, лимфоидных органах и ободочной кишке у половозрелых самцов и самок мышей C57BL/6 при холодном стрессе, вызванном интервальным холодным воздействием в режиме 35-минутных сеансов в течение 14 дней при  $-20^{\circ}$

Fig. 8. Changes in peripheral blood, lymphoid organs, and colon in mature male and female C57BL/6 mice after cold stress caused by intermittent cold exposure for 35-minute sessions for 14 days at  $-20^{\circ}$

бокаловидных клеток выше у самцов мышей, чем у самок. При холодном стрессе исследуемые параметры бокаловидных клеток не изменялись (рис. 7). У мышей при хроническом иммобилизационном стрессе выявлено снижение толщины внутреннего слоя слизи, экспрессии мРНК муцина Muc2 и числа ШИК-позитивных бокаловидных клеток в ободочной кишке [43]. По данным С.О. Абдулаевой [35, 36], число бокаловидных клеток на крипту и их объемная доля в ободочной кишке у самцов мышей C57BL/6 при ежедневном холодном воздействии в течение 9 дней и 21 дня не изменяется, а у самцов мышей Balb/c объемная доля возрастает на 9-е сутки, и число бокаловидных клеток на крипту снижается на 21-е сутки.

Выявленные иммунные реакции и морфофункциональные изменения ободочной кишки при холодном стрессе у самцов и самок мышей C57BL/6 суммированы на рисунке 8.

## Заключение

В литературе сведений о половых различиях лимфоидных органов и толстой кишки у человека и лабораторных грызунов мало. Данные противоречивы, что, вероятно, обусловлено влиянием половых гормонов, уровень которых значительно изменяется в течение менструального цикла у женщин и эстрального цикла у самок животных. Также расхождение данных может быть связано с межвидовыми, межлинейными, возрастными различиями, инфрадианными и сезонными биоритмами.

Несмотря на весьма значительное снижение температуры тела при холодном воздействии, мы наблюдали у самок и самцов мышей умеренные гистологические изменения лимфоидных органов и клеточного состава периферической крови. Эти данные указывают на развитие физиологического стресса у мышей и их высокую устойчивость к использованному нами режиму холодного воздействия. По данным литературы, стрессорные воздействия могут приводить к удлинению крипт, подавлению пролиферации эпителия, изменению числа эндокринных клеток, снижению числа бокаловидных клеток и продукции муцинов в ободочной кишке, однако мы наблюдали только снижение содержания эндокринных клеток у мышей обоего пола и увеличение длины крипт у самцов.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – О.В. Макарова.  
Сбор и обработка материала – Н.А. Золотова, И.С. Цветков, Д.Н. Хочанский, Д.Ш. Джалилова, А.М. Косырева, А.Л. Михайлова, Л.П. Михайлова, О.В. Макарова.  
Написание текста – Н.А. Золотова, А.Л. Михайлова.  
Редактирование – О.В. Макарова, Д.Ш. Джалилова.

## Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – O.V. Makarova.  
Collected the data and performed the analysis – N.A. Zolotova, I.S. Tsvetkov, D.N. Khochanskiy, D.Sh. Dzhaililova, A.M. Kosyryeva, A.L. Mikhailova, L.P. Mikhailova, O.V. Makarova.  
Wrote the paper – N.A. Zolotova, A.L. Mikhailova.  
Edited the manuscript – O.V. Makarova, D.Sh. Dzhaililova.

## Литература/References

- PM Treuting, SM Dintzis, CW Frevert, D Liggitt, HD Liggitt, KS Montine (eds.). Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas. Academic Press, 2012. 461 p.
- Пахомова И.Г. Заболевания толстой кишки: от функциональных расстройств к органической патологии. Медицинский Совет. 2013;5:46–53. DOI: 10.21518/2079-701X-2013-5-46-53. Pakhomova IG. Pathology of the colon: from functional to organic. Medical Council. 2013;5:46–53. DOI: 10.21518/2079-701X-2013-5-46-53 (In Russ.).
- Hadjivasilis A, Tsioutis C, Michalinos A, Ntourakis D, Christodoulou DK, Agouridis AP. New insights into irritable bowel syndrome: from pathophysiology to treatment. Ann Gastroenterol. 2019;32(6):554–64. DOI: 10.20524/aog.2019.0428.
- Bernstein CN. Psychological stress and depression: risk factors for IBD? Dig Dis. 2016;34(1–2):58–63. DOI: 10.1159/000442929.
- Baritaki S, de Bree E, Chatzaki E, Pothoulakis C. Chronic stress, inflammation, and colon cancer: A CRH system-driven molecular crosstalk. J Clin Med. 2019;8(10):1669. DOI: 10.3390/jcm8101669.
- Salleh MR. Life event, stress and illness. Malays J Med Sci. 2008;15(4):9–18.
- Welgan P, Meshkinpour H, Hoehler F. The effect of stress on colon motor and electrical activity in irritable bowel syndrome. Psychosom Med. 1985;47(2):139–49. DOI: 10.1097/00006842-198503000-00005.
- Bangasser DA, Valentino RJ. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. Front Neuroendocrinol. 2014;35(3):303–19. DOI: 10.1016/j.yfrne.2014.03.008.
- Murphy GE. Why women are less likely than men to commit suicide. Compr Psychiatry. 1998;39(4):165–75. DOI: 10.1016/S0010-440X(98)90057-8.
- Matud MP. Gender differences in stress and coping styles. Pers Individ Dif. 2004;37(7):1401–15. DOI: 10.1016/j.paid.2004.01.010.
- Lotter H, Altfeld M. Sex differences in immunity. Semin Immunopathol. 2019;41(2):133–5. DOI: 10.1007/s00281-018-00728-x.
- Ковальзон В.М., Латышкова А.А., Комарова А.Д., Панчин Ю.В. Ритмы активности–покоя и температуры у мышей, нокаутных по гену *Panx1*. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2018;104(11):1325–1330. DOI: 10.1134/S0869813918110067. Kovalzon VM, Latyshkova AA, Komarova AD, Panchin YuV. Rest–activity and body temperature rhythms in *Panx1*. Russian Journal of Physiology. 2018;104(11):1325–1330 (In Russ.). DOI: 10.1134/S0869813918110067.
- Gordon CJ. The mouse: An “average” homeotherm. J Therm Biol. 2012;37(4):286–90. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2011.06.008.
- Petrone P, Asensio JA, Marini CP. Management of accidental hypothermia and cold injury. Curr Probl Surg. 2014;51(10):417–31. DOI: 10.1067/j.cpsurg.2014.07.004.
- Ivanov KP, Arokina NK. Maintenance of the cardiovascular function in a deeply cooled homeothermic organism by physiological methods without external rewarming. Bull Exp Biol Med. 2016;160(4):407–9. DOI: 10.1007/s10517-016-3182-z.
- Graham TE. Thermal, metabolic, and cardiovascular changes in men and women during cold stress. Med Sci Sports Exerc. 1988;20(5 Suppl):S185–92. DOI: 10.1249/00005768-198810001-00017.
- Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. Endocrinol Metab (Seoul). 2013;28(4):288–96. DOI: 10.3803/EnM.2013.28.4.288.
- Zhu P, Zhang ZH, Huang XF, Shi YC, Khandekar N, Yang HQ et al. Cold exposure promotes obesity and impairs glucose homeostasis in mice subjected to a high-fat diet. Mol Med Rep. 2018;18(4):3923–31. DOI: 10.3892/mmr.2018.9382.
- Restell TI, Porfirio LC, de Souza AS, Silva IS. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. Acta Cir Bras. 2014;29(5):306–12. DOI: 10.1590/S0102-86502014000500004.
- He Q, Su G, Liu K, Zhang F, Jiang Y, Gao J et al. Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. PLoS One. 2017;12(12):e0189837. DOI: 10.1371/journal.pone.0189837.
- Лычева Н.А., Шахматов И.И. Общее непреднамеренное переохлаждение как угроза развития тромбоза у крыс. Казанский медицинский журнал. 2014;95(3):385–388. DOI: 10.17816/KMJ1520. Lycheva NA, Shakhmatov II. General casual hypothermia as a threat of thrombosis in rats. Kazan Medical Journal. 2014;95(3):385–388 (In Russ.). DOI: 10.17816/KMJ1520.
- Гао Ю., Постовалова Е.А., Добрынина М.Т., Макарова О.В. Половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов в периферической крови, брыжеечных лимфатических узлах и ободочной кишке при экспериментальном хроническом язвенном колите. Иммунология. 2018;39(1):32–38. DOI: 10.18821/0206-4952. Gao Y, Postovalova EA, Dobrynina MT, Makarova OV. Sex differences of subpopulation composition of lymphocytes in the peripheral blood, mesenteric lymph nodes and colon in experimental chronic ulcerative colitis. Immunology. 2018;39(1):32–38 (In Russ.). DOI: 10.18821/0206-4952.
- Dzhalilova DSh, Kosyreva AM, Tsvetkov IS, Zolotova NA, Mkhitarov VA, Mikhailova LP et al. Morphological and functional peculiarities of the immune system of male and female rats with different hypoxic resistance. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2020;169:825–830. DOI: 10.1007/s10517-020-04989-1.
- Afshan G, Afzal N, Qureshi S. CD4+CD25(hi) regulatory T cells in healthy males and females mediate gender difference in the prevalence of autoimmune diseases. Clin Lab. 2012;58(5–6):567–71. PMID: 22783590.
- Walecki M, Eisel F, Klug J, Baal N, Paradowska-Dogan A, Wahle E et al. Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T-cells. Mol Biol Cell. 2015;26(15):2845–57. DOI: 10.1091/mbc.E14-08-1323.
- Prieto GA, Rosenstein Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T-cells by promoting their proliferation. Immunology. 2006;118:58–65. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2006.02339.x.
- Weinberg A, Enomoto L, Marcus R, Canniff J. Effect of menstrual cycle variation in female sex hormones on cellular immunity and

- regulation. *J Reprod Immunol.* 2011;89(1):70–7. DOI: 10.1016/j.jri.2010.11.009.
28. *Tournier JN, Mathieu J, Mailfert Y, Multon E, Drouet C, Jouan A et al.* Chronic restraint stress induces severe disruption of the T-cell specific response to tetanus toxin vaccine. *Immunology.* 2001;102(1):87–93. DOI 10.1046/j.1365-2567.2001.01152.x.
  29. *Freier E, Weber CS, Nowotne U, Horn C, Bartels K, Meyer S et al.* Decrease of CD4<sup>(+)</sup>FOXP3<sup>(+)</sup> T regulatory cells in the peripheral blood of human subjects undergoing a mental stressor. *Psychoneuroendocrinology.* 2010; 35(5):663–73. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2009.10.005.
  30. *Симонова Е.Ю.* Сравнительная характеристика морфофункционального состояния органов иммунной системы и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови самцов и самок крыс Вистар. *Морфологические ведомости.* 2012;1:60–66.  
*Simonova EYu.* The comparative characteristics of the morphofunctional state of the organs of immune system and lymphocyte subsets in the peripheral blood of male and female Wistar rats. *Morphological Newsletter.* 2012;1:60–66 (In Russ.).
  31. *Gruver AL, Sempowski GD.* Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):915–23. DOI: 10.1189/jlb.0108025.
  32. *Domínguez-Gerpe L, Rey-Méndez M.* Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. *BMC Immunol.* 2001;2:7. DOI: 10.1186/1471-2172-2-7.
  33. *Гармаева Д.К., Белолобская Д.С., Федорова А.И., Аржакова Л.И., Афанасьева О.Г.* Влияние холодового стресса на морфофункциональные показатели тимуса в эксперименте. *Морфологические ведомости.* 2019;27(2):19–23. DOI: 10.20340/mv-mn.19(27).02.19-23.  
*Garmaeva DK, Belolyubskaya DS, Fedorova AI, Arzhakova LI, Afanasyeva OG.* The effect of the cold stress on morphological and functional parameters of the thymus in the experiment. *Morphological Newsletter.* 2019; 27(2):19–23 (In Russ.). DOI: 10.20340/mv-mn.19(27).02.19-23.
  34. *Гао Ю., Добрынина М.Т.* Морфологическая характеристика слизистой оболочки ободочной кишки у половозрелых самцов и самок мышей C57Bl/6. *Журнал анатомии и гистопатологии.* 2015;4(3):36. DOI: 10.18499/2225-7357-2015-4-3-36-36.  
*Gao Y, Dobrynina MT.* Morphological characteristics of the mucous membrane of the colon in adult male and female C57Bl/6 mice. *Journal of Anatomy and Histopathology.* 2015;4(3):36 (In Russ.). DOI: 10.18499/2225-7357-2015-4-3-36-36.
  35. *Абдулаева С.О.* Морфологические изменения слизистой оболочки толстой кишки мышей Balb/c и C57Bl/6 при холодовом воздействии. В сб.: *Материалы конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты».* Москва, 2011. С. 2–4.  
*Abdulaeva SO.* Morphological changes in the colon mucosa of Balb/c and C57Bl/6 mice upon cold exposure. V sb.: *Materialy konferencii «Citomorfometriya v medicine i biologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty».* Moscow, 2011. P. 2–4 (In Russ.).
  36. *Абдулаева С.О.* Морфологическая характеристика слизистой оболочки толстой кишки и микробиоты у мышей Balb/c при адаптации к холодовому воздействию. *Морфологические ведомости.* 2011;2:9–13.  
*Abdulaeva SO.* Morphological characteristics of the intestinal mucosa layer and the change of microflora in balb/c mice during adaptation to cold exposure. *Morphological Newsletter.* 2011;2:9–13 (In Russ.).
  37. *Newmark HL, Lipkin M, Maheshwari N.* Colonic hyperplasia and hyperproliferation induced by a nutritional stress diet with four components of Western-style diet. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(6):491–6. DOI: 10.1093/jnci/82.6.491.
  38. *Zhou W, Suriyavirun N, Dailey MJ.* Sex differences in intestinal epithelial crypt cell proliferation. *FASEB J.* 2017;31(1S):878.2. DOI: 10.1096/fasebj.31.1\_supplement.878.2.
  39. *Tutton PJ, Barkla DH.* Steroid hormones as regulators of the proliferative activity of normal and neoplastic intestinal epithelial cells (review). *Anticancer Res.* 1988;8(3):451–6. PMID: 3291747.
  40. *Dzaililova DS, Diatroptova MA, Mkhitarov VA, Diatroptov ME.* Infradian rhythms of resistance to a dissociative anesthetic in Wistar male rats under normal conditions and after surgical removal of the adrenal glands and testes. *Bull Exp Biol Med.* 2019;166(3):413–6. DOI: 10.1007/s10517-019-04362-x.
  41. *Kaushik S, Kaur J.* Effect of chronic cold stress on intestinal epithelial cell proliferation and inflammation in rats. *Stress.* 2005;8(3):191–7. DOI: 10.1080/10253890500245953.
  42. *Hori T, Wanibuchi H, Yano Y, Otani S, Nishikawa A, Osugi H et al.* Epithelial cell proliferation in the digestive tract induced by space restriction and water-immersion stress. *Cancer Lett.* 1998;125(1–2):141–8. DOI: 10.1016/s0304-3835(97)00504-1.
  43. *Gao X, Cao Q, Cheng Y, Zhao D, Wang Z, Yang H et al.* Chronic stress promotes colitis by disturbing the gut microbiota and triggering immune system response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115(13):E2960–E2969. DOI: 10.1073/pnas.1720696115.

### Информация об авторах

Наталья Александровна Золотова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Иван Сергеевич Цветков – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Дмитрий Николаевич Хочанский – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Джулия Шавкатовна Джалилова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Анна Михайловна Косырева – доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейроморфологии НИИ морфологии человека.

Александра Лэовна Михайлова – студентка 4-го курса биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Лилия Петровна Михайлова – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Ольга Васильевна Макарова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека; профессор биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

### Author information

Natalya A. Zolotova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0119-9889>

Ivan S. Tsvetkov – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0003-0946-1105>

Dmitry N. Khochanskiy – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-7153-6828>

Dzhuliia Sh. Dzhailova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-1337-7160>

Anna M. Kosyreva – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Neuromorphology, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-6182-1799>

Alexandra L. Mikhailova – 4<sup>th</sup> year Student, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University.

<https://orcid.org/0000-0003-4022-6058>

Lilia P. Mikhailova – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0479-8684>

Olga V. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology; Professor of the Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University.

<https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>



## Наблюдение тафтинг-энтеропатии: течение, сложности морфологической диагностики

*Т.А. Гаркуша<sup>1,2</sup>, С.В. Гаппоев<sup>1,2</sup>, В.А. Хоржевский<sup>1,2</sup>, Л.Г. Левкович<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> КГБУЗ Красноярское краевое патологоанатомическое бюро, Красноярск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Россия

Тафтинг-энтеропатия (ТЭ) – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, в клинике проявляющееся диареей, начинающейся в неонатальном периоде. Впервые болезнь описана в 1994 году Р.М. Райфеном с соавторами. Этиологией данного заболевания являются мутации в гене молекулы клеточной адгезии ЕpСAM. Морфологически при ТЭ выявляют изменения эпителия кишечника, где в первую очередь поражаются поверхностные энтероциты, формирующие «пучки». На ультраструктурном уровне тафтинг-энтеропатия характеризуется увеличением длины и числа десмосом. В работе приведено наблюдение ТЭ у ребенка 3 месяцев, диагностированной на основании клинико-морфологических сопоставлений с применением электронной микроскопии. Диарейный синдром развился у пациента со вторых суток жизни и сохранялся независимо от энтерального питания с нарастанием эксикоза.

**Ключевые слова:** тафтинг-энтеропатия, диарея, десмосома, энтероцит, микроворсинки

**Для корреспонденции:** Татьяна Андреевна Гаркуша. E-mail: sapfiradricula@yandex.ru

**Для цитирования:** Гаркуша Т.А., Гаппоев С.В., Хоржевский В.А., Левкович Л.Г. Наблюдение тафтинг-энтеропатии: течение, сложности морфологической диагностики. Клин. эксп. морфология. 2020;9(4):65–70. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.65-70.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

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

**Статья поступила** 30.06.2020. **Получена после рецензирования** 31.08.2020. **Принята в печать** 26.10.2020.

## Case report of tufting-enteropathy: course of the disease, complexity of morphological diagnosis

*T.A. Garkusha<sup>1,2</sup>, S.V. Gappoev<sup>1,2</sup>, V.A. Khorzhevskii<sup>1,2</sup>, L.G. Levkovich<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Krasnoyarsk regional pathoanatomical bureau, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup> V.F. Voyno-Yasensky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Tufting enteropathy (TE) is a rare autosomal recessive disease characterized by diarrhea starting in the neonatal period. This disease was first described in 1994 by Reifen R.M. et al. The disease is caused by mutations in the cell adhesion molecule EpcAM. TE is characterized by alterations in the intestinal epithelium: surface enterocytes are primarily affected, and they form tufts. At the ultrastructural level, this disease is characterized by an increase in the length and number of desmosomes.

This paper presents a clinical case of TE in a 3-month-old boy who was diagnosed based on clinical and morphological, electron microscopy findings. Diarrheal syndrome developed in the patient from the second day of life and persisted regardless of enteral nutrition and led to severe exsiccosis.

**Keywords:** tufting enteropathy, diarrhea, desmosome, enterocyte, microvilli

**Corresponding author:** Tatyana A. Garkusha. E-mail: sapfiradricula@yandex.ru

**For citation:** Garkusha T.A., Gappoev S.V., Khorzhevskii V.A., Levkovich L.G. Case report of tufting-enteropathy: course of the disease, complexity of morphological diagnosis. Clin. exp. morphology. 2020;9(4): 65–70 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.4.65-70.

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

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

**Received** 30.06.2020. **Received in revised form.** 31.08.2020. **Accepted** 26.10.2020.

Тафтинг-энтеропатия (ТЭ) – редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся диареей, начинающейся в неонатальном периоде [1–3]. Впервые описали болезнь R.M. Reifen et al. в 1994 году [4]. За-

болеваемость в странах Западной Европы, по расчетным данным, составляет около 1:50 000–100 000 новорожденных [1, 3, 5–7]. Этиологическим фактором заболевания считаются различные мутации в гене

молекулы клеточной адгезии ЕpСAM [1–3, 5–8], большинство из которых становится причиной отсутствия трансмембранного домена ЕpСAM и ведет к нарушению межклеточного взаимодействия. Основными клиническими проявлениями ТЭ являются секреторная диарея, начинающаяся в первые дни и недели жизни, нарушение всасывающей функции кишечника [1, 3, 5]. Диарея ведет к эксикозу и нарушению водно-электролитного баланса, что может служить причиной смерти новорожденных, страдающих ТЭ [1, 5, 8].

При гистологическом исследовании ТЭ проявляется изменением эпителия тонкой и толстой кишки, где в первую очередь поражаются поверхностные энтероциты с парциальной или тотальной атрофией микроворсинок [1–3, 6, 7]. Дезорганизованные энтероциты формируют «пучки», представленные прилежащими друг к другу клетками с округлой апикальной поверхностью, что придает им вид капли [1–3, 6, 7]. В части случаев имеют место аномалии базальной мембраны [3, 5], гиперплазия и ветвление крипт [1, 5, 8]. Некоторые авторы отмечают наличие клеток воспаления в собственной мышечной пластинке слизистой оболочки без распространения на эпителий [2, 5, 8].

При ТЭ обнаруживаются структурные и количественные изменения десмосом энтероцитов. Характерным для заболевания является увеличение длины десмосом до 0,7 мкм в сравнении с нормой (0,2–0,3 мкм). Число десмосом в апикальной части соседних энтероцитов увеличено до 4–8 в сравнении с образцами нормальной кишки (1–2 десмосомы) [3, 5]. Определяемые при гистологическом исследовании «пучки»

энтероцитов ультраструктурно представлены соединенными клетками с атипичными округлыми контурами клеточной мембраны, на которой определяются редкие микроворсинки. Имеются и менее характерные черты, такие как уменьшение высоты микроворсинок, появление в цитоплазме энтероцитов микровиллезных включений [8].

Диагностика ТЭ требует исключения целого ряда болезней кишечника, в том числе заболеваний инфекционного характера, врожденных ферментопатий, аутоиммунной энтеропатии (АЭ) и болезни микровиллезных включений (БМВ) (табл. 1).

Большие сложности вызывает дифференциальная диагностика между ТЭ, БМВ и АЭ, поскольку данные заболевания могут иметь сходные морфологические проявления и часто требуют электронной микроскопии. При ее проведении БМВ характеризуется наличием в энтероцитах специфических включений, имеющих округлую форму, с большим количеством прямых микроворсинок. При этом число и длина десмосом соответствуют норме.

Приводим наблюдение пациента с ТЭ, диагностика которой потребовала комплексного подхода с применением электронной микроскопии.

Пациент А., возраст – 3 месяца, родился доношенным, масса 3410 граммов. Со вторых суток жизни у ребенка появилась выраженная диарея с потерей в весе к четвертым суткам 400 граммов. С третьих суток отмечался метаболический ацидоз. Диарейный синдром сохранялся независимо от энтерального питания. После каждой попытки введения лечебной энтеральной

Таблица 1 | Table 1

**Дифференциальная диагностика энтеропатий новорожденных по морфологическим критериям | Differential diagnosis of neonatal enteropathy according to morphological criteria**

| Заболевание   Disease  | Световая микроскопия   Light microscopy  | Дополнительные методы исследования   Additional methods  |
|--|--|--|
| Тафтинг-энтеропатия   Tufting enteropathy                        | «Пучки» поверхностных энтероцитов   Tufts of surface enterocytes<br>Каплевидная форма энтероцитов   Teardrop-shaped enterocytes<br>AM   VA<br>Расширение и аномальное ветвление крипт   Expansion and anomalous branching of crypts<br>Утолщение базальной мембраны   Thickening of the basement membrane<br>ОВИСПСО   NIILPM<br>ОВЭЛ   NIEL | Аномальное осаждение ламинина и гепаринсульфата   Abnormal precipitation of laminin and heparin sulfate<br>Увеличение десмоглеина   Increased of desmoglein<br>Аномальное распределение интегрин a2b1   Anomalous a2b1 integrin distribution<br>Снижение экспрессии ЕpСAM   Reduced ЕpСAM expression<br>Увеличение длины и числа десмосом   The increase in the length and number of desmosomes<br>Могут быть обнаружены микровиллезные включения   Microvillus inclusions may be detected |
| Болезнь микровиллезных включений   Microvillus Inclusion Disease | AM   VA<br>Гиперплазия или гипоплазия крипт   Crypt hyperplasia or hypoplasia<br>Вакуоли в апикальной части клетки   Vacuoles in the apical part of the cell<br>PAS-позитивные включения в апикальной части клеток   PAS-positive inclusions in the apical part of cells<br>ОВИСПСО   NIILPM<br>ОВЭЛ   NIEL                                  | CD10-позитивные включения в апикальной части клеток   CD10-positive inclusions in the apical part of cells<br>Микровиллезные включения в апикальной части клетки, выстланные нормальными микроворсинками   Microvillus inclusions in the apical part of the cell lined with normal microvilli  |

Таблица 1. Окончание | End of Table 1

| Заболевание   Disease  | Световая микроскопия   Light microscopy   | Дополнительные методы исследования   Additional methods   |
|--|---|---|
| Энтероэндокринная аплазия   Enteroendocrine cell dysgenesis (Enteric anendocrinosiс) | Нормальная слизистая оболочка   Normal mucosa<br>AM   VA<br>ОВИСПСО   NILPM<br>ОВЭЛ   NIEL  | Отсутствуют энтероэндокринные клетки, экспрессирующие Chromogranin A   No enteroendocrine cells expressing Chromogranin A<br>Нормальные микроворсинки   Normal microvilli   |
| Аутоиммунная энтеропатия   Autoimmune enteropathy                                    | AM   VA<br>Гиперплазия крипт   Crypt hyperplasia<br>ВИСПСО   IILPM<br>Воспалительное разрушение эпителия крипт кишечника с наличием фигур апоптозов   Inflammatory destruction of the intestinal crypt epithelium with apoptotic figures<br>ВЭЛ   IEL<br>Могут присутствовать признаки аутоиммунного гастрита и колита   Autoimmune gastritis and colitis features may be present<br>Потеря энтероэндокринных клеток и клеток Панета   Loss of enteroendocrine cells and Paneth cells | Позитивный тест на циркулирующие антитела к энтероцитам   Positive test for circulating antibodies to enterocytes<br>Позитивная реакция иммунофлуоресценции с антителами к энтероцитам   Positive immunofluorescence reaction with anti-enterocyte antibodies                                       |
| Селективный дефицит IgA   Selective immunoglobulin A deficiency                      | AM   VA<br>Гиперплазия крипт   Crypt hyperplasia<br>ВИСПСО   IILPM<br>ВЭЛ   IEL   | Снижение сывороточного IgA при нормальном или повышенном уровне иммуноглобулинов сыворотки   Decreased serum IgA with normal or elevated serum immunoglobulins<br>В слизистой оболочке отсутствуют плазматические клетки, секретирующие IgA   There are no IgA secreting plasma cells in the mucosa |
| Врожденный дискариоз   Dyskariosis congenital  | Очагово крипты отсутствуют   Focal crypts are absent<br>Увеличение апоптоза в клетках эпителия   Increased apoptosis in the epithelial cells<br>Отсутствие плазматических клеток   No plasma cells<br>AM   VA<br>ВЭЛ   IEL<br>Атрофия желез   Gland atrophy   | Наличие мутации в генах <i>DKC1, ACD, CTC1, NHP2, NOP10, PARN, RTEL1, TERC, TERT, TINF2, WRAP53</i>   Mutations in <i>DKC1, ACD, CTC1, NHP2, NOP10, PARN, RTEL1, TERC, TERT, TINF2, WRAP53</i> genes  |

AM – атрофия микроворсинок, ОВИСПСО – отсутствует воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки, ОВЭЛ – отсутствуют внутриэпителиальные лимфоциты, ВИСПСО – воспалительная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки, ВЭЛ – внутриэпителиальные лимфоциты

VA – Villous atrophy, NILPM – no inflammatory infiltration of the lamina propria of the mucosa, NIEL – no intraepithelial lymphocytes, IILPM – inflammatory infiltration of the lamina propria of the mucosa, IEL – intraepithelial lymphocytes

смеси состояние ребенка ухудшалось: появлялась диарея (в среднем восемь раз в сутки, стул периодически содержал много воды), нарастал эксикоз, появлялся метаболический ацидоз, заострились черты лица. Любая попытка энтеральной регидратации приводила к усилению диареи. Отсутствие терапевтического эффекта от проводимого лечения дало основание заподозрить в клинике наследственный фактор заболевания. Для уточнения морфологических изменений был выполнен забор фрагмента тонкой кишки не только для рутинного гистологического исследования, но и для электронной микроскопии как метода оценки возможных ультраструктурных повреждений, которые могут не определяться при других методах.

В препаратах тонкой кишки, окрашенных гематоксилином и эозином, имеются характерные «пучки», представленные группой поверхностных энтероцитов с округлой апикальной частью клетки (рис. 1 А и 1 В), парциальная атрофия микроворсинок. Базальная мембрана поверхностного эпителия утолщена, при трихромной окраске по Массону утолщенная базальная мембрана окрашена гомогенно в голубой цвет (рис. 1 С).

При проведении просвечивающей электронной микроскопии число межклеточных десмосом составляет от трех до шести в апикальной части соседних клеток, имеются аномалии десмосом в виде инвагинатов в сторону цитоплазмы одной из клеток. Длина десмо-

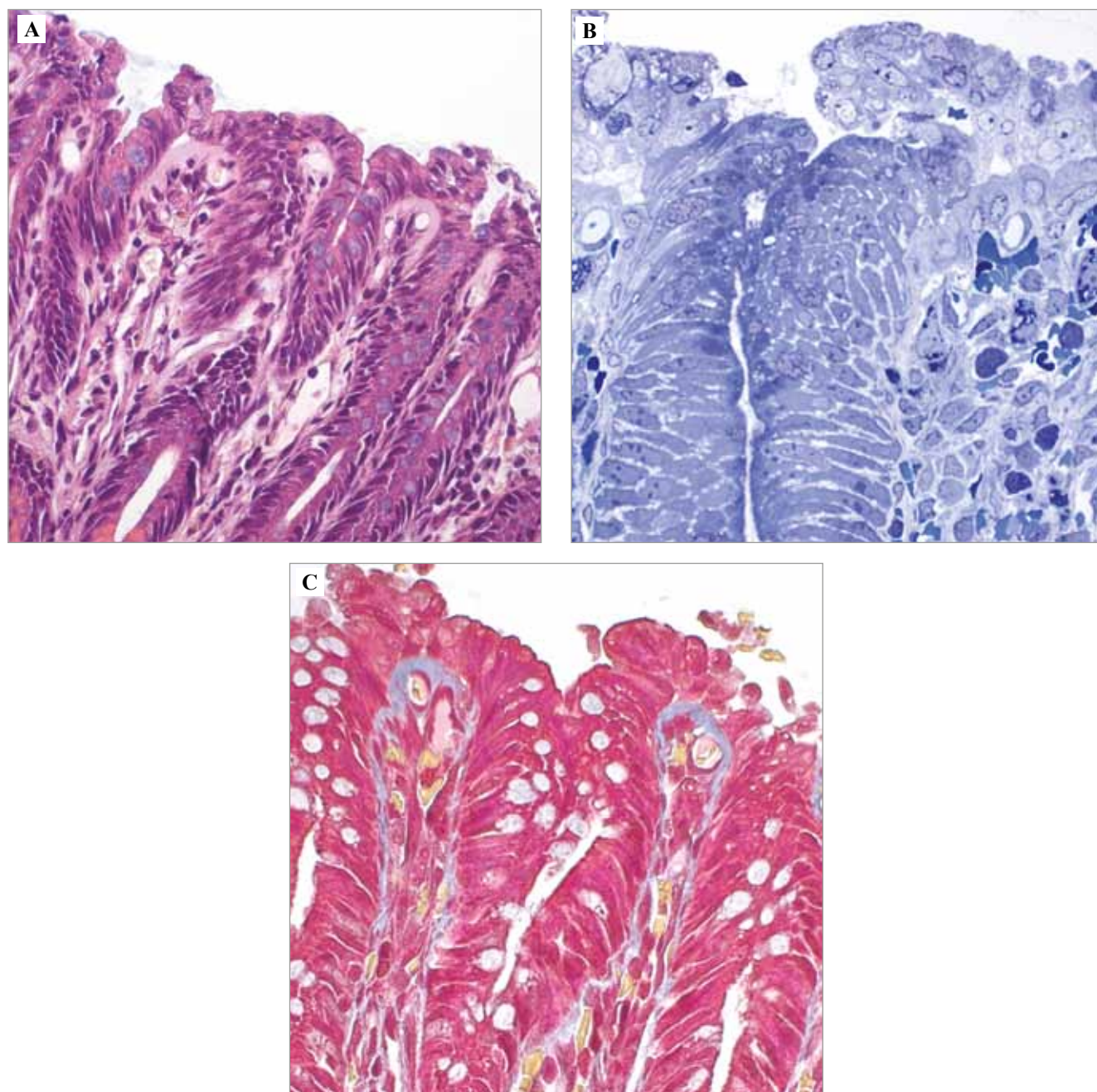


Рис. 1. Морфологические особенности эпителия тонкой кишки при ТЭ.

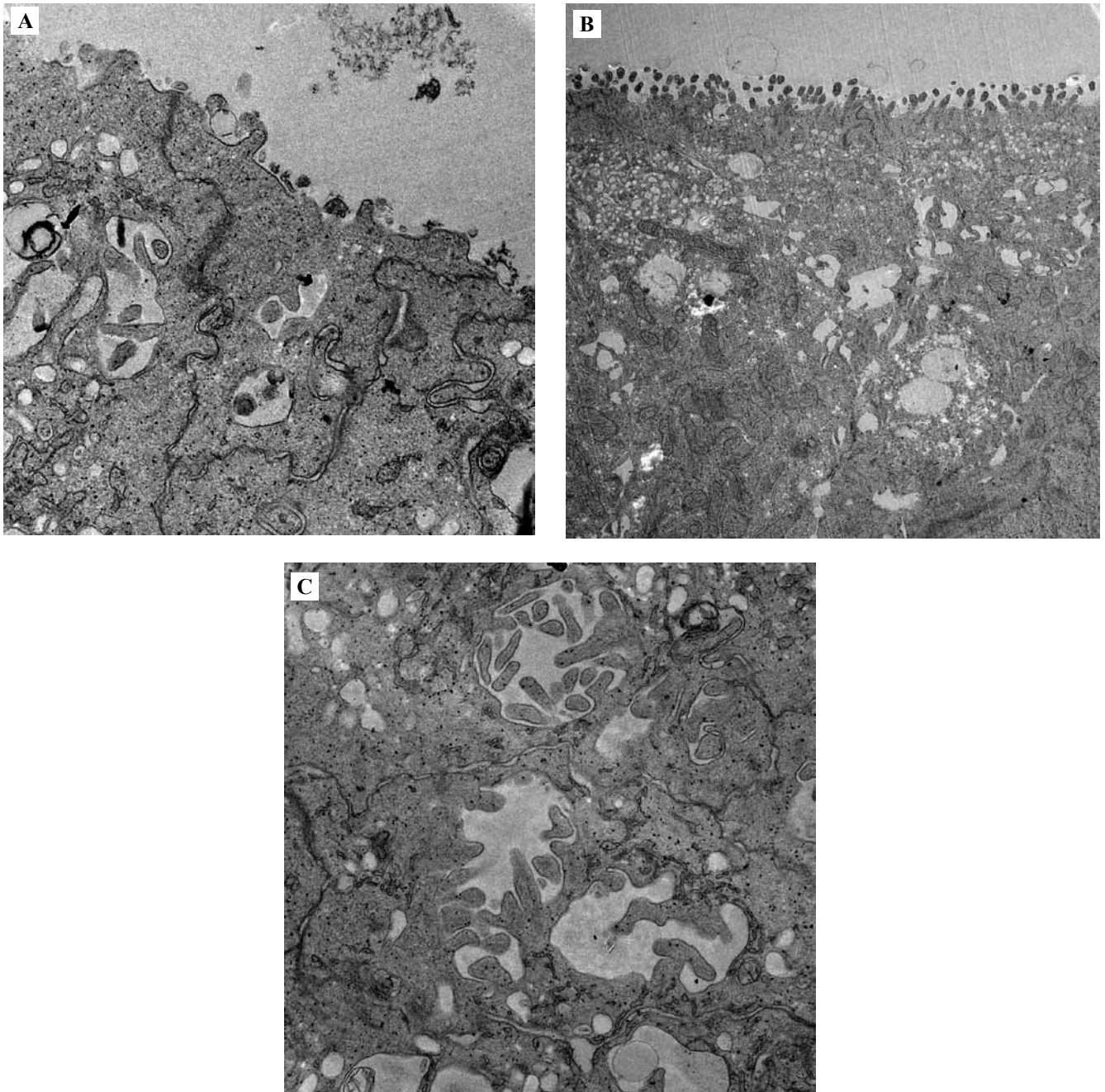
А – «пучки» поверхностных энтероцитов, базальная мембрана поверхностных энтероцитов утолщена, В – «пучок» поверхностных энтероцитов, базальная мембрана поверхностных энтероцитов утолщена, С – базальная мембрана поверхностных энтероцитов утолщена, равномерно голубого цвета, «пучки» поверхностных энтероцитов. А – окраска гематоксилином и эозином, ×630, В – полутонкие срезы, окраска толуидиновым синим, ×630, С – трихромная окраска по Массону, ×630

Fig. 1. Morphological features of the small intestine epithelium in TE.

А – tufts of surface enterocytes, the basement membrane of the surface enterocytes is thickened, В – tuft of surface enterocytes, the basement membrane is thickened, С – the basement membrane of the surface enterocytes is thickened, uniformly blue in color, the tufts of surface enterocytes. А – H&E stain, ×630, В – semifine sections, toluidine blue stain, ×630, С – trichrome Masson stain, ×630

сом варьирует в диапазоне от 0,029 мкм до 0,702 мкм (рис. 2 А). На апикальной поверхности цитолеммы поверхностных энтероцитов обнаруживаются короткие деформированные микроворсинки (рис. 2 В). Наблюда-

ется большое количество поверхностных энтероцитов, лишенных микроворсинок; единичные клетки имеют округлую форму. В части клеток определяются микровиллезные включения (рис. 2 С).



*Рис. 2.* Ультраструктурные особенности эпителия тонкой кишки при ТЭ.

А – число и длина десмосом увеличены, имеется аномальная десмосома, атрофия микроворсинок,  
 В – микроворсинки энтероцитов короткие и деформированные, в цитоплазме определяется большое количество вакуолей, С – в цитоплазме энтероцитов определяются микровиллезные включения, много вакуолей.  
 Электронномикроскопические снимки; контрастирование уранил ацетатом и цитратом свинца;  
 Zeiss, Libra 120. А –  $\times 8000$ , В –  $\times 1985$ , С –  $\times 6300$

*Fig. 2.* Ultrastructural features of the small intestine epithelium in TE.

А – increased number and length of desmosomes, there is an abnormal desmosome present, atrophy of microvilli,  
 В – enterocyte microvilli are short and deformed; large number of vacuoles in the cytoplasm,  
 С – microvillous inclusions, large number of vacuoles in the enterocyte cytoplasm.  
 Electron microscopic images; contrast: uranyl acetate and plumbum citrate; Zeiss, Libra 120.  
 А –  $\times 8000$ , В –  $\times 1985$ , С –  $\times 6300$

## Заключение

Тафтинг-энтеропатия представляет собой редкое аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся диареей, манифестирующее в неонатальном периоде. При установлении диагноза необходимо проводить дифференциальную диагностику с целым рядом болезней.

При гистологическом исследовании в представленном случае обнаруживались «пучки» поверхностных энтероцитов, апикальная поверхность клеток «пучков» имела округлую форму. Электронномикроскопическое исследование выявило увеличение числа и длины десмосом, а также их аномальные варианты. Данные изменения являются характерными для тафтинг-энтеропатии.

Описанный случай демонстрирует возможности электронной микроскопии при дифференциальной диагностики редких форм энтеропатий у детей.

## Литература/References

1. Sivagnanam M, Muller JL, Lee H, Chen Z, Nelson SF, Turner D et al. Identification of EpCAM as the Gene for Congenital Tufting Enteropathy. *Gastroenterology*. 2008;135(2):429–37. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.05.036.
2. Gerada J, De Gaetano J, Sebire NJ, Hill S, Vassallo M, Attard TM. Mucosal Inflammation as a Component of Tufting Enteropathy. *Immuno-Gastroenterology*. 2013;2(1):62–7. DOI: 10.7178/ig.33.
3. Ko JS, Seo JK, Shim JO, Hwang SH, Park HS, Kang GH. Tufting Enteropathy With EpCAM Mutations in Two Siblings. *Gut Liver*. 2010;4(3):407–10. DOI: 10.5009/gnl.2010.4.3.407.
4. Reifen RM, Cutz E, Griffiths A-M, Ngan BY, Sherman PM. Tufting Enteropathy: A Newly Recognized Clinicopathological Entity Associated With Refractory Diarrhea in Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994;18(3):379–85. DOI: 10.1097/00005176-199404000-00022.
5. Pêgas KL, Cambruzzi E, Ferrelli RS, Da Silva CS, Guedes RR, Adami M et al. Tufting Enteropathy With EpCAM Mutation: Case Report. *Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine*. 2014;50(3):234–7. DOI: 10.5935/1676-2444.20140021.
6. Carneiro P, Chaves A, Ensari (eds.). *Encyclopedia of Pathology: Pathology of the Gastrointestinal Tract*. Cham: Springer, 2017. 662 p. DOI: 10.1007/978-3-319-40560-5.
7. Odze RD, Goldblum JR. *Odze and Goldblum Surgical Pathology of the GI Tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas*. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. 1632 p.
8. Ranganathan S, Schmitt LA, Sindhi R. Tufting Enteropathy Revisited: The Utility of MOC31 (EpCAM) Immunohistochemistry in Diagnosis. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(2):265–72. DOI:10.1097/pas.000000000000106.

## Информация об авторах

Татьяна Андреевна Гаркуша – врач-патологоанатом Красноярского краевого патологоанатомического бюро, ассистент кафедры патологической анатомии им. проф. П.Г. Подзолкова КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Станислав Витальевич Гаппоев – заведующий лабораторией электронной и иммунофлуоресцентной микроскопии, врач-патологоанатом Красноярского краевого патологоанатомического бюро, ассистент кафедры патологической анатомии им. проф. П.Г. Подзолкова КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Владимир Алексеевич Хоржевский – кандидат медицинских наук, заместитель главного врача Красноярского краевого патологоанатомического бюро, заведующий кафедрой патологической анатомии им. проф. П.Г. Подзолкова КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

Любовь Геннадьевна Левкович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии им. проф. П.Г. Подзолкова КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого.

## Author information

Tatyana A. Garkusha – Pathologist, Krasnoyarsk regional pathoanatomical bureau; Teaching assistant, P.G. Podzolkov Pathology Department, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-3343-6973>

Stanislav V. Gappoev – Head of the Laboratory of the Electron and Immunofluorescence Microscopy, Pathologist, Krasnoyarsk regional pathoanatomical bureau; Teaching assistant, P.G. Podzolkov Pathology Department, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University. <https://orcid.org/0000-0001-6789-4860>

Vladimir A. Khorzhevskii – Cand. Sci. (Med.), Deputy Chief of the Krasnoyarsk regional pathoanatomical bureau; Head of the P.G. Podzolkov Pathology Department, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-9196-7246>

Lubov G. Levkovich – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, P.G. Podzolkov Pathology Department, V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University. <https://orcid.org/0000-0001-8379-2522>

## Кардиопульмональный транстиретиновый амилоидоз

*З.В. Гюева, А.А. Епхийев*

ФГБОУ ВО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, Владикавказ, Россия

Основным органом-мишенью при транстиретиновом амилоидозе дикого типа (ATTRwt) является сердце. В последние годы, согласно результатам аутопсийных исследований, вовлечение легких в патологический процесс происходит намного чаще, чем диагностируется прижизненно. Ввиду отсутствия специфических клинических признаков и наличия у пожилых пациентов множества сопутствующих патологий в большинстве случаев диагноз устанавливается на поздних стадиях заболевания или пропускается вовсе. В результате ATTRwt-амилоидоз становится недооцененной причиной заболеваемости и смертности у пациентов старшей возрастной группы. В статье представлено клиническое наблюдение пациентки 88 лет с генерализованным транстиретиновым амилоидозом с преимущественным поражением сердца и легких. Отражены сложности прижизненной диагностики данного типа амилоидоза, обусловленные отсутствием амилоидных отложений в биоптатах прямой кишки и подкожной жировой клетчатки. Особенностью наблюдения стало расхождение клинического и патологоанатомического диагнозов.

**Ключевые слова:** транстиретиновый амилоидоз дикого типа, амилоидоз сердца, амилоидоз легких, старческий амилоидоз, хроническая сердечная недостаточность

**Для корреспонденции:** Зарина Владиславовна Гюева. E-mail: gioeva\_z@mail.ru

**Для цитирования:** Гюева З.В., Епхийев А.А. Кардиопульмональный транстиретиновый амилоидоз. Клини. эксп. морфология. 2020;9(4):71–76. DOI:10.31088/CEM2020.9.4.71-76.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

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

Статья поступила 16.09.2020. Получена после рецензирования 19.10.2020. Принята в печать 26.10.2020.

## Cardiopylmonary transthyretin amyloidosis

*Z.V. Gioeva, A.A. Ephiev*

North Ossetian State Medical Academy of the Ministry of Health of Russia, Vladikavkaz, Russia

Wild type transthyretin amyloidosis (ATTRwt) affects a number of target organs, most commonly the heart. Over the last years, autopsy findings revealed that the lungs are involved in the pathological process more frequently than diagnosed in premortem cases.

Due to the nonspecific nature of ATTRwt clinical manifestations and the presence of multiple concomitant conditions in elderly people, the majority of patients are diagnosed at a late stage or the disease is overlooked.

As a result, ATTRwt has emerged as a previously underestimated cause of morbidity and mortality in the older age group. This article presents a clinical case report describing an 88-year-old female patient with generalized transthyretin amyloidosis characterized by predominant cardiac and pulmonary involvement. The paper elucidates the difficulties associated with premortem diagnosis of this type of amyloidosis which include the absence of amyloid deposits in biopsy specimens from the rectum and subcutaneous fat. The specific information in this case report is focused on the discrepancy between clinical and autopsy diagnosis.

**Keywords:** wild type transthyretin amyloidosis, cardiac amyloidosis, pulmonary amyloidosis, senile amyloidosis, chronic heart failure

**Corresponding author:** Zarina V. Gioeva. E-mail: gioeva\_z@mail.ru

**For citation:** Gioeva Z.V., Ephiev A.A. Cardiopylmonary transthyretin amyloidosis. Clin. exp. morphology. 2020;9(4):71–76 (In Russ.). DOI:10.31088/CEM2020.9.4.71-76.

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

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

Received 16.09.2020. Received in revised form 19.10.2020. Accepted 26.10.2020.

В практической медицине прижизненная диагностика кардиопульмонального амилоидоза вызывает определенные сложности ввиду обширной клинической симптоматики. Поражение сердца может проявляться в широком диапазоне: от очаговых изменений на ЭКГ у пациентов, не имеющих симптомов, до признаков застойной сердечной недостаточности, аритмий или фибрилляции желудочков. Такое разнообразие подчас приводит к ошибочной диагностике ишемической болезни сердца, кардиомиопатий, инфильтративных или воспалительных заболеваний миокарда. Зачастую при кардиопульмональном амилоидозе встречается диффузно-интерстициальная форма поражения легких, что также затрудняет диагностику из-за того, что клинкорентгенологическая картина выглядит как проявления хронической сердечной недостаточности.

Одновременное поражение сердца и легких наиболее характерно для системного AL-амилоидоза, причем AL-лямбда амилоид обнаруживается чаще, чем AL-каппа. Тем не менее в последние годы во время аутопсий у людей старческого возраста и долгожителей все чаще встречаются случаи обнаружения транстретинового амилоида в сердце с вовлечением легких в патологический процесс. Транстретиновый амилоидоз у пожилых пациентов с преимущественным поражением сердца раньше называли сенильным системным амилоидозом, но в соответствии с классификацией, предложенной Международным обществом по изучению амилоидоза в 2016 году, его следует классифицировать как транстретиновый амилоидоз с отложением белка дикого типа – ATTRwt [1]. Заболевание развивается в результате структурной нестабильности транстретина, приводящей к образованию неправильно свернутых промежуточных его форм. В дальнейшем происходят их агрегация и формирование амилоидных отложений. Сердце является основным органом-мишенью при ATTRwt, поэтому у большинства пациентов развивается медленно прогрессирующая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса левого желудочка. Другими клиническими проявлениями данного типа амилоидоза могут быть развитие синдрома карпального канала, стеноз поясничного отдела позвоночного канала, которые появляются за 10–15 лет до развития симптомов поражения сердца [2].

В современной медицине для диагностики различных типов амилоидоза используется много разных лабораторно-инструментальных исследований, но самым достоверным является биопсия пораженного органа. Однако в случае поражения сердца или легких данная манипуляция небезопасна для пациента и требует наличия в лечебном учреждении соответствующих технологий, а также специалистов. При подозрении на системный амилоидоз часто проводят аспирационную биопсию подкожно-жировой клетчатки, но данный метод информативен в основном для кардиопатического AL амилоидоза, а при ATTRwt он достоверен лишь в 15% случаев [3]. При обнаружении амилоида

в биоптатах, окрашенных конго красным, необходимо его дальнейшее типирование для подбора правильной тактики лечения. В последние годы для типирования амилоидоза в специализированных лабораториях используют масс-спектрометрию, иммуноэлектронную микроскопию, но в рутинной диагностике более распространенным методом является иммуногистохимическое типирование с использованием моно- и поликлональных антител к белкам – предшественникам амилоида [4].

Представленное нами клиническое наблюдение подтверждает сложности прижизненной диагностики ATTRwt.

Пациентка В., 88 лет, была госпитализирована 28 октября 2019 года в кардиологическое отделение Республиканской клинической больницы с клиникой декомпенсированной сердечной недостаточности. В анамнезе артериальная гипертензия в течение 35 лет, хроническая обструктивная болезнь легких с развитием *Cop pulmonale*, снижение массы тела на 10 кг за последние два года. В течение предшествующих семи лет пациентка неоднократно госпитализировалась в кардиологическое отделение с признаками прогрессирующей сердечной недостаточности. Шесть месяцев назад, во время последнего пребывания в клинике, ввиду отсутствия должного эффекта от проводимой терапии хронической сердечной недостаточности и наличия характерных для амилоидоза сердца признаков на ЭхоКГ (увеличение предсердий, уплотнение створок митрального и трикуспидального клапанов, утолщение стенок левого желудочка, перикардальный выпот, легочная гипертензия) у пациентки взяли биопсию прямой кишки и подкожной жировой клетчатки. Тем не менее амилоидные отложения ни в одном из биоптатов не были обнаружены. От биопсии сердца ввиду возраста пациентки и опасности осложнений родственники отказались.

Настоящая госпитализация была обусловлена длительным приступом стенокардии, не купирующимся после приема нитроглицерина. Несмотря на проводимую интенсивную терапию, состояние пациентки ухудшалось, нарастала бивентрикулярная недостаточность, развился отек головного мозга, что и стало причиной смерти. Заключительный клинический диагноз: «Два основных заболевания. 1) Гипертоническая болезнь III стадии; ишемическая болезнь сердца; атеросклеротический кардиосклероз; острый инфаркт миокарда. 2) Хроническая обструктивная болезнь легких в стадии обострения. Осложнения заболеваний: бивентрикулярная хроническая сердечная недостаточность III стадии, хроническое легочное сердце в стадии декомпенсации, анасарка, отек головного мозга».

На патологоанатомическом вскрытии: труп женщины астенического телосложения с выраженными отеками верхних и нижних конечностей. В левой плевральной полости около 400 мл прозрачной желтоватой жидкости, в правой – около 300 мл. В брюшной



полости такого же вида жидкое содержимое – около 1100 мл. Сердечно-сосудистая система: в околосердечной сумке 130 мл прозрачной желтой жидкости, сердце массой 460 г, толщина стенки левого желудочка 1,8 см, правого – 0,7 см. Желудочковый индекс (ЖИ) 0,7 см. Полость левого желудочка увеличена. Эндокард

бледный, гладкий. Миокард темно-красного цвета с множественными белесоватыми рубчиками диаметром до 0,3 см. В интима коронарных артерий очаги липосклероза, атерокальциноза. В интима аорты также липосклероз, атерокальциноз и очаги изъязвлений. Дыхательная система: стенка бронхов утолщена, имеются

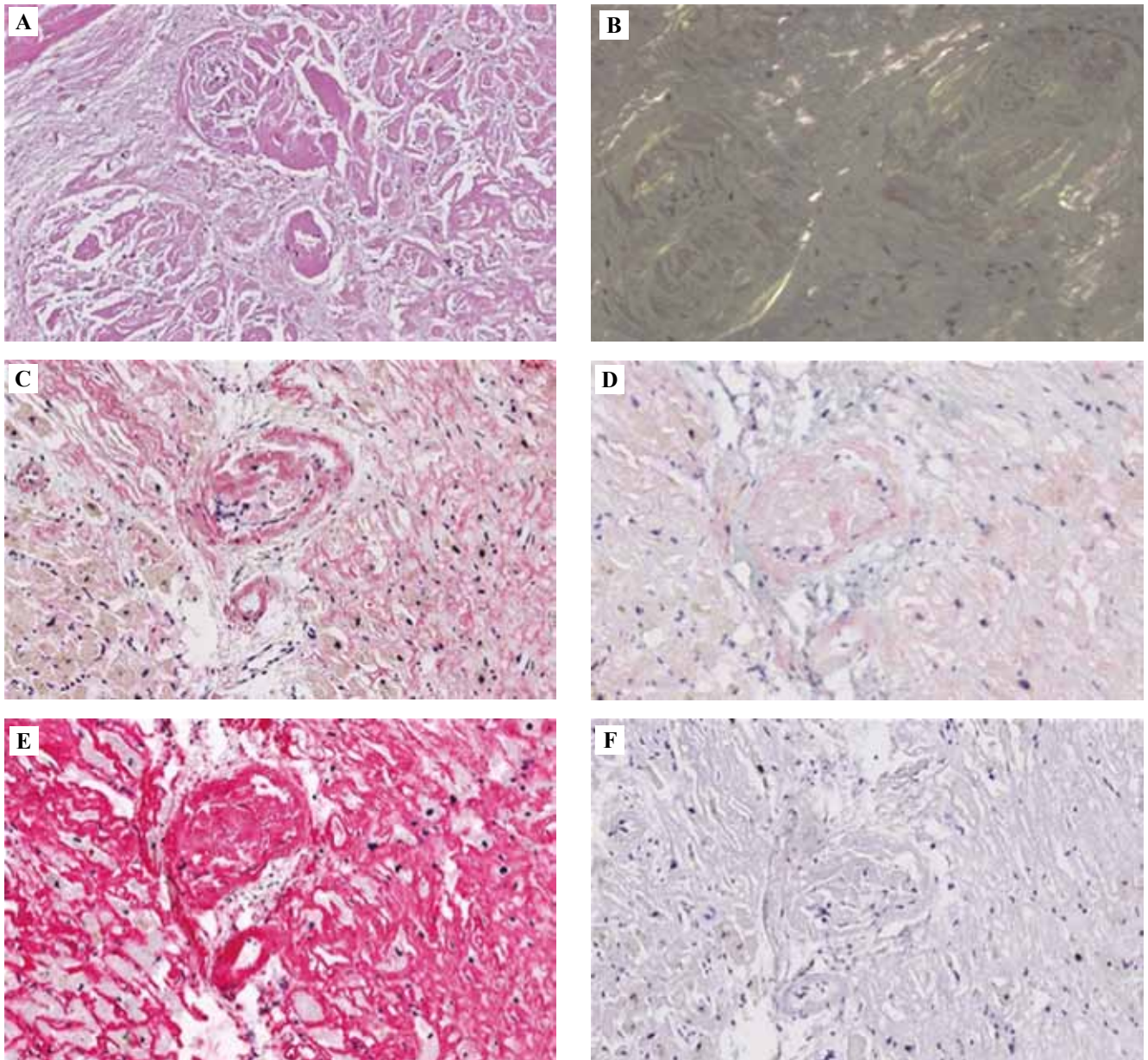


Рис. 1. Васкулярные и интерстициальные амилоидные отложения в сердце.

А – окрашивание гематоксилином и эозином выявило васкулярные и интерстициальные отложения гомогенных эозинофильных структур амилоида. В – при поляризационной микроскопии препаратов, окрашенных конго красным, обнаружено характерное для амилоида свечение. С – иммуногистохимическое окрашивание показало негативную реакцию с антителами к AL-λ и AL-κ (D) легким цепям амилоида. Е – выраженная иммунопозитивная реакция при окрашивании с антителом к трансфетину амилоиду. F – иммунонегативная реакция с антителом к АА-амилоиду. ×100

Fig. 1. Vascular and interstitial amyloid deposits in the heart.

A – haematoxylin and eosin (H&E) stain identified vascular and interstitial deposits of homogenous eosinophilic amyloid. B – polarized light microscopy of Congo red-stained specimens detected characteristic birefringence of the amyloid. C – immunohistochemical stain showed negative reaction with antibodies against AL-λ and AL-κ (D) amyloid light chains. E – significant immunopositive reaction with anti-transferrin amyloid antibody. F – immunonegative reaction with anti-AA-amyloid antibody. ×100

единичные плотные сероватые очаги в виде бляшек размерами от 0,2 до 0,6 см. Легкие серо-бурого цвета, тестоватой консистенции, с поверхности разреза стекает пенная розовая жидкость. При исследовании головного мозга выявлены отек и полнокровие мягких мозговых оболочек и вещества. Желудочно-кишечный тракт: слизистая оболочка желудка, тонкой и толстой кишок розовая, складчатая. Печень плотная, не увеличена. Мочеполовая система: почки макроскопически не изменены, плотноватой консистенции, на разрезе серо-красного цвета с умеренно четкой границей между корковым и мозговым веществом. Слизистая оболочка почечных лоханок и мочевого пузыря серо-розовая, без особенностей. Матка и придатки в состоянии возрастной инволюции.

При микроскопическом исследовании препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, в миокарде правых и левых отделов сердца обширные участки

гомогенных эозинофильных субстанций, которые при окрашивании конго красным и исследовании в поляризованном свете давали яблочно-зеленое свечение, характерное для амилоида. Отмечаются интенсивные васкулярные и интерстициальные отложения амилоида, выраженная атрофия и склероз кардиомиоцитов, гиалиноз кровеносных сосудов с выраженным сужением их просвета. Стенки кровеносных сосудов левых отделов сердца с массивными очагами амилоида (рис. 1). В створках клапанов сердца в результате скопления амилоидных субстанций нарушен ход коллагеновых волокон. Амилоид выявлен в стенках кровеносных сосудов легких, в межальвеолярных перегородках (рис. 2). Бляшковидные утолщения в стенке бронхов, обнаруженные при макроскопии, также оказались амилоидными субстанциями. Единичные очаги амилоидных отложений определены в венах портальных полей печени, артериях почек и селезенки.

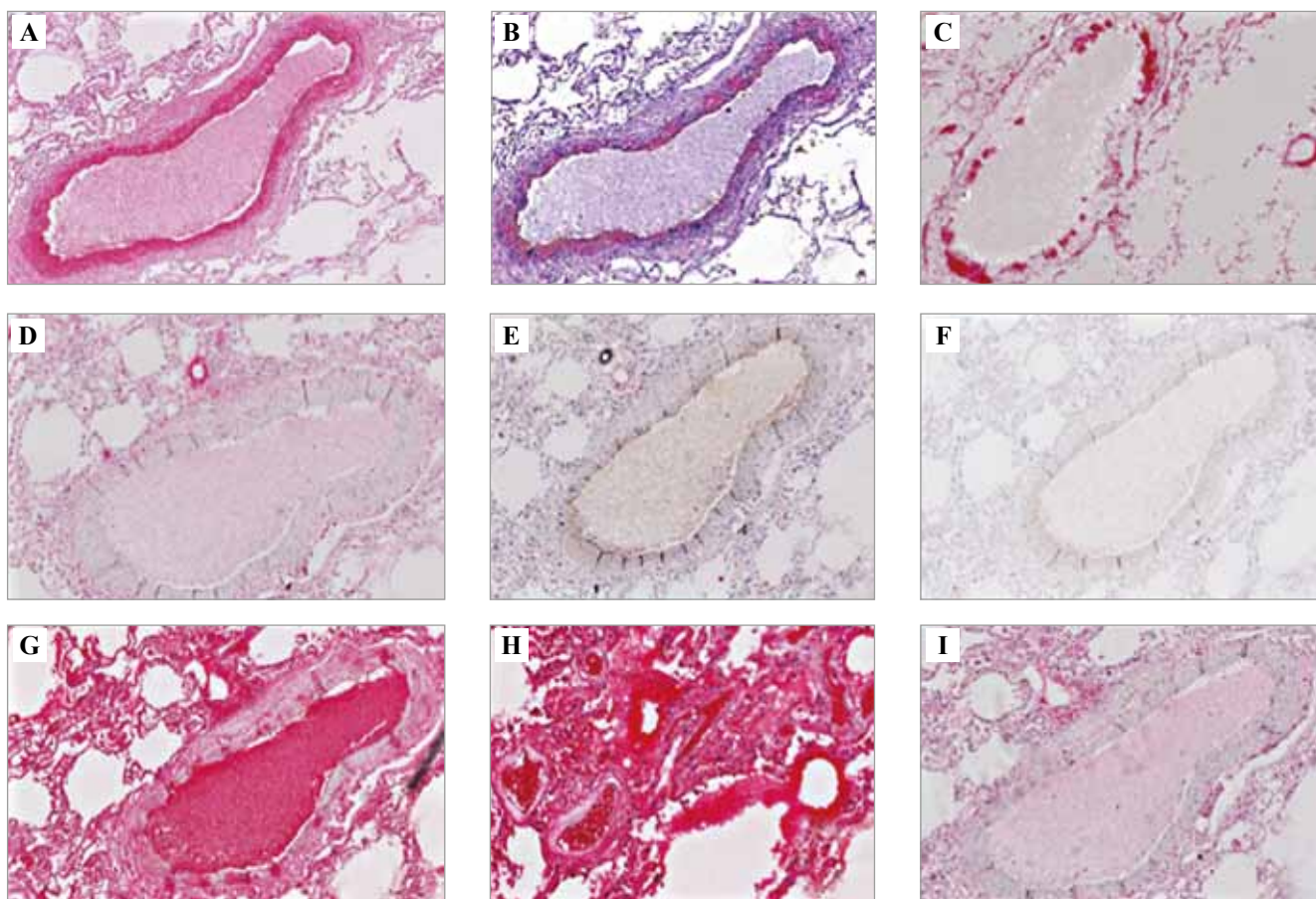


Рис. 2. Амилоидные отложения в стенке кровеносного сосуда легкого.

А – окрашивание гематоксилином и эозином. В – окрашивание конго красным. С – положительное иммуногистохимическое окрашивание с антителом к Р-компоненту амилоида. Негативная иммуногистохимическая реакция с антителами к AL-κ амилоиду (D), AL-λ амилоиду (E), AA амилоиду (F) и Apo AI амилоиду (I). Выраженная иммуноположительная реакция с антителом к транстиретину амилоиду (G, H). ×200

Fig. 2. Amyloid deposits in the pulmonary vessel wall.

A – haematoxylin and eosin (H&E). B – congo red. C – positive immunohistochemical stain with amyloid P-component antibody. Negative immunohistochemical reaction with antibodies against AL-κ amyloid (D), AL-λ amyloid (E), AA amyloid (F), and Apo AI amyloid (I). Significant immunopositive reaction with anti-transthyretin amyloid antibody (G, H). ×200

Иммуногистохимическое типирование амилоида проводилось с использованием панели пептидных антител к его наиболее распространенным типам. Использовались моноклональные антитела к AA-амилоиду, поликлональные антитела к Р-компоненту амилоида, транстретины (ATTR), антитела к AL- $\lambda$  и AL- $\kappa$  амилоиду (Dako, США). Амилоидные отложения имели позитивную реакцию при окрашивании с антителами к Р-компоненту амилоида и транстретины. Отмечалась иммунонегативная реакция с антителами к AA-, AL- $\lambda$  и AL- $\kappa$  амилоиду.

На основании макро- и микроскопического исследования был поставлен патологоанатомический диагноз.

Основное заболевание. Генерализованный амилоидоз с преимущественным поражением сердца и легких.

Осложнения заболевания. Хроническое легочное сердце (ЖИ 0,7). Дилатация полостей сердца. Отеки нижних и верхних конечностей. Двусторонний гидроторакс. Гидроперикард. Асцит. Хроническое венозное полнокровие внутренних органов. Отек легких. Отек головного мозга.

Сопутствующие заболевания. Гипертоническая болезнь (масса сердца 460,0 г, толщина стенки левого желудочка 1,8 см). Атеросклероз аорты и коронарных артерий. Атеросклеротический кардиосклероз.

В данном наблюдении был диагностирован генерализованный транстретиновый амилоидоз дикого типа с преимущественным поражением сердца и легких. Особенностью представленного клинического случая явилось массивное отложение амилоидных масс в стенках артерий левых отделов сердца, что привело к их сужению и, возможно, клинически проявилось в виде признаков ишемической болезни сердца с формированием на ЭКГ псевдоинфарктных очагов, что было расценено кардиологами как острый инфаркт миокарда, который не подтвердился на аутопсии. По данным литературы, острый инфаркт миокарда обнаруживается у 10% пациентов с амилоидозом сердца [5]. Диффузные отложения амилоида в стенках артерий и вен наиболее характерны для AL-амилоидоза, для ATTRwt более свойственно очаговое отложение в интерстиции вокруг клеток без поражения стенок кровеносных сосудов [6]. Тем не менее в настоящем наблюдении обнаружены выраженные интерстициальные и васкулярные амилоидные депозиты. Несмотря на обширные участки поражения миокарда, сократительная функция левого желудочка сохранялась довольно длительное время, что характерно для этого типа амилоидоза.

## Обсуждение

В последние годы в научной литературе все больше данных о том, что ATTRwt является недооцененной причиной заболеваемости и смертности у пациентов старшей возрастной группы. Очень часто диагноз устанавливается на поздних стадиях заболевания или пропускается вовсе ввиду отсутствия специфических

клинических признаков. Согласно T. Lane et al., в 42% случаев ATTRwt с момента появления первых симптомов до установления диагноза проходит более четырех лет [7]. Диагноз затрудняется в связи с тем, что у пожилых пациентов множество сопутствующих патологий, амилоидоз может протекать под маской одной из них и устанавливается только на аутопсии. Так, в работе А.А. Поляковой и соавт., по результатам аутопсийных исследований, ATTRwt был обнаружен у каждого пятого пациента с хронической сердечной недостаточностью и гипертрофией левого желудочка. При этом ни у одного из этих пациентов амилоидоз при жизни не диагностирован. В 97% случаев у них выявлен хронический бронхит [5].

Анализ аутопсийных данных в клинике Майо показал, что ATTRwt составляет 55% среди всех случаев системного амилоидоза [6]. По данным исследователей разных стран, транстретиновый амилоидоз дикого типа в сердце у пациентов старше 80 лет выявляют на аутопсии в 25% случаев [8].

Поражение легких при транстретиновом амилоидозе в основном обнаруживается только по результатам аутопсийного исследования. Так, в работе K. Ussavangsi et al. отмечено, что при жизни вовлечение легких в патологический процесс удалось диагностировать фактически во всех случаях с AL-амилоидозом (93%) и лишь в 23% случаев с транстретиновым амилоидозом [9].

Согласно P. Govender et al., диагноз транстретинового амилоидоза легких клинически устанавливается менее чем в 1% случаев, а по данным аутопсии, альвелярно-септальные амилоидные отложения встречаются у 58–100% пациентов с транстретиновым амилоидозом [10].

Одновременное отложение амилоида в сердце и легких в основном характерно для ATTRwt, а при наследственном типе транстретинового амилоидоза (ATTRm) это сочетание встречается весьма редко [9]. Поражение сердца является основной причиной смерти пациентов с ATTRwt.

Резюмируя изложенное выше, следует отметить, что проблема прижизненной диагностики ATTRwt весьма актуальна. Клиницистам необходимо более тщательно проводить дифференциальную диагностику резистентной к лечению хронической сердечной недостаточности (особенно при сохраненной фракции выброса левого желудочка) с транстретиновым амилоидозом. Сегодня самым лучшим неинвазивным методом диагностики ATTRwt является проведение сцинтиграфии с радиофармпрепаратом технецием ( $^{99m}\text{Tc}$ ), который обладает высокой чувствительностью к этой патологии. Однако транстретиновый амилоидоз в 20% случаев может сопровождаться моноклональной гаммопатией, которая в основном встречается при AL-амилоидозе. В таких случаях необходима дифференциальная диагностика с AL-амилоидозом, которая возможна лишь при взятии биопсии сердца и типировании амилоида [2, 8].

## Заключение

Представленный клинический случай демонстрирует сложности клинико-морфологической диагностики транстиретинового амилоидоза дикого типа у пожилых пациентов. Одной из причин не диагностированного при жизни амилоидоза явилось отсутствие амилоида в биоптатах прямой кишки и подкожно-жировой клетчатки. Проводить более инвазивные диагностические вмешательства в виде биопсии сердца или легких родные пациентки отказались из-за риска возможных осложнений. Особенность данного случая – расхождение клинического и патологоанатомического диагнозов. Во время патологоанатомического исследования инфаркт миокарда не был подтвержден, а псевдоинфарктные очаги на ЭКГ оказались обусловлены отложением амилоида в стенках коронарной артерии и массивными амилоидными отложениями в миокарде, которые привели к атрофии кардиомиоцитов и развитию хронической сердечной недостаточности. Столь выраженные интерстициальные и васкулярные отложения амилоидных субстанций не типичны для транстиретинового амилоидоза и чаще встречаются при AL-амилоидозе.

## Литература/References

1. Sipe JD, Benson MD, Buxbaum JN, Ikeda SI, Merlini G, Saraiva MJ et al. Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*. 2016;23(4):209–13. DOI: 10.1080/13506129.2016.1257986.
2. Martinez-Naharro A, Hawkins PN, Fontana M. Cardiac amyloidosis. *Clin Med (Lond)*. 2018;18(Suppl 2):s30–s35. DOI: 10.7861/clinmedicine.18-2-s30.
3. Quarta CC, Gonzalez-Lopez E, Gilbertson JA, Botcher N, Rowzenio D, Petrie A et al. Diagnostic sensitivity of abdominal fat aspiration in cardiac amyloidosis. *Eur Heart J*. 2017;38(24):1905–8. DOI: 10.1093/eurheartj/ehx047.
4. Гюева З.В., Михалева Л.М. Клинико-морфологические особенности амилоидоза желудка и двенадцатиперстной кишки. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2019;8(1):39–43. DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-39-43.  
Gioeva ZV, Mikhaleva LM. Specific clinical and morphological characteristics of amyloidosis of the stomach and duodenum. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2019;8(1):39–43 (In Russ.). DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-39-43.
5. Полякова А.А., Семернин Е.Н., Ситникова М.Ю., Авагян К.Л., Грозов Р.В., Пыко С.А. и др. Транстиретиновый амилоидоз в когорте пациентов с хронической сердечной недостаточностью старческого возраста и долгожителей. *Кардиология*. 2018;58(2S):12–18. DOI: 10.18087/cardio.2390.  
Poliakova AA, Semernin EN, Sitnikova MY, Avagyan KL, Grozov RV, Pyko SA et al. Transthyretin amyloidosis in a cohort of old and very old patients with chronic heart failure. *Kardiologiya*. 2018;58(2S):12–18 (In Russ.). DOI: 10.18087/cardio.2390.
6. Larsen BT, Mereuta OM, Dasari S, Fayyaz AU, Theis JD, Vrana JA et al. Correlation of histomorphological pattern of cardiac amyloid deposition with amyloid type: a histological and proteomic analysis of 108 cases. *Histopathology*. 2016;68(5):648–56. DOI: 10.1111/his.12793.
7. Lane T, Fontana M, Martinez-Naharro A, Quarta CC, Whelan CJ, Petrie A et al. Natural history, quality of life, and outcome in cardiac transthyretin amyloidosis. *Circulation*. 2019;140(1):16–26. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038169.
8. Ihne S, Morbach C, Sommer C, Geier A, Knop S, Störk S. Amyloidosis—the diagnosis and treatment of an underdiagnosed disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2020;117(10):159–66. DOI: 10.3238/arztebl.2020.0159.
9. Ussavarungsi K, Yi ES, Maleszewski JJ, Kurtin PJ, Dasari S, Theis JD et al. Clinical relevance of pulmonary amyloidosis: an analysis of 76 autopsy-derived cases. *Eur Respir J*. 2017;49(2):1602313. DOI: 10.1183/13993003.02313-2016.
10. Govender P, Keyes CM, Hankinson EA, O'Hara CJ, Santhorawala V, Berk JL. Transbronchial biopsies safely diagnose amyloid lung disease. *Amyloid*. 2017;24(1):37–41. DOI: 10.1080/13506129.2017.1301917.

## Информация об авторах

Зарина Владиславовна Гюева – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии с судебной медициной Северо-Осетинской государственной медицинской академии.

Александр Алибекович Епхийев – кандидат медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии с судебной медициной Северо-Осетинской государственной медицинской академии.

## Author information

Zarina V. Gioeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with Forensic Medicine, North Ossetian State Medical Academy.

<https://orcid.org/0000-0002-5456-8692>

Alexander A. Ephiev – Cand. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy with Forensic Medicine, North Ossetian State Medical Academy.

<https://orcid.org/0000-0002-9126-2019>

## Всероссийская научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии»

12–13 ноября 2020 года в Москве на базе НИИ морфологии человека в режиме онлайн прошла Всероссийская научная конференция с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». Это первый опыт института в проведении конференции в подобном формате, и надо отметить, что он оказался удачным. Впечатляет обширная представительность участников конференции с весьма широкой географией. В целом в работе конференции на всех заседаниях на протяжении двух дней приняли участие 760 человек из 23 городов России и из разных стран. Помимо Российской Федерации были представители из Белоруссии, Казахстана, Италии, Израиля, США. Максимальное число участников зарегистрировано на первом пленарном заседании – 458 человек. Участников конференции при открытии приветствовали директор НИИ морфологии человека профессор Л.М. Михалева, главный патологоанатом Минздрава России академик РАН Г.А. Франк, главный патологоанатом Департамента здравоохранения города Москвы профессор О.В. Зайратьянц, научный руководитель НИИ морфологии человека, президент Российского общества патологоанатомов член-корреспондент РАН Л.В. Кактуский.

На конференции был заслушан 71 устный доклад, среди них 20 докладов участников конкурса молодых ученых. Представлены и обсуждены 26 постерных докладов, которые заранее экспонировались на сайте Института морфологии человека. Десять молодых специалистов отмечены почетными грамотами: четверо – за доклады по клеточной биологии, трое – за доклады по патологической анатомии, трое – за постерные сообщения. Все докладчики имели возможность общения со слушателями в режиме онлайн, отвечая на заданные вопросы. Модераторами конференции стали ведущие морфологи страны. Конференция была аккредитована в системе непрерывного медицинского образования, и всем участникам присвоены образовательные кре-



диты (баллы) с учетом автоматизированных данных контроля присутствия.

К сожалению, нет возможности достаточно полно осветить насыщенную содержательную часть конференции. В докладах были представлены разные ветви морфологических дисциплин – патологической анатомии, гистологии, цитологии, клеточной биологии, эмбриологии. Наряду с фундаментальными разработками изложены результаты прикладных исследований, востребованных клинической практикой. Конечно же, большое внимание привлекли материалы группы отечественных патологоанатомов по патанатомии новой коронавирусной инфекции (COVID-19), обобщенные в программном докладе профессора О.В. Зайратьянца. Значительное место в программе было уделено вопросам онкоморфологии как наиболее востребованного раздела патологической анатомии. В русле этого направления упомянем доклады, посвященные факторам риска малигнизации пищевода Барретта (профессор Л.М. Михалева), прогностическим критериям раннего рака желудка (А.Е. Бирюков), проблеме классификации рака желудка (К.Ю. Мидибер), молекулярно-генетическим особенностям зубчатых новообразований кишечника (Р.А. Вандышева), лечебному патоморфозу рака яичников (профессор Е.М. Непомнящая), принципам диагностики опухолей костей (доктор медицинских наук Д.В. Рогожин).





Отдельная секция была посвящена болезням легких и сердечно-сосудистой системы. Ряд докладов охарактеризовал патологию легких при гиперсенситивном пневмоните (профессор А.Л. Черняев), идиопатическом легочном фиброзе (доктор медицинских наук М.В. Самсонова), туберкулезе (доктор биологических наук М.В. Ерохина, кандидат медицинских наук Т.А. Новицкая). Среди вопросов сердечно-сосудистой патологии рассмотрены структурные особенности кардиомиоцитов при пороках сердца (кандидат биологических наук Т.В. Сухачева, Е.В. Пеняева), радиационные поражения сердца (А.Е. Жарикова), морфологические проявления гипертрофии миокарда (Е.А. Помазанова).

Среди других вопросов патологоанатомического профиля отметим доклады, посвященные орфанным болезням (профессор Е.Л. Туманова), клинико-экспертной работе патологоанатома (кандидат медицинских наук А.А. Каниболоцкий), современным возможностям иммуногистохимической диагностики заболеваний (кандидат медицинских наук Ю.Ю. Вяльцева).

В программе конференции широко представлены результаты исследований в области экспериментальной морфологии, посвященные, в частности, экспериментальным моделям язвенного колита (профессор О.В. Макарова), алкогольной кардиомиопатии (кандидат медицинских наук И.А. Чернов), меланомы (доктор биологических наук А.М. Косырева), гиперплазии предстательной железы (кандидат биологических наук И.С. Цветков), радиационного поражения легких (Е.М. Малышева, С.Е. Тимофеев).

Ряд сообщений был посвящен структурным основам тонких механизмов общепатологических процессов, касающихся вопросов регенерации, иммунопатологии, клеточной патологии. Живой интерес вызвал

доклад заведующего лабораторией патологии клетки НИИ морфологии человека, президента Международного научно-исследовательского института «Галли» (Сан-Антонио, Техас, США) кандидата медицинских наук Г. Алиева, посвященный ультраструктурной патологии митохондрий при экспериментальной хронической алкогольной интоксикации и положительному эффекту при этих процессах антиоксидантов. Доклад был прочитан на английском языке, что следует приветствовать, так как это расширяет возможности обмена информацией с зарубежной аудиторией и стимулирует научную молодежь к совершенствованию международного общения. В русле названной тематики нужно отметить доклады, посвященные вопросам молекулярных механизмов пролиферации гепатоцитов в условиях спленэктомии (доктор медицинских наук А.В. Ельчанинов), морфологии раневого процесса (кандидат биологических наук Н.Б. Тихонова), структурно-функциональным особенностям мезенхимальных стромальных клеток (доктор биологических наук Е.Р. Андреева, кандидат биологических наук А.Н. Горностаева, кандидат биологических наук А.Ю. Ратушный), эндотелиальной дисфункции в условиях оксидативного стресса (Е.М. Малышева). В рамках проблем эмбриологии и онтогенеза заслушаны доклады по дифференцировке клеток поджелудочной железы (доктор биологических наук А.Е. Прошина), формированию каротидного клубочка человека (Д.А. Отлыга). В ряде сообщений освещены современные технологические возможности морфологического анализа, касающиеся, в частности, 3D реконструкции тканей (доктор биологических наук Г.А. Савостьянов), рентгеновской микротомографии (кандидат биологических наук В.И. Гулимова), расширения области применения растровой электронной микроскопии (профессор Т.В. Павлова).

В целом, конференция явилась важным этапом в демонстрации современных достижений морфологических дисциплин. Дистанционный характер общения предоставил новые возможности существенного расширения численности участников и их географического представительства. Этот положительный опыт несомненно будет продолжен и использован в дальнейшей работе.

*Л.В. Кактурский,  
научный руководитель НИИ морфологии человека,  
член-корреспондент РАН*

## Константин Аркадьевич Рогов (1952–2020)

22 ноября 2020 года ушел из жизни доктор медицинских наук, профессор, врач-патологоанатом высшей квалификационной категории, руководитель Центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека Константин Аркадьевич Рогов.

После окончания 1-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова в 1976 году он обучался в клинической ординатуре, а затем в аспирантуре Всесоюзного научного центра хирургии, где затем работал в должности младшего научного сотрудника в отделении патологической анатомии. С 1987 года был старшим, а затем ведущим научным сотрудником кафедры патологической анатомии 1-го ММИ им. И.М. Сеченова. С 1992 по 2016 год возглавлял патологоанатомическое отделение ГКБ № 4 города Москвы. В 1982 году защитил кандидатскую диссертацию, а в 2004-м, будучи патологоанатомом-практиком, – докторскую диссертацию.

Константин Аркадьевич Рогов является автором более 150 научных работ. В течение 36 лет он осуществлял педагогическую деятельность в качестве преподавателя патологической анатомии на кафедре клеточной биологии и гистологии МГУ им. М.В. Ломоносова, в 1-м Московском медицинском институте им. И.М. Сеченова, в последние годы был профессором кафедры патологической анатомии Российского университета дружбы народов.

С 2016 года К.А. Рогов руководил Центральной патологоанатомической лабораторией НИИ морфологии



человека. Ему удалось успешно совмещать научные исследования с практической работой врача-патологоанатома и обучением студентов, ординаторов и аспирантов.

Константин Аркадьевич имеет награды – медаль «В память 850-летия Москвы», почетную грамоту Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, нагрудный знак «Отличнику здравоохранения».

Константин Аркадьевич Рогов был мудрым, интеллигентным, доброжелательным человеком, любил природу, поэзию и прекрасно читал стихи.

Институт морфологии человека глубоко скорбит о невозможной утрате.

*Коллектив сотрудников  
Института морфологии человека*

# 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

