

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 10 | № 1 | 2021

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 индексируется в:

Scopus;

RSCI;

РИНЦ;

представлен в информационной
базе данных eLIBRARY.ru

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: sem.journal@mail.ru

www.sem-journal.ru

Тираж 500 экземпляров

Издательство

«Группа МДВ»

www.mdv-group.ru

Подписные индексы:

70045 по каталогу
«Урал-Пресс»

70045 по каталогу АРЗИ

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 10 | № 1 | 2021

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 :
Scopus;
Russian Science Citation Index
(RSCI);
online platform of the Russian
Science Citation Index database
eLIBRARY.ru

The Journal is included
in the current List of Scientific
Journals of the Higher Attestation
Commission of Russia
(Vysshaya Attestatsionnaya
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 «Ural-Press» catalog

70045 according
to the ARZI catalog

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

© FSBSI «Research Institute of
Human Morphology»

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

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

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

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

- Н.В. Яглова, С.С. Обернихин,
В.В. Яглов, С.В. Назимова*
Роль дендритных и тучных клеток кожи
в развитии иммунных реакций
- 5 *N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin,
V.V. Yaglov, S.V. Nazimova*
Role of skin dendritic and mast cells communications
in triggering immune reactions
- Л.М. Сомова, Е.А. Коцюрбий, Е.И. Дробот,
И.Н. Ляпун, М.Ю. Щелканов*
Клинико-морфологические проявления
дисфункции иммунной системы при новой
коронавирусной инфекции COVID-19
- 11 *L.M. Somova, E.A. Kotsyurbiy, E.I. Drobot,
I.N. Lyapun, M.Yu. Shchelkanov*
Clinical and morphological manifestations of immune
system dysfunction in new coronavirus infection
(COVID-19)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCHES

- Л.М. Михалева, О.И. Пацан, Т.В. Безуглова,
А.И. Давыдов, Г.М. Алиев*
Novel clinical and morphological predictors
of malignancy in patients with ovarian endometrioid
cysts
- 21 *Л.М. Михалева, О.И. Пацан, Т.В. Безуглова,
А.И. Давыдов, Г.М. Алиев*
Новые клинико-морфологические предикторы
неопластической трансформации у пациенток
с эндометриоидными кистами яичников
- А.С. Балканов, И.Д. Розанов, А.В. Голанов,
Л.Е. Гаганов, В.П. Черников*
Состояние эндотелия капилляров
перитуморальной зоны
после адъювантной лучевой терапии
глиобластомы головного мозга
- 33 *A.S. Balkanov, I.D. Rozanov, A.V. Golanov,
L.E. Gaganov, V.P. Chernikov*
Endothelium changes of peritumoral zone capillaries
after brain glioblastoma adjuvant radiation therapy
- М.И. Пахарукова, М.А. Котугина, Э.И. Вайнберг*
Анализ сопоставления результатов
цитологического и гистологического методов
в диагностике злокачественных новообразований
вульвы
- 41 *M.I. Pakharukova, M.A. Kotugina, E.I. Vainberg*
Analyzing the differences between the cytological and
histological methods in the vulva malignant neoplasm
diagnosis

А.Ю. Иванова, Е.Ю. Рысенкова, М.А. Афанасьев,
П.В. Чумаченко, В.С. Попов, А.Ю. Постнов,
Н.А. Медведева, О.С. Медведев
Изменения морфофункциональных параметров
сердечно-сосудистой системы на фоне
рациона питания с повышенной калорийностью
у спонтанно гипертензивных крыс

50 A.Yu. Ivanova, E.Yu. Rysenkova, M.A. Afanasiev,
P.V. Chumachenko, V.S. Popov, A.Yu. Postnov,
N.A. Medvedeva, O.S. Medvedev
High-calorie diet influence on morphological and
functional parameters of the cardiovascular system
in spontaneously hypertensive rats

В.В. Куделькина, А.С. Халанский, О.В. Макарова,
И.С. Цветков, А.М. Косырева, А.И. Алексеева,
А.Ю. Шелков, О.О. Максименко,
В.А. Разживина, С.Э. Гельперина
Сравнительная морфологическая
и биохимическая характеристика
токсического действия доxorубина
и наносомальной формы PLGA-доксорубина
при лечении экспериментальной глиобластомы

58 V.V. Kudelkina, A.S. Khalansky, O.V. Makarova,
I.S. Tsvetkov, A.M. Kosyрева, A.I. Alekseeva,
A.Y. Shelkov, O.O. Maksimenko,
V.A. Razzhivina, S.E. Gelperina
Comparative morphological and biochemical
characteristics of the toxic effects of doxorubicin
and nanosomal PLGA-doxorubicin form
in the experimental glioblastoma treatment

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

А.В. Каминский, И.Л. Плакса
Случай синдрома Мюира–Торре,
ассоциированного с наследственной мутацией
в гене *MSH2*

66 A.V. Kaminskiy, I.L. Plaksa
Muir–Torre syndrome case associated with a hereditary
MSH2 mutation

МЕТОДЫ TECHNICAL NOTES

В.Н. Митрофанов, О.П. Живцов,
Н.Ю. Орлинская, Д.В. Давыденко
Экспериментальная модель
хронического очагового остеомиелита
для исследований *in vivo*

71 V.N. Mitrofanov, O.P. Zhivtsov,
N.Yu. Orlynskaya, D.V. Davydenko
Experimental model of chronic focal osteomyelitis
for *in vivo* studies

ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ SPECIAL DAYS AND TRIBUTES

Памяти
Татьяны Григорьевны Бархиной
(1941–2018)

78 In the memory of
Tatyana Grigoryevna Barkhina
(1941–2018)

© Коллектив авторов, 2021

DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.5-10

УДК 616-002-008.953-092:576.5

Роль дендритных и тучных клеток кожи в развитии иммунных реакций

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин, В.В. Яглов, С.В. Назимова

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Кожа является барьерным органом и местом контакта с чужеродными антигенами. По сравнению с другими органами развитие иммунных реакций в ней отличается более высокой степенью выраженности, что подразумевает наличие дополнительных клеточных взаимодействий. Дендритные клетки традиционно рассматриваются как основные антигенпрезентирующие клетки кожи, однако в последние годы появились сведения о способности другой популяции – тучных клеток – осуществлять антигенпрезентирующие функции. В обзоре приведены новые данные о взаимодействии дендритных и тучных клеток кожи, формировании иммунных синапсов, обмене поверхностными молекулами и переносе секреторного материала. Авторами разработана и изложена новая концепция развития и модулирования иммунных реакций, обеспечиваемых функциональным комплексом дендритная клетка–тучная клетка.

Ключевые слова: дендритные клетки, тучные клетки, кожа, иммунные синапсы, дегрануляторный синапс, иммунный ответ

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

Для цитирования: Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В. Роль дендритных и тучных клеток кожи в развитии иммунных реакций. *Клин. эксп. морфология*. 2021;10(1):5–10. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.5-10.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 08.12.2020. Получена после рецензирования 02.02.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Role of skin dendritic and mast cells communications in triggering immune reactions

N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin, V.V. Yaglov, S.V. Nazimova

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Skin represents a natural barrier and a site of contact with antigens. Skin demonstrates higher intensity of immune reactions compared to other organs, which implies the additional cell interactions. Dendritic cells are traditionally considered as the main antigen-presenting cells of the skin, however, in recent years, some data on the ability of another population, mast cells, to perform antigen-presenting functions have appeared. The review presents novel data on the interaction of skin dendritic and mast cells, including formation of immune synapses, exchange of surface molecules, and transfer of secretory material. The authors have developed and presented a new concept for the initiation and modulation of immune responses provided by the functional dendritic cell–mast cell complex.

Keywords: dendritic cells, mast cells, skin, immunological synapse, degranulatory synapse, immune response

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

For citation: Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Yaglov V.V., Nazimova S.V. Role of skin dendritic and mast cells communications in triggering immune reactions. *Clin. exp. morphology*. 2021;10(1):5–10. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.5-10 (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 08.12.2020. **Received in revised form** 02.02.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Кожа, будучи барьерным органом, представляет собой уникальную среду, состоящую из разнообразных популяций иммунокомпетентных клеток [1] и значительного микробиома как бактериального, так и гриб-

кового происхождения [2, 3]. Таким образом, она может быть местом инициации иммунного ответа при введении антигена в организм. Известно, что при трансдермальном попадании антигена, в отличие от других

путей проникновения, иммунный ответ на этот антиген сильнее, чем иммунный ответ на тот же антиген, попадающий другим путем. Например, при вакцинации против гриппа при внутривидном введении требуется только одна пятая дозы, необходимой для внутримышечной инъекции, для достижения сопоставимых титров антител в сыворотке [4]. Кроме того, при прямом сравнении с другими путями введения вакцины, такими как внутривидное или внутримышечное, кожная иммунизация обеспечивает более сильные клеточные и гуморальные иммунные ответы [5]. В реализации иммунных процессов в коже участвуют разные клеточные популяции: дендритные клетки, в том числе клетки Лангерганса, тучные клетки, эозинофилы, нейтрофилы, различные популяции лимфоцитов.

Роль дендритных клеток в инициации иммунных реакций

Решающую роль в инициации иммунных реакций играют дендритные клетки (ДК). Как основные антигенпрезентирующие клетки, участвующие в формировании адаптивного иммунного ответа, ДК играют центральную роль в установлении долговременного иммунитета. В организме ДК принимают участие в генерировании мощных цитотоксических CD8⁺ Т-клеток [6], а также регулируют поляризацию хелперных CD4⁺ Т-клеток (Th) в сторону соответствующего типа (Th1, Th2, Th17) [7]. В коже существует несколько популяций ДК, имеющих разное происхождение и функцию. Плазмацитоидные ДК, специализирующиеся на врожденном противовирусном иммунитете, экспрессируют толл-подобные рецепторы 7-го и 9-го типа и являются первичными продуцентами интерферонов типа I в ответ на вирусные инфекции [8, 9]. При воспалительном процессе ДК могут развиваться и из моноцитов, принимая на себя функцию презентации антигена как CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеткам [10], а также обладать антимикробной активностью через продукцию фактора некроза опухоли- α и индуцированной NO-синтазы [11]. В дополнение к названным выше ДК существует несколько конститутивных популяций, которые можно в общих чертах сгруппировать в две категории: резидентные лимфоидные ДК, известные как классические, и мигрирующие ДК [12]. Резидентные лимфоидные ДК обнаруживаются в селезенке и лимфатических узлах. Они развиваются из предшественников костномозгового происхождения и включают субпопуляции CD8 α ⁺ и CD11b⁺ [13].

Мигрирующие ДК состоят из нескольких различных субпопуляций [14], которые циркулируют между нелимфоидными органами, такими как кожа, легкие или кишечник, и регионарными дренирующими лимфоузлами. Эта способность проникать в нелимфоидные органы, включая кожу, и выходить из них, представляет собой ключевую особенность трафика сети ДК [15].

Клетки Лангерганса являются единственными резидентными антигенпрезентирующими клетками

в эпидермисе и составляют 3–5% эпидермальных клеток [16]. Они располагаются в межфолликулярном и фолликулярном эпителии и обладают способностью продвигать свои отростки через плотные соединения для получения антигена из рогового слоя [17]. Как у мыши, так и у человека клетки Лангерганса экспрессируют молекулы МНС-II, лангерин (CD207), а также молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), которая способствует их миграции за счет уменьшения адгезии с кератиноцитами [18].

Роль тучных клеток в организации иммунных реакций

Тучные клетки (ТК) имеют гемопоэтическое происхождение. После выхода из костного мозга предшественники ТК циркулируют в крови, проникают в разные ткани и развиваются в зрелые ТК под влиянием факторов микроокружения, в том числе факторов роста, таких как фактор стволовых клеток и интерлейкин-3 [19]. Гемопоэтическое развитие ТК уникально, поскольку их предшественники покидают костный мозг и претерпевают трансэндотелиальную миграцию до того, как они приобретут какие-либо гистохимические свойства, специфичные для линии ТК. Затем ТК в соответствии с тканевой средой разделяются на две основные субпопуляции: ТК соединительной ткани, расположенные у нервных окончаний и кровеносной и лимфатической сосудистой сети, и ТК слизистых оболочек, расположенные в подслизистом слое слизистых оболочек, например кишечника и дыхательных путей. Секреторные элементы и потенциал высвобождения гранул этих фенотипов ТК в основном определяются местными тканевыми факторами [20]. Кроме того, субпопуляции ТК человека из кожи и легких первоначально были классифицированы как серозные (тип st) и слизистые, или мукозные (тип t). Они были разделены по протеазному составу их секреторных гранул, включающему триптазу, химазу, карбоксипептидазу A3 и катепсин G в первом типе и только триптазу во втором [21, 22]. ТК st-типа вносят вклад в ремоделирование тканей и ангиогенез, тогда как ТК t-типа связаны с иммунными функциями. Оба этих подтипа экспрессируют высокоаффинный рецептор для Fc-области иммуноглобулина E (Fc ϵ R1), что позволяет им участвовать в аллергических реакциях и реакциях гиперчувствительности [23].

Плотность ТК в тканях варьирует в разных органах. Например, в коже человека плотность ТК составляет 7000–12 000, в кишечнике – 20 000, в легких – 500–4000 на 1 мм³ [24]. Кроме того, в лимфатических узлах количество ТК значительно увеличивается в ответ на воспаление, где они активно участвуют в привлечении иммунных клеток к лимфатическим узлам посредством секреции цитокинов и хемокинов [25]. Известно, что в цитоплазме ТК имеются секреторные гранулы, содержащие медиаторы воспаления вазоактивные амины (прежде всего гистамин), хондроитинсульфаты A и C

и гепарин, серотонин, разнообразные ферменты (протеазы, рибонуклеаза, гистидиндекарбоксилаза, кислые гликозамингликаны), а также ряд цитокинов (фактор некроза опухоли- α , фактор роста фибробластов, интерлейкин-4, фактор стволовых клеток), различные хемокины [26]. После активации ТК высвобождают содержимое этих предварительно сохраненных (преформированных) гранул в их тканевое микроокружение, а также секретируют ряд биологически активных веществ, инициируя множественные физиологические реакции, не только аллергические, участвуют в контроле сосудистого тонуса и проницаемости, неоваскуляризации и защиты от воздействия патогенов [27, 28].

Являясь клетками врожденного иммунитета, ТК оснащены механизмами для раннего и быстрого обнаружения вторгающихся возбудителей, таких как бактерии, паразиты, грибы и вирусы [29]. Величина и характер ответов ТК на разные стимулы зависят от микроокружения и внутренних факторов, которые могут модулировать экспрессию и функциональность поверхностных рецепторов ТК и сигнальных молекул, соответствующих этим ответам [30, 31]. Возбудители имеют консервативные молекулярные структуры, называемые патогенассоциированными молекулярными паттернами (PAMP). Они связываются на поверхности ТК с рецепторами распознавания (PRR), к которым относятся толл-подобные рецепторы. ТК экспрессируют толл-подобные рецепторы 1–7-го и 9-го типов, NOD-подобные рецепторы (NLR) и ген-I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I) [32]. Толл-подобный рецептор-4 может быть активирован липополисахаридом грамотрицательных бактерий, что стимулирует как высвобождение уже сформированных гранул, так и продукцию множества цитокинов ТК, а также ТК-гистамин-NF- κ B-зависимую секрецию цитокинов клетками окружающей ткани [33]. Активация толл-подобных рецепторов-2 пептидогликаном грамположительных бактерий приводит к интенсивной дегрануляции ТК [34]. Гистамин, выделяемый ТК, способен связываться с рецепторами гистамина H1 и H2 на самих ТК и поддерживать или повторно инициировать дальнейшую их дегрануляцию [19]. Гистамин, высвобождаемый из ТК, является необходимым медиатором, участвующим в фосфорилировании транскрипционного фактора NF- κ B, который контролирует экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза клеток и клеточного цикла [33].

Взаимодействие тучных и дендритных клеток

Непосредственная близость ДК и ТК в коже на границах раздела с окружающей средой предполагает наличие взаимодействия между ними. Для иммуномодуляции и ТК, и ДК способны секретировать широкий спектр цитокинов, стимулирующих или подавляющих иммунный ответ. Продукция цитокинов ТК и ДК регулируется по-разному, в зависимости от того, происходит прямое или бесконтактное клеточное вза-

имодействие. При прямом взаимодействии возможен не только ответ ДК на растворимые медиаторы ТК, но и образование межклеточных контактов. Они изменяют передачу сигналов в клетке, вероятно за счет активации молекул адгезии, и могут приводить к изменению спектра продуцируемых цитокинов, а также влиять на скорость их секреции [35].

Рядом исследований *in vitro* на культурах клеток, полученных из полости брюшины, и незрелых ДК из костного мозга, а также *in vivo* на линии мышей Kit (W/W^v) с дефицитом ТК было продемонстрировано, что прямые контакты с ТК усиливают созревание ДК и последующую стимуляцию ими Т-клеток [35, 36]. R. Joulia et al. показали, что взаимодействие IgE- или IgG-несущих В-клеток с FcR рецепторами ТК приводит к векторной экспозиции гранул у последних, которую авторы назвали антителозависимым дегрануляторным синапсом [37, 38]. Активация ТК, опосредованная перекрестным связыванием антиген-IgE-Fc ϵ RI, приводит к поляризации ТК с последующим переносом интернализированного материала от ДК к ТК. Поляризация клеток является отличительной чертой иммунных синапсов и включает реорганизацию рецепторов и цитоскелета [39–41]. Установлено, что для эффективного образования синапсов ТК–ДК необходима клеточная адгезия, опосредованная интегринами [36]. Имеются данные, что при образовании контактов между ТК и ДК происходит изменение экспрессии мембранных рецепторов и лигандов, в частности снижение HLA-DR и CD80, участвующего в формировании иммунологического синапса между дендритными и Т-клетками, тенденция к увеличению хемокинового рецептора CCR7, значительное повышение экспрессии лиганда PD-L1 без существенных изменений CD86, являющегося костимулирующим сигналом для активации Т-лимфоцитов [42]. Образование синапсов между ТК и ДК может обеспечить доставку более концентрированных доз растворимых медиаторов, главным образом цитокинов [43]. Важно отметить, что это образование синапсов облегчает перенос интернализированного ТК-специфического антигена от ТК к ДК, который в конечном счете процессируется и презентруется ДК и может активировать Т-клетки. Предположения о взаимодействии ТК–ДК в периферических тканях, таких как кожа, были высказаны на основании наблюдения контактов в срезах тканей [43]. J. Dudeck et al. продемонстрировали высокодинамичную связь между кожными ДК и ТК *in vivo* и в режиме реального времени, которая возникала при воспалительном процессе в коже [44]. Также было показано, что активация секреторных процессов в ТК кожи происходит и при развитии воспалительных процессов во внутренних органах [45, 46]. Дермальные ДК поглощают интактные гранулы, выделяемые ТК кожи при развитии воспаления. Поглощение гранул ТК способствует созреванию ДК и их миграции в лимфатические узлы, дренирующие кожу, и повышает эффективность прайминга Т-клеток. Важную роль в созревании ДК

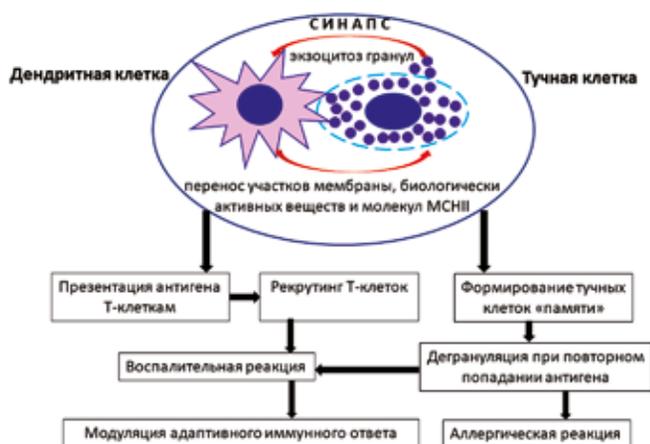


Рис. Участие синапса тучных и дендритных клеток в формировании и модуляции иммунного ответа

Fig. Participation of mast-dendritic cell synapse in development and modulation of immune response

играют цитокины семейства фактора некроза опухоли, происходящие из ТК [47]. Впоследствии поглощенные гранулы ТК разрушаются внутри ДК в лимфоидной ткани. Следует отметить тот факт, что одних экзогенных гранул ТК достаточно, чтобы вызвать заметную активацию ДК и Т-клеточный ответ [47]. Однажды инициированная связь ДК–ТК демонстрирует длительное функционирование в течение иммунного ответа. Эти синапсоподобные прочные контакты в конечном счете завершаются переносом белка, включая молекулы главного комплекса гистосовместимости II, от дермальных ДК к резидентным ТК ткани [44]. Таким образом, ТК могут извлекать участки мембран ДК через образовавшиеся синапсоподобные контакты (рис.). Известно, что при определенных воспалительных состояниях ТК способны экспрессировать молекулы главного комплекса гистосовместимости II, представлять антигены Т-клеткам и преимущественно увеличивать активацию эффекторных и регуляторных Т-клеток [48]. Кроме того, исследования образования иммунных синапсов ДК–ТК [49] или ТК–Т-клеток [50] подтверждают возможность межклеточного взаимодействия и способность ТК рекрутировать ДК или Т-клетки в место воспаления, инфекции либо повреждения. Таким образом, ТК наделены способностью модулировать не только врожденный, но и адаптивный иммунный ответ [51, 52].

Заключение

Анализ имеющихся данных показывает, что участие дендритных и тучных клеток кожи в развитии защитных реакций не ограничивается реализацией их собственных функций, направленных на привлечение других участников иммунных процессов, и носит не только локальный характер. Сформировавшийся в коже комплекс ДК–ТК может выполнять двойные функции: играть роль защитного звена при проникновении в кожу возбудителей и аллергенов и одновременно

быть генератором информационного сигнала, передающегося через лимфатические узлы во внутренние органы и активирующего клетки иммунной защиты в них. Также возможно, что синаптический комплекс ДК–ТК, образующийся в коже, необходим для формирования в органах тучных клеток «памяти» (рис. 1). Это объясняет возникновение некоторых заболеваний кожи и их связь с развитием инфекционного процесса в организме. Исследования взаимодействия тучных и дендритных клеток открывают новые перспективы изучения патогенеза кожных болезней и заболеваний внутренних органов, и в будущем дадут возможность выявить новые координационные связи в системе иммунной защиты организма, изучение которых позволит найти более эффективные подходы к активации иммунных реакций организма и управлению ими.

Литература/References

1. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(5):289–301. DOI:10.1038/nri3646.
2. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.* 2009;324(5931):1190–2. DOI: 10.1126/science.1171700.
3. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature.* 2013;498(7454):367–70. DOI: 10.1038/nature12171.
4. Kenney RT, Frech SA, Muenz LR, Villar CP, Glenn GM. Dose sparing with intradermal injection of influenza vaccine. *N Engl J Med.* 2004;351(22):2295–301. DOI: 10.1056/NEJMoa043540.
5. Liu L, Zhong Q, Tian T, Dubin K, Athale SK, Kupper TS. Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat Med.* 2010;16(2):224–7. DOI: 10.1038/nm.2078.
6. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T et al. In vivo depletion of CD11c dendritic cells abrogates priming of CD8 T cells by exogenous cell associated antigens. *Immunity.* 2002;17(2):211–20. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00365-5.
7. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(12):984–93. DOI: 10.1038/nri1246.
8. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:163–83. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101345.
9. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(12):1219–26. DOI: 10.1038/ni1141.
10. Dominguez PM, Ardavin C. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev.* 2010;234(1):90–104. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x
11. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune de-

- fense against bacterial infection. *Immunity*. 2003;19(1):59–70. DOI: 10.1016/S1074-7613(03)00171-7.
12. *Helft J, Ginhoux F, Bogunovic M, Merad M*. Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol Rev*. 2010;234(1):55–75. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00885.x.
 13. *Shortman K, Heath WR*. The CD8C dendritic cell subset. *Immunol Rev*. 2010;234(1):18–31. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00870.x.
 14. *Levin C, Perrin H, Combadiere B*. Tailored immunity by skin antigen-presenting cells. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(1):27–36. DOI: 10.4161/hv.34299.
 15. *Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Zwirner J et al*. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*. 2004;21(2):279–88. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.06.014.
 16. *Merad M, Ginhoux F, Collin M*. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):935–47. DOI: 10.1038/nri2455.
 17. *Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M*. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J Exp Med*. 2009;206(13):2937–46. DOI: 10.1084/jem.20091527.
 18. *Gaiser MR, Lämmermann T, Feng X, Igyarto BZ, Kaplan DH, Tessarollo L et al*. Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(15):E889–97. DOI: 10.1073/pnas.1117674109.
 19. *Gilfillan AM, Austen SJ, Metcalfe DD*. Mast cell biology: introduction and overview. *Adv Exp Med Biol*. 2011;716:2–12. DOI: 10.1007/978-1-4419-9533-9_1.
 20. *Gurish MF, Austen KF*. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity*. 2012;37(1):25–33. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.07.003.
 21. *Xia HZ, Kepley CL, Sakai K, Chelliah J, Irani AM, Schwartz LB*. Quantitation of tryptase, chymase, Fc epsilon RI alpha, and Fc epsilon RI gamma mRNAs in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *J Immunol*. 1995;154(10):5472–80. PMID: 7730649.
 22. *Oskeritzian CA, Zhao W, Min HK, Xia HZ, Pozez A, Kiev J et al*. Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(6):1162–8. DOI: 10.1016/j.jaci.2005.02.022.
 23. *Church MK, Levi-Schaffer F*. The human mast cell. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;99(2):155–60. DOI: 10.1016/S0091-6749(97)70089-7.
 24. *Abraham SN, Malaviya R*. Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun*. 1997;65(9):3501–8. DOI: 10.1128/IAI.65.9.3501-3508.1997.
 25. *Jawdat DM, Rowden G, Marshall JS*. Mast cells have a pivotal role in TNF-independent lymph node hypertrophy and the mobilization of Langerhans cells in response to bacterial peptidoglycan. *J Immunol*. 2006;177(3):1755–62. DOI: 10.4049/jimmunol.177.3.1755.
 26. *Mukai K, Tsai M, Saito H, Galli SJ*. Mast cells as sources of cytokines, chemokines and growth factors. *Immunol Rev*. 2018;282(1):121–50. DOI: 10.1111/imr.12634.
 27. *da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C*. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem*. 2014;62(10):698–738. DOI: 10.1369/0022155414545334.
 28. *Krystal-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG*. Mast cell: a multi-functional master cell. *Front Immunol*. 2016;6:620. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00620.
 29. *St John AL, Abraham SN*. Innate immunity and its regulation by mast cells. *J Immunol*. 2013;190(9):4458–63. DOI: 10.4049/jimmunol.1203420.
 30. *Shelburne CP, Abraham SN*. The mast cell in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2011;716:162–85. DOI: 10.1007/978-1-4419-9533-9_10.
 31. *Urb M, Sheppard DC*. The role of mast cells in the defense against pathogens. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002619. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002619.
 32. *Sandig H, Bulfone-Paus S*. TLR signaling in mast cells: common and unique features. *Front Immunol*. 2012;3:185. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00185.
 33. *Nizamutdinova IT, Dusio GF, Gasheva OY, Skoog H, Tobin R, Peddaboina C et al*. Mast cells and histamine are triggering the NF-kappaB-mediated reactions of adult and aged perilymphatic mesenteric tissues to acute inflammation. *Aging*. 2016;8(11):3065–90. DOI: 10.18632/aging.101113.
 34. *Marshall JS, Jawdat DM*. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(1):21–7. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.04.045.
 35. *Otsuka A, Kubo M, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Tanizaki H et al*. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PLoS One*. 2011;6(9):e25538. DOI: 10.1371/journal.pone.0025538.
 36. *Carroll-Portillo A, Surviladze Z, Cambi A, Lidke DS, Wilson BS*. Mast cell synapses and exosomes: membrane contacts for information exchange. *Front Immunol*. 2012;3:46. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00046.
 37. *Joulia R, Gaudenzio N, Rodrigues M, Lopez J, Blanchard N, Valitutti S et al*. Mast cells form antibody-dependent degranulatory synapse for dedicated secretion and defense. *Nat Commun*. 2015;6:6174. DOI: 10.1038/ncomms7174.
 38. *Valitutti S, Joulia R, Espinosa E*. The mast cell antibody-dependent degranulatory synapse. *Methods Mol Biol*. 2017;1584:487–95. DOI: 10.1007/978-1-4939-6881-7_30.
 39. *Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS*. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harb. Perspect Biol*. 2010;2(10):a002311. DOI: 10.1101/cshperspect.a002311.
 40. *Angus KL, Griffiths GM*. Cell polarisation and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25(1):85–91. DOI: 10.1016/j.ceb.2012.08.013.
 41. *Xie J, Tato CM, Davis MM*. How the immune system talks to itself: the varied role of synapses. *Immunol Rev*. 2013;251(1):65–79. DOI: 10.1111/imr.12017.
 42. *Rodrigues CP, Ferreira AC, Pinho MP, de Moraes CJ, Bergami-Santos PC, Barbuto JA*. Tolerogenic IDO(+) dendritic cells are induced by PD-1-expressing mast cells. *Front Immunol*. 2016;7:9. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00009.
 43. *Carroll-Portillo A, Cannon JL, Te Riet J, Holmes A, Kawakami Y, Kawakami T et al*. Mast cells and dendritic cells form synapses

- that facilitate antigen transfer for T cell activation. *J Cell Biol.* 2015;210(5):851–64. DOI: 10.1083/jcb.201412074.
44. Dudeck J, Medyukhina A, Fröbel J, Svensson CM, Kotrba J, Gerlach M *et al.* Mast cells acquire MHCII from dendritic cells during skin inflammation. *J Exp Med.* 2017;214(12):3791–811. DOI: 10.1084/jem.20160783.
45. Yaglova NV, Yaglov VV. Ultrastructural characteristics of molecular release of secretory products from thyroid mast cells induced by lipopolysaccharide. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2013;155(2):260–263. DOI: 10.1007/s10517-013-2127-z.
46. Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В. Изменения секреторных процессов в мастоцитах кожи крыс при развитии системного воспалительного ответа. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины.* 2020;10(2):61–68. DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-2-61-68.
Yaglova NV, Obernikhin SS, Yaglov VV. Changes in secretion of rat skin mast cells in systemic inflammatory response. *Crimean Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2020;10(2):61–68. DOI: 10.37279/2224-6444-2020-10-2-61-68.
47. Dudeck J, Froebel J, Kotrba J, Lehmann CHK, Dudziak D, Speier S *et al.* Engulfment of mast cell secretory granules on skin inflammation boosts dendritic cell migration and priming efficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143(5):1849–1864.e4. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.08.052.
48. Kambayashi T, Allenspach EJ, Chang JT, Zou T, Shoag JE, Reiner SL *et al.* Inducible MHC class II expression by mast cells supports effector and regulatory T cell activation. *J Immunol.* 2009;182(8):4686–95. DOI: 10.4049/jimmunol.0803180.
49. Pal S, Gasheva OY, Zawieja DC, Meiningner CJ, Gashev AA. Histamine-mediated autocrine signaling in mesenteric perilymphatic mast cells. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol.* 2020;318(3):R590–604. DOI: 10.1152/ajpregu.00255.2019.
50. Mantri CK, St John AL. Immune synapses between mast cells and gammadelta T cells limit viral infection. *J Clin Invest.* 2019;129(3):1094–108. DOI: 10.1172/JCI122530.
51. Shelburne CP, Nakano H, St John AL, Chan C, McLachlan JB, Gunn MD *et al.* Mast cells augment adaptive immunity by orchestrating dendritic cell trafficking through infected tissues. *Cell Host Microbe.* 2009;6(4):331–42. DOI: 10.1016/j.chom.2009.09.004.
52. Chatterjee V, Gashev AA. Mast cell-directed recruitment of MHC class II positive cells and eosinophils towards mesenteric lymphatic vessels in adulthood and elderly. *Lymphat Res Biol.* 2014;12(1):37–47. DOI: 10.1089/lrb.2013.0031.

Информация об авторах

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

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

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

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

Author information

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

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

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

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

Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19

Л.М. Сомова¹, Е.А. Коцюрбий², Е.И. Дробот¹, И.Н. Ляпун¹, М.Ю. Щелканов^{1,3,4}

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора, Владивосток, Россия

² ФГБОУ ВО Тихоокеанский государственный медицинский университет Минздрава России, Владивосток, Россия

³ ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

⁴ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Стремительное развитие в 2020 году пандемии COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, изначально свидетельствовало о значительном вовлечении иммунной системы в патологический процесс. Тем не менее информация о конкретных изменениях в органах иммунной системы пока ограничена. Выявлен широкий диапазон изменений – от выраженного опустошения В-зависимых и Т-зависимых зон лимфоидной ткани, напоминающего изменения при ВИЧ-инфекции на стадии СПИДа, до гиперплазии ткани лимфатических узлов и селезенки разной степени. При анализе данных литературы авторы акцентировали внимание на том, что патоморфологические изменения, выявленные при исследовании секционного материала от пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции, сопровождалась в большинстве случаев премортальной лимфопенией. Несмотря на то, что причина лимфопении при COVID-19 пока не раскрыта, авторами обзора высказана гипотеза, что одним из потенциальных индукторов лимфопении является нерегулируемый апоптоз циркулирующих лимфоцитов. Активация цитокинов («цитокиновый шторм») может быть связана с атрофией лимфоидных органов, что также способствует снижению количества циркулирующих лимфоцитов. Не вызывает сомнений актуальность дальнейшей идентификации апоптоза клеток иммунной системы как одной из причин лимфопении и иммунной дисфункции при COVID-19, что имеет перспективы для поиска средств фармакологического воздействия на процесс лимфоцитарного апоптоза.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция, COVID-19, патоморфология, лимфопения, лимфатические узлы, селезенка, лимфоцитарный апоптоз

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

Для цитирования: Сомова Л.М., Коцюрбий Е.А., Дробот Е.И., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю. Клинико-морфологические проявления дисфункции иммунной системы при новой коронавирусной инфекции COVID-19. Клини. эксп. морфология. 2021;10(1):11–20. DOI: 10.31088/SEM2021.10.1.11-20.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова Роспотребнадзора (№ 4А-А19-119011090003-7) при поддержке гранта РФФИ № 20-04-60212 «Комплексный эколого-вирусологический мониторинг коронавирусов в экосистемах Дальнего Востока».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 14.01.2021. Получена после рецензирования 29.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19)

L.M. Somova¹, E.A. Kotsyurbiy², E.I. Drobot¹, I.N. Lyapun¹, M.Yu. Shchelkanov^{1,3,4}

¹ Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Vladivostok, Russia

² Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

³ Federal Scientific Center of East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

⁴ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Rapid development in 2020 of the COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 initially indicated significant involvement of the immune system. However, information on specific changes in organs of the immune system is still limited. A wide range of alterations was revealed in our study: from pronounced devastation

of B-dependent and T-dependent zones of lymphoid tissue, reminiscent of changes in HIV infection at the AIDS stage, to hyperplasia of the tissue of lymph nodes and spleen of varying degrees. Analyzing the literature data, we focused on the fact that pathomorphological changes revealed in the autopsy studies of patients with a severe COVID-19 were accompanied by premortal lymphopenia in most cases. However, the cause of lymphopenia in COVID-19 has not yet been disclosed, authors of the review hypothesized that unregulated apoptosis of circulating lymphocytes is one of the potential lymphopenia inducers. Cytokine activation (“cytokine storm”) may be associated with lymphoid organs’ atrophy, which also contributes to a decrease in the circulating lymphocyte count. There is no doubt about the relevance of further identification of the immune cell apoptosis as one of the causes of lymphopenia and immune dysfunction in COVID-19 patients, which has prospects for pharmacological developments to manage lymphocytic apoptosis.

Keywords: coronavirus infection, COVID-19, pathomorphology, lymphopenia, lymph nodes, spleen, lymphocytic apoptosis

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

For citation: Somova L.M., Kotsyurbiy E.A., Drobot E.I., Lyapun I.N., Shchelkanov M.Yu. Clinical and morphological manifestations of immune system dysfunction in new coronavirus infection (COVID-19). Clin. exp. morphology. 2021;10(1):11–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.11-20 (In Russ.).

Funding. The work was carried out within the framework of State Assignment to Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology (No. 4A-A19-119011090003-7) and was supported by the RFBR Project No. 20-04-60212 “Integrated ecological and virological monitoring of coronaviruses in the ecosystems of the Far East”.

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

Received 14.01.21. **Received in revised form** 29.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

В XX столетии коронавирусы (Nidovirales: Coronaviridae) не рассматривались в качестве серьезной медицинской проблемы, хотя их ветеринарное значение было вполне очевидно [1, 2]. В начале XXI века эта точка зрения подверглась ревизии в связи с эпидемией, вызванной коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV – Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) (Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*) в южных провинциях Китая в 2002 году [3, 4], и открытием природных очагов коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV – Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) (Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Merbecovirus*) на территории Аравийского полуострова [5, 6].

Впервые изолированный в китайском городе Ухань (провинция Хубэй) в декабре 2019 года коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2-го типа (SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) (Coronaviridae, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*) продемонстрировал свой пандемический потенциал уже весной 2020 года – с тех пор этиологически связанное с ним заболевание COVID-19 (Coronavirus disease 2019) остается наиболее актуальным инфекционным заболеванием во всем мире [7–10]: по данным ВОЗ, на конец 2020 года летальность составила $2,2\% \approx 1\,754\,574 / 79\,231\,893$ [11].

Среди важнейших аспектов первостепенное значение было обращено на изучение патологической анатомии при тяжелых формах новой коронавирусной болезни, закончившихся летальным исходом [12]. На основе результатов более 2000 аутопсий умерших от COVID-19 в Российской Федерации московскими

патологоанатомами подготовлен и выпущен атлас патологических изменений, выявленных на разных стадиях заболевания, наглядно иллюстрированный микрофотографиями [13]. Установлено, что основным морфологическим субстратом поражения легких – главной мишени для SARS-CoV-2 является достаточно специфическое диффузное альвеолярное повреждение в сочетании с вовлечением в патологический процесс сосудистого русла легких и альвеолярно-геморрагическим синдромом. Помимо изменения легких разной степени выраженности на аутопсиях выявлены достаточно разнообразные поражения других органов и систем, патогенез которых пока не ясен, но, вероятно, носит сложный многофакторный характер. Среди таких основных факторов – специфическое повреждающее действие SARS-CoV-2, гипоксия, микроангиопатия, гиперкоагуляция и гиперергическая иммунная реакция (возможно, и аутоиммунная). Высказывается мнение о возможном значении генерализации коронавирусной инфекции в виде «цитокинового шторма» и, как следствие, повреждении микроциркуляторного русла с нарушениями в системе свертывания крови [14]. Таким образом, несмотря на то, что COVID-19 является прежде всего инфекцией дыхательных путей, все больше данных указывает на то, что ее следует рассматривать как системное заболевание, затрагивающее сердечно-сосудистую, дыхательную, желудочно-кишечную, неврологическую, кровяную, иммунную системы и гемостаз [13, 15–18].

Цель обзора – охарактеризовать клинико-патоморфологические изменения при новой коронавирусной инфекции (COVID-19), связанные с иммунной дисфункцией, и оценить их патогенетическое значение.

Общая характеристика патологии лимфоидных органов

Стремительное распространение новой коронавирусной инфекции во многие страны мира с развитием пандемии изначально предполагало, что иммунная система значительно вовлечена в патологический процесс при COVID-19. Тем не менее информация о конкретных изменениях иммунного ответа и патологии лимфоидных органов при этой болезни пока ограничена.

При анализе результатов исследований секционного материала 11 пациентов, умерших в Приморском крае, было подтверждено [19], что COVID-19 является системным заболеванием с обширным вовлечением не только легких и сердца, но и других органов. При этом все пациенты имели поражение кровеносных сосудов. I. Reva et al. [20] рассматривают возможный механизм патогенеза COVID-19, связанный с повреждением эритроцитов, которые отнесены к основной ключевой мишени, запускающей каскад реакций, ведущих к полиорганной недостаточности. В кровеносных сосудах и паренхиме поврежденных легких у пациентов с COVID-19 выявлены патологические формы эритроцитов (анизоцитоз и пойкилоцитоз, гипохромные и гиперхромные эритроциты), характерные для различных анемий. По мнению авторов [20], наличие макрофагов с гемосидерином в цитоплазме, а также нахождение свободного гемосидерина в просвете сосудов свидетельствуют о том, что гибель эритроцитов начинается не в паренхиме легких, а на стадии циркуляции и доставки кислорода к тканям, что приводит к ишемии клеток и анемии из-за невозможности переноса гемоглобина поврежденными эритроцитами. Ранее была установлена возможность прикрепления вирусов гриппа и энцефаломиокардита к эритроцитам человека за счет рецептора гликофорина А с последующей гемагглютинацией клеток [21, 22].

К настоящему времени опубликовано много работ по патоморфологическому исследованию секционного материала пациентов, умерших от COVID-19, но об изменениях, возникающих в органах лимфатической системы, в частности в лимфатических узлах средостения, по-прежнему информации недостаточно. По данным литературы, распространенность внутригрудной лимфаденопатии составляет примерно 6% среди всех случаев COVID-19 [23, 24]. РНК SARS-CoV-2 удалось обнаружить в прикорневых и субкаринальных лимфатических узлах, как методом иммуногистохимии (моноклональные антитела к белку шипа), так и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [25, 26]. Морфологически лимфатические узлы имели нормальную структуру фолликулов с картиной гемофагоцитоза приблизительно в половине описываемых случаев [23, 25]. РНК коронавируса была также идентифицирована в трахее, селезенке, эпителии почечных канальцев, что подтверждало диссеминированный характер течения новой коронавирусной инфекции [27]. С помощью иммуногистохимии и ПЦР SARS-CoV-2

был обнаружен во всем желудочно-кишечном тракте (кроме пищевода) [28] и в селезенке [26, 29].

Достаточно подробно патологические изменения в лимфатических узлах описаны Н. Zhang et al. при аутопсийном исследовании 12 пациентов [24]. В прикорневых лимфатических узлах обнаружены нарушения гистоархитектоники ткани и макрофагальная инфильтрация, характеризующие картину неспецифического лимфаденита [30]. Наблюдалось расширение субкапсулярных синусов в прикорневых лимфатических узлах, инфильтрированных CD68⁺ макрофагами. Соотношение CD3⁺ Т-лимфоцитов и CD20⁺ В-лимфоцитов в коре лимфатических узлов не было нарушено. При световой микроскопии паратрахеального лимфатического узла выявлено наличие первичных лимфоидных фолликулов, что подтверждено иммуногистохимическим анализом, демонстрирующим экспрессию к антителам CD21⁺ и CD10⁻. Отмечалось некоторое расширение межфолликулярной зоны с рассеянными CD3⁺ Т-лимфоцитами. Иммуногистохимически регистрировалось небольшое увеличенное соотношение CD4⁺/CD8⁺ клеток. Полученные изменения наблюдались на фоне сохранной гистоархитектоники лимфатических узлов. Сходные изменения, а также снижение пула CD4⁺ лимфоцитов указаны и в других работах [31–33].

При поступлении в больницу Тунци с 10 января по 12 февраля 2020 года были собраны и проанализированы демографические и клинические данные во всех подтвержденных случаях COVID-19 (452 пациента), причем у 286 пациентов (59%) диагностирована тяжелая инфекция [34]. В большинстве наблюдений с тяжелым вариантом течения процесса наблюдались повышенные уровни биомаркеров, связанных с инфекцией, и воспалительных цитокинов. Количество В-клеток, Т-клеток и NK-клеток было значительно снижено у пациентов с COVID-19, особенно в тяжелых случаях. Показано, что Т-хелперный пул клеток больше всего страдает от SARS-CoV-2 при тяжелом варианте течения. При этом процент юных Т-хелперов увеличивался, а Т-хелперов памяти уменьшался. Пациенты с COVID-19 имели более низкий уровень регуляторных Т-лимфоцитов, и более явно они повреждались в тяжелых случаях. Сделано заключение [34], что SARS-CoV-2 может в основном действовать на лимфоциты, особенно на Т-лимфоциты, и вызывать «цитокиновый шторм» и серию иммунных ответов в организме. Наблюдение за субпопуляциями нейтрофилов и лимфоцитов помогало при раннем скрининге критических заболеваний, диагностике и лечении COVID-19.

Проанализировав данные литературы, можно сделать вывод, что коронавирус SARS-CoV-2 обнаруживается в лимфатических узлах и селезенке человека, вызывая повреждение тканей и уменьшение количества лимфоцитов. Актуальным остается вопрос, являются ли выявленные изменения прямым следствием репликации вируса и фатальными иммунными нарушениями у пациентов с COVID-19 или же отражают неспецифи-

ческие реактивные изменения, возникающие на фоне коронавирусной инфекции в результате общей диссеминации. При этом следует учесть, что у пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции обнаружено отсутствие образования зародышевых центров в лимфоидных фолликулах [35], являющихся основным центром формирования В-лимфоцитов гуморального иммунитета.

При анализе 18 летальных случаев в России [12] наряду с рутинной оценкой макро- и микроскопических изменений проведено иммуногистохимическое исследование легких и других органов с использованием сывороток к CD2–CD5, CD7, CD20, CD31, CD34, CD56, CD57, CD69. Выявлено, что клеточная инфильтрация, связанная с генерализацией вирусной инфекции, представлена преимущественно супрессорными популяциями Т-лимфоцитов и макрофагами, а инфильтрация CD8⁺ лимфоцитами в почках, печени, надпочечниках, перикарде, кишечнике свидетельствовала, по мнению авторов, о вероятном аутоиммунном компоненте патогенеза болезни.

Хотя у большинства пациентов симптомы заболевания были слабо выражены, у части их развились тяжелые проявления инфекции и наступил летальный исход от полиорганных осложнений [13, 36, 37]. К настоящему времени детально охарактеризована патологическая анатомия COVID-19 у людей, однако патогенез коронавирусной инфекции остается неясным. Тем не менее сделан вывод о возможном патогенетическом значении иммунных нарушений при COVID-19 и предлагаются лечебные рекомендации по введению высоких доз внутривенного иммуноглобулина [36].

Особый интерес представляет тяжелый острый респираторный синдром, или атипичная пневмония, вызванная коронавирусом SARS-CoV-1, первый случай которой был зарегистрирован в ноябре 2002 года в южном Китае. Вирус удалось идентифицировать в ткани лимфатических узлов в 59% исследуемых образцов, причем вирусная нагрузка была сопоставима с таковой при исследовании тонкой и толстой кишки [38]. Аналогичные данные получены и другими китайскими учеными [39]. При патоморфологическом исследовании в ткани лимфатических узлов и селезенки выявляли некроз с геморрагическим компонентом, сочетающийся с истощением пула лимфоцитов [40–43]. Это позволило сделать заключение, что патологические изменения, наблюдаемые в этих органах при COVID-19, вероятно, связаны с системными эффектами аномальных иммунных реакций на репликацию вируса и сходны с таковыми при коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2.

Российскими учеными [44] с помощью гистологического и иммуногистохимического (с использованием антител к CD4, CD8, CD20, CD30, CD123, CD138, PD-1) методов исследована ткань лимфатических узлов 17 пациентов, умерших от COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения. Установлены редук-

ция 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 наблюдался 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.

Лимфопения – демонстративный признак иммунной дисфункции при коронавирусной инфекции COVID-19

Заслуживает внимания тот факт, что при новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у пациентов часто выявлялась лимфопения (лимфоцитопения), которая имеет отношение к гемограмме и характеризует количество лимфоцитов в крови $<1,0 \times 10^9/\text{л}$ [26, 30, 45]. Например, в Китае при госпитализации пациентов с COVID-19 в клинических анализах крови лимфопения составляла до 83,2% случаев [46, 47]. Ретроспективный анализ клинических данных пациентов, госпитализированных в Ухане, показал снижение лимфоцитов в периферической крови в 85% наблюдений [48, 49]. Подобный феномен был отмечен примерно у 40% первых пациентов с COVID-19, госпитализированных в Сингапуре [50]. При этом у многих переболевших снижение уровня лимфоцитов в периферической крови не достигало нормальных значений даже через 11 недель после выздоровления [51].

У 69% пациентов с лимфопенией была выявлена реактивная популяция лимфоцитов, включая подгруппу лимфоцитоплазматических форм (лимфоидные клетки с плазмцитарной дифференцировкой), которая не присутствовала в периферической крови у пациентов с SARS в Сингапуре в 2003 году, но имела только в 15,2% случаев в аналогичном исследовании в Гонконге [51, 52].

В исследованиях W. Guan et al. (2020) [46], объединивших в себе данные из разных провинций Китая, получены интересные биохимические результаты: С-реактивный белок был повышен у 60,7% пациентов, повышенный прокальцитонин, являющийся маркером вторичной бактериальной инфекции, осложняющей течение COVID-19, обнаружен у 5,5%, а повышенная активность лактатдегидрогеназы у 41%.

В течение инкубационного периода, обычно в диапазоне с 1-го по 14-й день, и в ранней фазе заболевания, когда присутствовали неспецифические симптомы, количество лейкоцитов и лимфоцитов периферической крови соответствовало норме или было слегка снижено. Спустя приблизительно 7–14 дней после начальных симптомов обнаруживались клинические проявления заболевания с выраженным системным повышением провоспалительных цитокинов, что именуется «цитокиновым штормом» [53]. К этому моменту лимфопения

становилась совершенно очевидной. Хотя причина лимфопении в случае COVID-19 до конца не изучена, названы некоторые факторы, приводящие к данному состоянию. Например, было показано, что лимфоциты тоже экспрессируют на своей поверхности АПФ2 [54], поэтому SARS-CoV-2 может непосредственно инфицировать эти клетки и в конечном счете приводить к их повреждению. Активация цитокинов может быть связана с атрофией лимфоидных органов, в том числе селезенки, что снижает количество циркулирующих лимфоцитов [29, 55].

Лимфопения также была отмечена у пациентов с критически тяжелым течением COVID-19 в Вашингтоне (США) [56, 57]. Она оказалась более выраженной в случае летальных исходов [47]. Сообщалось, что при тяжелом протекании заболевания и летальном исходе уровень лимфоцитов как при поступлении, так и в период госпитализации был значительно ниже по сравнению с таковым у выздоровевших пациентов [34, 58]. В отличие от умерших пациентов у выживших минимум количества лимфоцитов наблюдался на 7-й день с момента появления симптомов и при выздоровлении [59]. Однако механизмы, вызывающие потерю отдельных популяций иммунных клеток, недостаточно изучены.

В наших наблюдениях летальных случаев COVID-19, произошедших в 2020 году в Приморском крае (включая Владивосток), в премортальном периоде заболевания отмечено достоверное снижение числа лимфоцитов у 73% пациентов и тромбоцитов у 47%. Феномен лимфопении определялся на фоне увеличения общего числа лейкоцитов в 76% случаев, что соответствовало воспалительному заболеванию.

Апоптоз лимфоцитов как один из потенциальных индукторов лимфопении при COVID-19

Известно, что инфекция и клеточная гибель (некроз, апоптоз) – взаимовлияющие процессы, развитие которых может сыграть критическую роль в судьбе как организма-хозяина, так и микроорганизма-возбудителя [60]. В зарубежной литературе 2000-х годов обращают на себя внимание работы, посвященные апоптозу клеток иммунной системы при инфекционных болезнях, в том числе интенсивному апоптозу лимфоцитов при сепсисе.

Установлено [61, 62], что лимфоциты подвергаются массивному нерегулируемому апоптозу у больных людей и лабораторных животных при ряде тяжелых инфекций, протекающих с развитием сепсиса, потенциально играющего большую роль в случаях сильной иммуносупрессии, что характеризует терминальную фазу летального инфекционного заболевания. Сдвига в сторону начала апоптоза следует ожидать в течение ранней фазы сепсиса, когда патогены (бактерии, вирусы) или их побочные продукты стимулируют макрофаги к освобождению TNF- α , оксида азота и глюкокортикоидов. У большинства пациентов, умерших от сепсиса,

наблюдались апоптотические изменения лимфоцитов и потеря клеток в ткани селезенки, а приблизительно 15% этих больных имели пролонгированную лимфопению в течение терминального периода [63]. Отмечается [64, 65], что нарастающий лимфоцитарный апоптоз при септическом шоке начинается рано и тяжелая лимфопения (премортальное уменьшение циркулирующих лимфоцитов) прогнозировала летальный исход. Экстенсивный апоптоз лимфоцитов отмечен у человека и животных не только при бактериальном сепсисе, но и при инфицировании возбудителями особо опасных инфекций, включая вирус *Ebola* (возбудитель геморрагической лихорадки Эбола), возбудители сибирской язвы и чумы [62]. На мышинной модели интраназальной инфекции *Yersinia pestis* усиленный апоптоз лимфоцитов в селезенке обнаружили спустя 36 часов после заражения [66]. Экспериментальное ингибирование апоптоза через генетическую модификацию или фармакологическое вмешательство улучшало выживание животных [62].

Анализируя литературу о патологии инфекции, вызванной SARS-CoV-2, по нашему мнению, достаточно обоснованно можно высказать гипотезу, что одним из потенциальных индукторов лимфопении является нерегулируемый апоптоз циркулирующих лимфоцитов наряду с деструкцией лимфоцитов вследствие секреции лимфоидными клетками проапоптотических лигандов и тканевой лимфоидной инфильтрацией в условиях цитокиновой активации. Так, в атласе «Патологическая анатомия COVID-19» [13], основанном на 2000 аутопсий в Российской Федерации, указывается, что в органах иммунной системы выявлен широкий диапазон изменений, обусловленный рядом взаимоотношающихся событий – длительностью болезни, особенностями терапии, наличием коморбидных заболеваний и т.д. Морфологические изменения тканей иммунной системы демонстрируют пеструю картину. Они могут варьировать от полного опустошения, напоминающего изменения при ВИЧ-инфекции на стадии СПИДа, до разной степени гиперплазии. В органах иммуногенеза целевыми областями становятся В- и Т-зависимые зоны селезенки и лимфатических узлов. В краевых синусах лимфатических узлов (как и в легочной ткани) обнаружены феномены аутоцитотрофии и фагоцитоза макрофагами целых лимфоцитов и их фрагментов, которые скорее всего представляют собой апоптотические тельца. В связи с этим следует также отметить, что в трех из 11 летальных случаев, наблюдавшихся в Приморском крае [19], было обнаружено лимфоидное истощение белой пульпы селезенки. Особого внимания заслуживает факт, что развивающийся при COVID-19 «цитокиновый шторм» характеризуется существенно возросшими уровнями интерлейкинов (в основном IL-6, IL-2, IL-7, GM-CSF, CXCL10, MCP-1, MIP1- α) и провоспалительных цитокинов (TNF α), которые могут приводить к апоптозу лимфоцитов [30, 67]. Повышенный уровень IL-7 в сыворотке крови указывает на

недостаточность системных Т-лимфоцитов и признаки усиления пролиферации Т-клеток у пациентов с тяжелой лимфопенией [68]. Полученные результаты [68] также указали на увеличение апоптоза мононуклеарных клеток у пациентов с COVID-19, которое было более значительным в тяжелых клинических случаях. Согласно предыдущим данным этих же исследователей, SARS-CoV-2 имеет способность индуцировать внутренние и внешние пути апоптоза и стимулировать апоптоз Т-клеток, что также наблюдалось в случаях с MERS-CoV.

В работе Y. Xiong et al. [68] сообщается, что вызванная SARS-CoV-2 активация апоптоза и сигнального пути P53 в лимфоцитах может быть причиной лимфопении у пациентов. Лабораторные данные трех пациентов показали снижение количества различных типов иммунных клеток, включая лимфоциты, в крови. Также выявлено, что несколько значительно измененных генов обогащено сигнальными путями апоптоза и P53, включая *CTSL*, *CTSB*, *DDIT4*, *RRAS*, *CTSD*, *BIRC5*, *TNFSF10*, *CTSZ*, *NTRK1*, *IGFBP3*, *CCNB1*, *RRM2*, *CCNB2*, *GTSE1*, *CDK1*, *STEAP3* и *TP53I3*.

Важные данные получены иранскими исследователями [69], проанализировавшими демографические и клинические данные 61 пациента, госпитализированного с подтвержденным COVID-19. При этом мононуклеарные клетки периферической крови были выделены из всех образцов, и картина апоптоза оценена с использованием аннексина V/пропидия иодида. Частота субпопуляций лимфоцитов, включая T-CD4⁺, T-CD8⁺, NK, В-клетки и моноциты, измерена у всех пациентов и у 59% лиц в контрольной группе с помощью проточной цитометрии. Результаты показали, что процент лимфоцитов, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток был снижен у пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой. Количество лимфоцитов, CD4⁺, CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток в большей степени снижалось в тяжелых случаях по сравнению с легкими.

Заключение

В 2020 году важнейшим событием мирового уровня стала пандемия новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Быстрое распространение COVID-19 во многие страны мира изначально предполагало, что иммунная система значительно вовлечена в патологический процесс коронавирусной инфекции. При этом остается недостаточно информации об изменениях в лимфоидных органах, в первую очередь в регионарных лимфатических узлах средостения. Тем не менее не вызывает сомнений, что SARS-CoV-2 может в основном действовать на лимфоциты, особенно на Т-лимфоциты, и вызывать «цитокиновый шторм» и серию иммунных ответов в организме.

В обзоре акцентировано внимание на клиничко-патоморфологических проявлениях иммунной дисфункции при COVID-19, что имеет большое значение для

углубленного понимания патогенеза коронавирусного процесса. Важен факт премортальной упорной лимфопении у значительного числа пациентов, которая имеет прогностическое значение в конкретных случаях COVID-19 и ассоциируется с выраженным опустошением (атрофией) лимфоидных органов. На основании анализа имеющихся данных литературы о патоморфологии и иммунных сдвигах при COVID-19 высказана гипотеза, что одним из потенциальных индукторов лимфопении является нерегулируемый апоптоз циркулирующих лимфоцитов. Характерная для коронавирусной инфекции активация цитокинов («цитокиновый шторм») может приводить к опустошению лимфоидных органов, что также способствует снижению количества циркулирующих лимфоцитов.

Учитывая сказанное выше, актуальны дальнейшее изучение иммунопатогенеза болезни и идентификация апоптоза клеток иммунной системы, индуцированного SARS-CoV-2, как одной из причин лимфопении и иммунной дисфункции при COVID-19, что имеет перспективы для прогнозирования тяжелого (летального) исхода этой инфекции и поиска средств фармакологического воздействия на процесс лимфоцитарного апоптоза.

Литература/References

1. Д.К. Львов (ред.). Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Москва: МИА, 2013. 1200 с.
DK Lvov (ed.). Handbook of virology. Viruses and viral infections of humans and animals. Moscow: Med. Inf. Agency, 2013. 1200 p. (In Russ.).
2. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae). Инфекция и иммунитет. 2020;10(2):221–246. DOI: 10.15789/2220-7619-NOI-1412.
Shchelkanov MYu, Popova AYu, Dedkov VG, Akimkin VG, Maleev VV. History of investigation and current classification of coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae). Russian Journal of Infection and Immunity. 2020;10(2):221–246 (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-NOI-1412.
3. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Львов Д.К. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности. Лечащий врач. 2013;10:49–54.
Shchelkanov MYu, Kolobukhina LV, Lvov DK. Human coronaviruses (Nidovirales, Coronaviridae): increased level of epidemic threat. The Practitioner. 2013;10:49–54 (In Russ.).
4. А.Г. Чучалин (ред.). Пульмонология. Национальное руководство. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 800 с.
AG Chuchalin (ed.). Pulmonology. National guidance. Moscow: GEOTAR-Media, 2016. 800 p. (In Russ.).
5. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б. Ближневосточный респираторный синдром: когда вспыхнет тлеющий очаг? Тихоокеанский медицинский журнал. 2015;2(60):94–98.

- Shchelkanov MYu, Ananiev VYu, Kuznetsov VV, Shumatov VB.* Middle East respiratory syndrome: when will smouldering focus outbreak? *Pacific Medical Journal.* 2015;2(60):94–98 (In Russ.).
6. *Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Кузнецов В.В., Шуматов В.Б.* Эпидемическая вспышка ближневосточного респираторного синдрома в Республике Корея (май–июль 2015 г.): причины, динамика, выводы. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2015;3:25–29.
Shchelkanov MYu, Ananiev VYu, Kuznetsov VV, Shumatov VB. Epidemic outbreak of Middle East respiratory syndrome in the Republic of Korea (May–July, 2015): reasons, dynamics, conclusions. *Pacific Medical Journal.* 2015;3:25–29 (In Russ.).
 7. *Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Бургасова О.А., Кружкова И.С., Малеев В.В.* COVID-19: этиология, клиника, лечение. *Инфекция и иммунитет.* 2020;10(3):421–445. DOI: 10.15789/2220-7619-СЕС-1473.
Shchelkanov MYu, Kolobukhina LV, Burgasova OA, Kruzhkova IS, Maleev VV. COVID-19: etiology, clinical picture, treatment. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2020;10(3):421–445 (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-СЕС-1473.
 8. *Никифоров В.В., Колобухина Л.В., Сметанина С.В., Мазанкова Л.Н., Плавунوف Н.Ф., Щелканов М.Ю. и др.* Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): этиология, эпидемиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика. Учебно-методическое пособие. Москва: Департамент здравоохранения города Москвы, 2020. 71 с.
Nikiforov VV, Kolobukhina LV, Smetanina SV, Mazankova LN, Plavunov NF, Shchelkanov MYu. Novel coronavirus infection (COVID-19): etiology, epidemiology, clinics, diagnostics, treatment, and prophylaxis. Educational and methodological guide. Moscow: Department of Public Health of Moscow city, 2020. 71 p. (In Russ.).
 9. *Грибова В.В., Окунь Д.Б., Шалфеева Е.А., Щеглов Б.О., Щелканов М.Ю.* Облачный сервис для дифференциальной клинической диагностики острых респираторных вирусных заболеваний (в том числе – связанных с особо опасными коронавирусами) методами искусственного интеллекта. *Якутский медицинский журнал.* 2020;2(70):44–47. DOI: 10.25789/YMJ.2020.70.13.
Gribova VV, Okun DB, Shalfeeva EA, Shcheglov BO, Shchelkanov MYu. Cloud service for the differential clinical diagnostics of acute respiratory viral diseases (including those associated with highly contagious coronaviruses) with an application of methods of artificial intelligence. *Yakut Medical Journal.* 2020;2(70):44–47 (In Russ.). DOI: 10.25789/YMJ.2020.70.13.
 10. *Chiappelli F, Khakshooy A, Greenberg G.* COVID-19 immunopathology and immunotherapy. *Bioinformation.* 2020;16(3):219–22. DOI: 10.6026/97320630016219.
 11. World Health Organization. Weekly epidemiological update – 29 December 2020. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---29-december-2020> (date of request: 07.01.2021).
 12. *Цинзерлинг В.А., Ващукова М.А., Васильева М.В., Исаков А.Н., Луговская Н.А., Наркевич Т.А. и др.* Вопросы патоморфогенеза новой коронавирусной инфекции (COVID-19). *Журнал инфектологии.* 2020;12(2):5–11. DOI: 10.22625/2072-6732-2020-12-2-5-11.
Zinserling VA, Vashukova MA, Vasilyeva MV, Isakov AN, Lugovskaya NA, Narkevich TA et al. Issues of pathology of a new coronavirus infection COVID-19. *Journal Infectology.* 2020;12(2):5–11 (In Russ.). DOI: 10.22625/2072-6732-2020-12-2-5-11.
 13. *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, Chernyaev AL, Mishnev OD, Krupnov NM et al. / OV Zayratyants (ed.). COVID-19 Anatomical pathology: Atlas. Moscow, Research Institute of Health Organization and Medical Management of the Moscow Department of Health, 2020. 140 p. (In Russ.).
 14. *Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A et al.* Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: A prospective cohort study. *Ann Intern Med.* 2020;173(4):268–77. DOI: 10.7326/M20-2003.
 15. *Driggin E, Madhavan MV, Bikdeli B, Chuich T, Laracy J, Biondi-Zoccai G et al.* Cardiovascular considerations for patients, health care workers, and health systems during the COVID-19 pandemic. *J Am Coll Cardiol.* 2020;75(18):2352–71. DOI: 10.1016/j.jacc.2020.03.031.
 16. *Jiang F, Deng L., Zhang L, Cai Y, Cheung CW, Xia Z.* Review of the clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Gen Intern Med.* 2020;35(5):1545–9. DOI: 10.1007/s11606-020-05762-w.
 17. *Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Zhou P, Pan P et al.* Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol.* 2020;92(4):424–32. DOI: 10.1002/jmv.25685.
 18. *Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ.* COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020;395(10229):1033–4. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
 19. *Рева И.В., Ямамото Т., Гордзиевская К.В., Рассказова М.Е., Вершинина С.С., Фисенко А.Ю. и др.* Патогенез коронавирусной болезни 2019 (COVID-19), вызванной Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS Cov-2). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2020;9:23–29. DOI: 10.17513/mjpf.13122.
Reva IV, Yamamoto T, Gordzиеvskaya KV, Rasskazova ME, Verшинina SS, Fisenko AYU et al. Pathogenesis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS Cov-2). *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy (International Journal of Applied and Basic Research).* 2020;9:23–29 (In Russ.). DOI: 10.17513/mjpf.13122.
 20. *Reva I, Yamamoto T, Rasskuzova M, Lemeshko T, Usov V, Krasnikov Yu et al.* Erythrocytosis as a target of SARS Cov-2 in pathogenesis of COVID-19. *Archiv Euromedica.* 2020;10(3):5–11. DOI: 10.35630/2199-885X/2020/10/3.1.
 21. *Allaway GP, Burness AT.* Site of attachment of encephalomyocarditis virus on human erythrocytes. *J Virol.* 1986;59(3):768–70. DOI: 10.1128/JVI.59.3.768-770.1986.
 22. *Burness AT, Pardoe IU.* Effect of enzymes on the attachment of influenza and encephalomyocarditis viruses to erythrocytes.

- J Gen Virol. 1981;55(2):275–88. DOI: 10.1099/0022-1317-55-2-275.
23. *Maiese A, Manetti AC, La Russa R, Di Paolo M, Turillazzi E, Frati P et al.* Autopsy findings in COVID-19-related deaths: a literature review. *Forensic Sci Med Pathol.* 2020;1–18. DOI: 10.1007/s12024-020-00310-8.
 24. *Zhang H, Zhou P, Wei Y, Yue H, Wang Y, Hu M et al.* Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Ann Intern Med.* 2020;172(9):629–32. DOI: 10.7326/M20-0533.
 25. *Bradley BT, Maioli H, Johnston R, Chaudhry I, Fink SL, Xu H et al.* Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet.* 2020;396(10247):320–32. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)31305-2.
 26. *Feng Z, Diao B, Rongshuai W, Wang G, Wang Ch, Tan Y et al.* The novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) directly decimates human spleens and lymph nodes. *medRxiv.* 2020:1–18. DOI: 10.1101/2020.03.27.20045427.
 27. *Polak SB, van Gool IC, Cohen D, von der Thüsen JH, van Paassen J.* A systematic review of pathological findings in COVID-19: a pathophysiological timeline and possible mechanisms of disease progression. *Mod Pathol.* 2020;33(11):2128–38. DOI: 10.1038/s41379-020-0603-3.
 28. *Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H.* Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology.* 2020;158(6):1831–3. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.02.055.
 29. *Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC et al.* Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis.* 2020;71(9):2428–46. DOI: 10.1093/cid/ciaa325.
 30. *Liu Q, Shi Yu, Cai J, Duan Y, Rongshuai W, Zhang H et al.* Pathological changes in the lungs and lymphatic organs of twelve COVID-19 autopsy cases. *Natl Sci Rev.* 2020;7(12):1868–78. DOI: 10.1093/nsr/nwaa247.
 31. *Bian XW.* Autopsy of COVID-19 patients in China. *Natl Sci Rev.* 2020;7(9):1414–8. DOI: 10.1093/nsr/nwaa123.
 32. *Elsoukkary SS, Mostyka M, Dillard A, Berman DR, Ma LX, Chadburn A et al.* Autopsy findings in 32 patients with COVID-19: A single-institution experience. *Pathobiology.* 2021;88(1):56–68. DOI: 10.1159/000511325.
 33. *Wang XX, Shao C, Huang XJ, Sun L, Meng LJ, Liu H et al.* Histopathological features of multiorgan percutaneous tissue core biopsy in patients with COVID-19. *J Clin Pathol.* 2020;jclinpath-2020-206623. DOI: 10.1136/jclinpath-2020-206623.
 34. *Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y et al.* Dysregulation of immune response in patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):762–8. DOI: 10.1093/cid/ciaa248.
 35. *Duan YQ, Xia MH, Ren L, Zhang YF, Ao QL, Xu SP et al.* Deficiency of Tfh cells and germinal center in deceased COVID-19 patients. *Curr Med Sci.* 2020;40(4):618–24. DOI: 10.1007/s11596-020-2225-x.
 36. *Lin L, Lu L, Cao W, Li T.* Hypothesis for potential pathogenesis of SARS-CoV-2 infection—a review of immune changes in patients with viral pneumonia. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):727–32. DOI: 10.1080/22221751.2020.1746199.
 37. *Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C et al.* Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020;8(4):420–2. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
 38. *Farcaș GA, Poutanen S, Mazzulli T, Willey BM, Butany J, Asa SL et al.* Fatal severe acute respiratory syndrome is associated with multiorgan involvement by coronavirus. *J Infect Dis.* 2005;191(2):193–7. DOI: 10.1086/426870.
 39. *Zhang QL, Ding YQ, Hou JL, He L, Huang ZX, Wang HJ et al.* Detection of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus RNA in autopsy tissues with in situ hybridization. *Academic Journal of the First Medical College of PLA.* 2003;23(11):1125–7. PMID: 14625166.
 40. *Chan-Yeung M, Yu WC.* Outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong Special Administrative Region: case report. *BMJ.* 2003;326(7394):850–2. DOI: 10.1136/bmj.326.7394.850.
 41. *Ding YQ, Wang H, Shen H, Li ZG, Geng J, Han HX et al.* Study on etiology and pathology of severe acute respiratory syndrome. *Chinese Journal of Pathology.* 2003;32(3):195–200. PMID: 12882680.
 42. *Lang Z, Zhang L, Zhang S, Meng X, Li J, Song C et al.* Pathological study on severe acute respiratory syndrome. *Chin Med J (Engl).* 2003;116(7):976–80. PMID: 12890365.
 43. *Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003;361(9366):1319–25. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)13077-2.
 44. *Ковригина А.М., Шаламова Е.А., Березовский Ю.С., Калинин Д.В., Грецов Е.М., Багдасарян Т.Р. и др.* Патоморфологическая и иммуногистохимическая характеристика изменений лимфатических узлов у умерших от COVID-19 по данным аутопсий. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(4):12–23. DOI: 10.31088/CEM2020.9.4.12-23.
 45. *Kovrigina AM, Shalamova EA, Berezovsky YuS, Kalinin DV, Greitsov EM, Baghdasaryan TR et al.* Pathomorphological and immunohistochemical features of lymph nodes in COVID-19 patients (autopsy study). *Clinical and Experimental Morphology.* 2020;9(4):12–23 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.4.12-23.
 46. *Tabary M, Khanmohammadi Sh, Araghi F, Dadkhahfar S, Tavangar SM.* Pathologic features of COVID-19: A concise review. *Pathol Res Pract.* 2020;216(9):153097. DOI: 10.1016/j.prp.2020.153097.
 47. *Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX et al.* Clinical characteristics of Coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(18):1708–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
 48. *Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323(11):1061. DOI: 10.1001/jama.2020.1585.
 49. *Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T et al.* Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):811–8. DOI: 10.1001/jamacardio.2020.1017.
 50. *Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H et al.* Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational

- study. *Lancet Respir Med.* 2020;8(5):475–81. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
50. *Young BE, Ong SWX, Kalimuddin S, Low JG, Tan SY, Loh J et al.* Epidemiologic features and clinical course of patients infected with SARS-CoV-2 in Singapore. *JAMA.* 2020;323(15):1488. DOI: 10.1001/jama.2020.3204.
 51. *Fan BE, Chong VCL, Chan SSW, Lim GH, Lim KGE, Tan GB et al.* Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection. *Am J Hematol.* 2020;95(6):E131–4. DOI: 10.1002/ajh.25774.
 52. *Lee N, Hui D, Wu A, Chan P, Cameron P, Joynt GM et al.* A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med.* 2003;348(20):1986–94. DOI: 10.1056/NEJMoa030685.
 53. *Li T, Lu H, Zhang W.* Clinical observation and management of COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):687–90. DOI: 10.1080/22221751.2020.1741327.
 54. *Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X et al.* High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):8. DOI: 10.1038/s41368-020-0074-x.
 55. *Xu X, Chang XN, Pan HX, Su H, Huang B, Yang M et al.* Pathological changes of the spleen in ten patients with new coronavirus infection by minimally invasive autopsies. *Chinese Journal of Pathology.* 2020;49(6):576–82. DOI: 10.3760/cma.j.cn112151-20200401-00278.
 56. *Arentz M, Yim E, Klaff L, Lokhandwala S, Riedo FX, Chong M et al.* Characteristics and outcomes of 21 critically ill patients with COVID-19 in Washington State. *JAMA.* 2020;323(16):1612–14. DOI: 10.1001/jama.2020.4326.
 57. *Bhatraju PK, Ghassemieh BJ, Nichols M, Kim R, Jerome KR, Nalla AK et al.* Covid-19 in critically ill patients in the Seattle Region – case series. *N Engl J Med.* 2020;382(21):2012–22. DOI: 10.1056/NEJMoa2004500.
 58. *Deng Y, Liu W, Liu K, Fang YY, Shang J, Zhou L et al.* Clinical characteristics of fatal and recovered cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Wuhan, China: a retrospective study. *Chin Med J (Engl.).* 2020;133(11):1261–7. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000824.
 59. *Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395(10229):1054–62. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
 60. *Сомова Л.М., Беседнова Н.Н., Плехова Н.Г.* Апоптоз и инфекционные болезни. *Инфекция и иммунитет.* 2014;4(4):303–318. DOI: 10.15789/2220-7619-2014-4-303-318.
 - Somova LM, Besednova NN, Plekhova NG.* Apoptosis and infectious diseases. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2014;4(4):303–318 (In Russ.). DOI: 10.15789/2220-7619-2014-4-303-318.
 61. *Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC et al.* Sepsis-induced apoptosis caused progressive profound depletion of B and CD+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001;166(11):6952–53. DOI: 10.4049/jimmunol.166.11.6952.
 62. *Parrino J, Hotchkiss RS, Bray M.* Prevention of immune cell of apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerging Infectious Diseases.* 2007;13(2):191–8. DOI: 10.3201/eid1302.060963.
 63. *Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Cooper-smith CM, Karl IE.* Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the cell receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol.* 2005;174:5110–8. DOI: 10.4049/jimmunol.174.8.5110.
 64. *Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Gulloux V, Tribut O, Amiot L et al.* Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock.* 2002;18(6):487–94. DOI: 10.1097/00024382-200212000-00001.
 65. *Toti P, de Felice C, Occhini R, Schuerfeld K, Stumpo M, Epistolato MC.* Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis. *Amer J Clin Pathol.* 2004;122(5):765–71. DOI: 10.1309/RV6E9BMC9954A2WU.
 66. *Lathem WW, Crosby SD, Miller VI, Goldman WE.* Progression of primary pneumonic plague: a mouse model of infection, pathology and bacterial transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(49):17786–91. DOI: 10.1073/pnas.0506840102.
 67. *Aggarwal S, Gollapudi S, Yel L, Gupta AS, Gupta S.* TNF-alpha-induced apoptosis in neonatal lymphocytes: TNFRp55 expression and downstream pathways of apoptosis. *Genes Immun.* 2000;1(4):271–9. DOI: 10.1038/sj.gene.6363674.
 68. *Xiong Y, Liu Y, Cao L, Wang D, Guo M, Jiang A et al.* Transcriptional characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):761–70. DOI: 10.1080/22221751.2020.1747363.
 69. *Taghilo S, Aliyali M, Abedi S, Mehravaran H, Sharifpour A, Zaboli E et al.* Apoptosis and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes in Iranian COVID-19 patients: Clinical and laboratory characteristics. *J Med Virol.* 2020;93(3):1589–98. DOI: 10.1002/jmv.26505.

Информация об авторах

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

Евгений Анатольевич Коцюрбий – кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины Тихоокеанского государственного медицинского университета.

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

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

Михаил Юрьевич Щелканов – доктор биологических наук, доцент, директор НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, заведующий лабораторией вирусологии ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, заведующий лабораторией экологии микроорганизмов Школы биомедицины Дальневосточного федерального университета.

Author information

Larisa M. Somova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology.

<https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>

Evgeniy A. Kotsyurbiy – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Pacific State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-4382-7046>

Elena I. Drobot – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology.

<https://orcid.org/0000-0001-7672-1582>

Irina N. Lyapun – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology.

<https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Mikhail Yu. Shchelkanov – Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Director of Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Head of the Laboratory of Virology, Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity; Head of the Laboratory of Microorganism Ecology in the School of Biomedicine, Far Eastern Federal University.

<https://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Novel clinical and morphological predictors of malignancy in patients with ovarian endometrioid cysts

L.M. Mikhaleva¹, O.I. Patsap², T.V. Bezuglova¹, A.I. Davydov³, [G.M. Aliev](#)^{1,3,4}

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, Moscow, Russia

⁴ GALLY International Research Institute, San Antonio, TX, USA

Introduction. Endometriosis is an endless source of scientific investigations, but still the mechanisms of malignant transformation of ovarian endometriosis remain to be understood.

Patients and methods. This study was conducted on surgical specimens isolated from ovarian endometrioid cysts (OEC) and the endometriosis-associated ovarian tumors obtained after surgical operation from 117 patients. The normal level of serum CA 125 was assumed to be up to 35 IU/ml. Immunohistochemical study of MCK, CK7, CK20, CK 8/18, Calretinin, EMA, Ki67, CEA, Vimentin, Inhibin, WT1, p53, ARID1A (BAF250a), CA 125 antibodies was performed.

Results. The results revealed a direct correlation between the level of serum CA 125 and the WT1 expression in the OEC epithelium (Pearson $r=0.84$, $p<0.0001$) and between the level of serum CA 125 and the p53 expression (Pearson $r=0.81$, $p<0.0001$). A striking direct correlation was found when studying the relationship between WT1 and p53 expression in OEC epithelium (Pearson $r=0.79$, $p<0.0001$).

Conclusion. This research delineated the changes in OEC epithelium, which were similar to the serous epithelial type and associated with an extensive rise in the serum biomarker CA 125 level, which could be indicative of the early neoplastic transformation of OEC.

Keywords: CA 125, WT1, p53, ovarian endometrial cyst, ARID1A, malignant transformation

Corresponding author: Olga I. Patsap. E-mail: patsap.o@fccps.ru

For citation: Mikhaleva L.M., Patsap O.I., Bezuglova T.V., Davydov A.I., [Aliev G.M.](#) Novel clinical and morphological predictors of malignancy in patients with ovarian endometrioid cysts. Clin. exp. morphology. 2021;10(1):21–32. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.21-32.

Funding. The study was carried out without any sponsorship.

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

Received 11.01.2021. **Received in revised form** 02.02.2021. **Accepted** 11.02.2021.

УДК: 61:616-091.816

Новые клинко-морфологические предикторы неопластической трансформации у пациенток с эндометриоидными кистами яичников

Л.М. Михалева¹, О.И. Пацап², Т.В. Безуглова¹, А.И. Давыдов³, [Г.М. Алиев](#)^{1,3,4}

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

² ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

³ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Институт клинической медицины имени Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

⁴ Международный научно-исследовательский институт GALLY, Сан-Антонио, Техас, США

Введение. Проблема эндометриоза является неиссякаемым источником для научных исследований, при этом механизмы злокачественной трансформации эндометриоза яичников все еще остаются недостаточно изученными.

Материалы и методы. Исследование проведено на операционном материале эндометриоидных кист яичников (ЭКЯ) и опухолей яичников, полученных после хирургических операций у 117 пациенток. Нормальным уровнем сывороточного онкомаркера СА 125 были приняты значения до 35 МЕ/мл включительно. Иммуногистохимическое исследование проводилось с использованием маркеров МСК, СК7, СК20, СК 8/18, Calretinin, EMA, Ki67, CEA, Vimentin, Inhibin, WT1, p53, ARID1A (BAF250a), СА 125.

Результаты. Выявлена прямая корреляция между уровнем сывороточного СА 125 и экспрессией WT1 в эпителии ЭКЯ (коэффициент Пирсона, $r=0,84$, $p<0,0001$) и между уровнем сывороточного СА 125

и экспрессией p53 в эпителии ЭКЯ ($r=0,81$, $p<0,0001$). Сильная прямая корреляция обнаружена при изучении взаимосвязи между экспрессией WT1 и p53 в эпителии ЭКЯ ($r=0,79$, $p<0,0001$).

Заключение. По результатам данного исследования выявлены изменения в эпителии ЭКЯ с иммунофенотипом, подобным серозному эпителию, и эти изменения связаны со значительным повышением уровня сывороточного биомаркера СА 125, что может указывать на раннюю неопластическую трансформацию ЭКЯ.

Ключевые слова: СА 125, WT1, p53, эндометриоидная киста яичника, ARID1A, злокачественная трансформация

Для корреспонденции: Ольга Игоревна Пацап. E-mail: patsap.o@fccps.ru

Для цитирования: Михалева Л.М., Пацап О.И., Безуглова Т.В., Давыдов А.И., Алиев Г.М. Новые клинико-морфологические предикторы неопластической трансформации у пациенток с эндометриоидными кистами яичников. Клини. эксп. морфология. 2021;10(1):21–32 (англ.). DOI: 10.31088/SEM2021.10.1.21-32.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 11.01.2021. **Получена после рецензирования** 02.02.2021. **Принята в печать** 11.02.2021.

Introduction

Endometriosis takes the third place in all gynecological diseases after inflammation and leiomyoma. The incidence of endometriosis in fertile women ranges up to 15% and is one of the most common causes of infertility and chronic pelvic pain syndrome [1–4].

Endometriosis is characterized by ectopic tissue morphologically similar to the endometrium, with glands and stroma. To date, many theories have been proposed, which highlight the etiology, pathogenesis, and natural history of the endometriosis and endometriosis-associated tumors with genetic alterations, changes in the microenvironment, stress factors, etc., but none of them can explain the entire variety of its forms and ability to neoplastic transformation [1, 2, 5–7].

The history of malignant transformation of endometriosis started in 1925 when John Sampson first described endometriosis-associated malignancy criteria [8]. Malignant transformation of endometriosis is a rare phenomenon that occurs in about 0.7–2.5% of cases and, when it occurs, it usually involves the ovary [1, 9, 10]. Endometriotic foci also were identified near ovarian epithelial carcinomas and within these carcinomas. So, they were named endometriosis-associated tumors and included predominantly endometrioid, clear-cell carcinomas, and a minor group of seromucinous tumors [11, 12]. The risk of endometrioid and clear-cell ovarian tumors is 2–3 times higher in women with endometriosis [10, 13]. Further investigation led to discovering so-called “atypical” endometriosis. It consumes gradual changing of normal endometrioid cyst epithelium into atypical endometriosis with loss of nuclear polarity, hyperchromic nuclei, syncytial papillary changes, large hobnail cells, and then into invasive carcinoma [10]. Endometriosis was significantly associated with borderline ovarian tumors and endometriosis-associated ovarian carcinomas [14]. Atypical endometriosis and endometriosis-associated ovarian tumors have similar molecular changes, such as *PTEN*, *ARID1A*, and *HNF-1b* mutations. Moreover, *ARID1A* mutations were observed in clear-cell tumors

and atypical endometriosis but not in distant endometrioid foci [10, 15].

The mechanisms of malignant transformation of endometriosis such as genetic, epigenetic factors, microenvironment have been reported earlier [1–15]. The following neoplastic transformation pathways make a significant contribution to the development of “atypical” endometriosis and endometriosis-associated tumors. These include *KRAS/BRAF* mutations, *TP53* mutations, mTOR pathway, *ARID1A* mutation, iron metabolism, redox molecules in endometriotic cyst fluid, etc. Previous investigation has revealed a number of pathophysiological changes in endometriosis-associated carcinomas, such as deregulated oxidoreductase activity, metabolism, hormone activity, inflammatory response, innate immune response, and cell-to-cell signaling [16]. DNA methylation and demethylation, histone modifications, and miRNA aberrant expressions play a significant role in endometrioid ovarian cyst (OEC) malignant transformation [17]. PI3K-AKT-mTOR, chromatin remodeling (*ARID1A*), Notch signaling, and Wnt/ β -catenin pathway may contribute to OEC malignant transformation [1, 18–20].

Apart from the OEC malignant transformation, such cases have been reported from extraovarian endometriosis, including vaginal, ureteral, or cesarian scar. Most of the extraovarian malignancies are clear-cell or endometrioid carcinomas [21–26]. However, there are rare cases where rhabdomyosarcoma arises from OEC [27].

As previously mentioned, endometriosis-associated tumors could arise from endometrioid cysts [28]. There are reports available that cystic fluid contains several active biomolecules, such as iron, reactive oxygen species, interleukins. Iron-induced oxidative stress and DNA mutations are the basis of iron carcinogenesis, which are followed by the subsequent synthesis of the antioxidants with the decrease in cellular oxidative stress capacity, promotion of apoptosis resistance, and leading to tumor initiation and progression [29, 30]. So, with the help of metallobiology technology, these molecules can be used as non-invasive

biomarkers for detecting the endometriosis malignant transformation [31, 32].

World Health Organization approved the classification of ovarian tumors in 2014 that include high-grade and low-grade serous carcinomas (HGSC and LGSC, respectively) that differ from each other in genetic disorders, clinical course, and origin [33]. The source of HGSC is the fallopian tube epithelium implanted on the ovarian surface. It is associated with the fallopian tube's serous intraepithelial carcinoma (STIC) and *TP53* mutations [11]. LGSC is characterized by *KRAS* and *BRAF* mutations and develop sequentially from serous borderline tumors [11].

Glycosylation disorders are known as cancer markers. They lead to tumor-associated glycans and glycoproteins production. The glycosylation marker CA 125 is used for detecting and monitoring serous ovarian tumors. Since glycosylation changes are the early event in the tumor, the identification of tumor-associated markers of glycosylation is an effective strategy in early diagnosis and improving the treatment [34].

The level of serum CA 125 detected in 1% of healthy female donors can be 35 IU/ml and is often regarded as the upper limit of the normal reference in the clinical practice. It should be noted that this level is controversial, for example, in postmenopausal women or in patients after hysterectomy, the level of CA 125 tends to decrease, and the lower level may be more acceptable [35]. Approximately 85% of patients with ovarian epithelial tumors have a serum CA 125 level higher than 35 IU/ml. Serum CA 125 is less often increased in mucinous, clear-cell, and borderline tumors than in serous carcinomas. An increase in serum CA 125 level may also be associated with other malignancies (pancreas, breast, colon, lung tumors) and benign or physiological conditions, including pregnancy, endometriosis, and menstruation [35].

Regarding CA 125 as a marker of endometriosis, many authors are inclined to believe that the level of CA 125 ≥ 30 IU/ml is an indicator of endometriosis with high accuracy only in women with symptoms of pain and infertility. CA 125 should be considered a discriminatory test for suspected endometriosis, and the level of CA 125 < 30 IU/ml, however, cannot be a criterion for reliable detection of endometriosis [36–39].

The present work suggested that an increased level of serum CA 125 in patients with OEC indicates a change in the morphology and physiology of endometrioid epithelium, reflecting the beginning of the neoplastic transformation of OEC.

The efficient understanding of biological and functional mechanisms depicting OEC complex pathogenesis is considered a significant aspect for developing novel diagnostic and therapeutic strategies. Furthermore, the neoplastic transformation of ovarian endometriosis remains to be understood fully despite decades of research. The present study delineated an extensive rise in the serum levels of CA 125 in OEC conditions, which indicates a change in the morphology and physiology of endometri-

oid epithelium conducive to the possible beginning stage of neoplasm.

Patients and methods

The present study was conducted on the surgical specimen samples obtained from 117 patients. 104 patients were after cystectomy with endometrioid cysts and 13 with ovarian tumors, including endometriosis-associated ones. The age group was chosen from 20 to 83 years (average 36.58 ± 0.95 years) during the period of 2016 to 2019 admitted to the Hospital of S.S. Udina City of Moscow Hospital and the Moscow Clinical Hospital #31. All patients agreed and provided their individual informed consent to analyze their surgical specimen samples with complete Institutional ethical guidelines. Normal range of serum CA 125 was admitted under 35 IU/ml. We divided patients into five groups based on obtained data:

- group 1 includes OEC with normal levels of serum CA 125 cancer biomarker in 69 patients,
- group 2 includes an increased level of serum CA 125 (36–60 IU/ml) in 17 patients,
- group 3 includes an increased level of serum CA 125 (61–90 IU/ml) in 10 patients,
- group 4 includes an increased level of serum CA 125 (91–301 IU/ml) in 8 patients,
- and group 5 includes ovarian carcinomas, i.e., endometrioid (endometriosis-associated ones), serous low- and high-grade with solid, pseudo-endometrioid, transitional cell-like pattern (SET-type) in 13 patients. The serum CA 125 analysis was performed at various laboratories in Moscow using immunochemiluminescent analyzers Architect 1000i (USA) and Immulite 1000 (Japan).

Reagents

To compare expression in OEC with ovarian tumors, we used a diagnostic panel of mouse monoclonal antibodies against MCK, CK7, CK20, CK 8/18, Calretinin, EMA, Ki67, CEA, Vimentin, Inhibin, WT1, CA 125, ARID1A (BAF250a) (Santa Cruz, USA).

Immunohistochemistry

OEC and endometriosis-associated tumors surgical specimens were collected into buffered neutral 10% formalin and subjected to fixation. Paraffin-embedded tissue blocks were prepared through routine histological processing. Immunohistochemical analysis was executed with the aid of the avidin-biotin complex technique. Histological sections were made using Sakura rotary microtomes, stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry study of MCK, CK7, CK20, CK 8/18, Calretinin, EMA, Ki67, CEA, Vimentin, Inhibin, WT1, CA 125, ARID1A (BAF250a) antibodies was performed using “Leica Bond-maX” immunostainers (Germany).

Interpretation of the immunohistochemical results was carried out considering the localization of positive cells by counting both the number of colored epithelial cells

per 100 cells in 10 high power fields ($\times 400$ /HPF) and the intensity of staining. The obtained quantitative results were expressed as a percentage, where 0 – lack of expression, 1 – up to 50% of colored cells – focal expression, 2 – more than 50% of colored cells – intense expression of the marker.

The intensity of cytoplasmic expression of the marker was evaluated in points, where 0 – lack of expression, 1 – weak (pale) cell staining, 2 – moderate cell staining, 3 – intense (bright) cell staining.

Ki67 expression was evaluated as follows: 1) 0–20% – low proliferative activity, 2) 21–50% – moderate proliferative activity, 51–100% – high proliferative activity.

The expression of p53 in a weakly positive reaction was considered corresponding to the wild-type of *TP53* gene (weakly positive staining), with total negative or staining of more than 80% of the nuclei referred to mutant-type of *TP53* gene.

Statistics

Statistical analysis of results was performed using descriptive statistics and a paired t-test, and a correlation between the expression of immunohistochemical markers in OEC epithelial and stromal cells and the level of serum CA 125. The reliability of the differences in the mean values was calculated using the analysis of variance. The correlation analysis results estimated the relationship between the studied parameters with the Pearson correlation coefficient calculation (r). Also, the nonparametric Mann–Whitney criteria and the Spearman rank correlation coefficient were used in the calculation in cases where parametric statistics methods were incorrect. The data was presented as $M \pm m$, where M is the arithmetic mean and m is the mean's statistical error. A P-value of 0.05 was considered the cutoff for statistical significance.

Results

Most patients with OEC (groups 1–4) (98.1%) and with endometriosis-associated carcinomas (group 5) (82%) reported nagging pains in the lower abdomen with varying frequency during the menstrual cycle. The body mass index (BMI) ranged from 16.8 to 43 (average 23.08 ± 0.48) in OEC (groups 1–4) and from 18 to 28 (average, 23.77 ± 0.8) in group 5, the age of menarche was from 11 to 18 years (average 13.09 ± 0.13 years) in groups 1–4 and 11 to 16 (average, 12.77 ± 0.4) in group 5. The diameter of OEC ranged from 15 to 135 mm (average 61.54 ± 2.72 mm) in groups 1–4 and from 20 to 240 mm (average 93.8 ± 16.7 mm). Bilateral OEC were detected in 16 patients (13.68%) in groups 1–4. Gynecological diseases combined with OEC (groups 1–4) included cervical ectopy in 43 patients (41.3%), endometrial hyperplasia in 4 (3.8%), infertility I in 2 (1.9%), leiomyoma in 12 (11.5%), adenomyosis in 2 (1.9%), endometrial polyp in 12 (11.5%), endocervical polyp in 4 (3.8%), chronic salpingoophoritis in 5 (4.8%), and less than in 1% observed ovarian apoplexy, mature cystic teratoma, paraovarian cyst, cervical leukoplakia, HSIL,

and chronic endometritis. Three (3) patients had a history of breast fibroadenoma (2.9%). Twenty-five (25) (24%) patients had no combined gynecological pathology, and 20 (19%) patients had more than two diseases (Fig. 1). Gynecological diseases combined with endometriosis-associated tumors (group 5) included leiomyoma in 1 patient (7.7%).

Combined gynecological diseases in OEC patients

Expression of MCK, CK7, CK8/18, and EMA markers in OEC and endometriosis-associated ovarian tumors did not differ in all groups and were expressed in all cases. Expression of CK20, CEA, Calretinin, Inhibin, and Vimentin in OEC epithelium and endometriosis-associated ovarian tumors was negative. The expression of proliferation marker Ki67 in OEC did not exceed 5% in all cases. In contrast, its expression in ovarian tumors was 10–15% in endometrioid and low-grade serous carcinomas and 50–71% in high-grade serous carcinoma (SET-type). Expression of the immunohistochemical marker CA 125 was higher in serous ovarian tumors and in the OEC group with elevated serum CA 125 levels above 60 IU/ml. *ARID1A* (BAF250a) expression was 70–96% (average $83.73 \pm 0.67\%$) in all groups of OEC, 10–43% (average $21.6 \pm 4.5\%$) in endometrioid ovarian carcinomas and 60–67% (average $64 \pm 1.4\%$) in serous carcinomas low- and high-grade (Table 1).

Significant changes in nuclear expression were detected when evaluating the immunohistochemical reaction for WT1 and p53 expression. The WT1 gene located on chromosome 11p13 provides protein synthesis is required for the development of normal kidneys and gonads. WT1 protein is a transcription factor significantly involved in the growth, maturation, cell differentiation, and apoptosis in these tissues. The characteristic feature for serous differentiation of OEC epithelial cells is an intense nuclear expression of WT1 both in individual cells and in a group of epithelial cells.

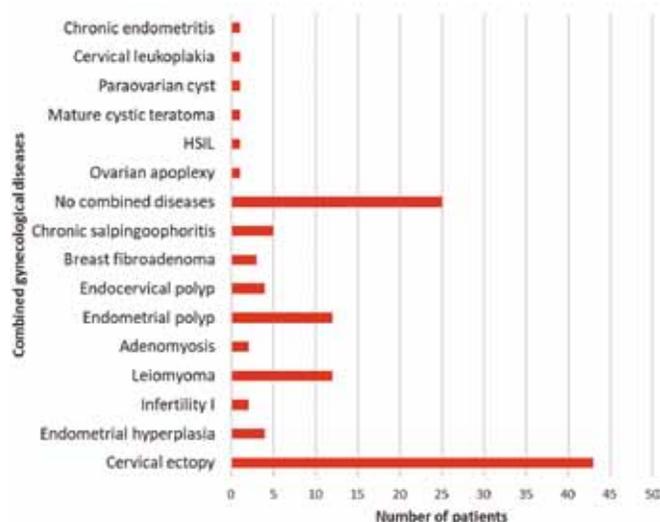


Fig. 1. Combined gynecological diseases in OEC patients

Рис. 1. Комбинированные гинекологические заболевания у пациенток с ЭКЯ

Table 1 | Таблица 1

Expression of IHC markers in all groups |
Экспрессия ИГХ маркеров во всех группах

Group Группа	MCK	CK7	CK8/18	EMA	Ki-67	WT1	p53	CA125	ARID1A BAF250
1 (0–35 UE/ml) МЕ/мл)	3+	3+	3+	3+	1–2%	0–2% (0.17±0.1%)	Wild-type Дикий тип, 0–15% (2.6±0.5%)	1–2+	3+
2 36–60 UE/ml) МЕ/мл)	3+	3+	3+	3+	1–2%	0–6,5% (0.76±0.37%)	Wild-type Дикий тип, 1–54% (18.74±3.52%)	1–2+	3+
3 (61–90 UE/ml) МЕ/мл)	3+	3+	3+	3+	2–3%	0–58% (20.7±6.4%)	Wild-type Дикий тип, 3–60% (31.7±7.6%)	2–3+	3+
4 (91–301 UE/ml) МЕ/мл)	3+	3+	3+	3+	2–4%	62–86% (77±3.01%)	Mutant-type Мутантный тип, 14–93% (71.9±8.9%)	2–3+	3+
5 endometrioid эндометриоидные	3+	3+	3+	3+	10–15%	0%	Wild-type Дикий тип	1–2+	Loss of expression in 60% of cells Потеря экспрессии в 60% клеток
5 serous low-grade low-grade серозные	3+	3+	3+	3+	10–15%	35–50%	Wild-type Дикий тип	2–3+	3+
5 serous high grade (SET-type) high-grade серозные (SET-типа*)	3+	3+	3+	3+	50–71%	50–80%	Mutant-type Мутантный тип	2–3+	3+

*SET-тип – серозная карцинома high-grade с солидными, эндометриоидными и переходноклеточными участками строения.

The nuclear expression of WT1 in the OEC epithelium was predominantly negative in the patients of 1–2 group with serum CA 125 levels up to 60 IU/ml (0–35; 36–60 IU/ml). However, a few positive nuclear expression cases of WT1 were observed in individual epithelial cells and were up to 6.5% (average 0.4±0.1%). Positive nuclear expression was observed in stromal cells in all cases in all groups and was 41–78.3% (average 67.9±5.6%). Patients with elevated levels of serum CA 125 61–90 IU/ml showed a positive nuclear expression up to 58% (average 20.7±6.4%) of OEC epithelial cells. Patients with elevated levels of serum CA 125 91–301 IU/ml demonstrated the positive nuclear expression in 62–86% epithelial cells (average, 77.0±3.01%). Positive nuclear expression of WT1 was also observed in stromal cells in all cases in 47–56% (average, 51.6±5.2%) of cells (Fig. 2, 3).

Correlation between the serum CA 125
and WT1 expression in epithelial and stromal OEC
clinicopathology

Relationship between levels of serum CA 125 and WT1,
p53, ARID1A (BAF250a) expression in epithelial and
stromal OEC clinicopathology

WT1 nuclear expression was observed focally in OEC epithelium along with epithelium with a negative reaction. It was noted that with an increase in serum CA 125 level, there was an increase in the number of such foci. However,

even at level 301 IU/ml, foci of epithelium with a negative expression remained in OEC. The expression of WT1 was ambiguous in 13 patients with ovarian carcinomas: group of endometrioid carcinomas (n=9): 8 exhibited negative expression, 1-weak focal and uneven (about 1% of cells); group of serous tumors (low-grade, n=3) was 35–50% and in serous carcinoma high-grade (SET-type), n=1, it was 50–80%.

The expression of protein p53 was predominantly wild-type, while the percentage of nuclear expression in

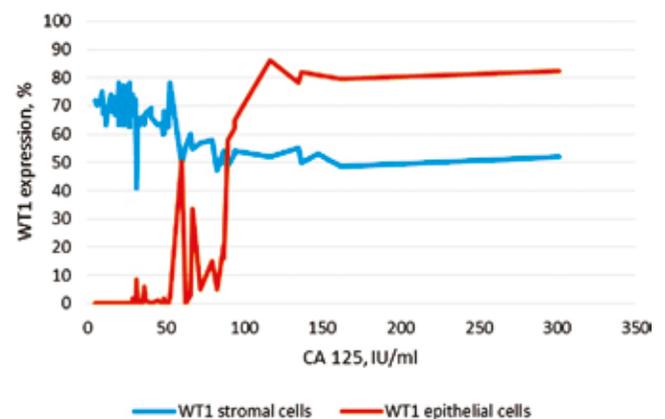


Fig. 2. WT1 expression in OEC epithelial and stromal cells
Рис. 2. Экспрессия WT1 в эпителиальных и стромальных
клетках ЭКЯ

Serum CA 125 level,
IU/ml |
Уровень сывороточного
СА 125, МЕ/мл

Under 60 IU/ml |
Менее 60 МЕ/мл

More than 60 IU/ml
in negative WT1
expression areas |
Свыше 60 МЕ/мл
в областях с негативной
экспрессией WT1

More than 60 IU/ml
in positive WT1
expression areas |
Свыше 60 МЕ/мл
в областях
с положительной
экспрессией WT1

WT1 expression |
Экспрессия WT1

p53 expression |
Экспрессия p53

ARID1A (BAF250a)
expression |
Экспрессия ARID1A
(BAF250a)

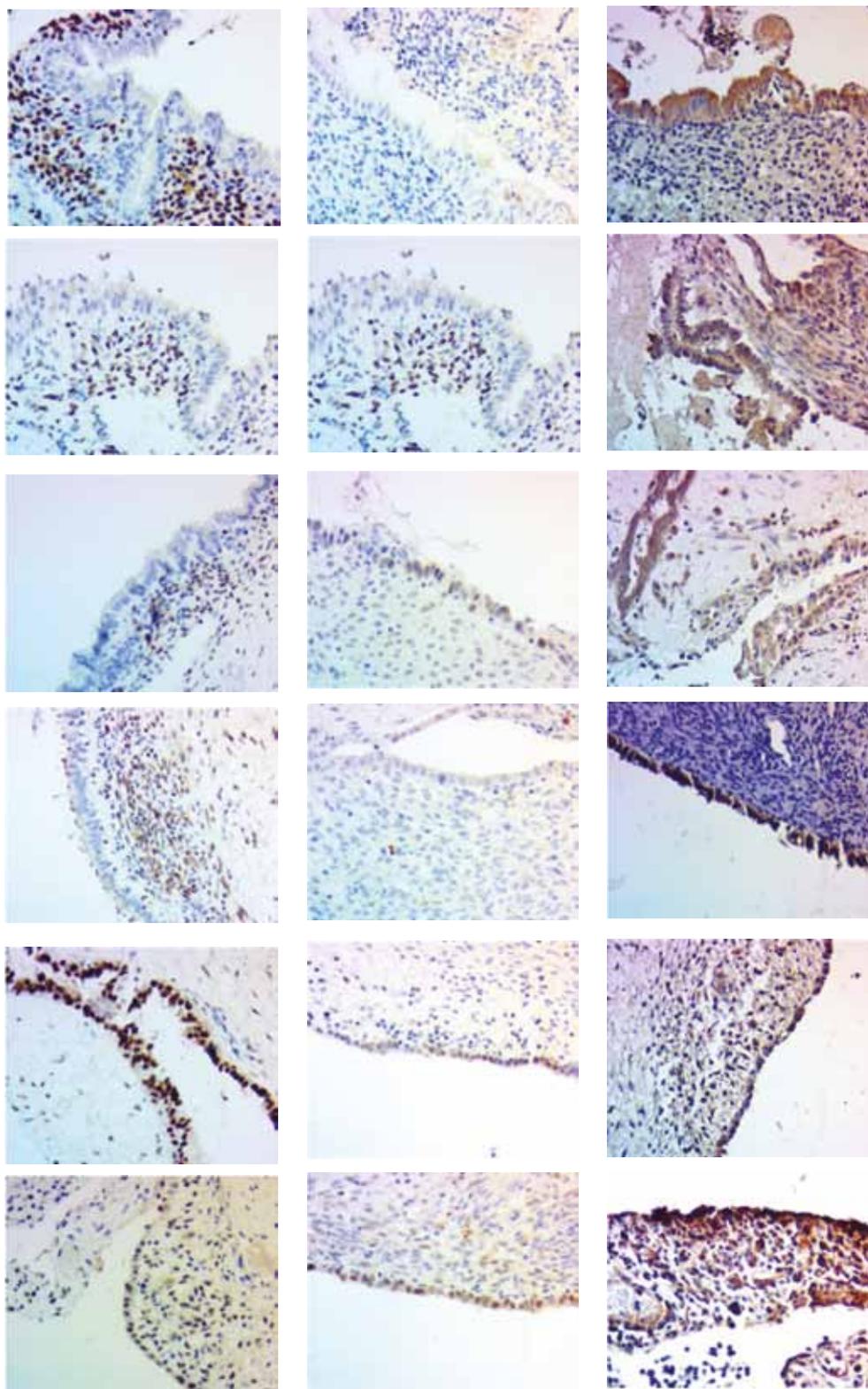


Fig. 3. WT1, p53, and ARID1A (BAF250a) expression in OEC epithelial and stromal cells

Рис. 3. Экспрессия WT1, p53 и ARID1A (BAF250a) в эпителиальных и стромальных клетках ЭКЯ

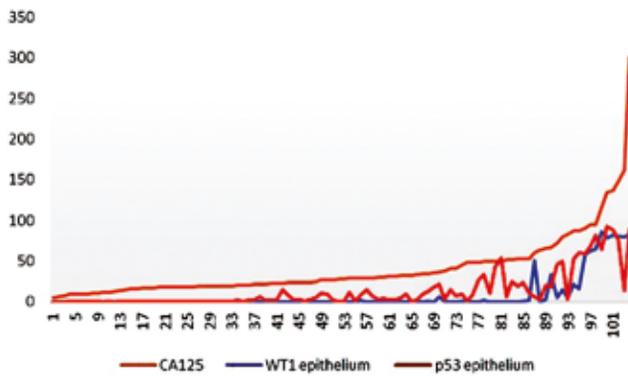


Fig. 4. WT1 and p53 expression in OEC epithelial cells

Рис. 4. Экспрессия WT1 и p53 в эпителиальных клетках ЭКЯ

OEC epithelial cells gradually but unevenly increased with increasing level of serum CA 125 and ranged from 0 to 75% (average $13.77 \pm 2.21\%$) in 99 cases. The expression level of p53 was over 80% in 4 cases with serum CA 125 levels 94.3–301 IU/ml, which is an indicator of pathological expression of p53 (Fig. 3, 4). P53 expression was predominantly wild-type, and the percentage of expression was 15–82% (average $33.56 \pm 4.6\%$) in endometrioid and serous low-grade ovarian tumors, and the mutant-type expression was detected in high-grade serous carcinoma (SET-type).

WT1 and p53 expression in OEC epithelial cells

Statistical analysis of this data was completed. We have identified a strong direct correlation between the serum CA 125 level and the WT1 expression level in the OEC epithelium (Pearson correlation coefficient (r) = 0.84, $p < 0.0001$) and between the serum CA 125 level and p53 expression

(Pearson, $r = 0.81$, $p < 0.0001$). There was a moderate inverse relationship between the serum CA 125 level and the WT1 expression level in the OEC stroma (Pearson, $r = -0.68$, $p = 0.002$) and between WT1 expression in the epithelium and stroma of OEC (Pearson, $r = -0.69$, $p = 0.5$).

When studying the relationship between the expression of WT1 and p53 in the OEC epithelium, a strong direct correlation was revealed (Pearson, $r = 0.79$, $p < 0.0001$), which may be associated with early neoplastic transformation.

BMI and OEC diameter were also evaluated in this study [40, 41]. Studies of the Pearson correlation coefficient for samples over 60 were conducted, and nonparametric statistics such as the Mann–Whitney coefficient (U) and Spearman correlation coefficient (P) were evaluated. When evaluating the Mann-Whitney coefficient, no differences were found in the samples in groups I–II and V. Significant differences in the samples were found in groups III and IV. At the same time, there was no significant correlation between the size of the OEC, BMI, and the expression of CA125, WT1, and p53 in groups I–II (0–60 IU/ml), the Spearman coefficient ranges -0.02 – 0.4 , which indicates a weak direct/inverse correlation. In group III (61–90 IU/ml), a moderate direct relationship was found between the OEC size and the expression of the immunohistochemical markers WT1 and p53 and a moderate inverse relationship between BMI and the level of p53 expression. There was a moderate direct relationship between the OEC size and the level of serum CA 125, as well as the level of p53 expression, and a moderate inverse relationship between BMI and WT1 expression in group IV (91–301 IU/ml). A moderate inverse relationship between BMI and WT1 expression was also found in the group of ovarian tumors. Summary data of parametric and nonparametric correlation in OEC groups are in Table 2a, 2b.

Table 2a | Таблица 2а

Summary data of correlation in all OEC groups (Pearson, r) |
Сводные корреляционные данные во всех группах ЭКЯ (критерий Пирсона, r)

	Serum CA 125, IU/ml Уровень СА 125 в сыворотке крови, МЕ/мл	Body mass index, kg/m ² Индекс массы тела, кг/м ²	OEC diameter, mm Диаметр ЭКЯ, мм	P53 expression in epithelium, % Экспрессия P53 в эпителии, %	WT1 expression in epithelium, % Экспрессия WT1 в эпителии, %
Serum CA 125, IU/ml Уровень СА 125 в сыворотке крови, IU/ml	–	–0,14	0,09	0,81	0,84
Body mass index, kg/m ² Индекс массы тела, кг/м ²	–0,14	–	–0,06	–0,14	–0,11
OEC diameter, mm Диаметр ЭКЯ, мм	0,09	–0,06	–	0,14	0,11
P53 expression in epithelium, % Экспрессия P53 в эпителии, %	0,81	–0,14	0,14	–	0,79
WT1 expression in epithelium, % Экспрессия WT1 в эпителии, %	0,84	–0,11	0,11	0,79	–

**Correlation between BMI/OEC diameter and WT1, p53 expression depending on serum CA 125 level (Spearman, rs) |
Корреляция между индексом массы тела (ИМТ)/ и диаметром ЭКЯ и экспрессией маркеров WT1, p53
в зависимости от сывороточного уровня СА 125 (IU/ml | МЕ/мл) (критерий Спирмана, rs)**

Groups Группы	OEC diameter Диаметр ЭКЯ			BMI ИМТ		
	WT1	p53	CA 125	WT1	p53	CA 125
I (CA 125 = 0–35 IU/ml МЕ/мл)	–0,2	0,2	0,09	–0,1	–0,16	–0,14
II (CA 125 = 36–60 IU/ml МЕ/мл)	0,4	0,01	–0,02	–0,2	–0,22	–0,2
III (CA 125 = 61–91 IU/ml МЕ/мл)	0,5	0,6	0,3	–0,35	–0,6	–0,3
IV (CA 125 = 90–301 IU/ml МЕ/мл)	0,24	0,57	0,65	–0,57	–0,19	–0,4
V (ovarian tumors опухоли яичника)	–0,1	–0,2	–0,3	–0,6	–0,1	–0,3

Discussion

CA125 is a significant marker, and it is mostly used to identify disease conditions, including OEC. Predominantly, the CA125 levels are reported to be enhanced in 80–85% in females with advanced stages of ovarian cancer and endometriosis. Hence, it is referred to as a suitable cancer marker to monitor ovarian tumor progression, differentiation, and regression to foster early diagnosis [38]. A plethora of research studies established a positive link between endometriosis and certain groups of ovarian tumors, such as endometrioid, clear-cell, and serous low-grade, based on data from more than 21,000 patients [42]. Yiyang Wang et al. reported that the immunohistochemical expression of markers OVGPI, WT1, and FMO in LGSCs and concluded these carcinomas develop from tubal-type epithelium of ovarian cystic inclusions [43, 44]. Abnormal expression of the WT1 protein is well known as a serous differentiation marker since it has a positive expression in serous ovarian tumors [45, 46]. A method exists for differential diagnosis of ovarian HGSC and LGSC based on the p53/P16 ratio. However, the authors of this study noted that routine morphological diagnosis is better associated with the patient survival outcome [47]. The same authors provide data that WT1 expression was observed in 71.4% of LGSC and 57.1% of HGSC, p53 expression was completely negative in 81% of LGSC and 30.6% of HGSC, focal in 9.5% of LGSC and 1.2% of HGSC, diffuse in 9.5% of LGSC and 68.2% of HGSC [47]. Other investigators did not find p53 expression in solitary endometriosis, and endometriosis coexisted with endometriosis-associated tumors [48]. However, they explored a small sample of 29 cases without any significant correlations with serum biomarkers. Ma X et al. suggested that PTEN mutation is an early indicator and p53 mutation is a later indicator in malignant transformation of endometriosis [49]. We also found p53 expression over 75% in 5 cases with serum CA 125 levels 94.3–301 IU/ml, which may reflect the serous epithelial transformation that had existed for a long time and possibly is at the beginning of neoplastic changes.

According to our data, there was focal serous differentiation of OEC epithelium with expression of serous markers such as WT1 and p53 with an increase in the CA 125 level more than 60 IU/ml. We found that the IHC-profile for normal endometrioid epithelium was WT1-/p53wt/ARID1A+ and was characteristic for groups 1–2 (0–35; 36–60 IU/ml). When comparing the IHC-profile of OEC group 3 (61–90 IU/ml) with group 5 (endometriosis-associated tumors), we stated their equality, i.e., WT1+/p53wt/ARID1A+. Moreover, when we compare the IHC-profile of group 4 (91–301 IU/ml) to group 5, these were similar: WT1+/p53mt/ARID1A+. These findings suggest the neoplastic transformation to serous ovarian borderline tumors and LGSC. We found OECs share similar immunohistochemical profiles with serous ovarian carcinomas, but not with the endometrioid ones because the expression of WT1 and p53 were not observed, and there was no lack of ARID1A expression. The expressions of WT1 and p53 levels were focal across the endometrioid carcinomas. Besides, ARID1A (BAF250a) expression in OEC was close to that in serous low-grade carcinomas and differed from endometrioid ones. Moreover, there is a clinical case that demonstrated OEC malignant transformation to well-differentiated endometrioid carcinoma with normal serum CA 125 [50], which supports our supposition that OEC may transform to serous ovarian tumor, and this process is accompanied by an increase in serum CA 125 level.

Bulun et al. established that endometriotic stromal cells are mutation-free. We likewise found that the stromal cells did not display any changes in immunohistochemical marker expression. These authors have depicted that the stroma cells contain widespread epigenetic defects, which could alter gene expression and induce a progesterone-resistance and inflammation. Subsequent estrogenic action in the stroma results in paracrine signaling to neighboring epithelial cells, which may enhance proliferation, causing mutation accumulation and malignant transformation in OEC epithelial cells that may lead to epithelial ovarian cancer [51].

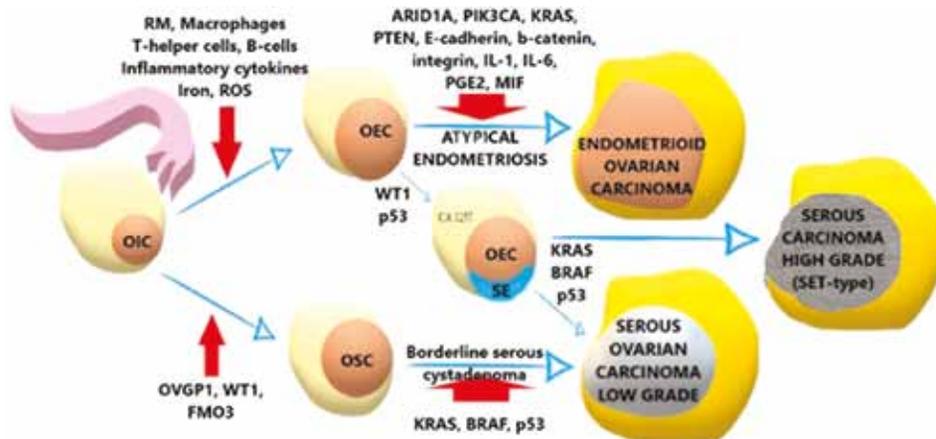


Fig. 5. Possible mechanisms of neoplastic transformations of OEC. OIC – ovarian inclusion cyst; OEC – ovarian endometrioid cyst; OSC – ovarian serous cystadenoma; RM – retrograde menstruation; ROS – reactive oxygen species; SE – serous epithelium; OVGP1 – oviduct-specific glycoprotein 1; WT1 – Wilm’s tumor protein; FMO3 – flavin-containing monooxygenase 3; *ARID1A* – AT-rich interactive domain-containing protein 1A; PIK3CA – phosphatidylinositol-3-kinase, catalytic subunit; KRAS – RAS/MAPK pathway protein; BRAF – v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog b; *PTEN* – homolog of phosphatase and tensin; IL-1 – interleukin 1; IL-6 – interleukin 6; PGE2 – prostaglandin E2; MIF – macrophage migration inhibitory factor; p53 – p53 protein; CA 125 – cancer antigen 125

Рис. 5. Предположительные механизмы неопластической трансформации ЭКЯ. OIC – инклюзионная киста яичника; OEC – эндометриодная киста яичника; OSC – серозная цистаденома яичника; RM – ретроградная менструация; ROS – активные формы кислорода; SE – серозный эпителий; OVGP1 – яйцеводспецифичный гликопротеин 1; WT1 – белок опухоли Вильмса; FMO3 – флавиносодержащая монооксигеназа 3; *ARID1A* – AT-насыщенный интерактивный домен, содержащий белок 1A; PIK3CA – фосфатидилинозитол-3-киназа, каталитическая субъединица альфа; KRAS – белок пути RAS/MAPK; BRAF – гомолог b вирусного онкогена мышинной саркомы v-RAF; *PTEN* – гомолог фосфатазы и тензина; ИЛ-1 – интерлейкин 1; ИЛ-6 – интерлейкин 6; PGE2 – простагландин E2; MIF – фактор ингибирования миграции макрофагов; p53 – белок p53; CA 125 – опухолевый антиген 125

In this regard, a scheme for the possible development of ovarian carcinomas from OEC was proposed (Fig. 5). Our results reported that OEC could be precursors to both endometrioid carcinomas via the *ARID1A*, *PI3K/AKT*, *MAPK/ERK* pathways, and serous carcinomas via the *TP53*, *RAS/MAPK* pathways.

Conclusion

Evaluation of immunohistochemical expression of WT1 and p53 markers in the OEC with increased serum CA 125 level is beneficial to oncologists to choose a suitable therapeutic modality with adequate follow-up to the patients. Our present study results replicate previously published reports. Furthermore, the results indicate an early change in the epithelium that may give rise to neoplastic transformation is feasible. However, the mechanism of neoplastic transformation remains only partially understood and requires extensive research.

Human and animal rights

All the study procedures were approved by the US NIH Ethical Standards. Animals were not used for this study. Consent was obtained from all the humans in this study. The procedures were in accordance with the ethical standards of the committee responsible for human experimentation (institutional and national) and with the NIH ethical guidelines.

Compliance with ethics guidelines

This article is based on research that was ethically approved by the Local Ethical Committee of the City Clinical Hospital No. 31, Moscow, and Institute of Human Morphology, Moscow, Russia (Approval Protocol No. 3, 12.06.2019).

Author contributions

Compiling and combining edits for additional drafts; assembly of data, results, and references; writing – original draft – L.M. Mikhaleva, O.I. Patsap.

Assembly of cases; slide scanning; survey creation, blinded review of slides – T.V. Bezuglova, A.I. Davydov, [G.M. Aliev](#).

Study conceptualization; digital slide review, writing – review, and editing – L.M. Mikhaleva, O.I. Patsap, [G.M. Aliev](#).

Each author has participated sufficiently in work to take public responsibility for the content as per ICMJE guidelines; authorship credit should be based on substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; drafting the article or revising it critically for important intellectual content; final approval of the version to be published; and agreement to be accountable for all aspects of the work.

Вклад авторов

Сбор данных, анализ результатов; написание оригинального текста статьи, составление списка литературы, внесение правок – Л.М. Михалева, О.И. Пацап.

Сбор клинических случаев; сканирование микропрепаратов; создание отчета об обследовании, анализ микропрепаратов слепым методом – Т.В. Безуглова, А.И. Давыдов, [Г.М. Алиев](#).

Концепция исследования; анализ оцифрованных микропрепаратов, написание обзора и редактирование текста – Л.М. Михалева, О.И. Пацап, Г.М. Алиев.

Каждый автор в достаточной степени участвовал в работе, чтобы вынести ее на всеобщее обозрение, взять ответственность за ее содержание в соответствии с руководящими принципами ICMJE; признание авторства основывается на существенном вкладе в разработку концепции и дизайна; сборе, анализе и интерпретации данных; написании статьи или ее критическом рецензировании и внесении правок, имеющих решающее значение для интеллектуального содержания; окончательном утверждении версии для публикации и согласии нести ответственность по всем аспектам работы.

References/Литература

- Mikhaleva LM, Davydov AI, Patsap OI, Mikhaylenko EV, Nikolenko VN, Neganova ME et al. Malignant transformation and associated biomarkers of ovarian endometriosis: A narrative review. *Adv Ther.* 2020;37(6):2580–2603 (2020). DOI: 10.1007/s12325-020-01363-5.
- Davydov AI, Mikhaleva LM, Patsap OI. On markers of early detection of endometriosis-associated ovarian tumours. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology.* 2019;18(4):133–137 (In Russ.). DOI: 10.20953/1726-1678-2019-4-133-137.
Давыдов А.И., Михалева Л.М., Пацап О.И. К вопросу о маркерах ранней детекции эндометриоз-ассоциированных опухолей яичника. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* 2019;18(4):133–137. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-4-133-137.
- Gajbhiye R, Bendigeri T, Ghuge A, Bhusane K, Begum S, Warty N et al. Panel of autoimmune markers for non-invasive diagnosis of minimal-mild endometriosis. *Reprod Sci.* 2017;24(3):413–20. DOI: 10.1177/1933719116657190.
- Socolov R, Socolov D, Sindilar A, Pavaleanu I. An update on the biological markers of endometriosis. *Minerva Ginecol.* 2017;69(5):462–7. DOI: 0.23736/S0026-4784.17.04046-1.
- Davydov AI, Mikhaleva LM, Tairova MB, Patsap OI. Ovarian endometriosis: a form of genital endometriosis or a specific nosological unit. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology.* 2019;18(5):5–12 (In Russ.). DOI: 10.20953/1726-1678-2019-5-5-12.
Давыдов А.И., Михалева Л.М., Таирова М.Б., Пацап О.И. Эндометриоз яичников: форма генитального эндометриоза или отдельная нозологическая единица? *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* 2019;18(5):5–12. DOI: 10.20953/1726-1678-2019-5-5-12.
- Lin Q, Ding SJ, Zhu TH, Li TT, Huang XF, Zhang XM. Role and clinical significance of coagulation and inflammatory factors in moderate and severe ovarian endometriosis. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2018;53(3):167–71. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567X.2018.03.005.
- Sapalidis K, Machairiotis N, Zarogoulidis P, Vasilakaki S, Sardeli C, Koimtzis G et al. Genes' interactions: A major contributor to the malignant transformation of endometriosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1842. DOI: 10.3390/ijms20081842.
- Taniguchi F. New knowledge and insights about the malignant transformation of endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017;43(7):1093–100. DOI: 10.1111/jog.13372.
- Kim HS, Kim TH, Chung HH, Song YS. Risk and prognosis of ovarian cancer in women with endometriosis: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 2014;110(7):1878–90. DOI: 10.1038/bjc.2014.29.
- Gadducci A, Lanfredini N, Tana R. Novel insights on the malignant transformation of endometriosis into ovarian carcinoma. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30(9):612–7. DOI:10.3109/09513590.2014.926325.
- Kurman RJ, Shih IeM. The dualistic model of ovarian carcinogenesis: Revisited, revised, and expanded. *Am J Pathol.* 2016;186(4):733–47. DOI: 10.1016/j.ajpath.2015.11.011.
- Anglesio MS, Yong PJ. Endometriosis-associated ovarian cancers. *Clin Obstet Gynecol.* 2017;60(4):711–27. DOI: 10.1097/GRF.0000000000000320.
- Kuo HH, Huang CY, Ueng SH, Huang KG, Lee CL, Yen CF. Unexpected epithelial ovarian cancers arising from presumed endometrioma: A 10-year retrospective analysis. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2017;56(1):55–61. DOI: 10.1016/j.tjog.2015.09.009.
- Oral E, Aydin O, Kumbak BA, İlvan S, Yılmaz H, Tustas E et al. Concomitant endometriosis in malignant and borderline ovarian tumours. *J Obstet Gynaecol.* 2018;38(8):1104–9. DOI: 10.1080/01443615.2018.1441815.
- Xiao W, Awadallah A, Xin W. Loss of ARID1A/BAF250a expression in ovarian endometriosis and clear cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(7):642–50. PMID: 22977660.
- Chang CM, Yang YP, Chuang JH, Chuang CM, Lin TW, Wang PH et al. Discovering the deregulated molecular functions involved in malignant transformation of endometriosis to endometriosis-associated ovarian carcinoma using a data-driven, function-based analysis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2345. DOI: 10.3390/ijms18112345.
- He J, Chang W, Feng C, Cui M, Xu T. Endometriosis malignant transformation: epigenetics as a probable mechanism in ovarian tumorigenesis. *Int J Genomics.* 2018; 1465348. DOI: 10.1155/2018/1465348.
- Er TK, Su YF, Wu CC, Chen CC, Wang J, Hsieh TH, et al. Targeted next-generation sequencing for molecular diagnosis of endometriosis-associated ovarian cancer. *J Mol Med (Berl).* 2016;94(7):835–47. DOI:10.1007/s00109-016-1395-2.
- Takeda T, Banno K, Okawa R, Yanokura M, Iijima M, Irie-Kunitomi H et al. ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers (Review). *Oncol Rep.* 2016;35(2):607–13. DOI: 10.3892/or.2015.4421.
- Lakshminarasimhan R, Andreu-Vieyra C, Lawrenson K, Duy-mich CE, Gayther SA, Liang G et al. Down-regulation of ARID1A is sufficient to initiate neoplastic transformation along with epigenetic reprogramming in non-tumorigenic endometriotic cells. *Cancer Lett.* 2017;401:11–19. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.04.040.
- Cozzolino M, Nasioudis D, Sisti G, Coccia ME. Malignant transformation of vaginal endometriosis – A review of literature. *Gynecol Obstet Invest.* 2017;82(2):105–12. DOI: 10.1159/000449198.
- Barra F, Scala C, Biscaldi E, Vellone VG, Ceccaroni M, Terrone C et al. Ureteral endometriosis: a systematic review of epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment, risk of malignant transformation and fertility. *Hum Reprod Update.* 2018;24(6):710–30. DOI: 10.1093/humupd/dmy027.
- Mihailovici A, Rottenstreich M, Kovel S, Wassermann I, Smorgick N, Vaknin Z. Endometriosis-associated malignant transformation in abdominal surgical scar: A PRISMA-compliant

- systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(49):e9136. DOI: 10.1097/MD.00000000000009136.
24. *Takeuchi M, Matsuzaki K, Bando Y, Nishimura M, Yoneda A, Harada M*. A case of polypoid endometriosis with malignant transformation. *AbdomRadiol (NY)*. 2016;41(9):1699–702. DOI: 10.1007/s00261-016-0696-9.
 25. *Gentile JKA, Migliore R, Kistenmacker FJN, Oliveira MM, Garcia RB, Bin FC et al*. Malignant transformation of abdominal wall endometriosis to clear cell carcinoma: case report. *Sao Paulo Med J*. 2018;136(6):586–90. DOI: 10.1590/1516-3180.2017.0103300417.
 26. *Ji W, Wu J, Cheng J, Di W*. Serous adenocarcinoma arising from endometriosis in cesarean section abdominal wall scar: a case report and literature review. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(7):7534–41. PMID: 31966597.
 27. *Nezhat C, Vu M, Vang N, Ganjoo K, Karam A, Folkins A et al*. Endometriosis malignant transformation review: Rhabdomyosarcoma arising from an endometrioma. *JSLs*. 2019;23(4):e2019.00038. DOI: 10.4293/JSLs.2019.00038.
 28. *Oral E, Sozen I, Uludag S, Demirkiran F, Ilvan S, Oncul M et al*. The prevalence of endometrioma and associated malignant transformation in women over 40 years of age. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2020;49(5):101725. DOI: 10.1016/j.jogoh.2020.101725.
 29. *Kobayashi H, Yamada Y, Kawahara N, Ogawa K, Yoshimoto C*. Integrating modern approaches to pathogenetic concepts of malignant transformation of endometriosis. *Oncol Rep*. 2019;41(3):1729–38. DOI: 10.3892/or.2018.6946.
 30. *Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H*. Oxidative stress and antioxidant defense in endometriosis and its malignant transformation. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:848595. DOI: 10.1155/2015/848595.
 31. *Kobayashi H, Yamada Y, Kawahara N, Ogawa K, Yoshimoto C*. Modern approaches to non-invasive diagnosis of malignant transformation of endometriosis. *Oncol Lett*. 2019;17(1):1196–202. DOI: 10.3892/ol.2018.9721.
 32. *Iwabuchi T, Yoshimoto C, Shigetomi H, Kobayashi H*. Cyst fluid hemoglobin species in endometriosis and its malignant transformation: The role of metallobiology. *Oncol Lett*. 2016;11(5):3384–8. PMID: 27123121.
 33. *RJ Kurman, ML Carcangiu, CS Herrington, RH Young (eds.)*. WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: IARC Press, 2014. 307 p.
 34. *Silsirivanit A*. Glycosylation markers in cancer. *Adv Clin Chem*. 2019;89:189–213. DOI: 10.1016/bs.acc.2018.12.005.
 35. *Crosby DA, Glover LE, Martyn F, Wingfield M*. CA125 measured during menstruation can be misleading. *Ir Med J*. 2018;111(4):738. PMID: 30488683.
 36. *Akinwunmi BO, Babic A, Vitonis AF, Cramer DW, Titus L, Tworoger SS et al*. Chronic medical conditions and CA125 levels among women without ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(12):1483–90. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0203.
 37. *Hirsch M, Duffy J, Davis CJ, Nieves Plana M, Khan KS*. International Collaboration to harmonise outcomes and measures for endometriosis. Diagnostic accuracy of cancer antigen 125 for endometriosis: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2016;123(11):1761–8. DOI: 10.1111/1471-0528.1405.
 38. *Hirsch M, Duffy JMN, Deguara CS, Davis CJ, Khan KS*. Diagnostic accuracy of Cancer Antigen 125 (CA125) for endometriosis in symptomatic women: A multi-center study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;210:102–7. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2016.12.002.
 39. *Karimi-Zarchi M, Dehshiri-Zadeh N, Sekhavat L, Nosouhi F*. Correlation of CA-125 serum level and clinico-pathological characteristic of patients with endometriosis. *Int J Reprod Biomed*. 2016;14(11):713–8. PMID: 28008424.
 40. *Zhou Y, Hua KQ*. Ovarian endometriosis: risk factor analysis and prediction of malignant transformation. *Przegląd Menopauzalny (Menopause Review)*. 2018;17(1):43–8. DOI: 10.5114/pm.2018.74902.
 41. *Zhang Y, Qu P*. Factors associated with ovarian endometriosis malignancy and its recurrence in Chinese women. *J Obstet Gynaecol*. 2019;39(8):1148–53. DOI: 10.1080/01443615.2019.1603209.
 42. *Pearce CL, Templeman C, Rossing MA, Lee A, Near AM, Webb PM et al*. Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case-control studies. *Lancet Oncol*. 2012;13(4):385–94. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70404-1.
 43. *Wang Y, Mang M, Wang Y, Wang L, Klein R, Kong B et al*. Tubal origin of ovarian endometriosis and clear cell and endometrioid carcinoma. *Am J Cancer Res*. 2015;5(3):869–79. PMID: 26045974.
 44. *Wang Y, Hong S, Mu J, Wang Y, Lea J, Kong B et al*. Tubal origin of “ovarian” low-grade serous carcinoma: A gene expression profile study. *J Oncol*. 2019;2019:8659754. DOI: 10.1155/2019/8659754.
 45. *Rhodes A, Vallikkannu N, Jayalakshmi P*. Expression of WT1 and PAX8 in the epithelial tumours of Malaysian women with ovarian cancer. *Br J Biomed Sci*. 2017;74(2):65–70. DOI: 10.1080/09674845.2016.1220709.
 46. *Hatano Y, Hatano K, Tamada M, Morishige KI, Tomita H, Yanai H et al*. A comprehensive review of ovarian serous carcinoma, advances in anatomic pathology. 2019;26(5):329–39. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000243.
 47. *Sallum L, Andrade L, Ramalho S, Ferracini AC, de Andrade Natal R, Brito ABC et al*. WT1, p53 and p16 expression in the diagnosis of low- and high-grade serous ovarian carcinomas and their relation to prognosis. *Oncotarget*. 2018;9(22):15818–27. DOI: 10.18632/oncotarget.24530.
 48. *Akahane T, Sekizawa A, Purwosunu Y, Nagatsuka M, Okai T*. The role of p53 mutation in the carcinomas arising from endometriosis. *Int J Gynecol Pathol*. 2007;26(3):345–51. DOI: 10.1097/pgp.0b013e31802b41a8.
 49. *Ma X, Hui Y, Lin L, Wu Y, Zhang X, Qin X*. Possible relevance of tumor-related genes mutation to malignant transformation of endometriosis. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2016;37(1):89–94. PMID: 27048117.
 50. *Nahar K, Ferdous B, Akhter N, Shamsunnahar PA, Khatun K, Begum SA et al*. Ovarian endometrioid adenocarcinoma arising in endometriosis: A case report. *Mymensingh Med J*. 2018;27(2):420–3. PMID: 29769513.
 51. *Bulun SE, Wan Y, Matei D*. Epithelial mutations in endometriosis: Link to ovarian cancer. *Endocrinology*. 2019;160(3):626–38. DOI: 10.1210/en.2018-00794.

Author information

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

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

Tatiana V. Bezuglova – Cand. Sci. (Biol), Deputy Director for Scientific Work, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0001-7792-1594>

Olga I. Patsap – Head of the Department of Pathology, Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies.

<https://orcid.org/0000-0003-4620-3922>

Aleksandr I. Davydov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Professor of the Department of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-5592-8429>

[Gjumrakch M. Aliev](#) – Cand. Sci. (Med.), President of the GALLY International Research Institute.

<https://orcid.org/0000-0001-7373-3182>

Информация об авторах

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

Татьяна Васильевна Безуглова – кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе НИИ морфологии человека.

Ольга Игоревна Пацап – заведующая патологоанатомическим отделением Федерального центра мозга и нейротехнологий.

Александр Ильгизирович Давыдов – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

[Гюмрах Магомедович Алиев](#) – кандидат медицинских наук, президент Международного научно-исследовательского института GALLY.

Состояние эндотелия капилляров перитуморальной зоны после адъювантной лучевой терапии глиобластомы головного мозга

А.С. Балканов¹, И.Д. Розанов¹, А.В. Голанов², Л.Е. Гаганов¹, В.П. Черников³

¹ ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

² ФГАУ Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Введение. Несмотря на совершенствование методик лечения, выживаемость пациентов с глиобластомой (ГБ) головного мозга (ГМ) сохраняется на уровне 10–16 месяцев. В связи с этим тема изучения состояния вещества перитуморальной зоны головного мозга на момент развития рецидива ГБ весьма актуальна в рамках оптимизации выбора тактики лечения. Цель исследования – сравнительный анализ состояния эндотелиоцитов в сосудах вещества перитуморальной зоны (ПЗ) ГМ при ГБ до и после проведения адъювантной дистанционной лучевой терапии (аДЛТ) с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

Материалы и методы. Визуальная оценка состояния эндотелиоцитов в капиллярах сосудов вещества ПЗ ГМ до аДЛТ (1-я группа – 32 капилляра) и через 12–14 месяцев после нее (2-я группа – 75 капилляров) выполнена с использованием ТЭМ.

Результаты. В капиллярах вещества ПЗ ГМ из 2-й группы значительно чаще, чем в капиллярах 1-й группы (60% и 12,6% капилляров, соответственно, $p < 0,001$) наблюдался апоптоз эндотелиоцитов. В 4% и 1,4% капилляров из 2-й группы имели место гибель и тромбоз капилляров, соответственно. Важной находкой оказалось то, что только в 69,3% капилляров из 2-й группы обнаружено утолщение базальной мембраны (БМ), а в 26,9% из них выявлена также ее пикообразная деформация.

Заключение. Через 12–14 месяцев после аДЛТ в веществе ПЗ ГМ сохраняется ишемия, обусловленная апоптозом эндотелия капилляров, утолщением с пикообразной деформацией БМ. Обнаруженные признаки ревазуляризации вещества ПЗ ГМ после ранее проведенной аДЛТ дают основания считать возможным рассмотрение стереотаксической радиохирургии (СТРХ) в качестве метода лечения рецидива ГБ ГМ.

Ключевые слова: глиобластома головного мозга, перитуморальная зона, апоптоз эндотелиоцита, утолщение базальной мембраны, стереотаксическая радиохирургия, рецидив глиобластомы

Для корреспонденции: Андрей Сергеевич Балканов. E-mail: andreybalkanov@yandex.ru

Для цитирования: Балканов А.С., Розанов И.Д., Голанов А.В., Гаганов Л.Е., Черников В.П. Состояние эндотелия капилляров перитуморальной зоны после адъювантной лучевой терапии глиобластомы головного мозга. Клини. эксп. морфология. 2021;10(1):33–40. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.33-40.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского (НИР № 68).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 10.11.2020. Получена после рецензирования 19.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Endothelium changes of peritumoral zone capillaries after brain glioblastoma adjuvant radiation therapy

A.S. Balkanov¹, I.D. Rozanov¹, A.V. Golanov², L.E. Gaganov¹, V.P. Chernikov³

¹ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia

² N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

³ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. Despite the treatment methods' improvement, the brain glioblastoma (GB) patient survival remains at the level of 12–14 months. In this regard, it is very relevant to optimize the choice of the treatment of recurrent GB, including using stereotactic radiosurgery (SRS).

Materials and methods. Comparative analysis of the endothelial cells in the capillaries of blood vessels of the brain peritumoral zone (PZ) before (1 group – 32 capillaries) and 12 – 14 months after (2 group – 75 capillaries) adjuvant external radiation therapy (AERT) was performed using transmission electron microscopy (TEM).

Results. Apoptosis of endotheliocytes was observed in the capillaries of the brain PZ from 2 group much more often than from 1 group (60% and 12.6% of capillaries, respectively, $p < 0.001$). Capillary death and thrombosis occurred in 4% and 1.4% of 2 group capillaries. An important finding was that only 69.3% of capillaries from 2 group revealed thickening of the basement membrane (BM), and 26.9% of them also revealed its peak deformation.

Conclusion. 12–14 months after AERT, the brain PZ remains ischemic due to apoptosis of the capillary endothelium, thickening and peak deformation of the BM. The detected signs of revascularization of the brain PZ after previously performed AERT suggest that it is possible to consider SRS as a method of treatment for recurrent brain GB.

Keywords: brain glioblastoma, peritumoral zone, endotheliocyte apoptosis, thickening of the basement membrane, stereotactic radiosurgery, glioblastoma relapse

Corresponding author: Andrey S. Balkanov. E-mail: andreybalkanov@yandex.ru

For citation: Balkanov A.S., Rozanov I.D., Galanov A.V., Gaganov L.E., Chernikov V.P. Endothelium changes of peritumoral zone capillaries after brain glioblastoma adjuvant radiation therapy. Clin. exp. morphol. 2021;10(1):33–40. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.33-40 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute (No. 68).

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

Received 10.11.2020. **Received in revised form** 19.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Дистанционная лучевая терапия (ДЛТ) является основным компонентом лечения наиболее распространенной злокачественной опухоли головного мозга (ГМ) – глиобластомы (ГБ) и применяется в адьювантном режиме (аДЛТ). Несмотря на последние достижения в технологиях выполнения хирургического вмешательства и аДЛТ, в том числе в сочетании с лекарственной терапией, продолжительность жизни пациентов с ГБ ГМ остается неудовлетворительной и составляет всего 10–16 месяцев [1].

Использование аДЛТ при ГБ ГМ не только вызывает гибель опухолевых клеток, формирующих резидуальное новообразование, но и обуславливает возникновение целого ряда ранних и поздних морфологических повреждений вещества перитуморальной зоны (ПЗ) ГМ, прежде всего в микроциркуляторном сегменте. К ранним признакам относят отек вещества ГМ, возникающий вследствие снижения экспрессии окклюдина в межэндотелиальных плотных контактах (ПК), сосудистую дилатацию и транзиторную атрофию глии. В группу поздних лучевых повреждений включают демиелинизацию аксонов и некроз клеток сосудистой стенки с последующей гибелью такого сосуда и формированием лучевого некроза (ЛН) вещества ГМ. Считается, что патогенез ЛН ГМ включает активацию ряда генов и цитокинов [2, 3] в ответ на повреждение сосудов ПЗ с последующей гипоксией белого вещества ГМ, сопровождающейся гиперэкспрессией *hypoxia inducible factor-1 alpha* (HIF-1 α). В свою очередь, HIF-1 α потенцирует экспрессию VEGF и CXCL12/CXCR4 в астроцитах и тем самым

способствует формированию и/или усилению отека, который усугубляет степень гипоксии [3], что значительно повышает риск ЛН ГМ.

Возникновение ранних лучевых повреждений вещества ГМ может сопровождаться только транзиторным нарушением сознания (сомноленция) и/или судорогами. Формирование ЛН вещества ГМ при применении конформной аДЛТ диагностируется у 3–24% пациентов и часто является причиной смерти больных [2, 4]. Вероятность возникновения ЛН возрастает при увеличении разовой или суммарной дозы облучения, при увеличении объема мишени, при повторном облучении, в случае сочетанного использования аДЛТ и стереотаксической радиохирургии (СТРХ) и при одновременном использовании аДЛТ и химиотерапии. Так, в случае использования СТРХ при ГБ ГМ у 68% пациентов выявляется ЛН [3].

В последнее время публикуется много работ, посвященных изучению ранних лучевых повреждений эндотелиоцитов в капиллярах ГБ и/или ПЗ ГМ. Так, в течение 8–48 часов после облучения обнаружены набухание эндотелия и сужение просвета капилляров ГБ [5], апоптоз 16% эндотелиоцитов в сосудах вещества ГМ [6, 7]. Через 8–18 недель после облучения также выявляется апоптоз эндотелия, основными признаками которого являются конденсация хроматина и цитоплазмы, пузырчатость плазмолеммы эндотелиоцитов в сосудах ПЗ вещества ГМ. Кроме того, отмечают утолщение базальной мембраны (БМ) капилляров [8]. Сегодня золотым стандартом диагностики апоптоза эндотелиоцитов считается трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ).

Несмотря на то, что сведения о характере поздних лучевых повреждений, имеющих место в сосудах вещества ПЗ ГМ через несколько месяцев после аДЛТ, смогли бы дать ответы на вопросы, связанные с лечением рецидива ГБ, морфологические исследования в этом направлении носят единичный характер [9]. Следствием этого, вероятно, считается, что проведение повторной ДЛТ (пДЛТ) является недостаточно эффективным средством лечения рецидива ГБ ГМ и предпочтение отдается резекции рецидива или использованию лекарственной терапии [10].

Материалы и методы

В группу интактных капилляров вещества ПЗ ГМ (1-я группа – до проведения аДЛТ) включены результаты исследования 32 капилляров, наличие которых установлено при морфологическом исследовании операционного материала, полученного в ходе резекции первично выявленной ГБ ГМ у четырех пациентов в возрасте 55–65 лет. После выполнения резекции ГБ осуществляли забор морфологического материала из трех зон стенки послеоперационного дефекта, располагающихся на расстоянии не менее 2 см друг от друга. Признаком вещества ПЗ считали присутствие в морфологических образцах неповрежденных миелиновых структур (аксонов). Во 2-ю группу включены результаты исследования 75 капилляров вещества ПЗ ГМ, полученных у пяти пациентов с рецидивом ГБ (возраст 50–61 год), у которых при лечении первично выявленной ГБ (12–14 месяцев назад) применялась аДЛТ (60 Гр / 2 Гр). Забор морфологического материала осуществляли в соответствии с принципами, которые использовались в 1-й группе.

Исследование капилляров выполнялось при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Материал фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,4), дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия, обезжировали в этаноле по общепринятой схеме, контрастировали 1% уранилацетатом на 70% этаноле в процессе обезжиривания и проводили заливку в смесь эпон–аралдит по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III (LKB Produkter, Швеция), срезы дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Libra 120 (Zeiss, Германия).

В ходе проведения ТЭМ устанавливали наличие просвета капилляра, оценивали форму эндотелиоцита и его органелл – митохондрий, эндоплазматического ретикулума, межэндотелиальных плотных контактов (ПК) и БМ. Апоптоз эндотелиоцита диагностировали в случае выявления либо пузырчатости плазмолеммы эндотелиоцита, либо конденсации его ядерного хроматина – локализация хроматина вдоль ядерной плазмолеммы. Деструкцию ПК устанавливали в случае выявления выраженных полостей в его проекции.

Статистическую значимость выше обозначенных различий в сравниваемых группах оценивали с использованием непараметрических критериев – критерия χ^2 Пирсона и точного критерия Фишера. Статистически значимой разницей исследуемых показателей считалась при $p < 0,05$.

Результаты

Изучение состояния 32 капилляров вещества ПЗ из 1-й группы не установило наличия глубоких морфологических изменений сосудистой стенки, которые можно было бы расценить как гибель сосуда. Также в этой группе не выявлены капилляры с окклюзией просвета тромботическими массами. Признаки апоптоза эндотелиоцитов обнаружены в четырех капиллярах данной группы (12,6%): в эндотелиоцитах двух капилляров (50%) выявлена пузырчатость плазмолеммы, в эндотелиоцитах двух капилляров (50%) – конденсация хроматина. Следует отметить, что в эндотелиоцитах всех указанных выше четырех капилляров имелся лишь один признак апоптоза. Отек эндотелиоцитов диагностирован в двух капиллярах из 1-й группы (6,3%). Во всех случаях зафиксирован тотальный отек доступных для визуального осмотра эндотелиоцитов. Вакуолизация эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и набухание митохондрий имели место в эндотелиоцитах 11 капилляров (34,4%) и 26 (81,3%), соответственно. Расширение БМ установлено в шести из 32 капилляров (18,8%). Межэндотелиальные плотные соединения (ПК) визуализированы в эндотелии 21 капилляра из 1-й группы. Деструкция ПК диагностирована в двух из них (9,5%) (табл.).

Состояние эндотелиоцитов через 12–14 месяцев после проведения аДЛТ изучали в 75 капиллярах вещества ПЗ из 2-й группы (табл.). Существенным отличием от результатов исследования капилляров из 1-й группы явилось то, что в трех капиллярах (4%) из 2-й группы выявлены необратимые изменения всех клеточных элементов сосудистой стенки, в том числе в эндотелиоцитах, свидетельствующие о гибели сосуда. В одном капилляре (1,4%) также обнаружена полная окклюзия его просвета тромботическими массами. Во 2-й группе достоверно чаще ($p < 0,001$), чем в 1-й группе, устанавливались признаки апоптоза эндотелиоцитов – в 45 капиллярах (60,0%). Как и в 1-й группе, конденсация хроматина и пузырчатость плазмолеммы в эндотелиоцитах 2-й группы выявлялись с одинаковой частотой – в 51,1% и 62,2% капилляров, соответственно (рис. 1, 2). Однако в эндотелиоцитах семи капилляров (15,6%) из 2-й группы присутствовали оба указанных выше признака апоптоза. Отек эндотелиоцитов в капиллярах из 2-й группы наблюдали чаще, чем в капиллярах из 1-й группы, – в 17 капиллярах (22,7%) (рис. 3). Тем не менее при статистической обработке кратность выявления отека эндотелиоцитов в капиллярах из 1-й и 2-й групп достоверно не отличалась ($p = 0,079$). В 88,2% капилляров 2-й группы отек наблюдался только в отдельных эндотелиоцитах.

Сравнительный анализ состояния эндотелиоцитов в капиллярах вещества перитуморальной зоны до проведения аДЛТ и через 12–14 месяцев после нее |

Comparative analysis of the state of endotheliocytes in the capillaries of the peritumoral zone before and 12–14 months after aRT

Признаки Characteristics	До аДЛТ Before aRT, n (%)	После аДЛТ After aRT, n (%)	P
Гибель капилляра Capillary death	0 (0%)	3 (4%)	0,26
Апоптоз эндотелиоцита Endothelial cell apoptosis	4 (12,6%)	45 (60%)	<0,001
пузырчатость bubbliness	2 (50%)	28 (62,2%)	1,0
конденсация хроматина chromatin condensation	2 (50%)	23 (51,1%)	1,0
Отек эндотелиоцита Endotheliocyte swelling	2 (6,3%)	17 (22,7%)	0,079
тотальный total	2 (100%)	2 (11,8%)	0,12
отек отдельных эндотелиоцитов separate cells are swelled	0 (0%)	15 (88,2%)	0,49
Расширение ЭПР эндотелиоцита Extension of ESR endotheliocyte	11 (34,4%)	25 (34,7%)	0,94
Отек митохондрий эндотелиоцита Swelling of endothelial cell mitochondria	26 (81,3%)	37 (51,4%)	0,13
Утолщение БМ Thickening of BM	6 (18,8%)	52 (69,3%)	0,004
пикообразная деформация peak-shaped deformation	0 (0%)	14 (26,9%)	0,58
Всего капилляров Total capillaries	32 (100%)	75 (100%)	

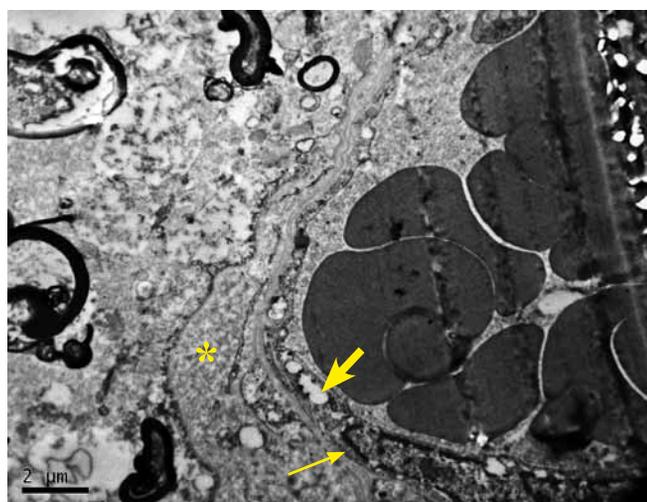


Рис. 1. Ультраструктура капилляра вещества ПЗ (2-я группа). Имеется расширение БМ преимущественно за счет набухания (*). Наблюдаются периферическая конденсация хроматина вдоль ядерной плазмолеммы (тонкая стрелка), набухание митохондрий (толстая стрелка). ТЭМ

Fig. 1. Ultrastructure of the peritumoral zone capillaries (group 2). There is an expansion of BM mainly due to swelling (*). There is peripheral condensation of chromatin along the nuclear plasmalemma (thin arrow), swelling of mitochondria (thick arrow). TEM

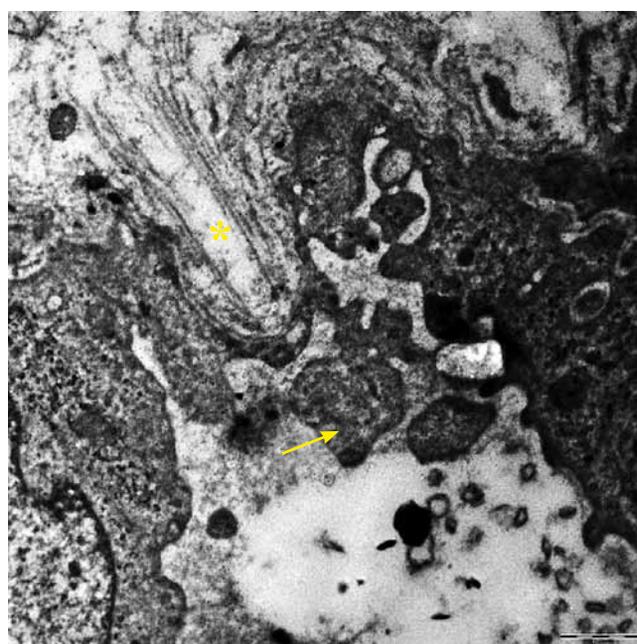


Рис. 2. Ультраструктура капилляра вещества ПЗ (2-я группа). Наблюдается расширение БМ. В границах БМ визуализируется пикообразная деформация БМ (*) в направлении просвета капилляра, включающая коллагеновые волокна. Наблюдается пузырчатость плазмолеммы эндотелиоцита (стрелка). ТЭМ

Fig. 2. Ultrastructure of the peritumoral zone capillaries (group 2). There is an expansion of the BM. Within the boundaries of the BM, a peak-shaped deformation of the BM (*) in the direction of the capillary lumen, including collagen fibers, is visualized. Bubbliness of endotheliocyte plasmalemma (arrow) is observed. TEM

Вакуолизации ЭПР (рис. 4) и набухание митохондрий (рис. 1) в эндотелиоцитах капилляров из 2-й группы выявлялись так же часто, как и в 1-й группе, – в 25 капиллярах (34,7%) и 37 капиллярах (51,4%), соответственно (табл.). Состояние ПК оценивали в 36 капиллярах из 2-й группы. Деструкция ПК (рис. 3) обнаруживалась чаще в капиллярах 2-й группы – в семи (19,4%). Однако при статистической обработке данных частота деструкции ПК в обеих группах оказалась сравнимой ($p=0,47$). Утолщение БМ, за счет набухания и редупликации коллагеновых волокон (рис. 1, 2), выявлялось значительно чаще ($p=0,004$) в капиллярах 2-й группы – в 52 (69,3%). В 14 капиллярах (26,9%) из 2-й группы наблюдалось не только утолщение БМ, но и увеличение ее длины, следствием чего стало появление пикообразной деформации БМ (рис. 2) в направлении просвета капилляра.

Обсуждение

Проведение аДЛТ при ГБ ГМ обеспечивает летальное повреждение клеток резидуальной опухолевой ткани и тем самым обуславливает значительное увеличение продолжительности жизни пациентов. К сожалению, при этом возникают и постлучевые изменения в капиллярах вещества ПЗ ГМ, приводящие к развитию ишемии и формированию в ряде случаев ЛН, который, в свою очередь, является одной из причин смерти таких пациентов. Так, при ТЭМ вещества ГМ через 3 месяца после облучения установлено, что имеют место выраженный гиалиноз стенки капилляров

(утолщение за счет набухания БМ и увеличения количества коллагеновых волокон), вакуолизация цитоплазмы, гипертрофия ядер эндотелиоцитов и снижение их числа. Многие авторы считают, что гибель сосудов ГМ в результате программируемой смерти эндотелиоцитов (апоптоза) – следствие облучения. Полагается, что описанные выше изменения являются причиной тромбоза капилляров. Наличие сходных изменений в капиллярах вещества ГМ через 6 месяцев после воздействия ионизирующей радиации [2, 6, 11] также указывает на крайне высокую вероятность развития ЛН. В связи с этим становится понятным, что в случае возникновения рецидива ГБ в эти сроки использование пДЛТ не представляется возможным. Вместе с тем важно отметить, что иногда достаточно сложно дифференцировать некоторые изменения структурных элементов микроциркуляторного русла в капиллярах вещества ПЗ ГМ в ответ на проведение аДЛТ, так как предполагается, например, что микровезикулярная секреция РНК клетками ГБ с последующей ее миграцией с кровотоком в ПЗ также приводит к отеку эндотелиоцитов и утолщению БМ [12–15].

Наши данные включают результаты исследования капилляров вещества ПЗ ГМ методом ТЭМ в более отдаленные сроки после аДЛТ – через 12–14 месяцев. В эти сроки апоптоз эндотелиоцитов диагностирован в 60% капилляров. В капиллярах вещества ПЗ ГМ из 1-й группы апоптоз эндотелиоцитов обнаруживался нами значительно реже. Факт выявления высокой степени апоптоза эндотелиоцитов в капиллярах ПЗ

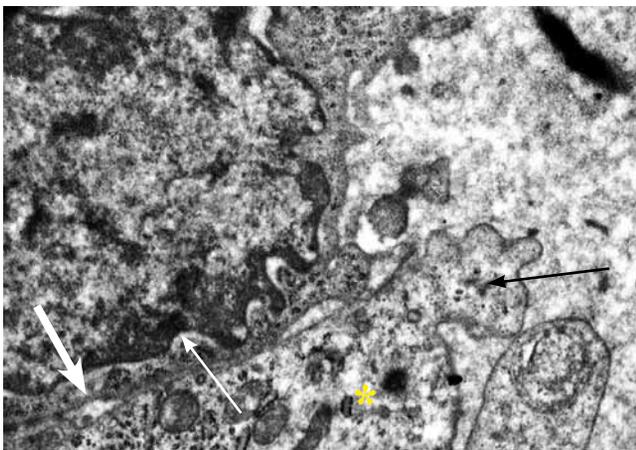


Рис. 3. Ультраструктура капилляра вещества ПЗ (2-я группа). Отек эндотелиоцита (*), пузырчатость (черная тонкая стрелка) плазмолеммы, ранняя стадия апоптоза эндотелиоцита (белая тонкая стрелка) и деструкция ПК (белая толстая стрелка). ТЭМ

Fig. 3. The ultrastructure of the peritumoral zone capillary (group 2). Endotheliocyte edema (*) with bubbliness (black thin arrow) of the plasmalemma, early stage endotheliocyte apoptosis (white thin arrow) and interendothelial tight contact destruction (white thick arrow). TEM

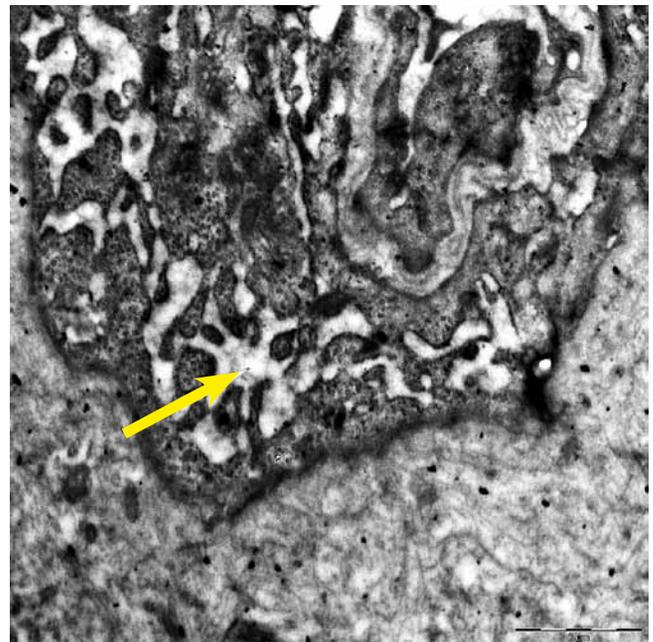


Рис. 4. Ультраструктура капилляра вещества ПЗ (2-я группа). Вакуолизация эндоплазматического ретикулума (стрелка). ТЭМ

Fig. 4. The ultrastructure of peritumoral zone capillary (group 2). Vacuolization of the endoplasmic reticulum is determined (arrow). TEM

вещества ГМ через 12–14 месяцев после проведения АДЛТ диктует необходимость тщательного анализа рисков развития ЛН в случае рассмотрения вопроса об использовании пДЛТ в качестве метода лечения рецидива ГБ. Мы считаем, что у таких пациентов выбор все-таки может быть сделан в пользу СТРХ, особенностями которой являются прецизионное облучение только самого рецидива ГБ и исключение из мишени вещества ПЗ ГМ, а значит, и поврежденных во время ранее проведенной АДЛТ капилляров. Так, некоторые авторы публикуют результаты применения СТРХ при рецидиве ГБ ГМ (после применения АДЛТ), где отмечают, что медиана выживаемости после СТРХ может составлять 10,6 месяца, а 1-летняя выживаемость – до 50% пациентов. Уже установлены некоторые позитивные предикторы продолжительности жизни после СТРХ, среди которых следует выделить прежде всего интервал времени после АДЛТ – более 20 месяцев. Не исключено, что позитивное влияние этого предиктора обусловлено существенной регрессией лучевых повреждений, в том числе апоптоза эндотелиоцитов в эти сроки после АДЛТ. Подтверждает данный факт то, что использование ингибитора VEGF (бивацизумаб), который в ряде случаев с успехом применяется при лечении лучевых повреждений вещества ГМ [3], оказывает существенное положительное влияние и на продолжительность жизни в случае его назначения при рецидиве ГБ ГМ в сочетании со СТРХ [16, 17].

Среди негативных предикторов применения СТРХ при рецидиве ГБ ГМ отмечают возраст (>50 лет) и объем рецидива ГБ [16, 17]. Каждый из двух этих предикторов также в определенной степени обусловлен состоянием микроциркуляторного русла вещества ПЗ. Так, известно, что возрастные изменения капилляров довольно часто похожи на лучевые повреждения, следовательно, могут схоже влиять на результат лечения рецидива ГБ. Что касается размеров рецидивирующей опухоли ГБ, то даже при использовании СТРХ в случае первичной ГБ ГМ больших размеров отмечается увеличение риска развития ЛН вещества ПЗ, так как в этой ситуации увеличивается доза облучения капилляров ПЗ, а значит, и степень их повреждения.

Выявление нами через 12–14 месяцев после АДЛТ в веществе ПЗ ГМ капилляров с признаками их гибели (4%) или тромбоза (1,4%) наравне с упоминавшимся выше апоптозом эндотелиоцитов лишний раз свидетельствует об уже имеющейся ишемии, которая может быть причиной как высокой радиорезистентности рецидива ГБ, так и неврологического дефицита (низкий индекс Карновского). Следует отметить, что, как известно, низкая выживаемость после СТРХ отмечается именно у пациентов с индексом Карновского <70% [16, 17]. Мы считаем, что факт наличия в ПЗ капилляров с признаками апоптоза эндотелиоцитов в стадии гибели или с явлениями тромбоза должен всегда рассматриваться при решении вопроса об алгоритме лечения рецидива ГБ ГМ с использованием пДЛТ.

Утолщение БМ вследствие повреждения гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) является одним из признаков лучевого патоморфоза в капиллярах вещества ПЗ после АДЛТ [2, 9] и включает ее вакуолизацию, набухание (отек) и образование новых коллагеновых волокон. Тем не менее следует заметить, что утолщение БМ в капиллярах ГМ – неспецифический признак и наблюдается также, например, при травмах ГМ. Степень утолщения БМ чаще всего прямо пропорциональна степени повреждения ГЭБ и величине отека вещества ГМ [12]. В своем исследовании мы обнаружили достоверное увеличение числа капилляров, в которых зафиксировано утолщение БМ в веществе ПЗ ГМ после АДЛТ (18,8% капилляров до АДЛТ; 69,5% капилляров после АДЛТ, $p=0,004$). Важно отметить, что в настоящем исследовании мы выявили не только утолщение БМ, но и увеличение ее протяженности, что обусловило возникновение пикообразных деформаций БМ в направлении просвета капилляра. Мы не обнаружили упоминаний о подобного рода изменениях БМ в других публикациях. Не исключаем, что пикообразные деформации можно рассматривать как визитную карточку воздействия ионизирующей радиации на капилляры вещества ГМ. Уточнение прогностической значимости указанных выше изменений БМ, в том числе с точки зрения их участия в патогенезе формирования зон ишемии в веществе ПЗ, станет предметом наших последующих исследований.

Не менее важным обстоятельством, установленным в ходе исследования, стало отсутствие утолщения БМ в 30% капилляров из 2-й группы. Ожидалось, что утолщение БМ, как следствие повреждения ГЭБ, будет обнаружено во всех капиллярах ПЗ после АДЛТ. Отсутствие утолщения БМ в указанных капиллярах с нашей точки зрения может являться признаком того, что такие сосуды не подвергались повреждающему воздействию радиации, а следовательно, они образовались уже после завершения АДЛТ. Другими словами, данный факт можно рассматривать как свидетельство реваскуляризации (образование новых капилляров) вещества ПЗ ГМ через 12–14 месяцев после завершения АДЛТ. В литературе показано наличие как минимум двух источников реваскуляризации – клетки миелоидного ряда (bone marrow-derived cells) и эндотелиоциты, сохранившие способность к ангиогенезу после облучения [18]. Например, опубликованы данные о том, что через 12 месяцев после ДЛТ в ряде эндотелиоцитов ПЗ обнаруживается митотическая активность [9, 7]. Результаты изучения состояния БМ методом ТЭМ представляют дополнительную возможность корректно оценить интенсивность реваскуляризации вещества ПЗ после АДЛТ и в последующем использовать полученные данные при решении вопроса о тактике лечения рецидива ГБ, в том числе с использованием пДЛТ [19].

ТЭМ также позволила установить довольно низкий процент капилляров вещества ПЗ, в которых выявляются повреждения трансэндотелиального (отек эндо-

телиоцита) и параэндотелиального (деструкция ПК) компонентов ГЭБ как до аДЛТ (6,3% и 9,5% капилляров), так и после нее (22,7 и 19,4% капилляров, соответственно). Однако установлены существенные отличия отека эндотелиоцитов в исследуемых группах. Так, до аДЛТ (1-я группа) наблюдался тотальный отек всех видимых эндотелиоцитов, но лишь в 6,5% капилляров. Во 2-й группе в 88,2% капилляров имел место отек, но только отдельных эндотелиоцитов. Приведенные факты подтверждают данные о том, что источником отека вещества ПЗ ГМ, как правило, являются капилляры опухоли, что само по себе всегда заставляет прежде всего исключать рецидив ГБ в случае визуализации лишь увеличения отека вещества ГМ в ложе ранее удаленной опухоли без явных признаков рецидива.

Электронномикроскопическое исследование состояния ЭПР и митохондрий эндотелиоцитов вещества ПЗ, которые мы оценивали по факту их вакуолизации, не установило существенных различий выраженности указанных выше признаков до аДЛТ и через 12–14 месяцев после нее. При этом не исключается, что повреждения в этих структурах имеются и могут быть обнаружены другими методами.

В заключение следует констатировать, что через 12–14 месяцев после аДЛТ при ГБ ГМ в веществе ПЗ сохраняется ишемия, обусловленная как апоптозом эндотелия капилляров, так и утолщением с пикообразной деформацией БМ. Обнаруженные признаки ревазуляризации вещества ПЗ ГМ после ранее проведенной аДЛТ дают основания считать возможным рассмотрение СТРХ в качестве метода лечения рецидива ГБ ГМ.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.С. Балканов, И.Д. Розанов.
Сбор и обработка материала – И.Д. Розанов, В.П. Черников.
Статистическая обработка данных – Л.Е. Гаганов.
Написание текста – И.Д. Розанов, А.С. Балканов.
Редактирование – А.В. Голанов, В.П. Черников.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.S. Balkanov, I.D. Rozanov.
Collected the data – I.D. Rozanov, V.P. Chernikov.
Performed the statistical analysis – L.E. Gaganov.
Wrote the paper – I.D. Rozanov, A.S. Balkanov.
Edited the manuscript – A.V. Golanov, V.P. Chernikov.

Литература/References

1. *Reitman ZJ, Winkler F, Elia AEH.* New directions in the treatment of glioblastoma. *Semin Neurol.* 2018;38(1):50–61. DOI: 10.1055/s-0038-1623534.
2. *Wong CS, Van der Kogel AJ.* Mechanisms of radiation injury to the central nervous system: implications for neuroprotection. *Mol Interv.* 2004;4(5):273–84. DOI: 10.1124/mi.4.5.7.
3. *Miyatake S, Nonoguchi N, Furuse M, Yoritsune E, Miyata T, Kawabata S et al.* Pathophysiology, diagnosis, and treatment of radiation necrosis in the brain. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2015;55(1):50–9. DOI: 10.2176/nmc.ra.2014-0188.
4. *Gilmore SA, Sims TJ.* Glial-glia and glial-neuronal interfaces in radiation-induced, glia-depleted spinal cord. *J Anat.* 1997;190(Pt. 1): 5–21. DOI: 10.1046/j.1469-7580.1997.19010005.x.
5. *Lund EL, Bastholm L, Kristjansen PE.* Therapeutic synergy of TNP-470 and ionizing radiation: effects on tumor growth, vessel morphology, and angiogenesis in human glioblastoma multiforme xenografts. *Clin Cancer Res.* 2000;6(3):971–8. PMID: 10741723.
6. *Peña LA, Fuks Z, Kolesnick RN.* Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency. *Cancer Res.* 2000;60(2):321–7. PMID: 10667583.
7. *Cheng L, Ma L, Ren H, Zhao H, Pang Y, Wang Y et al.* Alterations in the expression of vascular endothelial growth factor in the rat brain. *Mol Med Rep.* 2014;10(5): 2263–70. DOI: 10.3892/mmr.2014.2520.
8. *Taatjes DJ, Sobel EB, Budd RC.* Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(1):33–43. DOI: 10.1007/s00418-007-0356-9.
9. *Schiffer D, Chiò A, Giordana MT, Mauro A, Migheli A, Soffietti R et al.* Vascular response to irradiation in malignant gliomas. *J Neurooncol.* 1990;8(1):73–84. DOI: 10.1007/BF00182090.
10. *Niyazi M, Siefert A, Schwarz SB, Ganswindt U, Kreth FW, Tonn JC et al.* Therapeutic options for recurrent malignant glioma. *Radiother Oncol.* 2011;98(1):1–14. DOI: 10.1016/j.radonc.2010.11.006.
11. *Burrell K, Hill RP, Zadeh G.* High-resolution in vivo analysis of normal brain response to cranial irradiation. *PLoS One.* 2012;7(6):e38366. DOI: 10.1371/journal.pone.0038366.
12. *Castejón OJ.* Ultrastructural alterations of human cortical capillary basement membrane in human brain oedema. *Folia Neuropathol.* 2014;52(1):10–21. DOI: 10.5114/fn.2014.41740.
13. *Li CC, Eaton SA, Young PE, Lee M, Shuttleworth R, Humphreys DT et al.* Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA Biol.* 2013;10(8):1333–44. DOI: 10.4161/rna.25281.
14. *Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H et al.* Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol.* 2000;100(3):323–31. DOI: 10.1007/s004010000180.
15. *Балканов А.С., Черников В.П., Голанов А.В.* Роль ультраструктурных изменений гематоэнцефалического барьера в развитии радиорезистентности глиобластомы головного мозга. *Альманах клинической медицины.* 2018;46(7):682–689. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-682-689.
16. *Balkanov AS, Chernikov VP, Golanov AV.* The role of ultrastructural abnormalities of the blood-brain barrier in the development of brain glioblastoma radioresistance. *Almanac of Clinical Medicine.* 2018;46(7):682–689 (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-7-682-689.
17. *Cuneo KC, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Reardon DA, Desjardins A, Peters KB et al.* Safety and efficacy of stereotactic radiosurgery and adjuvant bevacizumab in patients with recurrent malignant gliomas. *Oncol Biol Int J Radiat Phys.* 2012;82(5):2018-24. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.12.074.

17. *Imber BS, Kanungo I, Braunstein S, Barani IJ, Fogh SE, Nakamura JL et al.* Indications and efficacy of gamma knife stereotactic radiosurgery for recurrent glioblastoma: 2 decades of institutional experience. *Neurosurgery.* 2017;80(1):129–39. DOI: 10.1227/NEU.0000000000001344.
18. *Kozin SV, Duda DG, Munn LL, Jain RK.* Neovascularization after irradiation: what is the source of newly formed vessels in recurring tumors? *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(12):899–905. DOI: 10.1093/jnci/djs239.
19. *Jain R, Poisson LM, Gutman D, Scarpace L, Hwang SN, Holder CA et al.* Outcome prediction in patients with glioblastoma by using imaging, clinical, and genomic biomarkers: focus on the nonenhancing component of the tumor. *Radiology.* 2014;272(2):484–93. DOI: 10.1148/radiol.14131691.

Информация об авторах

Андрей Сергеевич Балканов – доктор медицинских наук, заведующий отделением радиотерапии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского.

Иван Дмитриевич Розанов – научный сотрудник отделения радиотерапии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского.

Андрей Владимирович Голанов – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением радиохирургии и радиотерапии НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко.

Леонид Евгеньевич Гаганов – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения патоморфологии МОНКИ им. М.Ф. Владимирского.

Валерий Петрович Черников – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека.

Author information

Andrey S. Balkanov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Radiotherapy Department, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute.
<https://orcid.org/0000-0002-1601-9780>

Ivan D. Rozanov – Researcher, Radiotherapy Department, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute.
<https://orcid.org/0000-0002-8701-651X>

Andrey V. Golanov – Corresponding member of RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Radiosurgery and Radiotherapy, N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery.
<https://orcid.org/0000-0002-0976-4547>

Leonid E. Gaganov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Department of Pathomorphology, M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute.
<https://orcid.org/0000-0002-5073-2774>

Valery P. Chernikov – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Experimental Cell Pathology, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-3253-6729>

Анализ сопоставления результатов цитологического и гистологического методов в диагностике злокачественных новообразований вульвы

М.И. Пахарукова, М.А. Котугина, Э.И. Вайнберг

МАУ Клинико-диагностический центр, Екатеринбург, Россия

Введение. Рак вульвы является редкой опухолью женских половых органов. Несмотря на доступную визуализацию процесса, окончательный диагноз пациенткам часто ставят на поздних стадиях распространения опухоли, что говорит о необходимости улучшения ранней диагностики данной патологии. Цель работы – повысить эффективность цитологической диагностики предрака и рака вульвы путем сопоставления результатов с данными гистологического исследования и анализа причин полученных расхождений.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ результатов биопсий, мазков-отпечатков и соскобов, взятых с наружных половых органов у 82 пациенток в период с 2014 по 2019 год.

Результаты. Доля истинно положительных результатов составила 75%, ложноотрицательные заключения даны в 25% (17 случаев). Гипердиагностика имела место в 3,7% от всех сопоставленных случаев. Чувствительность цитологического метода составила 76,4%, специфичность 70,0%. Рассмотрены причины, приводящие к постановке неверного цитологического заключения.

Заключение. Ретроспективный анализ расхождений цитологического заключения с гистологическим позволяет выявить особенности микроскопической картины, приводящие к неверному результату, и, таким образом, повысить достоверность цитологической диагностики.

Ключевые слова: рак вульвы, неоплазия, меланома, болезнь Педжета, цитологическое исследование вульвы

Для корреспонденции: Мария Игоревна Пахарукова. E-mail: pakharukovami@gmail.com

Для цитирования: Пахарукова М.И., Котугина М.А., Вайнберг Э.И. Анализ сопоставления результатов цитологического и гистологического методов в диагностике злокачественных новообразований вульвы. Клини. эксп. морфология. 2021;10(1):41–49. DOI:10.31088/CEM2021.10.1.41-49.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 14.09.2020. Получена после рецензирования 15.10.2020. Принята в печать 26.10.2020.

Analyzing the differences between the cytological and histological methods in the vulva malignant neoplasm diagnosis

M.I. Pakharukova, M.A. Kotugina, E.I. Vainberg

Clinical Diagnostic Center, Yekaterinburg, Russia

Introduction. Vulvar cancer is a rare female genital tract tumor. Unfortunately, the final diagnosis is often made in the late stage despite the available visualization methods. It indicates the need to improve the early diagnosis methods. The aim of the study was to improve the efficiency of the cytological diagnosis of vulvar cancer and pre-cancerous lesions by comparing the cytological and histological findings and diagnoses and analyzing the differences.

Materials and methods. A retrospective analysis of the biopsies, smears, and scrapings of 82 patients from 2014 to 2019 was carried out.

Results. We found that true positive conclusions were given in 75% of cases, false negative – in 25% (17 cases). False positive results (overdiagnosis) occurred in 3.6% of all cases compared. The sensitivity of the cytological method was 76.4%, its specificity – 70%. We discussed the possible causes of incorrect cytology conclusions.

Conclusion. A retrospective analysis of the discrepancy between the cytological and the histological diagnoses allowed us to identify the microscopic features that resulted into incorrect conclusions and, thus, to increase the reliability of the cytological diagnosis

Keywords: vulvar cancer, neoplasia, melanoma, Paget's disease, vulvar cytology

Corresponding author: Mariia I. Pakharukova. E-mail: pakharukovami@gmail.com

For citation: Pakharukova M.I., Kotugina M.A., Vainberg E.I. Analyzing the differences between the cytological and histological methods in the vulva malignant neoplasm diagnosis. Clin. exp. morphology. 2021;10(1):41–49. DOI:10.31088/CEM2021.10.1.41-49 (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 14.09.2020. **Received in revised form** 15.10.2020. **Accepted** 26.10.2020.

Введение

Рак вульвы (РВ) является редкой опухолью, его доля в структуре злокачественных новообразований женских половых органов составляет около 5% [1–5]. В отличие от рака шейки матки, который почти всегда обусловлен инфицированием вирусом папилломы человека (ВПЧ), рак наружных половых органов имеет два разных пути этиопатогенеза. Первый также связан с папилломавирусом и часто наблюдается у женщин моложе 50 лет, второй – с мутаций гена-супрессора p53 и чаще встречается у пожилых пациенток [6–10]. Самый распространенный морфологический тип РВ – плоскоклеточный рак, частота его выявления достигает 90–95% от всех злокачественных новообразований вульвы [7, 9, 11, 12]. Интраэпителиальная неоплазия вульвы (VIN) является неинвазивным плоскоклеточным повреждением и предшественником плоскоклеточного рака вульвы [7, 11, 13].

В последние несколько десятилетий частота случаев выявления дисплазий и инвазивного рака вульвы увеличилась во всем мире, особенно среди женщин репродуктивного возраста [9, 10, 13–15]. Несмотря на возможность визуализации опухолевого процесса, около 50% пациенток обращаются за помощью лишь на III и IV стадиях опухолевого процесса. Многие пациентки, особенно пожилого возраста, из-за смущения откладывают визит к врачу. Причиной поздней диагностики также могут быть ошибки врачей (как клиницистов, так и морфологов) в связи с редкой встречаемостью опухоли [4]. Основными методами диагностики заболеваний вульвы являются вульвоскопия, цитологическое и гистологическое исследования. Признавая простоту и доступность цитологического метода, некоторые авторы отмечают его низкую чувствительность (32–60%) в отношении выявления неоплазий и инвазивного рака [15–17].

Цель работы – повысить эффективность цитологической диагностики неоплазий и рака вульвы путем сопоставления результатов с данными гистологического исследования и анализом причин расхождений.

Материалы и методы

Для изучения информативности цитологического метода проведен ретроспективный анализ результатов исследований мазков-отпечатков и соскобов, взятых с наружных половых органов 82 пациенток в период с

2014 по 2019 год, выполненных в лаборатории цитологии МАУ Клинико-диагностический центр. Средний возраст обследованных составил 76 лет. Практически все исследования были выполнены традиционным методом с нанесением клеточного материала на стекло, кроме одного препарата, полученного методом жидкостной цитологии. Материал, полученный традиционным способом, фиксировали в 95% спирте и окрашивали гематоксилином и эозином. В случае жидкостной цитологии проводилось окрашивание по Папаниколу.

В исследование включены цитологические препараты с достаточным количеством клеток для их оценки – не менее 5 тыс. клеток. При формулировании заключения их классифицировали как отрицательные в отношении дисплазии и рака (отмечались доброкачественные изменения эпителия); положительные по наличию плоскоклеточного поражения низкой степени (LSIL), включающего VIN I; положительные по наличию плоскоклеточного поражения высокой степени (HSIL), включающего VIN II, VIN III, и *cancerin situ* (CIS); подозрительные и положительные по наличию плоскоклеточного рака. Цитологическое заключение сравнивали с результатом гистологического исследования биоптатов. Разница между взятием материала для цитологического и гистологического методов исследования составляла не более трех месяцев.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ цитологических и гистологических заключений представлен в таблице.

Как видно из таблицы, из 68 обследованных женщин, у которых гистологически был подтвержден рак, 51 пациентке (75%) было дано цитологическое заключение о злокачественном процессе (заподозрено или в утвердительной форме), то есть истинно положительное. Ложноотрицательные заключения даны в 17 случаях (25%). Показатель цитологической гипердиагностики составил 3,7% от всех сопоставленных случаев.

Нами проведен расчет показателей эффективности цитологической диагностики по формулам [18]:

- Чувствительность = $\frac{ИП}{ИП + ЛО} \times 100\%$
- Специфичность = $\frac{ИО}{ИО + ЛП} \times 100\%$

Таким образом, чувствительность метода составила 76,4%, а специфичность 70,0%.

Сопоставление заключений по данным цитологического и гистологического методов исследования |
Comparison findings of cytological and histological research methods

Цитологическое заключение Cytological diagnosis	Число наблюдений Number of cases	Гистологическое заключение Histological diagnosis		
		рак cancer	HSIL true (VIN II, III, CIS)	отсутствие интраэпителиальных изменений и рака negative for SIL and cancer
Рак, подозрение на рак Cancer, cancer suspicious	53	51 (ИП TP)	–	2 (ЛП FP)
HSIL (VIN II, VIN III, CIS)	8	3 (ЛО FN)	4 (ИП TP)	1 (ЛП FP)
LSIL (VIN I)	3	3 (ЛО FN)	–	–
Отсутствие интраэпителиальных изменений и рака Negative for SIL and cancer	18	11 (ЛО FN)	–	7 (ИО TN)
Всего Total	82	68	4	10

Цитологические заключения: ИП – истинно положительное, ИО – истинно отрицательное, ЛП – ложноположительное, ЛО – ложноотрицательное

Cytological conclusions: TP – true positive, TN – true negative, FP – false positive, FN – false negative

При ретроспективном пересмотре препаратов были выявлены основные причины ошибочных заключений и проанализированы цитологические особенности материала, послужившие причиной расхождений с гистологическим методом. Стоит отметить, что материал, получаемый с вульвы, как правило, немногочеточный, что часто приводит к снижению эффективности метода. Наиболее частой причиной ложноотрицательного цитологического заключения (10 из 17 случаев) было присутствие в полученном материале только ороговевшего многослойного плоского эпителия и элементов воспаления. Это может быть объяснено гиперкератозом в верхних слоях эпителиального пласта, а также частым изъязвлением слизистых при злокачественной трансформации. Таким образом, дисплазии вульвы и преинвазивный рак, при которых патологические процессы начинаются в глубоких слоях, могут не выявляться при цитологическом исследовании. По этой же причине, по мнению некоторых авторов, нецелесообразно брать мазки-отпечатки для цитологического исследования с тканей наружных половых органов [15, 18].

В шести случаях ложноотрицательного результата в отношении рака вульвы по цитологическим препаратам поставлены диагнозы интраэпителиального поражения низкой степени (LSIL) в трех случаях и поражения высокой степени (HSIL, VIN II) на фоне выраженного клеточного воспалительного инфильтрата в других трех случаях. При пересмотре препаратов нами не выявлены признаки злокачественности. Вероятно, это связано с ограничениями метода и расположением патологических клеток рака в глубоких слоях пласта, в связи с чем они не попали в цитологический материал.

Нами обнаружен один случай гиподиагностики РВ из-за ошибочной оценки клеточных изменений

цитологом (рис. 1). Пациентка 1951 года рождения, направительный диагноз «язвенный вульвит». Цитологическое заключение: клеточные элементы воспаления в умеренном количестве, клетки многослойного плоского эпителия с признаками гипер- и паракератоза. Гистологическое заключение: плоскоклеточный ороговевающий рак. При пересмотре препарата отмечены единичные скопления клеток с полиморфизмом, нарушением ядерно-цитоплазматического соотношения, гиперхромией ядер, присутствие двуядерных атипичных клеток. Таким образом, в данном случае цитологическое заключение о доброкачественном процессе было дано неверно.

Проанализировав ошибки, связанные с ложноположительными результатами (три случая) в отношении диагностики РВ, мы пришли к выводу, что основную трудность составляет цитологическая оценка паракератоза (два наблюдения). Мелкие клетки с гиперхромными ядрами могут ошибочно оцениваться как атипичные, что приводит к гипердиагностике. Однако при более тщательном рассмотрении раковые клетки (рис. 2 А, В) отличаются от клеток при паракератозе (рис. 2 С, D) более гиперхромными, неровными ядрами, глыбчатым хроматином с участками конденсации, при этом ядерно-цитоплазматическое соотношение сдвинуто в сторону ядра.

Приводим также третий случай ошибочной гипердиагностики злокачественного процесса. Пациентка 1951 года рождения. Цитологическое заключение: найденные изменения соответствуют плоскоклеточному раку с признаками ороговения. Гистологическое заключение: хронический воспалительный процесс, VIN I–II, HSIL. При пересмотре препарата в основном отмечены изменения многослойного плоского эпителия, соответствующие дисплазии от легкой до умеренной

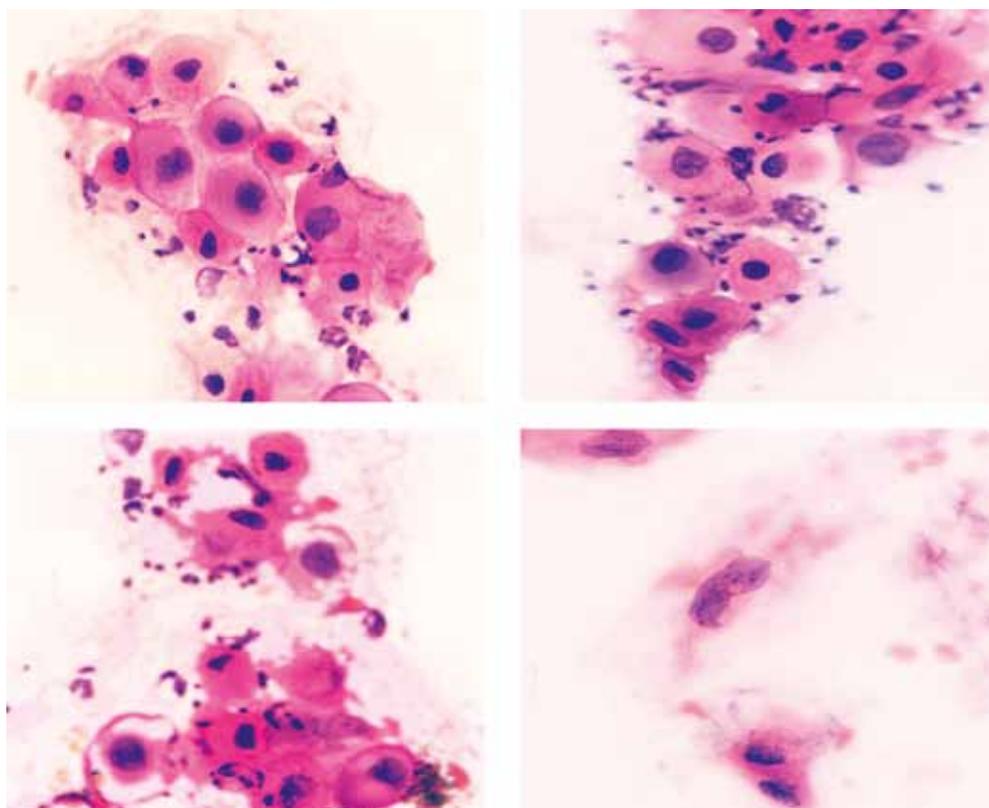


Рис. 1. Плоскоклеточный ороговевающий рак вульвы. Цитологические препараты. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$
Fig. 1. Keratinizing squamous cell carcinoma of the vulva. Cytological slides. H&E stain, $\times 1000$

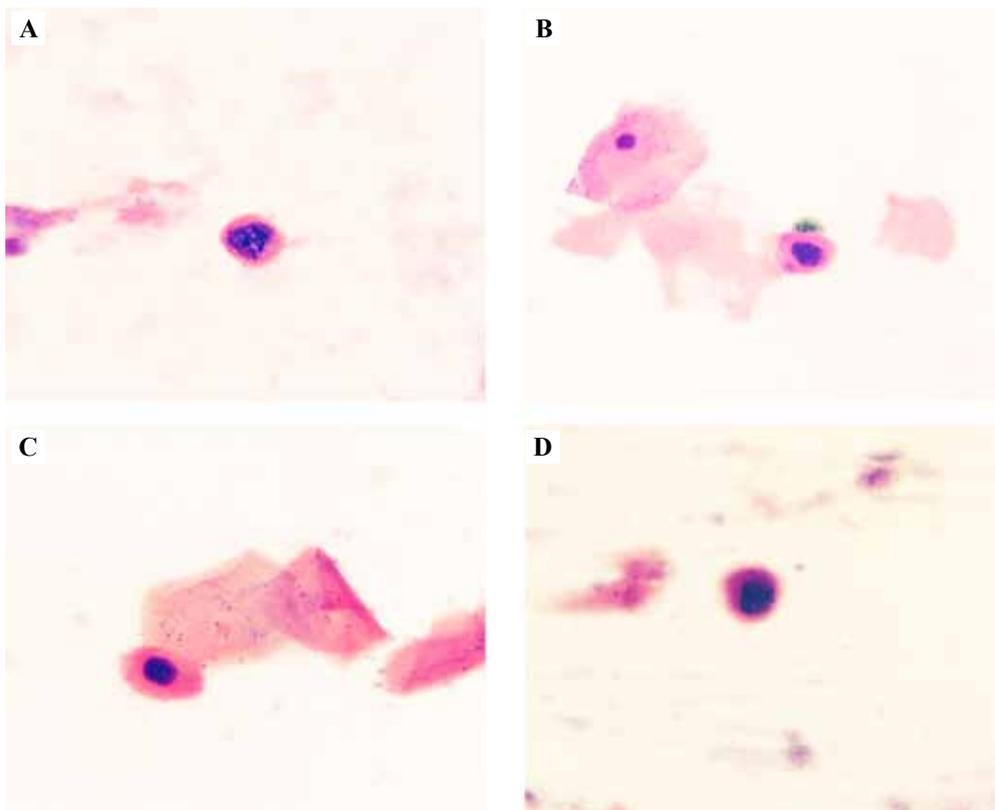


Рис. 2. Сравнение клеток с паракаратозом и клеток рака. Цитологические препараты. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$.
 А, В – клетки рака, С, D – клетки с паракаратозом
Fig. 2. Comparison of parakeratosis cells and cancer cells. Cytological slides. H&E stain, $\times 1000$.
 А, В – cancer cells, С, D – parakeratosis cells

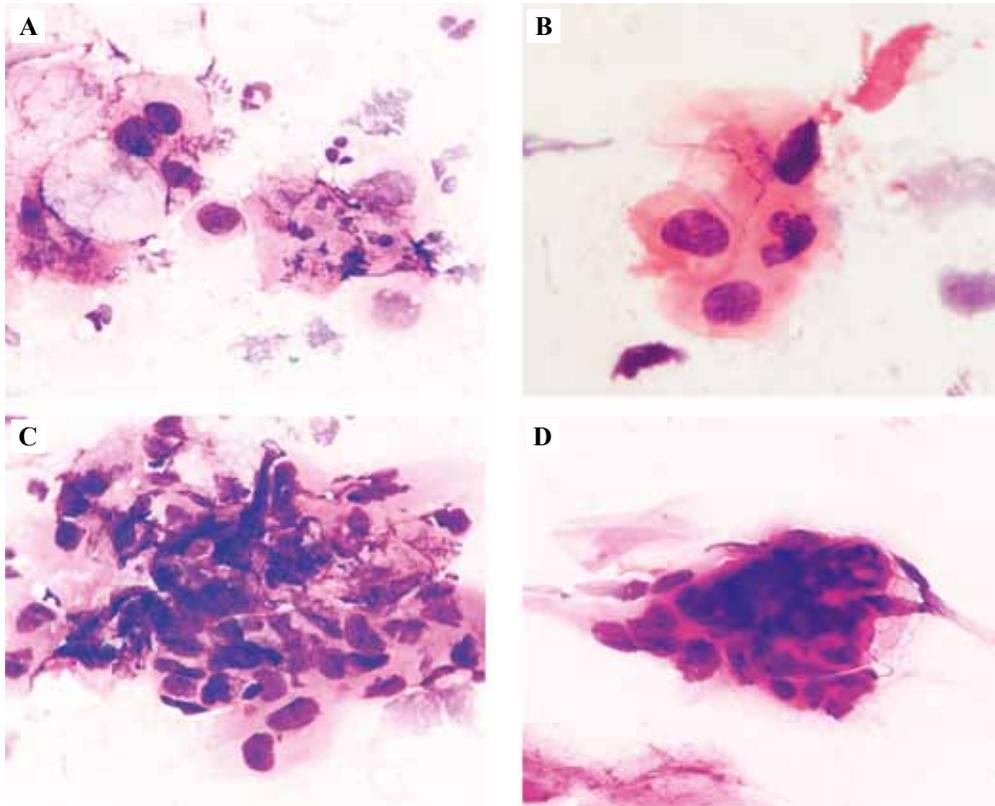


Рис. 3. VIN I–II, HSIL. Цитологические препараты. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$
 Fig. 3. VIN I–II, HSIL. Cytological slides. H&E stain, $\times 1000$

степени (рис. 3 А, В), но при этом присутствовали в небольшом количестве группы клеток парабазального слоя с атипией (рис. 3 С, D). Стоит отметить, что решающим фактором цитологической гипердиагностики был сопутствующий анамнез пациентки. Полугодом ранее по результатам исследования, полученного методом жидкостной цитологии, было дано заключение об интраэпителиальном поражении высокой степени (VIN III, HSIL), подозрительном на *carcinoma in situ* (рис. 4). В результате исследования методом ПЦР выявлен ВПЧ высокого канцерогенного риска 16-го типа в концентрации 7,25 на 100 тыс. клеток. Гистологическое заключение: HSIL, плоскоклеточная карцинома *in situ*. Пациентке проведено иссечение опухоли.

Приводим также два редких случая новообразований вульвы, в которых по цитологической картине был правильно определен злокачественный процесс, но ошибочно предположен морфологический тип.

Первый случай. Пациентка 1936 года рождения. Направительный диагноз: эритроплакия вульвы. Цитологическое заключение: цитограмма крайне подозрительна на плоскоклеточный рак с ороговением. Гистологическое заключение: меланома.

При пересмотре препарата отмечены в большом количестве вытянутые веретенообразные клетки с гиперхромными полиморфными ядрами (рис. 5 А, В). В единичных полях зрения обнаружен меланин

в виде пылевидных гранул вне- и внутриклеточно (рис. 5 С, D). Отметим, что при окраске гематоксилином и эозином данный пигмент визуализируется труднее и может быть пропущен цитологом. В то же время неопластические меланоциты в виде обширных скоплений могут имитировать VIN и плоскоклеточный рак, обуславливая возможность ошибки в цитологической диагностике [9].

Первичная меланома женского полового тракта встречается крайне редко, на ее долю приходится меньше 10% всех меланом, диагностируемых у женщин. Несмотря на редкость, она является вторым наиболее распространенным гистологическим типом опухолей вульвы, составляя 7–10% всех злокачественных новообразований этого органа [19–22]. Данный тип опухоли является причиной до 80% смертей, приходящихся на группу злокачественных новообразований наружных половых органов. В отличие от плоскоклеточного рака вульвы меланома представляет те опухоли, для которых характерно не только развитие локальных рецидивов и/или регионарных метастазов, но и в меньшей степени возникновение отдаленных метастазов в разные органы и ткани даже при исходно небольших размерах первичного очага [20]. Таким образом, знание цитологических особенностей картины при меланоме позволит нацелить врача на скорейшее взятие материала для гистологического исследования. Уточним, что при данном заболевании биопсия должна быть только

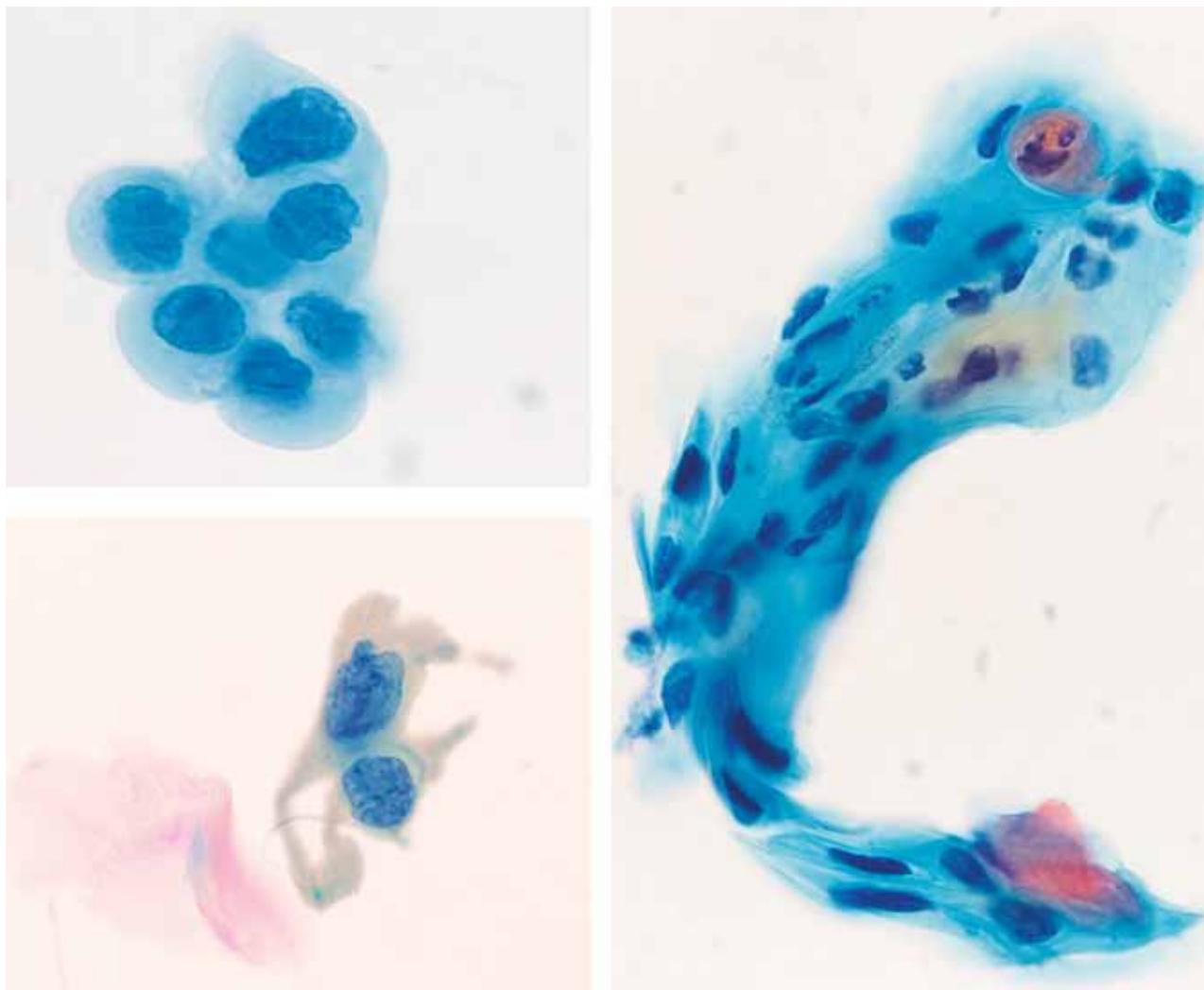


Рис. 4. VIN III, cancer *in situ*, HSIL. Цитологические препараты. Метод жидкостной цитологии. Окраска по Папаниколау, $\times 1000$

Fig. 4. VIN III, cancer *in situ*, HSIL. Cytological slides. Liquid-based cytology. Papanicolaou stain, $\times 1000$

тотальной, в противном случае происходит быстрая генерализация опухоли.

Второй случай. Пациентка 1951 года рождения. Направительный диагноз: атрофический вагинит. Цитологическое заключение: клетки многослойного плоского эпителия, подозрительные на интраэпителиальное поражение высокой степени (HSIL). Гистологическое заключение: интраэпителиальная карцинома (болезнь Педжета) в сочетании с лейкоплакией вульвы.

При ретроспективном изучении препарата отмечены клетки преимущественно изолированные или в небольших группах, с крупными эксцентричными ядрами, обильной и вакуолизированной цитоплазмой. Контур ядер в основном ровный, хроматин распределен равномерно (рис. 6). В данном случае клетки Педжета были ошибочно приняты цитологом за многослойный плоский эпителий.

Болезнь Педжета – это новообразование, характеризующееся наличием в пласте многослойного плос-

кого эпителия крупных эпителиоцитов железистого типа (клетки Педжета) [12]. Болезнь Педжета вульвы является редкой экстрамаммарной формой заболевания, частота встречаемости которой составляет около 2% от большинства злокачественных опухолей наружных половых органов [23]. В литературе описано лишь несколько случаев первичной диагностики заболевания при помощи цитологического метода исследования [24–26]. В то же время это простая, но эффективная диагностическая мера с минимальной травматизацией. Необходимо уточнить, что следует брать не мазок-отпечаток, а соскоб с пораженной области, так как клетки Педжета локализуются в нижней трети эпителиального пласта, чаще в базальном и парабазальных слоях [12]. Знание цитологических особенностей болезни Педжета может обеспечить весьма вероятную диагностику заболевания и рекомендации врачу о необходимости назначения биопсии.

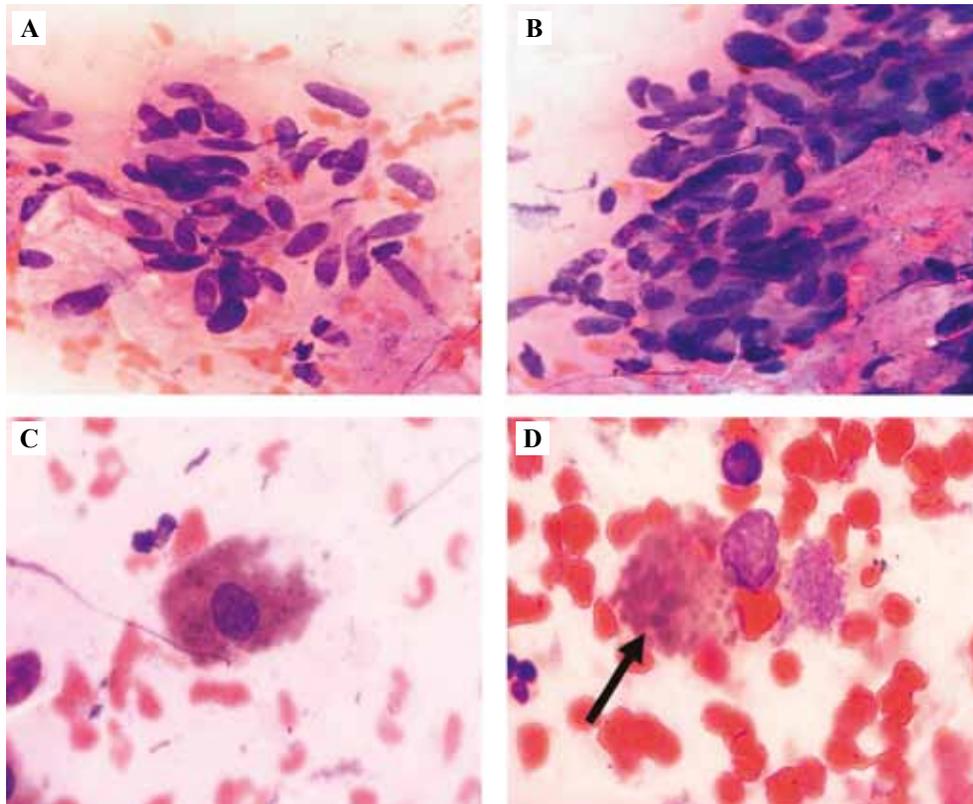


Рис. 5. Меланома вульвы. Цитологические препараты. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$.

A, B – полиморфные вытянутые клетки опухоли. C – меланин внутриклеточно, D – меланин внеклеточно

Fig. 5. Melanoma of the vulva. Cytological slides. H&E stain, $\times 1000$.

A, B – polymorphic elongated tumor cells, C – intracellular melanin, D – extracellular melanin

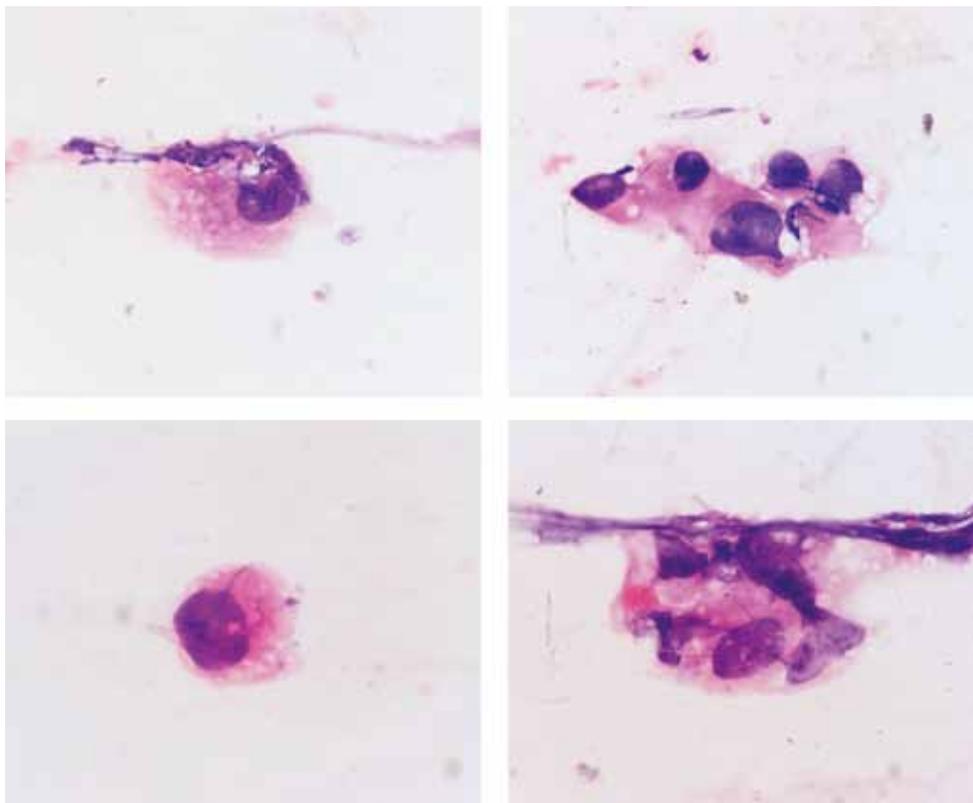


Рис. 6. Болезнь Педжета вульвы. Цитологические препараты. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$

Fig. 6. Paget's disease of the vulva. Cytological slides. H&E stain, $\times 1000$

Выводы

1. Чувствительность цитологического метода выявления рака и интраэпителиальных неоплазий вульвы составляет 76,4%, специфичность 70,0%.

2. Ретроспективный анализ расхождений цитологического заключения с гистологическим позволил выявить особенности микроскопической картины, сопровождающей ошибки цитолога, и, таким образом, повысить достоверность цитологической диагностики.

3. Ложноотрицательные результаты, как правило, связаны с отсутствием патологических клеток в получаемом материале для цитологического исследования.

4. Для уменьшения доли ошибочных результатов необходимо тщательно изучать клетки паракератоза и дифференцировать их от клеток рака.

5. Знание морфологических особенностей редких злокачественных опухолей наружных половых органов может обеспечить весьма вероятную их диагностику уже на этапе цитологического метода.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – М.И. Пахарукова, М.А. Котугина.

Сбор и обработка материала – М.И. Пахарукова, М.А. Котугина.

Написание текста – М.И. Пахарукова.

Редактирование – Э.И. Вайнберг.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – M.I. Pakharukova, M.A. Kotugina.

Collected the data and performed the analysis – M.I. Pakharukova, M.A. Kotugina.

Wrote the paper – M.I. Pakharukova.

Edited the manuscript – E.I. Vainberg.

Литература/References

- Hacker NF, Eifel PJ, van der Velden J. Cancer of the vulva. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015;131(Suppl 2):S76–83. DOI: 10.1016/j.ijgo.2015.06.002.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21332.
- Clancy AA, Spaans JN, Weberpals JI. The forgotten woman's cancer: vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) and a targeted approach to therapy. *Ann Oncol*. 2016;27(9):1696–705. DOI:10.1093/annonc/mdw242.
- Kang YJ, Smith M, Barlow E, Coffey K, Hacker N, Canfell K. Vulvar cancer in high-income countries: Increasing burden of disease. *Int J Cancer*. 2017;141(11):2174–86. DOI: 10.1002/ijc.30900.
- Prete M, Rotondo JC, Holzinger D, Micheletti M, Gallio N, McKay-Chopin S et al. Role of human papillomavirus infection in the etiology of vulvar cancer in Italian women. *Infect Agent Cancer*. 2020;15:20. DOI: 10.1186/s13027-020-00286-8.
- Prete M, Scurry J, Marchitelli CE, Micheletti L. Vulvar intraepithelial neoplasia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2014;28(7):1051–62. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2014.07.010.
- Léonard B, Kridelka F, Delbecq K, Goffin F, Demoulin S, Doyen J et al. Clinical and pathological overview of vulvar condyloma acuminatum, intraepithelial neoplasia, and squamous cell carcinoma. *Bio Med Res Int*. 2014;480573. DOI: 10.1155/2014/480573.
- Yang EJ, Kong CS, Longacre TA. Vulvar and anal intraepithelial neoplasia: terminology, diagnosis, and ancillary studies. *Adv AnatPathol*. 2017;24(3):136–50. DOI: 10.1097/PAP.000000000000149.
- Hoang LN, Park KJ, Soslow RA, Murali R. Squamous precursor lesions of the vulva: current classification and diagnostic challenges. *Pathology*. 2016;48(4):291–302. DOI:10.1016/j.pathol.2016.02.015.
- Zhang J, Zhang Y, Zhang Z. Prevalence of human papillomavirus and its prognostic value in vulvar cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(9):e0204162. DOI: 10.1371/journal.pone.0204162.
- Pils S, Gensthaler L, Alemany L, Horvat R, de Sanjose S, Joura EA. HPV prevalence in vulvar cancer in Austria. *Wien Klin Wochenschr*. 2017;129(21–22):805–9. DOI: 10.1007/s00508-017-1255-2.
- Tan A, Bieber AK, Stein JA, Pomeranz MK. Diagnosis and management of vulvar cancer: A review. *J Am Acad Dermatol*. 2019;81(6):1387–96. DOI:10.1016/j.jaad.2019.07.055.
- Wakeham K, Kavanagh K, Cuschieri K, Millan D, Pollock KG, Bell S et al. HPV status and favorable outcome in vulvar squamous cancer. *Int J Cancer*. 2017;140(5):1134–46. DOI: 10.1002/ijc.30523.
- Baandrup L, Varbo A, Munk C, Johansen C, Frisch M, Kjaer SK. In situ and invasive squamous cell carcinoma of the vulva in Denmark 1978–2007—a nationwide population-based study. *Gynecol Oncol*. 2011;122(1):45–9. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.03.016.
- Чулкова О.В., Новикова Е.Г. Особенности клинического течения предрака и рака вульвы у молодых. Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. 2017;1:83–88. DOI: 10.24411/2303-9698-2017-00022. Чулкова ОВ, Новикова ЕГ. Features of a clinical progression of premalignant and vulvar cancer at young people. *Obstetrics and gynecology: news, opinions, training*. 2017;1:83–88 (In Russ.). DOI: 10.24411/2303-9698-2017-00022.
- Jimenez-Ayala M, Jimenez-Ayala B. Terminology for vulvar cytology based on the Bethesda System. *Acta Cytol*. 2002;46(4):645–50. DOI: 10.1159/000326969.
- Bae-Jump VL, Bauer M, Van Le L. Cytological evaluation correlates poorly with histological diagnosis of vulvar neoplasias. *J Low Genit Tract Dis*. 2007;11(1):8–11. DOI: 10.1097/01.lgt.0000229566.57482.f3.
- van den Einden LC, Grefte JM, van der Avoort IA, Vedder JE, van Kempen LC, Massuger LF et al. Cytology of the vulva: feasibility and preliminary results of a new brush. *Br J Cancer*. 2012;106(2):269–73. DOI:10.1038/bjc.2011.533.
- Trone JC, Guy JB, Mery B, Escure JL, Lahmar R, Monchamont C et al. Melanomas of the female genital tract: state of the art. *Bull Cancer*. 2014;101(1):102–6. DOI: 10.1684/bdc.2013.1881.
- Pang Y, Yuan H, Ren A, Zhang S, Liu P. Primary malignant melanoma of the female genital tract synchronously involving the vulva and uterine cervix: a case report. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(30):e16366. DOI: 10.1097/MD.00000000000016366.
- Pleunis N, Schuurman MS, van Rossum MM, Bulten J, Massuger LF, De Hullu JA et al. Rare vulvar malignancies; inci-

- dence, treatment and survival in the Netherlands. *Gynecol Oncol.* 2016;142(3):440–5. DOI: 10.1016/j.ygyno.2016.04.021.
22. *Wohlmuth C, Wohlmuth-Weiser I, May T, Vicus D, Gien LT, Laframboise S.* Malignant melanoma of the vulva and vagina: a US population-based study of 1863 patients. *Am J Clin Dermatol.* 2020;21(2):285–95. DOI: 10.1007/s40257-019-00487-x.
 23. *Saito T, Tabata T, Ikushima H, Yanai H, Tashiro H, Niikura H et al.* Japan Society of Gynecologic Oncology guidelines 2015 for the treatment of vulvar cancer and vaginal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2018;23(2):201–34. DOI: 10.1007/s10147-017-1193-z.
 24. *Castellano Megias VM, Ibarrolade Andrés C, Martínez Parra D, Lara Lara I, Pérez Palacios C, Conde Zurita JM.* Cytology of extramammary Paget's disease of the vulva. A case report. *Acta Cytol.* 2002;46(6):1153–7. DOI: 10.1159/000327124.
 25. *Tanaka Y, Kirihara T, Kitamura H, Kuriyama M, Hori H, Gorai I.* Cytologic detection of recurrence in extramammary Paget's disease of the vulva: a report of two cases. *Acta Cytol.* 2010;54(5 Suppl):1007–12. PMID: 21053588
 26. *Funamoto Y, Haba R, Kobayashi T, Kushida Y, Kouno K, Matsunaga T et al.* Cytologic diagnosis of vulvar Paget's disease by means of brushing smear: report of a case. *Diagn Cytopathol.* 2010;38(2):127–31. DOI: 10.1002/dc.21160.

Информация об авторах

Мария Игоревна Пахарукова – биолог лаборатории цитологии Клинико-диагностического центра.

Мария Александровна Котугина – врач лаборатории цитологии Клинико-диагностического центра.

Элла Иосифовна Вайнберг – заведующая лабораторией цитологии Клинико-диагностического центра.

Author information

Mariia I. Pakharukova – Biologist, Cytological Laboratory, Clinical Diagnostic Center.

<https://orcid.org/0000-0001-6019-3463>

Mariia A. Kotugina – Cytologist, Cytological Laboratory, Clinical Diagnostic Center.

<https://orcid.org/0000-0001-6728-4501>

Ella I. Vainberg – Head of the Cytological Laboratory, Clinical Diagnostic Center.

<https://orcid.org/0000-0002-8814-8346>

Изменения морфофункциональных параметров сердечно-сосудистой системы на фоне рациона питания с повышенной калорийностью у спонтанно гипертензивных крыс

А.Ю. Иванова^{1,2}, Е.Ю. Рысенкова², М.А. Афанасьев³, П.В. Чумаченко^{2,3},
В.С. Попов¹, А.Ю. Постнов^{2,3}, Н.А. Медведева¹, О.С. Медведев^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт экспериментальной кардиологии, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Введение. В настоящее время особое внимание уделяется рациону питания в профилактических целях и при патологиях сердечно-сосудистой системы. Сердечная мышца наиболее чувствительна к изменениям рациона, так как миокард содержит липиды не в виде жировых депо, а в основном в качестве структурных и функциональных единиц. Цель исследования – изучение изменений артериального давления и морфологии миокарда в эксперименте на фоне рациона питания с повышенным содержанием жиров различного жирнокислотного состава, быстроусвояемых углеводов у спонтанно гипертензивных и нормотензивных крыс.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 34 инбредных самцах крыс со спонтанной гипертонией линии SHR и 34 инбредных нормотензивных самцах крыс линии WKY. Животные каждой линии были разделены на пять групп по 6–7 особей в каждой. В течение 10 недель контрольная группа получала стандартный полнорационный корм (СПК), три группы получали СПК с добавлением жировых продуктов (11% от калорийности рациона), различающихся по составу жирных кислот (ЖК), четвертая группа получала СПК с добавлением сахарозы (11% от калорийности рациона). До начала и после 10 недель у бодрствующих животных проводили регистрацию систолического артериального давления (САД) на хвостовой артерии неинвазивным методом. По окончании эксперимента сердце фиксировали в растворе формалина, изготавливали гистологические срезы, окрашивали их гематоксилином и эозином. Далее морфометрическим методом определяли количество ядер кардиомиоцитов на стандартной единице площади.

Результаты. Статистически значимое повышение САД в конце эксперимента выявлено у животных линии SHR только в группах, получавших жировой продукт с повышенным содержанием трансизомерных ЖК и сахарозу, на 10,9 мм рт. ст. и 13,4 мм рт. ст., соответственно. В группе животных линии SHR, получавших сливочное масло, наблюдалось увеличение показателей гипертрофии миокарда, характеризующихся уменьшением количества ядер кардиомиоцитов на 39% на стандартную единицу площади относительно контрольной группы.

Заключение. Установлено, что повышенное содержание в рационе трансизомерных форм ЖК и быстроусвояемых углеводов (сахарозы) у спонтанно гипертензивных крыс приводит к повышению САД, насыщенных ЖК – к гипертрофии миокарда без нарастания САД. У нормотензивных животных негативное влияние повышенного содержания жировых продуктов и углеводов в рационе на сердечно-сосудистую систему отмечено не было.

Ключевые слова: гипертрофия миокарда, артериальная гипертония, высокожировые диеты, пальмовое масло, углеводы

Для корреспонденции: Анастасия Юрьевна Иванова. E-mail: glf-inasty@yandex.ru

Для цитирования: Иванова А.Ю., Рысенкова Е.Ю., Афанасьев М.А., Чумаченко П.В., Попов В.С., Постнов А.Ю., Медведева Н.А., Медведев О.С. Изменения морфофункциональных параметров сердечно-сосудистой системы на фоне рациона питания с повышенной калорийностью у спонтанно гипертензивных крыс. Клини. эксп. морфология. 2021;10(1):50–57. DOI:10.31088/CEM2021.10.1.50-57.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания НИИЭК, ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России (№ АААА-А19-119022690022-8).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 27.07.2020. Получена после рецензирования 14.09.2020. Принята в печать 26.10.2020.

High-calorie diet influence on morphological and functional parameters of the cardiovascular system in spontaneously hypertensive rats

A. Yu. Ivanova^{1,2}, E. Yu. Rysenkova², M. A. Afanasiev², P. V. Chumachenko^{2,3}, V. S. Popov¹, A. Yu. Postnov^{2,3}, N. A. Medvedeva¹, O. S. Medvedev^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

³ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. Hypertension with left ventricular hypertrophy (LVH) is a major independent risk factor for cardiovascular-related morbidity. Diet plays an essential role in the prevention and treatment of chronic cardiovascular disease. The aim of our study was to analyze the influence of 10-week diets consisting of different high fats and carbohydrates on the myocardium in spontaneously hypertensive rats (SHR).

Materials and methods. The SHR (n=34) and WKY (n=34) were randomly divided into five groups (n=6 or 7 per group). For 10 weeks, the control group was fed the standard diet; the experimental groups were fed the standard chow diet with the different fats and sucrose (11% of the calorie intake). Systolic blood pressure (SBP) was measured before the experiment and 10 weeks after by the non-invasive tail-cuff method. After the experiment, the animals were humanely sacrificed. The heart specimens after routine processing were stained with hematoxylin and eosin. We determined the thickness of the left ventricle and the number of cardiomyocyte nuclei per unit area using morphometry.

Results. An increase in SBP at the end of the experiment was found in SHR animals in groups receiving trans-fat and sucrose by 10.9 mm Hg and 13.4 mm Hg, respectively. Myocardial hypertrophy was observed in the SHR Butter group.

Conclusion. We found that the increased content of trans-fats and sucrose in the diet leads to an increase in SBP in spontaneously hypertensive rats; saturated fatty acids – to myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats without aggravation of systolic hypertension. In normotensive animals, no negative effect of the high-fat diet on the cardiovascular system was observed.

Keywords: myocardial hypertrophy, arterial hypertension, high fat diets, palm oil, carbohydrates

Corresponding author: Anastasiia Yu. Ivanova. E-mail: glf-inastya@yandex.ru

For citation: Ivanova A. Yu., Rysenkova E. Yu., Afanasiev M. A., Chumachenko P. V., Popov V. S., Postnov A. Yu., Medvedeva N. A., Medvedev O. S. High-calorie diet influence on morphological and functional parameters of the cardiovascular system in spontaneously hypertensive rats. *Clin. exp. morphology* 2021;10(1):50–57. DOI:10.31088/CEM2021.10.1.50-57 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of the state assignment of Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology (No. AAAA-A19-119022690022-8).

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

Received 27.07.2020. **Received in revised form** 14.09.2020. **Accepted** 26.10.2020.

Введение

Артериальная гипертензия (АГ) – широко распространенное заболевание как в России, так и во всем мире. В большом исследовании, опубликованное в *Lancet*, *Global Burden of Disease Study*, *GBD*, проведенном среди жителей 51 страны в период с 1990 до 2016 год с учетом оценки заболеваемости, продолжительности жизни, смертности и пола, было выявлено, что на протяжении многих лет высокое систолическое артериальное давление (САД) является наиболее важным фактором риска ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, сердечной и почечной недостаточности. Более 9,1 млн преждевременных смертей от сердечно-сосудистых заболеваний связано с особенностями питания. К диетологическим рискам, согласно исследованию [1], относят недостаточное потребление фруктов, овощей, пищевых волокон, низкое содержание полиненасыщенных омега-3 (эйкозопентаеновая и докозагексаеновая) и омега-6 (линолевая, арахидоновая) кислот и высокую долю в рационе питания обработанного

мяса, сахаросодержащих напитков, повышенную долю трансизомерных форм жирных кислот (ЖК).

Целью работы было изучение изменений уровня САД и морфологии миокарда на фоне рациона питания с повышенным содержанием насыщенных, ненасыщенных, трансизомерных форм ЖК, а также быстроусвояемых углеводов (сахарозы) у животных линий SHR и WKY.

Материалы и методы

Исследование проведено на 34 инбредных самцах крыс со спонтанной гипертензией линии SHR массой тела 325,8±3,6 грамма и 34 инбредных самцах крыс линии WKY массой тела 410,8±4,5 грамма. Все они получены из питомника лабораторных животных филиала Института биоорганической химии (Пушино Московской области). Животных перед началом эксперимента выдерживали на карантине на протяжении двух недель, содержали в виварии, в условиях 12-часового режима день/ночь при температуре окружающей

среды +22–23°C, влажности 55–65% в клетках типа T4 по две особи в каждой с неограниченным доступом к корму и воде. Все процедуры были выполнены в соответствии с Guide for Care and Use of Laboratory Animals [2].

Продолжительность эксперимента составила 10 недель. Крысы каждой из двух линий были рандомизированы на пять групп по 6–7 животных в группе в соответствии с добавкой к своему ежедневному пищевому рациону: группа 1: контрольная группа (к); крысы, получавшие только брикетированный полнорационный корм для лабораторных животных «Чара» (ЗАО «Ассортимент Агро») с энергетической ценностью 270 ккал/100 г; группа 2: крысы, получавшие в качестве добавки масло пальмовое рафинированное дезодорированное отбеленное; ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты» (п); группа 3: крысы, получавшие в качестве добавки традиционное сливочное масло «Вкуснотеево», ГОСТ 32261-2013 (с); группа 4: крысы, получавшие в качестве добавки специализированный жир с высоким содержанием трансизомерных форм ЖК; ООО «ЭФКО Пищевые Ингредиенты» (тж); группа 5: крысы, получавшие в качестве добавки сахар белый, ГОСТ 33222-2015 (у).

Жировые добавки в группах 2, 3, 4 и углеводная добавка в группе 5 были эквивалентны по калорийности и составляли 11% от общей калорийности корма. Жирнокислотный состав масел промышленного производства, используемых в качестве добавки к стандартному пищевому рациону лабораторных животных, отличался. В составе пальмового масла были пальмитиновая кислота (43,04%), олеиновая кислота (40,12%), линолевая кислота (9,89%), соотношение насыщенных/ненасыщенных кислот составляло приблизительно 1:1; в сливочном масле преобладали насыщенные ЖК (67,02%); в жировом продукте «специализированный жир» было повышено содержание трансизомерных форм ЖК (32,06%).

Животных взвешивали в начале и в конце эксперимента. Регистрацию АД проводили на ненаркотизированных иммобилизованных животных на хвостовой артерии плетизмографическим методом [3] с помощью прибора NIBPSystems (ADINSTRUMENTS, Австралия). Запись и обработку данных проводили с использованием программного обеспечения LabChart 7.3.7. Измерение САД выполняли до и после 10-недельного кормления. Перед измерением САД животных нагревали до температуры +28–30°C на платформе «Флогистон» («Нейроботикс», Россия) для улучшения циркуляции крови в хвосте и стабилизации кровотока.

Из эксперимента крыс выводили при помощи ингаляции двуокиси углерода. Жировую ткань придатков семенников иссекали и взвешивали. Накопление эпидидимального жира определяли по рассчитываемому параметру удельной массы жировой ткани придатков семенников на 100 г массы тела животного. Сердце извлекали, взвешивали и помещали в охлажденный кар-

диолегический раствор (0,9 г KCl + 81,8 мл 0,0667 М раствора гидрофосфата натрия, доведенного до 100 мл 0,0667 М раствором дигидрофосфата калия), имеющий рН 7,4. Сердце фиксировали в 10% нейтральном формалине, заключали в парафин, изготавливали срезы сердца толщиной 5 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином. Изображения миокарда были получены на гистосканере ScanScope CS2 (Leica Microsystems, Германия) при $\times 400$. Гистологические срезы сердца обрабатывали с помощью программы анализа изображений ImageScore с одновременным подсчетом ядер кардиомиоцитов у каждого животного в автоматическом режиме. Подсчет ядер кардиомиоцитов осуществляли на стандартной единице площади среза, то есть система анализа изображений регистрировала количество ядер кардиомиоцитов в 10 полях зрения общей площадью 4 500 000 мкм². Измерения данного показателя проводили на боковой (свободной) стенке левого желудочка. Таким образом, с уменьшением числа ядер на стандартной единице площади и, соответственно, количества кардиомиоцитов увеличивались их площадь и объем, то есть степень гипертрофии сократительного миокарда выражалась конкретной цифрой [4].

Сравнение значений исследуемых показателей между линиями животных проводили при помощи непараметрического рангового однофакторного критерия Краскела–Уоллиса, между группами одной линии – с использованием непараметрического критерия ранговых сумм Манна–Уитни, параметрического парного t-теста. Данные представлены в виде среднего арифметического плюс-минус стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США).

Результаты

Во всех экспериментальных группах крыс линий SHR и WKY в течение 10 недель эксперимента отмечалось увеличение массы тела (табл. 1). Исключение составляла группа крыс WKYтж, в которой наблюдалось уменьшение массы тела по сравнению с WKYк на 5,5% (9,2% против 14,7%, $p = 0,043$), связанное с выраженной диареей на фоне смены рациона питания в начале эксперимента. Наиболее интенсивное накопление жировой ткани у животных линии WKY происходило в группах WKYс (увеличение в 1,23 раза, $p = 0,0004$) и WKYп (увеличение в 1,15 раза, $p = 0,048$) относительно WKYк. У крыс линии SHR во всех группах, за исключением группы SHRс, динамика изменения массы тела была выражена в меньшей степени, чем у нормотензивных крыс. В группе SHRс увеличение массы тела составляло на 10,5% больше, чем в контрольной группе (20,6% против 10,1%, $p = 0,01$). Накопление эпидидимального жира у животных в группе SHRс было также максимальным – на 17% больше относительно контрольной группы ($p = 0,027$).

САД у животных линии SHR было статистически значимо повышено по отношению к величине САД нормотензивных животных линии WKY как в начале, так и в конце эксперимента. Показатели САД животных всех групп линии WKY не изменялись (табл. 2). В экспериментальных группах SHR_{тж} и SHR_у происходил рост

величин САД по сравнению с исходными значениями на 10,9 мм рт. ст. ($p=0,002$) и 13,4 мм рт. ст. ($p=0,03$), соответственно. В остальных группах линии SHR повышение САД в конце эксперимента не отмечалось.

Таким образом, использование рациона с жировым компонентом с преобладанием трансизомерных форм

Таблица 1 | Table 1

**Изменение массы тела и эпидидимальной жировой ткани у крыс линий SHR и WKY при разных рационах питания |
Body weight and epididymal fat mass in SHR and WKY rats with different diets**

Группы наблюдения Groups	Изменение массы тела (Δ, %) Body weight (Δ, %)	Масса эпидидимального жира (г) Epididymal fat (g)	Удельная масса эпидидимального жира (г/100 г массы тела) The ratio epididymal fat/100 g body weight
WKY			
Контроль Control	14,7±1,3	7,8±0,2	1,73±0,06
Сливочное масло Butter	14,9±2,4	10,2±0 (## p менее 0,0001)	2,13±0,04 (## p = 0,0004)
Пальмовое масло Palm oil	14,1±3,2	9,6±0,2 (# p = 0,02)	1,99±0,1 (# p = 0,048)
Трансжиры Trans fat	9,2±2,0 (# p = 0,006)	8,4±0,2	1,82±0,11
Углеводы Carbohydrates	18,7±1,3	8,6±0,7	1,8±0,11
SHR			
Контроль Control	10,1±0,3	4,3±0,1	1,2±0,06
Сливочное масло Butter	20,6±3,3 (** p = 0,01)	5,4±0,3 (** p = 0,004)	1,4±0,1 (** p = 0,027)
Пальмовое масло Palm oil	7,6±1,6	4,6±0,3	1,3±0,1
Трансжиры Trans fat	10,3±1,7	4,2±0,5	1,1±0,1
Углеводы Carbohydrates	10,9±3,5	5,1±0,2	1,4±0,1 (** p = 0,038)

** $p<0,01$ – статистически значимые отличия в экспериментальных группах линии SHR относительно контрольной группы; ## $p<0,01$, # $p<0,05$ статистически значимые отличия в экспериментальных группах линии WKY относительно контрольной группы

** $p<0,01$ – comparisons significant for SHR control group; ## $p<0,01$, # $p<0,05$ – comparisons significant for WKY control group

Таблица 2 | Table 2

**Значения уровня САД у крыс линий SHR и WKY при разных рационах питания |
The values of the level of systolic blood pressure in SHR and WKY rats with different diets**

Группы наблюдения Groups	Уровень САД (мм рт. ст.) SBP level (mm Hg)	
	начало эксперимента 0 week	после 10 недель эксперимента 11 week
WKY		
Контроль Control	122,2±0,6	123,1±0,6
Сливочное масло Butter	123,2±2,0	123,6±2,2
Пальмовое масло Palm oil	123,3±2,0	123,5±1,9
Трансжиры Trans fat	121,3±2,1	121,9±1,6
Углеводы Carbohydrates	122,1±0,9	125,6±1,3
SHR		
Контроль Control	200,1±1,8	199,9±0,8
Сливочное масло Butter	189,3±3,6	190,1±3,9
Пальмовое масло Palm oil	204,5± 2,1	204,6± 4,3
Трансжиры Trans fat	191,1±1,2	202±2,0**
Углеводы Carbohydrates	191,3±4,1	204,7±3,3*

* $p<0,05$; ** $p<0,01$ статистически значимые различия относительно исходного уровня САД в экспериментальной группе

* $p<0,05$; ** $p<0,01$ – comparisons significant for control group

ЖК и углеводами способствовало увеличению САД у спонтанно гипертензивных крыс после 10 недель эксперимента.

Параметр отношения массы сердца к общей массе тела, как дополнительный маркер гипертрофии миокарда, был статистически значимо выше у спонтанно гипертензивных крыс, чем у крыс линии WKY (рис. 1). Средние значения для линии SHR находились в диапазоне от $0,46 \pm 0,01$ до $0,54 \pm 0,03$, для линии WKY от $0,37 \pm 0,01$ до $0,41 \pm 0,03$, что соответствует данным литературы [5]. Это связано с адаптационными изменениями сердечной мышцы, обусловленными повышенной функциональной нагрузкой в условиях высокого артериального давления. Во всех экспериментальных группах линии SHR при увеличении калорийности рациона у животных происходил рост отношения массы сердца к массе тела. Статистически достоверными отличия были в группе SHRтж по отношению к группе SHRк ($p=0,019$). По-видимому, относительное увеличение массы сердца в группе SHRтж связано с увеличением САД, которое наблюдалось в ходе эксперимента (табл. 2). Для линии WKY не был характерен рост этого показателя. В группах WKYп и WKYтж происходило снижение значения соотношения массы сердца к массе тела, и оно было статистически значимым ($p=0,038$ и $p=0,012$, соответственно).

При гистологическом исследовании структура миокарда крыс линии WKY во всех группах имела нормальное строение. Кардиомиоциты были одинаковой величины, формировали одинаковые мышечные волокна. Строма образована соединительной тканью с рыхло расположенными коллагеновыми волокнами. Гистологическая картина миокарда крыс линии SHR во всех группах была сходной. На всех микропрепаратах отмечалась гипертрофия кардиомиоцитов, ядра кардиомиоцитов были увеличены в размерах, некото-

рые из них неправильной формы, вокруг отдельных ядер отмечалась вакуолизация саркоплазмы. Выражены периваскулярный склероз и небольшие единичные периваскулярные инфильтраты из гистиоцитов и лимфоцитов. Строма миокарда местами утолщена, склерозирована, встречались мелкие участки ее коллапса и склероза с незначительной лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрацией. Мелкие артерии были с утолщенными стенками. При морфометрическом исследовании гистологических срезов сердца у крыс в группе SHRс количество ядер на единицу площади ($450\ 000\ \mu\text{m}^2$) составляло $2,2 \pm 0,2$ и было статистически значимо ниже относительно группы SHRк ($p=0,026$) (рис. 2, 3).

Обсуждение

Наше исследование демонстрирует, что состав жирового компонента пищи, а также введение в рацион быстроусвояемых углеводов приводят к функциональным и морфологическим изменениям сердечно-сосудистой системы у гипертензивных животных. В ходе нашего исследования в каждой экспериментальной группе применяли жировые добавки в количестве, обеспечивающем 30% от общей получаемой энергии из пищи за счет жиров, что соотносится с границей допустимого уровня жиров в рационе человека [6]; углеводная добавка была эквивалентна жировой. На фоне приема пищи с повышенным содержанием сливочного масла у животных как линии SHR, так и WKY наблюдались признаки ожирения. Следует отметить, что животные обеих линий, получавшие пальмовое масло в рационе, имели разную реакцию на изменение массы тела и накопление эпидидимального жира. Масса тела у крыс линии WKY, которые получали пальмовое масло, не изменялась, но при этом значительно возрастала удельная масса эпидидимального жира. Масса тела у крыс линии SHR изменялась с тенденцией к ее умень-

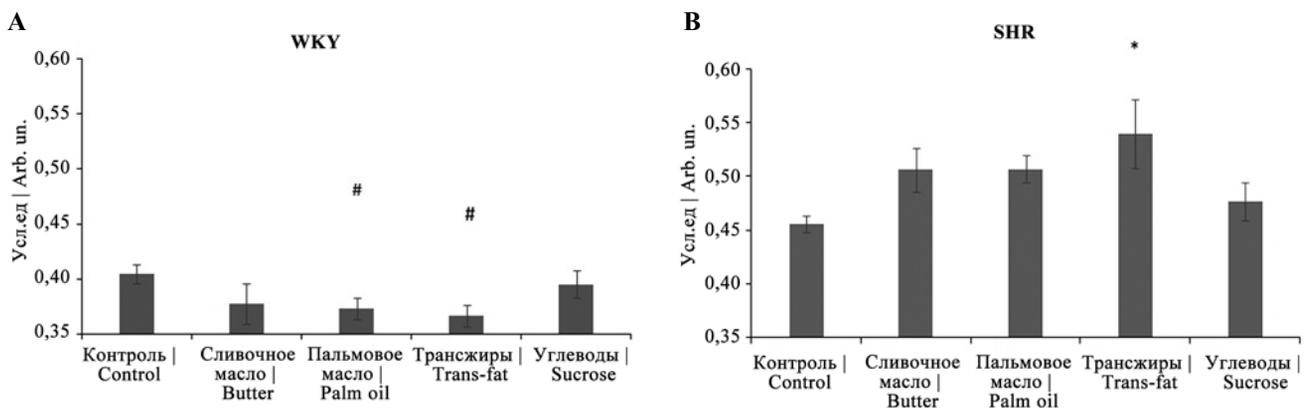


Рис. 1. Величина отношения массы сердца к массе тела у животных экспериментальных групп по окончании эксперимента.

А – животные линии WKY, В – животные линии SHR

$p < 0,05$ статистически значимые отличия в экспериментальных группах линии WKY относительно контрольной группы;

* $p < 0,05$ – статистически значимые отличия в экспериментальных группах линии SHR относительно контрольной группы

Fig. 1. Heart-body mass ratio in animals of the experimental groups at the end of the experiment.

А – WKY groups, В – SHR groups

$p < 0,05$ – comparisons significant for WKY control group; * $p < 0,05$ – comparisons significant for SHR control group

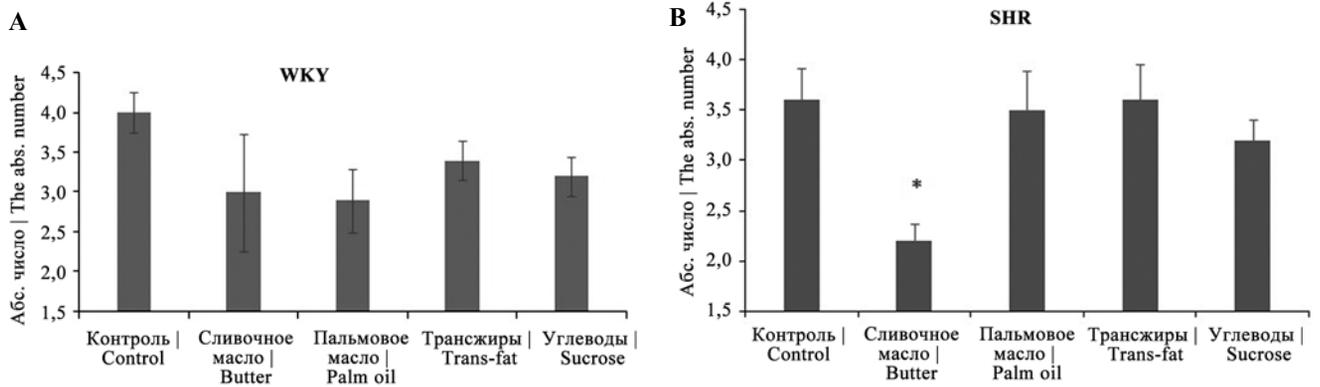


Рис. 2. Количество ядер кардиомиоцитов миокарда средней трети стенки левого желудочка сердца на единицу площади (450 000 мкм²) в экспериментальных группах.

А – животные линии WKY, В – животные линии SHR

* $p < 0,05$ – статистически значимые отличия в экспериментальных группах линии SHR относительно контрольной группы

Fig. 2. The number of cardiomyocytes' nuclei from the middle third of the left ventricle per unit area (450 000 μm^2) in the experimental groups.

А – WKY groups, В – SHR groups

* $p < 0,05$ – comparisons significant for SHR control group

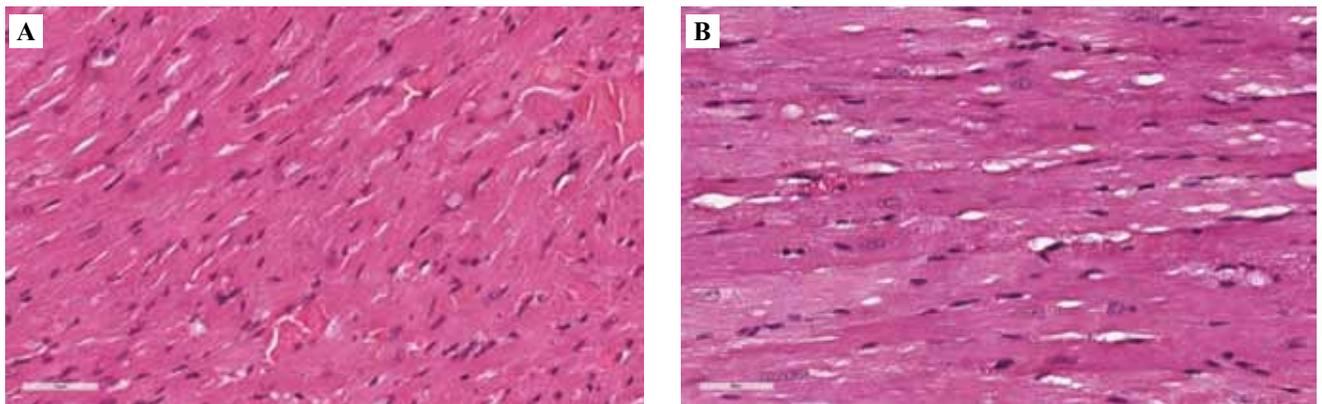


Рис. 3. Миокард после 10 недель эксперимента.

А – животные линии WKY из группы с (сливочное масло). Кардиомиоциты с эозинофильной цитоплазмой, ядра небольшого размера, строма миокарда без явлений отека. В – животные линии SHR из группы с (сливочное масло). Выраженная гипертрофия кардиомиоцитов, неравномерное эозинофильное окрашивание цитоплазмы, ядра клеток увеличены в размерах. Выраженный отек стромы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 3. Myocardium at 10th week of the experiment (A – WKY Butter group; B – SHR Butter group). Microscopic evaluation of the myocardium in WKY Butter group showed cardiomyocytes with eosinophilic cytoplasm, small nuclei, and myocardial stroma without edema. Severe cardiomyocyte hypertrophy, uneven eosinophilic cytoplasm staining, enlarged cell nuclei, pronounced stroma edema were observed in SHR Butter group. H&E stain, $\times 400$

шению, и прироста массы эпидидимального жира не было. Отличие в реакции у крыс линий SHR и WKY на введение в рацион жировых продуктов и углеводов связано с различиями в углеводном и липидном обмене. Так, у крыс линии SHR повышена активность белка, переносящего эфиры холестерина (СЕТР), который функционально блокирует рецепторное поглощение полиненасыщенных ЖК клетками, тем самым создавая дефицит этих ЖК в клетках [5]. Повышенная экспрессия этого белка может объяснять большую чувствительность к развитию метаболических нарушений у крыс линии SHR. Наше исследование показывает, что развившееся ожирение у гипертензивных крыс, получавших в рационе сливочное масло, способствовало

увеличению нагрузки на сердечно-сосудистую систему (в частности, на сердце), тем самым спровоцировав развитие гипертрофии миокарда.

Изменение рациона питания у нормотензивных крыс линии WKY не влияло на уровень артериального давления и не вызвало развитие гипертрофии кардиомиоцитов. Возможно, это связано с тем, что негативное действие какого-либо агента на организм может проявиться только при превышении защитных барьеров. Подобным защитным фактором для поддержания физиологических гомеостатических сил организма при экзогенных воздействиях (рацион питания, факторы окружающей среды) может служить микробиота кишечника. У крыс SHR в отличие от крыс WKY снижено

таксономическое разнообразие сообществ кишечных бактерий, что препятствует продукции широкого спектра метаболитов, необходимых для поддержания гомеостаза в организме; в 5 раз увеличено соотношение *Firmicutes/Bacteroidetes*, маркера дисбиоза кишечника, связанного с развитием сахарного диабета, ожирения и метаболических нарушений [7]. Особенности микробиоты крыс линии SHR на фоне введения в рацион насыщенных ЖК могли способствовать усугублению артериальной гипертензии, а также проявлению морфофункциональных изменений со стороны сердечно-сосудистой системы в быстрые сроки (в течение 10 недель). Из этого следует, что для проявления выраженных метаболических нарушений и в дальнейшем развития патологии со стороны сердечно-сосудистой системы у нормотензивных животных требуется более длительное воздействие негативного фактора.

Заключение

Полученные данные о негативном влиянии транс-изомерных форм жирных кислот, быстроусвояемых углеводов на состояние сердечно-сосудистой системы у гипертензивных крыс согласуются с современными требованиями ВОЗ по поддержанию здорового питания у человека. Тем не менее следует учитывать значительные отличия в метаболизме макроорганизмов с уже существующей эссенциальной гипертензией и имеющих нормальное давление. В связи с этим можно предположить, что здоровые люди, без патологий со стороны сердечно-сосудистой системы, должны придерживаться принципов здорового питания длительно для профилактики их развития, а у людей, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями, необходимы персонализированный подход при подборе диеты и тщательный контроль за употреблением жиров и углеводов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – О.С. Медведев, Н.А. Медведева, В.С. Попов, А.Ю. Иванова.
Сбор и обработка материала – А.Ю. Иванова, Е.Ю. Рысенкова, М.А. Афанасьев.

Информация об авторах

Анастасия Юрьевна Иванова – аспирант кафедры фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; лаборант-исследователь лаборатории экспериментальной фармакологии Института экспериментальной кардиологии НМИЦ кардиологии.

Елена Юрьевна Рысенкова – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии Института экспериментальной кардиологии НМИЦ кардиологии.

Максим Александрович Афанасьев – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии сердечно-сосудистых заболеваний Института экспериментальной кардиологии НМИЦ кардиологии.

Петр Валериевич Чумаченко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии сердечно-сосудистых заболеваний Института экспериментальной кардиологии НМИЦ кардиологии.

Владимир Сергеевич Попов – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией трансляционной медицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Написание текста – А.Ю. Иванова, П.В. Чумаченко, М.А. Афанасьев.

Редактирование – А.Ю. Постнов, Н.А. Медведева, О.С. Медведев.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – O.S. Medvedev, N.A. Medvedeva, V.S. Popov, A.Yu. Ivanova.

Collected the data and performed the analysis – A.Yu. Ivanova, E.Yu. Rysenkova, M.A. Afanasiev.

Wrote the paper – A.Yu. Ivanova, P.V. Chumachenko, M.A. Afanasiev.

Edited the manuscript – A.Yu. Postnov, N.A. Medvedeva, O.S. Medvedev.

Литература/References

1. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1659–724.
2. National Society for Medical Research. Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC: National Academic Press, 1996. 140 p.
3. Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension*. 2002;39(1):135–41. DOI: 10.1161/hy0102.100540.
4. Lukashovich M., Starovoitov V. An Approach to Cell Nuclei Counting in Histological Image Analysis. In: K. Saeed, W. Homenda (eds.). *Computer Information Systems and Industrial Management*. CISIM 2016. Lecture Notes in Computer Science. V. 9842. Springer, Cham. P. 139–147. DOI: 10.1007/978-3-319-45378-1_13
5. Boon CM, Ng MH, Choo YM, Mok SL. Super, red palm and palm oleins improve the blood pressure, heart size, aortic media thickness and lipid profile in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*. 2013;8(2):e55908. DOI: 10.1371/journal.pone.0055908.
6. Thijssen MA, Mensink RP. Fatty acids and atherosclerotic risk. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2005;170:165–94. DOI: 10.1007/3-540-27661-0_5.
7. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Jessica Marulanda Carvajal JM et al. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015;65(6):1331–40. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05315

Антон Ювенальевич Постнов – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и молекулярной патологии сердечно-сосудистой системы НИИ морфологии человека, заведующий лабораторией патоморфологии сердечно-сосудистых заболеваний Института экспериментальной кардиологии НМИЦ кардиологии.

Наталья Александровна Медведева – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Олег Стефанович Медведев – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова; руководитель лаборатории экспериментальной фармакологии Института экспериментальной кардиологии НМИЦ кардиологии.

Author information

Anastasiia Yu. Ivanova – Postgraduate Student, Department of Pharmacology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University; Research Assistant, Laboratory of Experimental Pharmacology, Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology.
<https://orcid.org/0000-0002-0497-7666>

Elena Yu. Rysenkova – Junior Researcher, Laboratory of Experimental Pharmacology, Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology.
<https://orcid.org/0000-0002-9504-7762>

Maxim A. Afanasiev – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Pathomorphology of Cardiovascular Diseases, Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology.
<http://orcid.org/0000-0002-4382-3176>

Peter V. Chumachenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Research Institute of Human Morphology; Senior Researcher, Laboratory of Pathomorphology of Cardiovascular Diseases, Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology.
<http://orcid.org/0000-0002-1162-6055>

Vladimir S. Popov – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Translational Medicine Laboratory, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University.
<http://orcid.org/0000-0002-5039-7152>

Anton Yu. Postnov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Cellular and Molecular Pathology of the Cardiovascular System, Research Institute of Human Morphology; Head of the Laboratory of Pathomorphology of Cardiovascular Diseases, Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology.
<http://orcid.org/0000-0002-2501-7269>

Natalia A. Medvedeva – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher, Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University.
<http://orcid.org/0000-0001-5998-6781>

Oleg S. Medvedev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pharmacology, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University; Head of the Laboratory of Experimental Pharmacology, Institute of Experimental Cardiology, National Medical Research Center of Cardiology.
<http://orcid.org/0000-0001-8942-4851>

Сравнительная морфологическая и биохимическая характеристика токсического действия доксорубицина и наносомальной формы PLGA-доксорубицина при лечении экспериментальной глиобластомы

В.В. Куделькина¹, А.С. Халанский¹, О.В. Макарова¹, И.С. Цветков¹,
А.М. Косырева¹, А.И. Алексеева¹, А.Ю. Шелков¹, О.О. Максименко²,
В.А. Разживина², С.Э. Гельперина^{2,3}

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

² ООО «Технология лекарств», Химки, Россия

³ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Доксорубин (Докс) в составе полилактидгликолидных (Poly(Lactic-co-Glycolic Acid, 50:50, PLGA) наноразмерных частиц имеет высокую противоопухолевую эффективность у крыс с глиобластомой 101.8. Однако токсическое действие Докс-PLGA недостаточно изучено. Цель исследования – морфологическая и биохимическая оценка гепатотоксического и кардиотоксического действия доксорубицина и Докс-PLGA при лечении глиобластомы 101.8 у крыс Вистар.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 24 самцах крыс Вистар с глиобластомой: без лечения (n=7), получавших доксорубин (n=9) или Докс-PLGA (n=8) внутривенно в дозе 1,5 мг/кг на 2-е, 5-е и 8-е сутки после перевивания опухоли. На 14-е сутки эксперимента исследовали морфологические изменения в миокарде и печени. Проводили гематологическое и биохимическое исследование крови.

Результаты. При лечении крыс с экспериментальной глиобластомой 101.8 Докс-PLGA по сравнению с доксорубицином по данным морфологического, гематологического и биохимического исследования оказывает менее выраженное кардиотоксическое и гепатотоксическое действие.

Воспалительные изменения в миокарде у животных, получавших Докс-PLGA, были менее выраженными и распространенными, чем при лечении доксорубицином. При лечении глиобластомы крыс Докс-PLGA активность аспаратаминотрансферазы, общей и сердечной изоформ креатинфосфокиназы была статистически значимо ниже, чем у животных с глиобластомой без лечения и получавших доксорубин. Гепатотоксические эффекты Докс-PLGA оказались минимальными. В отличие от животных, леченных доксорубицином, при введении Докс-PLGA дистрофия гепатоцитов была слабо выраженной. Активность АЛТ во всех группах не отличалась от референсных значений.

Заключение. По сравнению с доксорубицином наносомальная форма Докс-PLGA при лечении экспериментальной глиобластомы 101.8 оказывает менее выраженное кардио- и гепатотоксическое действие.

Ключевые слова: глиобластома 101.8 крыс, доксорубин, PLGA-наночастицы, токсическое действие, печень, миокард, морфология, биохимия

Для корреспонденции: Вера Владимировна Куделькина. E-mail: verakudelkina8047@gmail.com

Для цитирования: Куделькина В.В., Халанский А.С., Макарова О.В., Цветков И.С., Косырева А.М., Алексеева А.И., Шелков А.Ю., Максименко О.О., Разживина В.А., Гельперина С.Э. Сравнительная морфологическая и биохимическая характеристика токсического действия доксорубицина и наносомальной формы PLGA-доксорубицина при лечении экспериментальной глиобластомы. Клини. эксп. морфология. 2021;10(1):58–65. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.58-65.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Развитие фармакологической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (государственный контракт № 13411.1008799.13.144).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 10.12.2020. Получена после рецензирования 14.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Comparative morphological and biochemical characteristics of the toxic effects of doxorubicin and nanosomal PLGA-doxorubicin form in the experimental glioblastoma treatment

V.V. Kudelkina¹, A.S. Khalanskiy¹, O.V. Makarova¹, I.S. Tsvetkov¹, A.M. Kosyreva¹,
A.I. Alekseeva¹, A.Y. Shelkov¹, O.O. Maksimenko², V.A. Razzhivina², S.E. Gelperina^{2,3}

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² LLC Drugs Technology, Khimki, Russia

³ D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

Introduction. Doxorubicin (Dox) in the composition of poly(lactic-co-glycolic acid, 50:50) (PLGA) – nanoparticles has high antitumor efficacy in rats with glioblastoma 101.8. However, the toxic effect of Dox-PLGA is not well understood. The aim of the study was morphological and biochemical evaluation of the hepatotoxic and cardiotoxic effects of doxorubicin and Dox-PLGA in the glioblastoma 101.8 treatment in Wistar rats.

Materials and methods. The study was performed on 24 male Wistar rats with glioblastoma: no treatment (n=7), treated with doxorubicin (n=9) or Dox-PLGA (n=8) intravenously at a dose of 1.5 mg/kg on days 2, 5 and 8 after tumor implantation. On the 14th day of the experiment, morphological changes in the myocardium and liver were examined. Hematological and biochemical blood tests were performed.

Results. When treating rats with experimental glioblastoma 101.8, Dox-PLGA in comparison with doxorubicin has less pronounced cardiotoxic and hepatotoxic effects according to the morphological, hematological and biochemical tests. Inflammatory changes in the myocardium of the animals treated with Dox-PLGA were less pronounced and widespread than the ones treated with doxorubicin. The activities of total and cardiac creatine phosphokinase (CPK) isoforms and AST were statistically significantly lower in Dox-PLGA group than in animals with glioblastoma without treatment and receiving doxorubicin. The hepatotoxic effects of Dox-PLGA were minimal. Unlike animals treated with doxorubicin, they had mild hepatocyte dystrophy. ALT activity in all groups did not differ from the reference values.

Conclusion. Compared with doxorubicin, the nanosomal form of Dox-PLGA in the experimental glioblastoma 101.8 treatment has less pronounced cardio- and hepatotoxic effects.

Keywords: rat glioblastoma 101.8, doxorubicin, PLGA-nanoparticles, toxic effect, liver, myocardium, morphology, biochemistry

Corresponding author: Vera V. Kudelkina. E-mail: verakudelkina8047@gmail.com

For citation: Kudelkina V.V., Khalanskiy A.S., Makarova O.V., Tsvetkov I.S., Kosyreva A.M., Alekseeva A.I., Shelkov A.Y., Maksimenko O.O., Razzhivina V.A., Gelperina S.E. Comparative morphological and biochemical characteristics of the toxic effects of doxorubicin and nanosomal PLGA-doxorubicin form in the experimental glioblastoma treatment. Clin. exp. morphology. 2021;10(1):58–65. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.58-65 (In Russ.).

Funding. The study was carried out with the financial support of the federal target program “Development of the pharmacological and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond” (state contract No. 13411.1008799.13.144).

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

Received 10.12.2020. **Received in revised form** 14.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Глиобластома – наиболее часто встречающаяся злокачественная опухоль головного мозга, среди всех новообразований центральной нервной системы она составляет 14,6% и среди злокачественных – 48,3% [1]. Относительная выживаемость пациентов после постановки диагноза варьирует от 1 года до 2 лет, лишь у 6–22% пациентов она достигает 5 лет. Стандартными методами лечения глиобластомы являются хирургический, лучевой и химиотерапевтический [2, 3].

Противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, выделенный из культуры *Streptomyces peuceletius* var. *caesioides*, – доксорубин, а также его липосомальная и пегилированная (PEG, полиэтиленгликоль) формы применяются при лечении целого ряда онкологических заболеваний – лейкозов, лимфом, карцином яичников,

опухолей молочной железы, легких, щитовидной железы и т.д. [4]. Противоопухолевая эффективность доксорубина в отношении глиобластомы выявлена в экспериментах *in vitro* [5] и *in vivo* [6, 7], а также при его внутриопухолевом введении у человека [8]. Тем не менее применение доксорубина в терапии глиом ограничено, так как он не проникает через гематоэнцефалический барьер, а также имеет выраженную кардио- и гепатотоксичность [9].

Доксорубин эффективно снижает экспрессию генов, ответственных за пролиферацию и регуляцию клеточного цикла опухолевых клеток, чувствительных к нему в S- и G₂-фазах. Механизм действия доксорубина заключается в изменении структуры ДНК, ингибировании топоизомеразы II-β, подавлении синтеза нуклеиновых кислот, повреждении митохондриальной

ДНК, образовании свободных радикалов, разрушении мембран, что приводит к некрозу и апоптозу опухолевых клеток. Доксорубин в комбинации с ингибитором гистоновых деацетилаз – энтиностатом в опухолевых клетках снижает экспрессию *tgf-β* (transforming growth factor beta), повышает экспрессию *tp53* (tumorprotein 53), что приводит к замедлению темпов пролиферации клеток опухоли [10, 11]. Указанные механизмы обуславливают также развитие побочных токсических эффектов доксорубина. Поскольку доксорубин метаболизируется преимущественно в печени, накапливается в основном в почках, а также в сердце и тонкой кишке, он оказывает дозозависимое цитотоксическое действие преимущественно на эти органы [12]. По мнению ряда авторов, кардиотоксичность доксорубина обусловлена активацией перекисного окисления липидов в кардиомиоцитах с последующим разрушением миофибрилл [13].

Для снижения общей токсичности и обеспечения доставки доксорубина используют различные носители, в том числе липосомы [14, 15] и наночастицы [16–18]. Показано, что наносомальная форма доксорубина на основе полибутилцианакрилатных наночастиц ((Poly(n-ButylCyanoAcrylate), ПБСА) помимо высокой противоопухолевой активности в отношении глиобластомы крыс 101.8 оказывает меньшее токсическое действие на миокард, печень, семенники и красный костный мозг [19, 20]. По данным обзора A. Shafei et al. [21] по сравнению с доксорубином его липосомальная и наносомальная формы обладают меньшей кардиотоксичностью.

В отличие от ПБСА (Ø 250 нм) наночастицы PLGA (Ø 100–120 нм), используемые для доставки доксорубина, имеют преимущество: они дольше циркулируют в кровотоке и медленнее биodeградируют: 2–3 часа против 24–48 часов, соответственно. Кроме того, выявлена более высокая противоопухолевая эффективность доксорубина, связанного с PLGA- наночастицами, по сравнению с его стандартной формой [16]. Несмотря на высокую противоопухолевую эффективность, побочное действие Докс-PLGA недостаточно изучено.

Цель исследования – сравнительная морфологическая и биохимическая оценка гепатотоксического и кардиотоксического действия доксорубина и Докс-PLGA при лечении глиобластомы 101.8 у крыс Вистар.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 24 самцах крыс Вистар массой тела 200–220 граммов (филиал «Столбовая» НЦБТ ФМБА России). Животных содержали в условиях вивария при температуре +21±3°C и относительной влажности 35–65%. Доступ к воде и корму был свободным. При работе с животными руководствовались Национальным стандартом Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» (приказ Ростехрегулирования от 02.12.2009 № 544-ст «Об утверждении национального стандарта», ГОСТ Р 53434-2009), ГОСТ 33216-2014 «Правила рабо-

ты с грызунами и кроликами». Соблюдали принципы гуманного обращения в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. В работе применяли тканевую модель глиобластомы 101.8 крыс Вистар из коллекции штаммов опухолей нервной системы НИИ морфологии человека.

Моделирование глиобластомы

Трансплантацию глиобластомы 101.8 в головной мозг крыс проводили под зоветиловым наркозом (5 мг/100 г) – зоветил (Virbac Sante Animale, Франция) – с соблюдением правил асептики и антисептики. Гомогенизованную ткань глиобластомы 101.8 (~10⁶ опухолевых клеток) трансплантировали следующим образом: кожу теменной области головы крыс обрабатывали 70% этанолом и 5% спиртовым раствором йода и делали продольный разрез длиной 10 мм справа от срединной линии. Стоматологическим бором диаметром 2 мм в правой теменной кости черепа на расстоянии 2 мм от сагиттального шва и 2 мм каудально от венечного шва делали отверстие. С помощью троакара диаметром 1,8 мм ткань опухоли вводили на глубину 4 мм от поверхности кости в область полосатого тела.

После операции животные были разделены на три группы: группа 1 – без лечения (n=7); группа 2 – с лечением доксорубином (Teva, Израиль), (n=9); группа 3 – с лечением Докс-PLGA (доксорубин в составе полилактидгликолидных (Poly(Lactic-co-GlycolicAcid), PLGA), ООО «Технология лекарств», Россия) (n=8). Раствор доксорубина вводили животным в хвостовую вену в терапевтической дозе (1,5 мг/кг) трехкратно, на 2-е, 5-е и 8-е сутки после трансплантации опухоли.

На 14-е сутки после трансплантации опухоли животных выводили из эксперимента передозировкой зоветила (100 мг/кг). Печень и сердце фиксировали в жидкости Буэна.

Обезвоживание, проводку в спиртах возрастающей концентрации, ксилоле и парафине осуществляли в автоматизированной системе Tissue-Tek VIP 5 Jr (Sakura, Япония), заливку блоков проводили в системе Tissue-Tek TEC-5 (Sakura, Япония). Ступенчатые срезы изготавливали на ротационном микротоме Microm GmbH HM-340 (Thermo Scientific, Германия). Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Для заключения гистологических препаратов использовали синтетическую монтирующую среду (Biovitrum, Россия).

Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Nihon Kohden MEK-7222 (Япония). Мазки крови окрашивали по Романовскому–Гимзе и проводили оценку патологических форм эритроцитов.

Определение активности ферментов: аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинфосфокиназы (КФК) и ее сердечной изоформы (КФК-МВ) проводили кинетическим методом на автоматическом биохимическом анализаторе

Mindray Bs-120 (Китай) с использованием наборов Human GmbH (Германия). Полученные данные соотносились с референсными значениями.

Данные анализировали в программе Statistica 8.1 (Statsoft). Характер распределения анализируемых цифровых данных оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова, который показал необходимость применения непараметрической статистики. Показатели центральных тенденций выражали в виде медианы и квартилей. Сравнение цифровых данных между экспериментальными группами проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса (ANOVA, comparing multiple independent samples). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

По сравнению с физиологическими значениями в контрольной группе у животных с глиобластомой без лечения и леченных доxorубицином и Докс-PLGA различия по показателям содержания тромбоцитов, эритроцитов и гемоглобина не выявлены (табл. 1). В мазках периферической крови у животных, получавших доxorубицин, обнаружены патологические формы эритроцитов: с тельцами Жолли, эритробласты, акантоциты, макроциты, гипо- и полихромия эритроцитов, что косвенно свидетельствует о токсичности доxorубицина, в то время как в мазках крови крыс, леченных Докс-PLGA, обнаружены только полихроматофильные эритроциты, что отражает его меньшую токсичность по сравнению с доxorубицином.

При морфологическом исследовании сердца у крыс с глиобластомой 101.8 патологические изменения не обнаружены. Кардиомиоциты были с четко выраженной поперечной исчерченностью, ядра нормохромные, овальной формы. В межмышечной рыхлой соединительной ткани определялись единичные гистиоциты и лимфоциты. Сосуды микроциркуляторного русла

были неравномерно полнокровны (рис. 1 А). При лечении животных доxorубицином в миокарде выявлялись зоны с волнообразной деформацией и контрактурными повреждениями кардиомиоцитов, очаги некроза (единичные в поле зрения при $\times 400$) с выраженной инфильтрацией гистиоцитами и лимфоцитами (рис. 1 В). Определялись обширные зоны межочечного отека со слабо выраженной диффузной инфильтрацией лимфоцитами и гистиоцитами. При лечении Докс-PLGA патологические изменения в миокарде были менее выражены, чем в группе крыс, леченных доxorубицином. Очаги некроза определялись в 1–2 из 20 полей зрения при $\times 400$, отмечались волнообразная деформация и контрактурные изменения кардиомиоцитов (рис. 1 С). Межочечный отек и диффузная инфильтрация гистиоцитами и лимфоцитами оказались менее выраженными.

Во всех исследованных группах животных активность КФК была выше по сравнению с референсными значениями (табл. 2). Показано, что активность КФК коррелирует с тяжестью повреждения ткани и может служить маркером распространенности опухолевого процесса и ответа на терапию [22, 23].

При лечении животных Докс-PLGA активность КФК как общей, так и сердечной изоформы была статистически значимо ниже, чем в группе крыс, получавших доxorубицин, и у животных с глиобластомой без лечения (табл. 2). Таким образом, у животных, леченных Докс-PLGA, низкие показатели активности КФК связаны с замедлением опухолевого роста и меньшими повреждениями сердца, что согласуется с результатами морфологического исследования.

Показатели активности АСТ у животных, леченных Докс-PLGA, были ниже по сравнению с другими группами, что также свидетельствует о менее выраженном кардиотоксическом эффекте.

При морфологическом исследовании у крыс с глиобластомой 101.8 патологические изменения в печени

Таблица 1 | Table 1

Гематологические показатели крови у крыс Вистар с глиобластомой 101.8 при лечении доxorубицином и Докс-PLGA. Me (LQ-UQ) |

Hematological parameters of Wistar rats with glioblastoma 101.8 treated with doxorubicin and Dox-PLGA. Me (LQ-UQ)

Показатель Parameter	Группы наблюдения Observation groups		
	глиобластома без лечения glioblastoma untreated (1)	Докс Dox (2)	Докс-PLGA Dox-PLGA (3)
RBC $10^6/\text{мм}^3$ Эритроциты Red blood cell (6,65–7,62)*	6,50 (5,09; 7,56)	6,59 (4,37; 7,33) $P_{2-3} = 0,004$	7,61 (6,63; 8,46)
HGB г/л Гемоглобин Hemoglobin (149–173)*	121 (105; 149)	125 (103; 136) $P_{2-3} = 0,01$	143 (125; 155)
Plt $10^3/\text{мм}^3$ Тромбоциты Platelets (700–1429)*	600 (512; 651)	601 (520; 720) $P_{2-3} = 0,004$	808 (710; 1008) $P_{1-3} = 0,004$

* референсные значения | * reference values

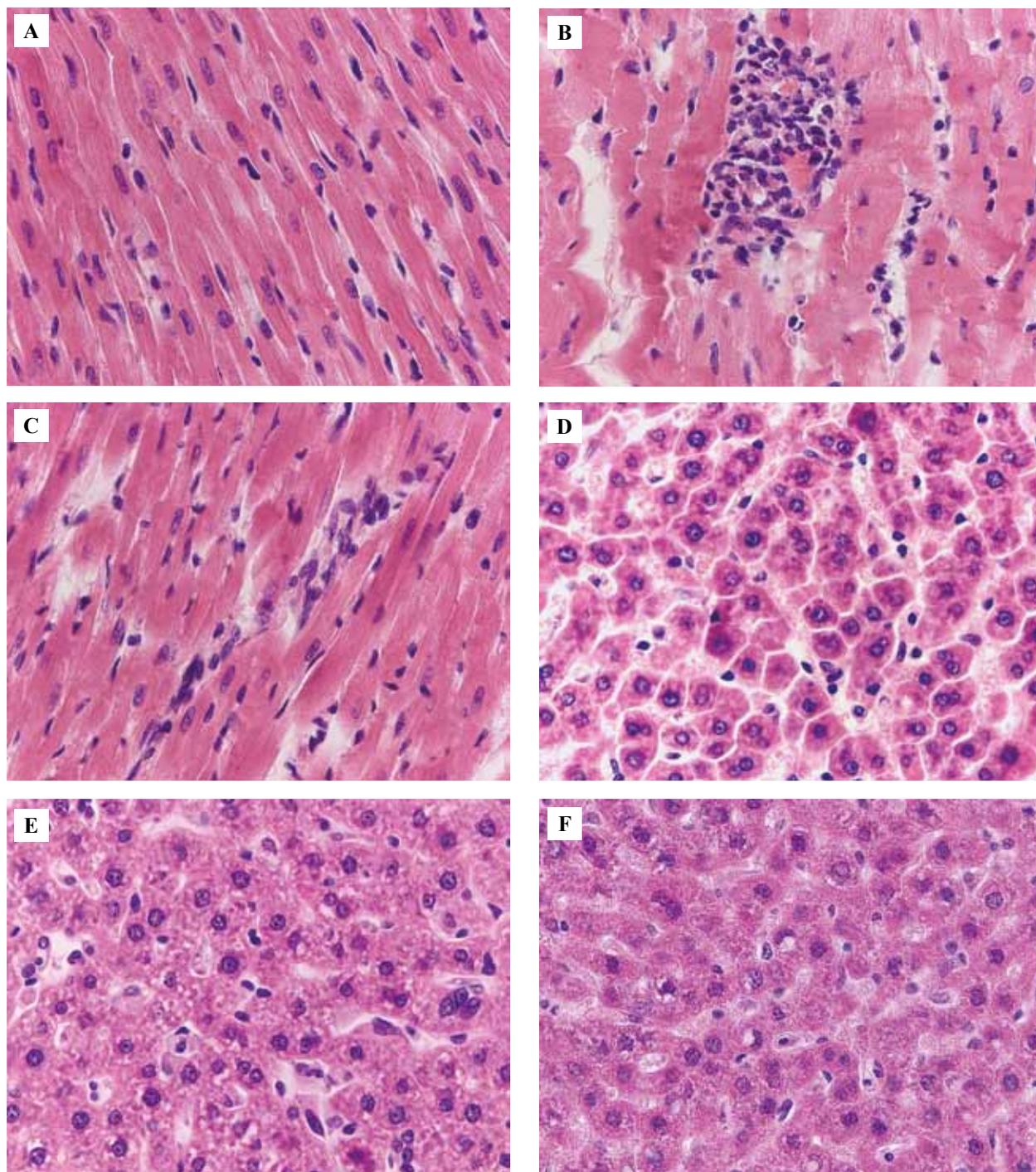


Рис. 1. Морфологическая характеристика миокарда (А–С) и печени (D–F) крыс с глиобластомой 101.8 (А), леченных доксорубицином (В, Е) и Докс-PLGA (С, F). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

А – нелеченные животные: кардиомиоциты с четко выраженной поперечной исчерченностью, ядра овальной формы волокна межмышечной соединительной ткани тонкие; В – очаг некроза кардиомиоцитов с воспалительной инфильтрацией, межлунный отек; С – очаговая лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация; D – нелеченные животные: гепатоциты с базофильной зернистостью цитоплазмы; Е – слабо выраженная вакуольная дистрофия гепатоцитов; F – единичные гепатоциты с вакуолями

Fig. 1. Morphological characteristics of the myocardium (A–C) and liver (D–F) of rats with glioblastoma 101.8, treated with doxorubicin (B, E) and Dox-PLGA (C, F). H&E stain, $\times 400$.

A – untreated animals: cardiomyocytes with clearly expressed cross striation, oval-shaped nuclei; intermuscular connective tissue fibers are thin; B – the cardiomyocyte necrosis focus with inflammatory infiltration; interstitial edema; C – focal lymphoid-histiocytic infiltration; D – untreated rats: hepatocytes with basophilic granularity of cytoplasm; E – weakly expressed hydropic degeneration of hepatocytes; F – single hepatocytes with vacuoles

Таблица 2 | Table 2

Показатели активности ферментов в сыворотке крови у крыс Вистар с глиобластомой 101.8 при лечении доксорубицином и Докс-PLGA. Me (LQ-UQ) | Enzyme activity indicators in the blood serum samples from Wistar rats with glioblastoma 101.8 treated with doxorubicin and Dox-PLGA. Me (LQ-UQ)

Показатель Indicator	Группы наблюдения Observation groups		
	глиобластома без лечения glioblastoma untreated (1)	Докс Dox (2)	Докс-PLGA Dox-PLGA (3)
КФК , Ед/л CPK , U/L (431–686)*	5200 (4096; 6179)	4811 (4286; 5682) $p_{2-3} = 0,0001$	2115 (1920; 2444) $p_{1-3} = 0,00003$
КФК-МВ , Ед/л CPK-МВ , U/L (0–120)*	2743 (1667; 2870) $p_{1-2} = 0,01$	1620 (1423; 1816) $p_{2-3} = 0,0004$	858 (719; 1169) $p_{1-3} = 0,0009$
АЛТ , Ед/л ALT , U/L (63–95)*	57 (46; 71) $p_{1-2} = 0,041$	70 (65; 71)	62 (57; 71)
АСТ , Ед/л AST , U/L (132–161)*	247 (196; 273)	225 (219; 231) $p_{2-3} = 0,002$	182,5 (166; 198) $p_{1-3} = 0,004$

* референсные значения (Ананич И.В. Биохимические характеристики крови крыс. Ветеринарная клиника. 2008;10:18–19)

* reference values (Ananich I.V. Biochemical characteristics of rat blood. Veterinarnaya klinika (Vet clinic). 2008;10:18–19)

не обнаружены. Дольковое и балочное строение было сохранено, гепатоциты – с мелкой базофильной зернистостью цитоплазмы (рис. 1 D). Внутри долек небольшое количество неэпителиальных клеточных элементов – клеток Купфера и лимфоцитов. При лечении крыс доксорубицином гепатоциты периферических отделов долек были с умеренной мелко- и средневакуольной дистрофией, более распространенной в периферических отделах долек (рис. 1 E). При лечении крыс Докс-PLGA дистрофические изменения гепатоцитов были менее выражены, чем при лечении доксорубицином. В периферических отделах долек выявлялось небольшое количество гепатоцитов со слабо выраженной мелковакуольной дистрофией (рис. 1 F). Активность АЛТ в сыворотке крови во всех исследованных группах не изменилась (табл. 2).

Полученные в эксперименте результаты по токсическому действию доксорубицина соотносятся с данными, в том числе, Р. Shivakumar et al. [24], которые показали, что доксорубин при его четырехкратном введении интактным крысам Вистар с интервалом в 7 дней вызывал морфологические изменения в сердце, почках и печени, сходные с выявленными нами [25, 26]. Результаты сравнительного анализа действия Докс-PLGA и доксорубицина в целом соотносятся с данными токсикологических исследований, которые проводились как на здоровых животных [27], так и на крысах с интракраниально имплантированной глиобластомой [20].

Выявленные нами патологические формы эритроцитов и повреждения миокарда при введении доксорубицина и Докс-PLGA сопоставимы с результатами оценки гемато- и кардиотоксичности, обнаруженными другими авторами [28]. Подобные изменения описаны при введении липосомальных форм доксорубицина [29]. Биоразлагаемый полимер PLGA одобрен FDA (Food and Drug Administration, Управление по санитарному над-

зору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) и ЕМА (European Medicines Agency, Европейское медицинское агентство) для использования в системах доставки лекарств и вакцин у человека как один из наиболее эффективных благодаря контролируемому и длительному высвобождению связанного с ним лекарства, а также низкой токсичности и высокой биосовместимости с тканями и клетками [30]. Несмотря на то, что включение доксорубицина в PLGA-наночастицы не изменило качественные патоморфологические характеристики кардиотоксичности, оно привело к снижению распространенности и выраженности гепатотоксического и кардиотоксического эффекта.

Выводы

При лечении крыс с экспериментальной глиобластомой 101.8 Докс-PLGA по сравнению с доксорубицином по данным морфологического, гематологического и биохимического исследования оказывает менее выраженное токсическое действие.

В миокарде у животных, получавших Докс-PLGA, воспалительные изменения – очаговые некрозы, воспалительная инфильтрация и отек – были менее выраженными и распространенными, чем при лечении доксорубицином. При лечении глиобластомы 101.8 Докс-PLGA активность аспаратаминотрансферазы, общей и сердечной изоформ креатинфосфокиназы в сыворотке крови оказались статистически значимо ниже, чем у животных с глиобластомой без лечения и получавших доксорубицин.

В отличие от животных, леченных доксорубицином, при лечении крыс Докс-PLGA гепатотоксический эффект был минимальным и дистрофические изменения гепатоцитов оказались слабо выраженными. Активность АЛТ во всех группах не отличалась от референсных значений.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.В. Куделькина, О.В. Макарова, С.Э. Гельперина, О.О. Максименко, В.А. Разживина.
Сбор и обработка материала – В.В. Куделькина, И.С. Цветков, А.С. Халанский.
Статистическая обработка данных – В.В. Куделькина.
Написание текста – В.В. Куделькина, О.В. Макарова, А.И. Алексеева, А.Ю. Шелков.
Редактирование – О.В. Макарова, А.М. Косырева, И.С. Цветков, С.Э. Гельперина.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.V. Kudelkina, O.V. Makarova, S.E. Gelperina, O.O. Maksimenko, V.A. Razzhivina.
Collected and processed the data – V.V. Kudelkina, I.S. Tsvetkov, A.S. Khalanskiy.
Statistical analysis – V.V. Kudelkina.
Wrote the paper – V.V. Kudelkina, O.V. Makarova, A.I. Alekseeva, A.Y. Shelkov.
Edited the manuscript – O.V. Makarova, A.M. Kosyreva, I.S. Tsvetkov, S.E. Gelperina.

Литература/References

1. *Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro Oncol.* 2019;21(Suppl. 5):v1–v100. DOI: 10.1093/neuonc/noz150.
2. *Gallego O.* Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Curr Oncol.* 2015;22(4):e273–81. DOI: 10.3747/co.22.2436.
3. *Siegel RL, Miller KD, Jemal A.* Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21590.
4. *Rivankar S.* An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther.* 2014;10(4):853–8. DOI: 10.4103/0973-1482.139267.
5. *Stan AC, Casares S, Radu D, Walter GF, Brumeanu TD.* Doxorubicin-induced cell death in highly invasive human gliomas. *Anticancer Res.* 1999;19(2A):941–50. PMID: 10368637.
6. *Gulyaev AE, Gelperina SE, Skidan IN, Antropov AS, Kivman GY, Kreuter J.* Significant transport of doxorubicin into the brain with Ps 80-coated nanoparticles. *Pharm Res.* 1999;16(10):1564–9. DOI: 10.1023/a:1018983904537.
7. *Steiniger SC, Kreuter J, Khalanski AS, Skidan IN, Bobruskin AI, Smirnova ZS et al.* Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int J Cancer.* 2004;109(5):757–67. DOI: 10.1002/ijc.20048.
8. *Shimura T, Nakazawa S, Ikeda Y, Node Y, Kitamura T, Akutsu Y.* Histopathological study of a recurrent malignant glioma after an intratumor local injection of adriamycin. *Gan No Rinsho.* 1988;34(11):1537–43. PMID: 3184457.
9. *Henninger C, Huelsenbeck S, Wenzel P, Brand M, Huelsenbeck J, Schad A et al.* Chronic heart damage following doxorubicin treatment is alleviated by lovastatin. *Pharmacol Res.* 2015;91:47–56. DOI: 10.1016/j.phrs.2014.11.003.
10. *Merino VF, Cho S, Nguyen N, Sadik H, Narayan A, Talbot C Jr et al.* Induction of cell cycle arrest and inflammatory genes by combined treatment with epigenetic, differentiating, and chemotherapeutic agents in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2018;20(1):145. DOI: 10.1186/s13058-018-1068-x.
11. *Carryn S, Chanteux H, Serai C, Mingeot-Leclercq MP, van Bambeke F, Tulkens PM.* Intracellular pharmacodynamics of antibiotics. *Infect Dis Clin North Am.* 2003;17(3):615–34. DOI: 10.1080/10611860500411043.
12. *Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D, Denine EP, Asbell MA.* Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species. *Cancer Res.* 1972;32(6):1177–83. PMID: 5030818.
13. *Uma Mahesh B, Shrivastava S, Kuncha M, Sahu BD, Swamy CV, Pragada RR et al.* Ethanolic extract of *Boswellia ovalifoliolata* bark and leaf attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013;36(3):840–9. DOI: 10.1016/j.etap.2013.07.016.
14. *Gumulec J, Fojtu M, Raudenska M, Sztalmachova M, Skotakova A, Vlachova J et al.* Modulation of induced cytotoxicity of doxorubicin by using apoferritin and liposomal cages. *Int J Mol Sci.* 2014;15(12):22960–77. DOI: 10.3390/ijms151222960.
15. *McGuire WP, Penson RT, Gore M, Herraes AC, Peterson P, Shahir A et al.* Randomized phase II study of the PDGFR α antibody olaratumab plus liposomal doxorubicin versus liposomal doxorubicin alone in patients with platinum-refractory or platinum-resistant advanced ovarian cancer. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1292. DOI: 10.1186/s12885-018-5198-4.
16. *Федосеева В.В., Постовалова Е.А., Халанский А.С., Разживина В.А., Гельперина С.Э., Макарова О.В.* Лекарственный патоморфоз глиобластомы 101.8 у крыс линии Wistar при лечении наноразмерной формой доксорубицина на основе полилактидных наночастиц. Современные технологии в медицине. 2018;10(4):105–112. DOI: 10.17691/stm2018.10.4.12.
17. *Fedoseeva VV, Postovalova EA, Khalansky AS, Razzhivina VA, Gelperina SE, Makarova OV.* Drug-Induced pathomorphosis of glioblastoma 101.8 in Wistar rats treated with doxorubicin bound to poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Modern Technologies in Medicine.* 2018;10(4):105–112. DOI: 10.17691/stm2018.10.4.12.
18. *Maksimenko O, Malinovskaya J, Shipulo E, Osipova N, Razzhivina V, Arantseva D et al.* Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int J Pharm.* 2019;572:118733. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.
19. *Son S, Rao NV, Ko H, Shin S, Jeon J, Han HS et al.* Carboxymethyl dextran-based hypoxia-responsive nanoparticles for doxorubicin delivery. *Int J Biol Macromol.* 2018;110:399–405. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.048.
20. *Steiniger SC, Kreuter J, Khalanski AS, Skidan IN, Bobruskin AI, Smirnova ZS et al.* Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int J Cancer.* 2004;109(5):757–67. DOI: 10.1002/ijc.20048.
21. *Gelperina SE, Khalanski AS, Skidan IN, Smirnova ZS, Bobruskin AI, Severin SE et al.* Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracerebral glioblastoma. *Toxicol Lett.* 2002;126(2):131–41. DOI: 10.1016/s0378-4274(01)00456-8.
22. *Shafei A, El-Bakly W, Sobhy A, Wagdy O, Reda A, Aboelenin O et al.* A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2017;95:1209–18. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.059.

22. Wallimann T, Hemmer W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem.* 1994;133–134:193–220. DOI: 10.1007/BF01267955.
23. Wilson IJ, Burchell RK, Worth AJ, Burton SE, Gedye KR, Clark KJ et al. Kinetics of plasma cell-free DNA and creatine kinase in a canine model of tissue injury. *J Vet Intern Med.* 2018;32(1):157–164. DOI: 10.1111/jvim.14901.
24. Zeeshan M, Hamidi M, O’Keeffe T, Hanna K, Kulvatunyou N, Tang A et al. Pediatric liver injury: Physical examination, fast and serum transaminases can serve as a guide. *J Surg Res.* 2019;242:151–6. DOI: 10.1016/j.jss.2019.04.021.
25. Amacher DE. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1998;27(2):119–30. DOI: 10.1006/rtph.1998.1201.
26. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of Doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol Int.* 2012;19(3):241–4. DOI: 10.4103/0971-6580.103656.
27. Pereverzeva E, Treschalin I, Treschalin M, Arantseva D, Ermolenko Y, Kumskova N et al. Toxicological study of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma. *Int J Pharm.* 2019;554:161–78. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.014.
28. Zucchi R, Danesi R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Med Chem Anticancer Agents.* 2003;3(2):151–71. DOI: 10.2174/1568011033353434.
29. Soloman R, Gabizon AA. Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2008;8(1):21–32. DOI: 10.3816/clm.2008.n.001.
30. Mirakabad FS, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Review Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(2):517–35. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.2.517.

Информация об авторах

Вера Владимировна Куделькина – научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека.

Александр Сергеевич Халанский – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека.

Ольга Васильевна Макарова – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

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

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

Анна Игоревна Алексеева – младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека.

Артем Юрьевич Шелков – лаборант-исследователь лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Ольга Олеговна Максименко – кандидат медицинских наук, заместитель заведующей лабораторией систем доставки лекарств, ООО «Технология лекарств».

Виктория Александровна Разживина – кандидат биологических наук, руководитель отдела клинических исследований ООО «Технология лекарств».

Светлана Эммануиловна Гельперина – доктор химических наук, заведующая лабораторией систем доставки лекарств, ООО «Технология лекарств»; профессор кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева.

Author information

Vera V. Kudelkina – Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-2620-7427>

Aleksandr S. Khalanskiy – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-2575-7523>

Olga V. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

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

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>

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

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

Anna I. Alekseeva – Junior Researcher, Laboratory of Neuromorphology, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0370-6477>

Artem Y. Shelkov – Research Assistant, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-5491-6802>

Olga O. Maksimenko – Cand. Sci. (Med.), Deputy Head of the Drug Delivery System Laboratory, LLC Drugs Technology.

<https://orcid.org/0000-0002-1230-4680>

Victoria A. Razzhivina – Cand. Sci. (Biol.), RCO Manager, LLC Drugs Technology.

<https://orcid.org/0000-0002-7826-9937>

Svetlana E. Gelperina – Dr. Sci. (Chem.), Head of the Drug Delivery System Laboratory, LLC Drugs Technology;

Professor of the Department of Chemistry and Technology of Biomedical Drugs, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia.

<https://orcid.org/0000-0003-1113-6715>

Случай синдрома Мюира–Торре, ассоциированного с наследственной мутацией в гене *MSH2*

А.В. Каминский¹, И.Л. Плакса^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, Россия

² ГБУЗ Ленинградский областной клинический онкологический диспансер, Санкт-Петербург, Россия

³ ООО Центр генетики и репродуктивной медицины «ГЕНЕТИКО», Москва, Россия.

Синдром Мюира–Торре характеризуется сочетанием опухолей кожи с себацейной дифференцировкой со злокачественными опухолями желудочно-кишечного тракта, что обусловлено наследственными мутациями в генах белков системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов. В статье представлен разбор клинического случая. Мужчина 42 лет обратился с жалобами на наличие экзофитной опухоли кожи спины размерами 2,3 × 1,8 см. При гистологическом исследовании опухоль была представлена преимущественно клетками с себацейной дифференцировкой, что соответствовало себациоме. Из анамнеза пациента стало известно, что в возрасте 37 лет ему была выполнена гемиколэктомия по поводу высокодифференцированной аденокарциномы толстой кишки. При иммуногистохимическом исследовании с антителами к белкам системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов в образце опухоли сальных желез было выявлено отсутствие ядерной реакции в опухолевых клетках с антителами к белкам MLH1 и MSH2, что свидетельствует о наличии наследственных мутаций в этих генах. При проведении высокопроизводительного полупроводникового параллельного секвенирования ДНК выявлен вариант нуклеотидной последовательности в 12-м экзоне гена *MSH2* (с.1797_1801 del), приводящий к сдвигу рамки считывания (NM_000251: p.L599fs).

Ключевые слова: синдром Мюира–Торре, себациома, *MSH2*

Для корреспонденции: Артем Вячеславович Каминский. E-mail: kaminsart@mail.ru

Для цитирования: Каминский А.В., Плакса И.Л. Случай синдрома Мюира–Торре, ассоциированного с наследственной мутацией в гене *MSH2*. Клини. эксп. морфология. 2021;10(1):66–70. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.66-70.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 31.12.2020. Получена после рецензирования 25.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Muir–Torre syndrome case associated with a hereditary *MSH2* mutation

A.V. Kaminskiy¹, I.L. Plaksa^{2,3}

¹ I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

² Leningrad Regional Clinical Oncological Dispensary, Saint Petersburg, Russia

³ GENETICO LLC, Moscow, Russia

Muir–Torre syndrome combines skin tumors with sebaceous differentiation with malignant tumors of the gastrointestinal tract, which is caused by hereditary mutations in the genes of the mismatched nucleotide repair system. The article presents a clinical case of a 42-year old man who complained of an exophytic skin tumor on the back measuring 2.3 × 1.8 cm. At histological examination, the tumor was presented primarily with sebaceous differentiated cells, which corresponded to adenoma of the sebaceous glands. From the patient's history it became known that at the age of 37 he underwent hemicolectomy for high-differentiated adenocarcinoma. An immunohistochemical study with antibodies to proteins of the mismatched nucleotide repair system in a tumor sample revealed the absence of a nuclear reaction in tumor cells with antibodies to MLH1 and MSH2 proteins, which indicates the presence of germline mutations in these genes. High-throughput semiconductor parallel DNA sequencing revealed a variant

of the nucleotide sequence in exon 12 of the *MSH2* gene (c.1797_1801 del), leading to a shift in the reading frame (NM_000251: p.L599fs).

Keywords: Muir–Torre syndrome, colorectal cancer, repair system, wrong-paired bases

Corresponding author: Artem V. Kaminskiy. E-mail: kaminsart@mail.ru

For citation: Kaminskiy A.V., Plaksa I.L. Muir–Torre syndrome case associated with a hereditary *MSH2* mutation. Clin. exp. morphology. 2021;10(1):66–70. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.66-70 (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 31.12.2020. **Received in revised form** 25.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Синдром Мюира–Торре (СМТ) – заболевание аутосомно-доминантного типа наследования, которое характеризуется сочетанием (комбинированным развитием) опухолей кожи, таких как множественные кератоакантомы, эпителиомы, аденомы сальных желез и себациомы, со злокачественными опухолями желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы [1]. Причиной развития синдрома Мюира–Торре является нарушение системы репарации ДНК, которое обусловлено мутациями в генах *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* и *MSH6* системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов. Система репарации исправляет ошибки, появляющиеся при неправильном спаривании оснований в процессе репликации, благодаря чему поддерживаются непрерывность и целостность генома. Выпадение одного из белков ведет к формированию микросателлитной нестабильности, которое характеризуется изменением количества мономеров в микросателлитных повторах на протяжении всей молекулы ДНК [2].

Формирование опухолей кожи с себационой (сальной) дифференцировкой – одно из основных клинических проявлений синдрома. В связи с этим важное значение имеет правильная дифференциальная диагностика опухолей кожи, так как своевременно выявленное новообразование может являться диагностическим маркером синдрома Мюира–Торре, что позволит онкологу своевременно диагностировать этот наследственный синдром и таким образом скорректировать тактику ведения пациента. Целью настоящего сообщения стала демонстрация клинического наблюдения пациента с синдромом Мюир–Торре, обусловленного мутацией в гене *MSH2*.

Клиническое наблюдение

Мужчина 42 лет обратился с жалобами на наличие на коже спины экзофитной опухоли размерами 2,3 × 1,8 см розового цвета без изъязвления поверхности. Новообразование появилась за 4 месяца до оперативного вмешательства по поводу удаления. Опухоль медленно увеличивалась в размерах, что в конечном счете стало поводом для обращения пациента в клинику.

При гистологическом исследовании выявлено, что опухоль имеет дольчатое строение и представлена

клетками с себационой дифференцировкой, которые формируют дольки разного размера и формы, имеющие тесную связь с эпидермисом в области верхушки, что в совокупности соответствует себациоме [3] (рис. 1). Проводилась дифференциальная диагностика с карциномой сальной железы, для которой тоже характерны дольки, но в отличие от себациомы они не имеют связи с эпидермисом. Для карциномы более типичны ядерный полиморфизм и участки опухолевой инвазии, которые отсутствовали в материале.

Из анамнеза известно, что за 4 года до появления опухоли кожи пациенту была проведена комбинированная лапароскопически ассистированная гемиколэктомия по поводу высокодифференцированной аденокарциномы печеночного угла поперечно-ободочной кишки, стадия T3N0M0. На момент обращения по поводу опухоли кожи пациент находился в ремиссии – по данным проведенной колоноскопии и КТ признаки рецидива колоректального рака не выявлены. При сборе семейного анамнеза выяснилось, что у матери пациента в возрасте 37 лет была выполнена экстирпация матки с придатками по поводу эндометриоидной аденокарциномы. Сестра матери и их отец, приходящийся пациенту дедушкой, также страдали колоректальным раком, что стало причиной их смерти.

Совокупность данных – метакронное развитие аденокарциномы толстой кишки и себациомы кожи и наличие семейного онкологического анамнеза позволили предположить существование у пациента наследственного опухолевого синдрома, ассоциированного с мутациями в генах системы репарации ДНК. С целью оценки наличия микросателлитной нестабильности в образце опухоли кожи проведено иммуногистохимическое исследование на иммуноштейнере Link48 (Dako, Дания) с антителами к *MLH1* (клон ES05, Leica), *PMS2* (клон EP51, Leica), *MSH2* (клон FE11, Merck) и *MSH6* (клон EP49, CellMarque) в соответствии со стандартным протоколом. Выявлено отсутствие ядерной реакции с антителами к белкам *MSH2* и *MSH6* при присутствии реакции к белкам *PMS2* и *MLH1*, что характерно для нарушения функции *MSH2* с вторичной потерей экспрессии *MSH6* и наиболее часто наблюдается при врожденных мутациях гена *MSH2* при синдроме Линча и врожденном неполипозном раке толстой

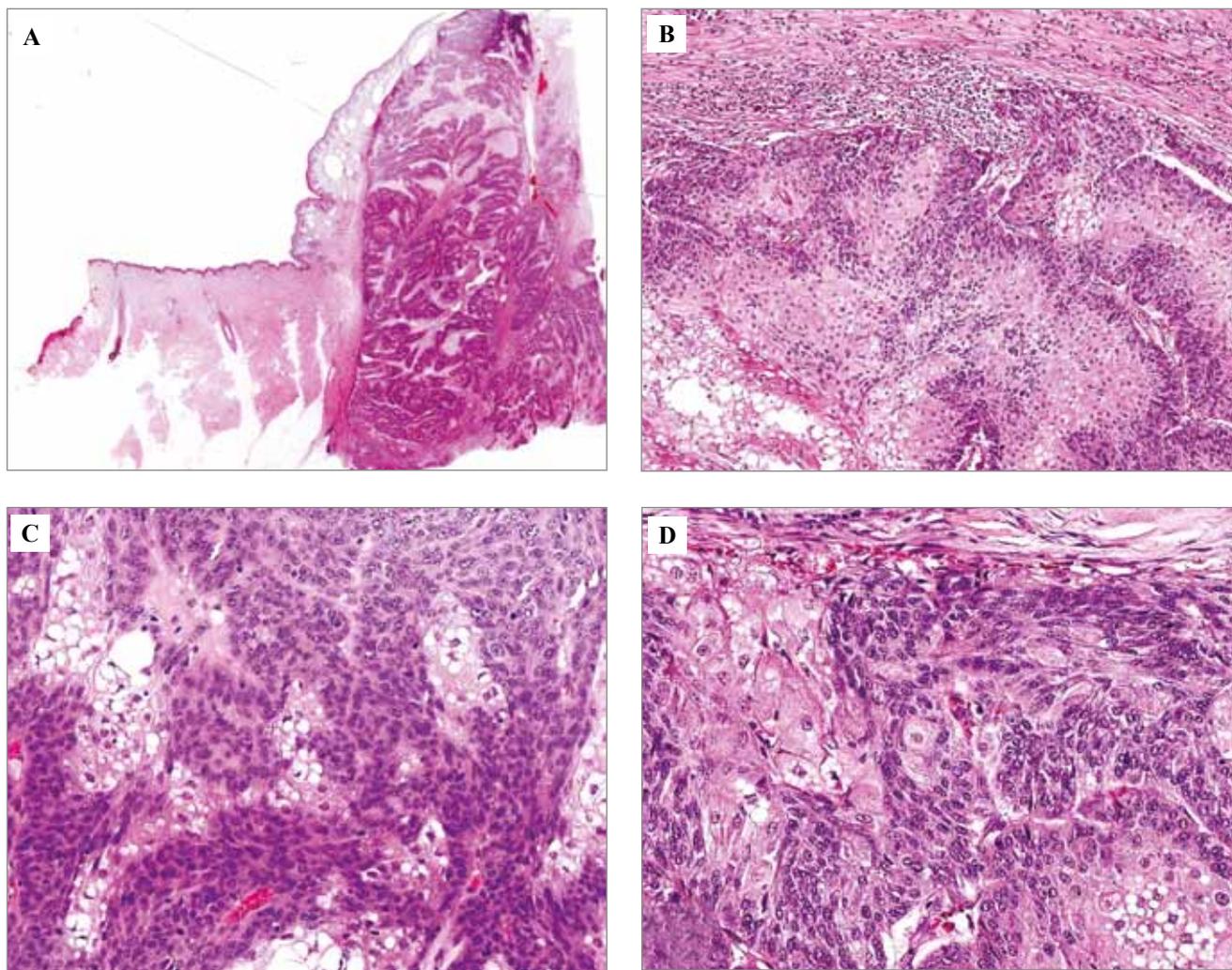


Рис. 1. Биоптат опухоли кожи.

А – опухоль представлена дольчатым образованием с четким контуром, В – экспансивный тип роста, очаговая перитуморальная лимфоидная инфильтрация, С, D – опухоль представлена двумя популяциями клеток – базалоидными (меньшие по размеру и с узким ободком цитоплазмы) и зрелыми себоцитами (большие по размеру клетки с широким ободком эозинофильной или оптически пустой цитоплазмы). Встречаются опухолевые клетки с фигурами митозов. А–С – окраска гематоксилином и эозином, D – окраска по Романовскому–Гимзе. А ×40, В ×100, С ×200, D ×400

Fig. 1. Skin tumor biopsy.

A – the tumor has lobular formation with a clear outline, B – expansive growth type, focal peritumoral lymphoid infiltration. C, D – the tumor is represented by two populations of cells – basaloid (smaller in size and with a narrow rim of the cytoplasm) and mature sebocytes (large in size with a wide rim of eosinophilic or optically empty cytoplasm). Mitotic figures within tumor cells are detected. A–B – H&E stain, D – Romanovsky–Giemsa stain. A ×40, B ×100, C ×200, D ×400

кишки (рис. 2) Для уточнения наследственной природы заболевания на образце крови пациенту проведен поиск мутаций в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* EPCAM методом высокопроизводительного полупроводникового параллельного секвенирования ДНК с использованием прибора Ion S5 (Thermo Scientific, США) со средним покрытием 678x. Был выявлен вариант нуклеотидной последовательности в 12-м экзоне гена *MSH2*(с.1797_1801 del), приводящий к сдвигу рамки считывания (NM_000251: p.L599fs), который описан как патогенный и ассо-

циирован с развитием рака кишечника согласно базам данных ClinVar, LOVD, HGMD.

С учетом высокого риска развития рака висцеральных органов при синдроме Мюира–Торре пациенту рекомендован комплекс профилактических мероприятий, который направлен на снижение этого риска. Он включал в себя выполнение колоноскопии один раз в 6 месяцев с целью превентивного удаления полипов толстой кишки в случае их развития, эзофагогастродуоденоскопию каждые 2–3 года с проведением эрадикации *Helicobacter pylori* и ежегодный анализ мочи.

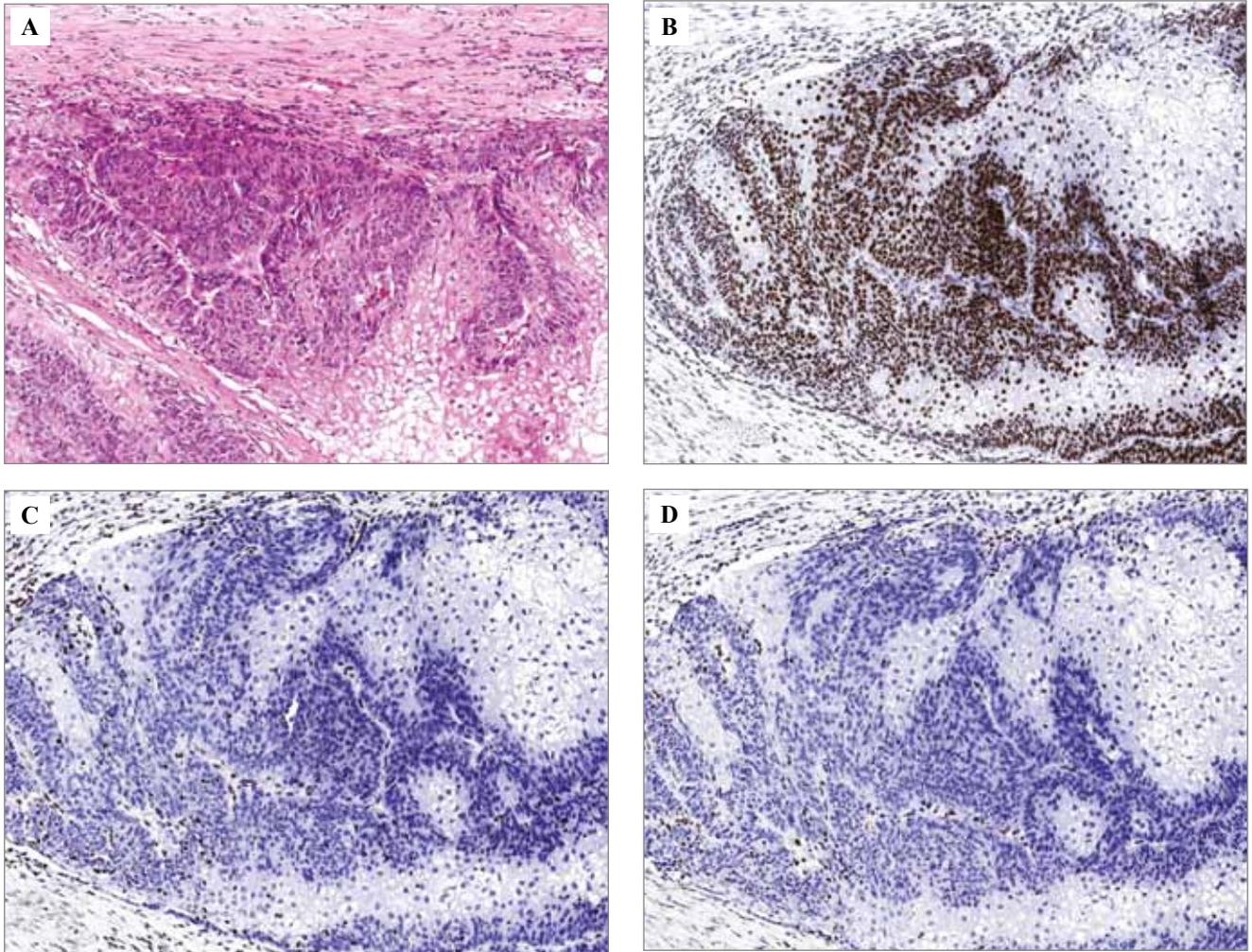


Рис. 2. Биопсия опухоли кожи.

А – опухоль представлена узловым образованием с четким контуром, В – наличие интенсивного ядерного окрашивания в опухолевых клетках, а также в лимфоцитах (внутренний позитивный контроль), С – отсутствие ядерного окрашивания в опухолевых клетках при его наличии в лимфоцитах (внутренний позитивный контроль), D – отсутствие ядерного окрашивания в опухолевых клетках при его наличии в лимфоцитах (внутренний позитивный контроль).

А – окраска гематоксилином и эозином. В – иммуногистохимическое окрашивание с антителами MLH1 (клон ES05), С – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к MSH2 (клон FE11), D – иммуногистохимическое окрашивание с антителами к MSH6 (клон EP49). А–D $\times 100$

Fig. 2. Skin tumor biopsy.

А – the tumor has nodular formation with a clear outline, B – intense nuclear MLH1 staining in tumor cells, as well as in lymphocytes (internal positive control), C – the absence of nuclear staining in tumor cells, however present in lymphocytes (internal positive control), D – absence of nuclear staining in tumor cells, however present in lymphocytes (internal positive control).

А – H&E stain, B – immunohistochemical assay (IHC) with antibodies to MLH1 (clone ES05), C – IHC with antibodies to MSH2 (clone FE11), D – IHC with antibodies to MSH6 (clone EP49). A–D $\times 100$

Обсуждение

Наличие опухоли с себациной дифференцировкой – специфичный маркер синдрома Мюира–Торре, причем наиболее характерной нозологической формой из этого ряда новообразований является себациома, которая встречается у 68% пациентов [4]. По данным отдельных исследований, появление опухоли с себациной дифференцировкой у 22% пациентов с синдромом Мюира–Торре предшествует возникновению рака висцеральных органов, в 6% случаев опухоли проявляются синхронно, а в 56% себациома манифестирует

последней [5]. Таким образом, правильная диагностика патологоанатома имеет важное значение в своевременном выявлении части пациентов с синдромом Мюира–Торре еще до формирования висцеральных новообразований.

Согласно данным литературы, мутации в гене *MSH2* являются причиной возникновения синдрома Мюира–Торре в 90% случаев, а остальные 10% приходятся преимущественно на ген *MLH1*. В то же время имеются отдельные наблюдения развития синдрома при наличии наследственных мутаций в гене *MSH6* [6].

При этом только в гене *MSH2* на сегодняшний день описано более 70 различных вариантов мутаций [7]. В связи с этим при наличии у пациента характерной клинико-морфологической картины необходимо выполнение совокупного анализа всех генов, ассоциированных с микросателлитной нестабильностью методом экзомного секвенирования.

При подтверждении у пациента синдрома Мюира–Торре должен быть организован комплекс профилактических мер, направленных на снижение риска развития рака висцеральных органов, а также проведено медико-генетическое консультирование кровных родственников. Из числа опухолей висцеральных органов наиболее часто у пациентов с синдромом Мюира–Торре развивается колоректальный рак, поэтому всем носителям мутации начиная с 20–25 лет необходимо с периодичностью раз в 1–2 года выполнять эндоскопическое обследование толстой кишки. В случае развития колоректального рака показана колэктомия с илеоректальным анастомозом, так как риск метастазного колоректального рака после проведения типичной резекции составляет 16–19% уже в первые 10 лет после операции [8]. При выявлении синдрома Мюира–Торре у женщин рекомендован ежегодный осмотр гинекологом с проведением ультразвукового исследования, начиная с 30–35 лет, потому что риск развития рака эндометрия у этой категории пациенток составляет от 21 до 60% [9]. Если женщина не планирует рождение детей, может быть рекомендовано профилактическое хирургическое удаление тела матки.

Заключение

Разбор клинического случая пациента с синдромом Мюира–Торре демонстрирует важную роль комплексного анализа клинико-морфологических данных этой категории больных, что лежит в основе своевременного выявления группы риска развития опухолей висцеральных органов и подбора оптимальной тактики лечения.

Информация об авторах

Артем Вячеславович Каминский – студент 4-го курса лечебного факультета Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

Игорь Леонидович Плакса – кандидат медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением Ленинградского областного клинического онкологического диспансера; руководитель проекта в ООО Центр генетики и репродуктивной медицины «ГЕНЕТИКО».

Author information

Artem V. Kaminskiy – 4th year Student, Medical Faculty, I.P. Pavlov Ryazan State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-6574-0921>

Igor L. Plaksa – Cand. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, Leningrad Regional Clinical Oncological Dispensary; Head Project Manager, GENETICO LLC.
<https://orcid.org/0000-0001-6600-0933>

Литература/References

1. *Shalin SC, Lyle S, Calonje E, Lazar AJ.* Sebaceous neoplasia and the Muir–Torre syndrome: important connections with clinical implications. *Histopathology.* 2010;56(1):133–47. DOI:10.1111/j.1365-2559.2009.03454.x.
2. *John AM, Schwartz RA.* Muir–Torre syndrome (MTS): An update and approach to diagnosis and management. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74(3):558–66. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.09.074.
3. DE Elder, D Massi, RA Scolyer, R Willemze (eds.). WHO Classification of Skin Tumors. World Health Organization of Tumours, 4th ed. Vol. 11. Lyon France: IARC Press, 2018. 500 p.
4. *Peltomäki P, Vasen HF.* Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 1997;113(4):1146–58. DOI: 10.1053/gast.1997.v113.pm9322509.
5. *Akhtar S, Oza KK, Khan SA, Wright J.* Muir–Torre syndrome: case report of a patient with concurrent jejunal and ureteral cancer and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41(5 Pt. 1):681–6. DOI: 10.1016/s0190-9622(99)70001-0.
6. *Kacerovska D, Cerna K, Martinek P, Grossmann P, Michal M, Ricar J et al.* MSH6 mutation in a family affected by Muir–Torre syndrome. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(6):648–52. DOI: 10.1097/DAD.0b013e3182446fe2.
7. *Finan MC, Connolly SM.* Sebaceous gland tumors and systemic disease: a clinicopathologic analysis. *Medicine (Baltimore).* 1984;63(4):232–42. DOI: 10.1097/00005792-198407000-00005.
8. *Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW et al.* Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(8):1159–79. DOI: 10.1038/ajg.2014.186.
9. *Цуканов А.С., Шельгин Ю.А., Семенов Д.А., Пикун Д.Ю., Поляков А.В.* Синдром Линча. Современное состояние проблемы. *Медицинская генетика.* 2017;16(2):11–18. *Tsukanov AS, Shelygin YA, Semenov DA, Pikunov DY, Polyakov AV.* Lynch syndrome: current status. *Medical Genetics.* 2017;16(2):11–18 (In Russ.).

Экспериментальная модель хронического очагового остеомиелита для исследований *in vivo*

В.Н. Митрофанов, О.П. Живцов, Н.Ю. Орлинская, Д.В. Давыденко

ФГБОУ ВО Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

Введение. С появлением новых лечебно-диагностических алгоритмов курации пациентов с остеомиелитом нарастает потребность в сравнении методик хирургической санации и пластики дефектов костной ткани в условиях инфекционного процесса с целью создания экспериментальной стандартизированной модели этого заболевания, максимально приближенной к клинической картине остеомиелита у человека. Цель нашего исследования – разработка экспериментальной модели стандартизированной хронической гнойной костной полости, подходящей для комплексной оценки эффективности хирургической санации гнойной раны и остеопластических свойств костезамещающих материалов.

Материалы и методы. Был сформирован стандартизированный дефект большой берцовой кости у 24 особей кроликов. В качестве инфекционного возбудителя применялся штамм *Staphylococcus aureus*. Проводили динамическую оценку основных показателей общих анализов крови животных. При помощи методов рентгенографии, компьютерной томографии и гистологических исследований оценивали формирование хронического остеомиелита.

Результаты. Было показано, что разработанная модель обеспечивала формирование гнойной раны, выявлен дефект с признаками хронического гнойно-воспалительного процесса.

Заключение. Предлагаемая модель хронического остеомиелита является воспроизводимой. Указанная универсальность и наличие идентичных по размерам и месту положения костных дефектов делают модель пригодной для исследования широкого спектра свойств новых остеопластических материалов.

Ключевые слова: хронический остеомиелит, эксперимент, экспериментальные животные

Для корреспонденции: Олег Петрович Живцов. E-mail: zhivtsovoleg@gmail.com

Для цитирования: Митрофанов В.Н., Живцов О.П., Орлинская Н.Ю., Давыденко Д.В. Экспериментальная модель хронического очагового остеомиелита для исследований *in vivo*. Клини. эксп. морфология. 2021;10(1):71–77. DOI:10.31088/CEM2021.10.1.71-77.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Приволжского исследовательского медицинского университета Минздрава России (№ АААА-А18-118052190094-8).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 04.08.2020. Получена после рецензирования 17.09.2020. Принята в печать 26.10.2020.

Experimental model of chronic focal osteomyelitis for *in vivo* studies

V.N. Mitrofanov, O.P. Zhivtsov, N.Yu. Orlynskaya, D.V. Davydenko

Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of Russia, Nizhny Novgorod, Russia

Introduction. The article describes an experimental model of chronic suppurative osteomyelitis in a rabbit. As new therapeutic and diagnostic algorithms for the supervision of patients with osteomyelitis appear, there is an growing need to compare the methods of surgical debridement and plasty of bone defects in an infectious process, in order to create experimental standardized pathological conditions as close to the clinical course of the disease in humans as possible. The aim of the study was to develop an experimental model of a standardized chronic purulent bone cavity, suitable for a comprehensive assessment of surgical debridement effectiveness and osteoplastic properties of bone substitute materials.

Materials and methods. A standardized defect of the tibia in 24 rabbits was formed. The *Staphylococcus aureus* strain was used as an infectious agent. A dynamic assessment of the main indicators of blood counts in animals was carried out. The formation of chronic osteomyelitis was evaluated using radiography, computed tomography methods and histological studies.

Results. It was shown that purulent bone wound developed in experimental animals with the technique created, and a defect with signs of a chronic purulent-inflammatory process was demonstrated.

Conclusion. The proposed model of chronic osteomyelitis is reproducible. Operational flexibility and identical in size and location bone defects allow to use this model in new osteoplastic material research.

Keywords: chronic osteomyelitis, experiment, experimental animals

Corresponding author: Oleg P. Zhivtsov. E-mail: zhivtsovoleg@gmail.com

For citation: Mitrofanov V.N., Zhivtsov O.P., Orlinskaya N.Yu., Davydenko D.V. Experimental model of chronic focal osteomyelitis for *in vivo* studies. Clin. exp. morphology. 2021;10(1):71–77. DOI:10.31088/CEM2021.10.1.71-77 (In Russ.).

Funding. The work was carried out within the framework of State Assignment to Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of Russia (No. AAAA-A18-118052190094-8).

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

Received 04.08.2020. **Received in revised form** 17.09.2020. **Accepted** 26.10.2020.

Введение

Несмотря на достижения современной науки, технического прогресса, остеомиелит продолжает оставаться нерешенной до конца проблемой. По-прежнему основным и самым эффективным способом его лечения является хирургический, включающий радикальное удаление всех нежизнеспособных тканей. В настоящее время нет устраивающего всех хирургов остеопластического материала, обладающего стойкими остеокондуктивными и остеоиндуктивными эффектами. Постоянно предлагаются новые научно-технические решения, которые необходимо изучать. Эксперимент *in vivo* сочетает возможности клинической, рентгенологической, лабораторной и статистической оценки результатов [1–5], поэтому воспроизводимые экспериментальные модели хронического остеомиелита с привлечением доступных лабораторных животных необходимы в современных условиях. В настоящей публикации описаны результаты создания воспроизводимой экспериментальной модели, позволяющей изучать анатомические, функциональные взаимоотношения костного дефекта и окружающих тканей, оценивать эффективность методов лечения [6].

Разнообразие представленных в литературе способов экспериментального воспроизведения гнойной патологии с дефектами костных структур на животных демонстрирует неоднозначный подход к проведению экспериментальных исследований. Часто отмечается индивидуализированный дизайн моделирования заболевания, ограничивающий объективный анализ полученных результатов.

Всемирно известные научные группы продолжают создавать разные экспериментальные модели для проведения разнообразных исследований, в том числе модели хронического остеомиелита на крысах [7], и они продемонстрировали эффективность. Однако моделирование на мелких животных имеет ряд недостатков. Технология одной из разработок включает нанесение незначительных по размеру дефектов, что позволяет исследовать антибактериальные свойства фармакологических препаратов. Некоторые исследователи, стремясь создать ортопедически значимый дефект, вынуждены применять методики остеосинтеза уже на этапе нанесения дефекта, что усложняет воспроизведение модели. Описаны модели с несколькими фрезевыми дефектами одной кости [8]. Такая методика является воспроизводимой

и обоснованной. Тем не менее для применения подобных технологий необходимы расчеты высокой степени для идентичности течения патологического процесса у экспериментальных животных различных видов. Наблюдение за животным с неоднократно нанесенным костным дефектом требует повышенного внимания вследствие специфики операционной травмы, повышения рисков осложнений. В некоторых публикациях описаны достоверные результаты исследований на кроликах с локализацией гнойного очага на бедре [9]. Значительные размеры дефекта способствуют детальному исследованию остеопластических свойств разных препаратов. Подобные модели могут быть воспроизведены с высокой точностью, но анатомические особенности кроликов и распространение гнойных затеков в проксимальном направлении усложняют дренирование гнойного содержимого на этапе наблюдения за хронизацией заболевания. Возможен высокий риск генерализации гнойного воспалительного процесса [10, 11].

В связи с высокой актуальностью изучаемой нами гнойно-воспалительной патологии опорно-двигательного аппарата, отсутствием подходящей экспериментальной модели, необходимой для проведения последующего сравнительного анализа предполагаемых хирургических методик лечения, была поставлена цель разработать экспериментальную модель стандартизованной хронической гнойной костной полости, подходящую для комплексной оценки эффективности хирургической санации гнойной раны и остеопластических свойств костезамещающих материалов.

Материалы и методы

Модель отработывалась на 24 кроликах породы «серый великан» 6–8-месячного возраста весом от 1800 до 2100 граммов в отделении экспериментальной хирургии с виварием ПИМУ согласно требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 2014). Все манипуляции проводили в соответствии с приказом Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование одобрено локальным этическим комитетом ПИМУ от 10.03.2015 (протокол № 4). Выведение животных из эксперимента осуществляли воздушной эмболией под наркозом.

В качестве инфекционного возбудителя применялся штамм *Staphylococcus aureus*. Для подготовки операционного поля удаляли волосяной покров в области оперативного вмешательства, трехкратно дезинфицировали растворами антисептиков, отгораживали стерильным бельем. Все болезненные процедуры и операции проводили под обезболиванием (золетил 50 10 мг/кг + ксила 50 мг/кг).

Хирургический доступ осуществляли по передней поверхности проксимальной метаэпифизарной области большеберцовой кости продольным разрезом с послойным рассечением кожи, подкожной клетчатки, фасции длиной 3,0 см. Края раны разводили острыми крючками. Распатором Фарабефа скелетировали большую берцовую кость на площади 2×1 см. Фрезой диаметром 4,0 мм вдоль оси кости формировали дефект надкостницы, кортикального слоя и губчатого вещества размерами $8,0 \times 4,0$ мм глубиной 4,0 мм (рис. 1). Размеры дефекта контролировали при помощи штангенциркуля ШЦ-1 с глубиномером.

Дефект инфицировали взвесью суточной культуры стафилококка в стерильном физиологическом растворе в дозе 40–45 млн колониеобразующих единиц (КОЕ) и 0,2 г стерильного кварцевого песка на 1 кг массы тела животного.

В костной полости кварцевый песок выполнял роль «секвестров» с большой площадью поверхности, что способствовало формированию биопленки как субстрата для развития хронического гнойного процесса. Завершали операцию наложением послойного узлового шва раны.

Для получения хронической гнойной свищевой раны через 72 часа после операции снимали 3–4 шва в проксимальной части раны и разводили ее края на протяжении 1 см.

Пассивное дренирование очага хронического воспаления рассматривали как надежную профилактику ге-

нерализации процесса, что исключало риск летального исхода у животных. С целью хронизации гнойного воспаления одновременно с формированием свища реинфицировали костную полость культурой *Staphylococcus aureus* в дозе 15–20 млн КОЕ на 1 кг массы тела кролика. Такие «подсевы» применяли трехкратно с интервалом 72 часа. Оставшиеся швы кожной раны снимали через 10 суток после оперативного вмешательства. Трехкратное реинфицирование обеспечивало формирование хронической свищевой раны (рис. 2). Динамический контроль за состоянием раны и животного, развитием воспалительного процесса осуществляли в ходе ежедневного клинического наблюдения и анализа крови на анализаторе (автоанализатор DREW-3, DrewScientific, Великобритания). Бактериологическое исследование раневого отделяемого из свища проводили на 14-е сутки после операции. У всех животных выявлена смешанная флора: *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Всем оперированным особям тотчас после операции и через 30 суток выполнялись рентгенография и компьютерная томография (КТ) области вмешательства. После прекращения действия наркоза экспериментальные животные не опирались на оперированную конечность, поджимали ее.

Экспериментальный материал фиксировали в растворе нейтрального 10% формалина. Костную ткань подвергали декальцинации в бескислотном растворе. Стандартную гистологическую проводку осуществляли на аппарате Excelsior ES (Thermo Scientific, США). После проводки изготавливали парафиновые блоки с использованием заливочной станции HistoStar (Thermo Scientific, США). Срезы толщиной 4–6 мкм получали на микротоме Microm HM 325 (Thermo Scientific, США). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином при помощи станции для окраски Gemini AS (Thermo Scientific, США).

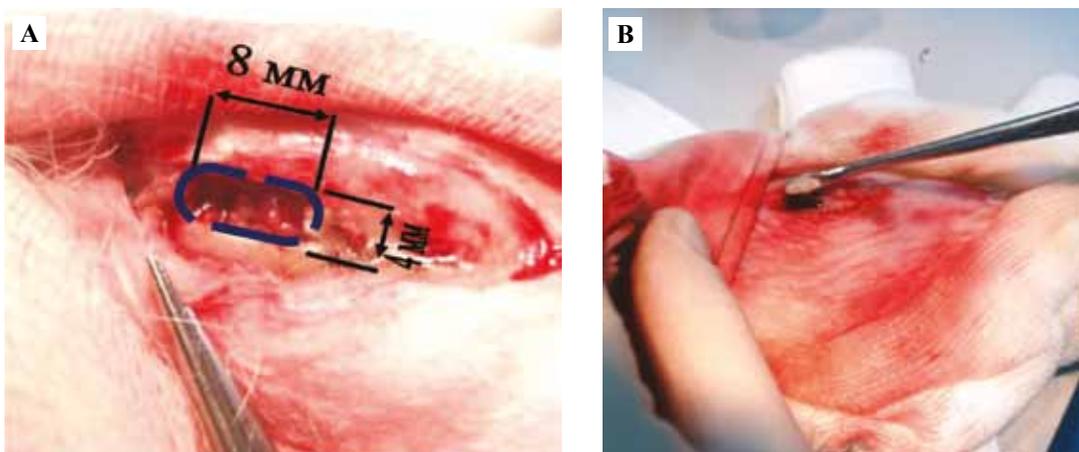


Рис. 1. Сформированный стандартизованный дефект большой берцовой кости.

А – форма дефекта и размеры, В – интраоперационное внесение инфицирующей смеси

Fig. 1. Defect of the tibia.

A – defect's shape and dimensions, B – intraoperative administration of the infectious agent

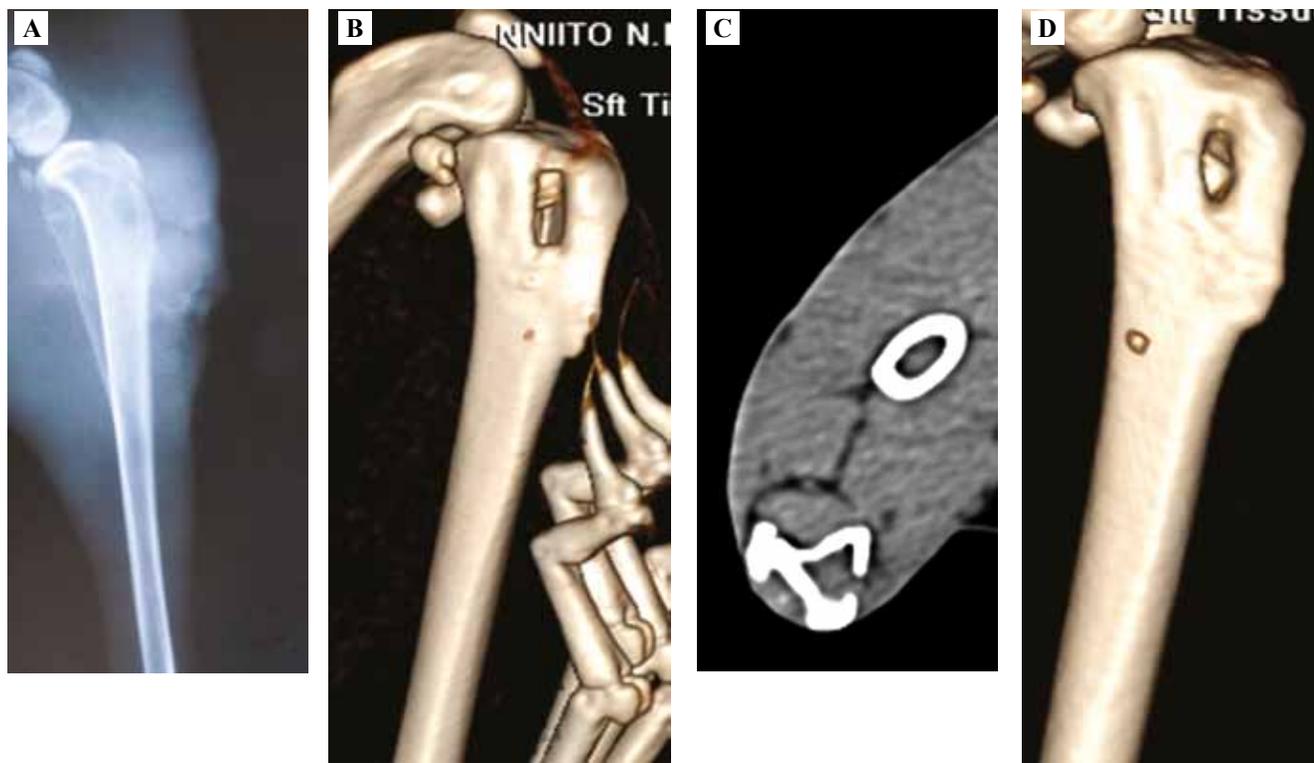


Рис. 2. Визуализация дефекта большеберцовой кости.

А – рентгенография области верхней трети левой голени кролика с нанесенным дефектом, В – интраоперационная КТ картина оперированного сегмента, С – аксиальный срез большеберцовой кости через центр дефекта, D – трехмерная КТ реконструкция области оперированного сегмента с нанесенным дефектом через 30 суток после операции

Fig. 2. Visualisation of the tibia defect.

A – X-ray of the left tibia with applied defect, B – intraoperative CT scan, C – axial section of the tibia through the center of the defect, D – 3-dimensional CT reconstruction of the defect area 30 days after the surgery

Результаты и обсуждение

Отмечались гиперемия, локальное повышение температуры, при пальпации флюктуация, кролики отдергивали лапу, что расценивалось как признак боли. Формирование свища приводило к исчезновению флюктуации, отмечалось густое гнойное отделяемое в объеме 1–2 мл в сутки. Нарушение функции смежных суставов не определялось.

Через 8–10 дней после оперативного вмешательства наблюдали полное восстановление опороспособности конечности. Гнойно-некротическая рана характеризовалась наличием свищевого хода, дном которого являлась костная ткань. Отмечалось образование участков некрозов мягких тканей и грануляций, легко кровоточащих при зондировании раны. Раневое отделяемое содержало песчинки. Клиническими признаками хронического гнойного воспаления экспериментальной модели традиционно считаются 1) наличие очагов влажного или сухого некроза мягких тканей (кожа, клетчатка, фасция, мышца), 2) медленное, мозаичное выполнение раны вялыми, бледными, легко кровоточащими грануляциями, 3) существование свищевой гнойной раны на всем сроке наблюдения после оперативного вмешательства.

Интраоперационная рентгенография выявила дефект костной ткани в метаэпифизарной области с рентгенологическим просветлением и чередующимися очагами затемнения. Участки затемнения обуславливались наличием инородных тел – кварцевого песка. Через 30 суток после операции эти признаки сохранялись.

Результаты интраоперационного КТ исследования – прямоугольный дефект большой берцовой кости со сторонами 8×4 мм. Расположен вдоль оси конечности, имеет четкие контуры.

Через 30 суток на компьютерных томограммах дефект костной ткани имел неправильную форму, неровные края, свободно лежащие мелкие рентгеноконтрастные объекты в полости, признаки периостальной реакции, окружающей очаг (рис. 2).

Через 30 суток животных выводили из эксперимента. Сегмент кости, содержащий гнойную костную полость, подвергали гистологическому исследованию.

В ходе гистологического исследования был выявлен дефект с признаками хронического гнойно-воспалительного процесса. Со стороны периоста определялись очаги гнойно-некротического воспаления с большим количеством нейтрофильных и сегментоядерных лейкоцитов, фибрина и микробных колоний (рис. 3).

Гнойный воспалительный процесс с наличием участков рассасывания костных фрагментов и формированием абсцессов визуализировался и со стороны костномозговой полости в областях, смежных с дефектом (рис. 4).

Вокруг отграничивающихся участков воспаления были обнаружены разрозненные безостеоцитные костные балки (рис. 5). Очаги гнойного расплавления выявлены и со стороны периоста. Гнойный процесс захватывал кортикальную костную пластинку, о чем свидетельствовали участки ее рассасывания, что расценивалось нами как формирование свищевого хода (рис. 6).

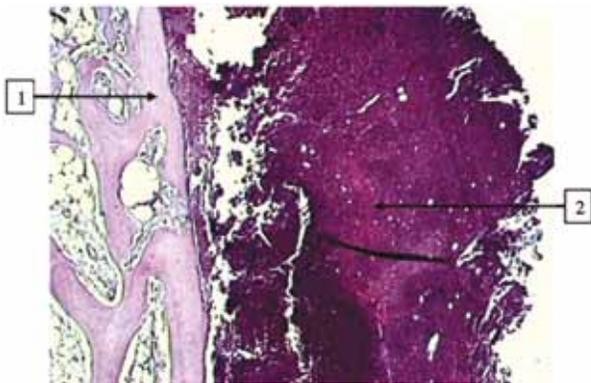


Рис. 3. Гнойно-некротический очаг краевой области дефекта через 30 суток после его создания. 1 – губчатая костная ткань края дефекта, 2 – очаг гнойного воспаления. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 50$

Fig. 3. Purulent necrotic focus in the defect margin 30 days after the surgery. 1 – cancellous bone tissue in the defect margin; 2 – focal purulent inflammation. H&E stain, $\times 50$

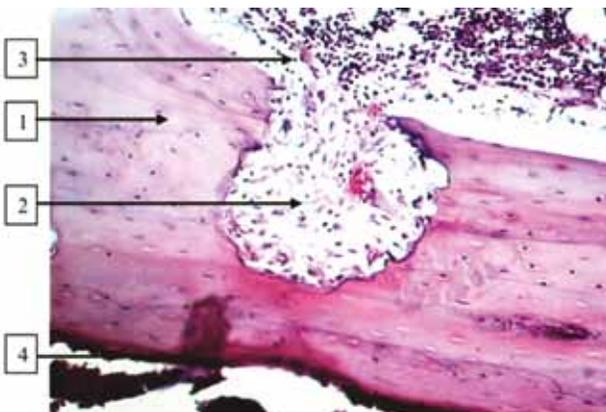


Рис. 4. Гистологическая картина формирования абсцесса. 1 – кортикальная костная пластинка, прилегающая к дефекту, 2 – очаг рассасывания костной ткани, 3 – гнойно-воспалительный инфильтрат в костномозговом канале, 4 – периост. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 4. Abscess formation. 1 – cortical bone plate adjacent to the defect, 2 – focus of bone tissue resorption, 3 – purulent inflammatory infiltrate in the bone marrow canal, 4 – periosteum. H&E stain, $\times 200$

Таким образом, разработанная модель обеспечивала формирование хронической гнойной раны, локализованной в области дефекта кости.

Морфологическая картина соответствовала макроскопической, полученной при КТ на 30-е сутки эксперимента, подтверждающей наличие очага низкой рентгенологической плотности и периостальной воспалительной реакции.

Наряду с применением клинко-рентгенологических методов и выполнением гистологического исследования, подтверждающими формирование хронической гнойной костной полости у экспериментальных животных, проводилась динамическая

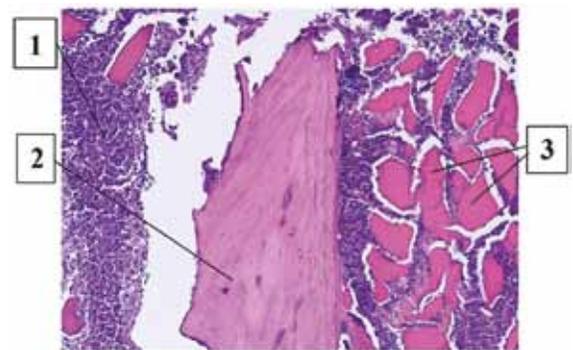


Рис. 5. Область очага хронического воспаления.

1 – очаг гнойного воспаления, 2 – костный секвестр, 3 – безостеоцитные костные фрагменты. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 5. The area of chronic inflammation. 1 – focus of purulent inflammation, 2 – bone sequestration, 3 – osteocytic bone fragments. H&E stain, $\times 200$

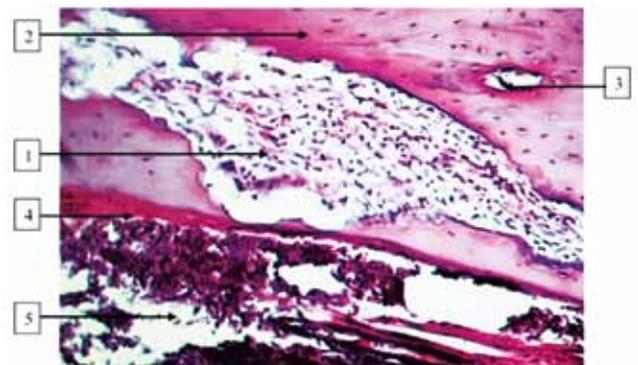


Рис. 6. Участок рассасывания кортикальной костной ткани – формирование свищевого хода. 1 – грануляционная ткань в формирующемся свищевом ходе, 2 – компактная костная ткань, 3 – гаверсов канал, 4 – эндост, 5 – очаг гнойного воспалительного процесса в костномозговом канале. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 6. The resorption site of the cortical bone tissue – the fistula formation. 1 – granulation tissue in the forming fistula, 2 – compact bone tissue, 3 – Havers channel, 4 – endosteum, 5 – a focus of a purulent inflammation in the bone marrow canal. H&E stain, $\times 200$

оценка основных показателей общих анализов крови у 27 животных через 7, 14, 30 суток от первого внесения инфицирующей смеси в созданный дефект костной ткани. Через 7 суток от начала эксперимента число лейкоцитов возрастало на $18,6 \pm 3,1\%$, тромбоцитов на $14,8 \pm 1,7\%$. Гемоглобин снижался на $15,3 \pm 2,4\%$. Через 14 суток число лейкоцитов превышало исходные показатели на $10,4 \pm 2,1\%$, тромбоцитов на $14,3 \pm 2,3\%$, а концентрация гемоглобина уменьшилась на $10,3 \pm 0,5\%$. Через 30 суток ничего из измеряемых показателей к исходным значениям не возвращалось.

Динамика лабораторных показателей соответствует развитию хронического процесса под влиянием травмы кости, инфекционного фактора и инородных тел. Такие изменения могут служить первыми лабораторными признаками хронизации раневого процесса у экспериментальных животных.

Заключение

В результате проведенного исследования было показано, что разработанная модель обеспечивала формирование гнойной раны, был выявлен дефект с признаками хронического гнойно-воспалительного процесса. Предлагаемая модель хронического остеомиелита является воспроизводимой и основана на стандартизированном нарушении нормальной анатомии опорной структуры, внесении инфицированных инородных тел, повторных инфицированиях костной полости, пассивном дренаже гнойного очага. В течение исследования за животными можно наблюдать в динамике с учетом лабораторных показателей, проводить рентгенологические обследования и гистологическое исследование по завершении эксперимента. Указанная универсальность и наличие идентичных по размерам и месту положения костных дефектов делает модель пригодной для исследования широкого спектра свойств новых остеопластических материалов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – В.Н. Митрофанов, О.П. Живцов.

Сбор и обработка материала – В.Н. Митрофанов, О.П. Живцов, Н.Ю. Орлинская, Д.В. Давыденко.

Написание текста – В.Н. Митрофанов, О.П. Живцов, Н.Ю. Орлинская, Д.В. Давыденко.

Редактирование – В.Н. Митрофанов, О.П. Живцов, Н.Ю. Орлинская, Д.В. Давыденко.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – V.N. Mitrofanov, O.P. Zhivtsov.

Collected the data and performed the analysis – V.N. Mitrofanov, O.P. Zhivtsov, N.Yu. Orlinskaya, D.V. Davydenko.

Wrote the paper – V.N. Mitrofanov, O.P. Zhivtsov, N.Yu. Orlinskaya, D.V. Davydenko.

Edited the manuscript – V.N. Mitrofanov, O.P. Zhivtsov, N.Yu. Orlinskaya, D.V. Davydenko.

Литература/References

1. Cassat JE, Skaar EP. Recent advances in experimental models of osteomyelitis. *Exp Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(12):1263–5. DOI:10.1586/14787210.2013.858600.
2. Cui T, Li J, Zhen P, Gao Q, Fan X, Li C. Masquelet induced membrane technique for treatment of rat chronic osteomyelitis. *Exp Ther Med*. 2018;16(4):3060–4. DOI:10.3892/etm.2018.6573.
3. Dym H, Zeidan J. Microbiology of acute and chronic osteomyelitis and antibiotic treatment. *Dent Clin North Am*. 2017;61(2):271–82. DOI:10.1016/j.cden.2016.12.001.
4. Lew DP, Waldvogel FA. Osteomyelitis. *Lancet*. 2004;364(9431):369–79. DOI:10.1016/S0140-6736(04)16727-5.
5. Worlock P, Slack R, Harvey L, Mawhinney R. An experimental model of post-traumatic osteomyelitis in rabbits. *Br J Exp Pathol*. 1988;69(2):235–44.
6. Lazzarini L, Overgaard KA, Conti E, Shirliff ME. Experimental osteomyelitis: what have we learned from animal studies about the systemic treatment of osteomyelitis? *J Chemother*. 2006;18(5):451–60. DOI:10.1179/joc.2006.18.5.451.
7. Мигулева И.Ю., Савотченко А.М., Петухова М.Н., Панининов А.С., Клюквин И.Ю., Кислицына О.С. и др. Две новые модели экспериментального дефекта кости на голени крысы для исследования регенерации костной ткани после пластики различными материалами. Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2015;18(2):34–45.
Miguleva IYu, Savotchenko AM, Petukhova MN, Papaninov AS, Kliukvin IYu, Kislitsyna OS et al. Two original rat tibial bone defect models for the purpose of bone formation and healing process investigations after any graft or bone substitute material implanted. *Issues of Reconstructive and Plastic Surgery*. 2015;18(2):34–45.
8. Ладонин С.В., Сонис А.Г., Алексеев Д.Г., Белозерцева Е.А., Вовк Е.А. Моделирование хронического остеомиелита. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2011;4(2):344–348.
Ladonin SV, Sonis AG, Alekseev DG, Belozertseva EA, Vovk EA. Modeling of chronic osteomyelitis. *Journal of Experimental and Clinical Surgery*. 2011;4(2):344–348.
9. Azuara G, García-García J, Ibarra B, Parra-Ruiz FJ, Asúnsolo A, Ortega MA et al. Experimental study of the application of a new bone cement loaded with broad spectrum antibiotics for the treatment of bone infection. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2019;63(2):95–103. DOI:10.1016/j.recot.2018.10.002.
10. Nandi SK, Bandyopadhyay S, Das P, Samanta I, Mukherjee P, Roy S et al. Understanding osteomyelitis and its treatment through local drug delivery system. *Biotechnol Adv*. 2016;34(8):1305–17. DOI:10.1016/j.biotechadv.2016.09.005.
11. Neyisci C, Erdem Y, Bilekli AB, Demiralp B, Kose O, Bek D et al. Treatment of implant-related methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis with vancomycin-loaded VK100 silicone cement: An experimental study in rats. *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2018;26(1):2309499017754093. DOI:10.1177/2309499017754093.

Информация об авторах

Вячеслав Николаевич Митрофанов – кандидат медицинских наук, травматолог-ортопед, заведующий отделением гнойной хирургии (остеологии) университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

Олег Петрович Живцов – кандидат медицинских наук, травматолог-ортопед отделения гнойной хирургии (остеологии) университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

Наталья Юрьевна Орлинская – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник группы патологической анатомии университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

Дина Владимировна Давыденко – кандидат биологических наук, научный сотрудник отделения патологической анатомии университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета.

Author information

Vyacheslav N. Mitrofanov – Cand. Sci. (Med.), Orthopedic Traumatologist, Head of the Purulent Surgery Department, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<http://orcid.org/0000-0003-2046-3865>

Oleg P. Zhivtsov – Cand. Sci. (Med.), Orthopedic Traumatologist, Purulent Surgery Department, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<http://orcid.org/0000-0002-2809-1683>

Natalia Yu. Orlynskaya – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Pathology Research Group, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<http://orcid.org/0000-0003-2896-2968>

Dina V. Davydenko – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Pathology Department, University Clinic, Privolzhsky Research Medical University.

<http://orcid.org/0000-0002-8339-1291>

Памяти Татьяны Григорьевны Бархиной (1941–2018)



18 марта 2021 года Татьяне Григорьевне Бархиной – профессору, доктору медицинских наук, академику Российской академии естествознания – исполнилось бы 80 лет.

Т.Г. Бархина была одним из старейших научных сотрудников НИИ морфологии человека. В институт Татьяна Григорьевна пришла в 1965 году после окончания лечебного факультета 1-го ММА им. И.М. Сеченова, поступив в клиническую ординатуру по специальности «патологическая анатомия», а затем в этом же институте проходила аспирантуру по специальности «гистология» (специализация «электронная микроскопия»). С 1970 по 2018 год она работала в НИИ морфологии человека сначала младшим, затем старшим и ведущим научным сотрудником в лаборатории патологии клетки, а в последние годы была руководителем группы по исследованию клеточных взаимодействий. В 1971 году Т.Г. Бархина защитила кандидатскую диссертацию на тему «Ультраструктура поджелудочной железы при некоторых видах гипоксии и гипероксии», а в 1993-м – докторскую диссертацию на тему «Роль ферментов обмена циклических нуклеотидов в норме и при бактериально-вирусных поражениях».

Татьяна Григорьевна Бархина была высококвалифицированным специалистом, владеющим самыми современными методами морфологического исследования, включая различные методы электронной микроскопии, иммуногисто- и цитохимическими методами, методами выделения клеток и их мембран. В последние годы совместно с сотрудниками группы клеточных взаимодействий Татьяна Григорьевна занималась изучением морфофункциональных изменений органов и тканей при различных патологических состояниях, в том числе при инфекционных заболеваниях и аллергических состояниях. Т.Г. Бархина – автор и соавтор 217 научных работ, в том числе двух монографий, двух глав в руководстве для врачей «Внутриутробное развитие человека», одного авторского свидетельства. Ею создана классификация локализации ферментов обмена циклических

нуклеотидов в клеточных и субклеточных структурах в физиологических условиях, в онтогенезе и при патологии, а также представлена ультраструктурная диагностика ВИЧ-инфекции. Под ее руководством были выполнены и защищены три докторские диссертации и четыре кандидатские. Татьяна Григорьевна, будучи членом Европейского респираторного общества, представляла свои научные достижения на конгрессах этого общества во многих европейских странах. В 2007 году Т.Г. Бархина получила сертификат участника энциклопедии «Известные ученые».

В течение многих лет Т.Г. Бархина успешно возглавляла профсоюзную организацию НИИ морфологии человека, способствуя сплочению коллектива.

Татьяна Григорьевна была доброжелательным, обаятельным, общительным человеком, очень красивой женщиной с удивительной улыбкой, необыкновенными синими, излучающими свет глазами.

Сотрудники НИИ морфологии человека с большим уважением и теплотой вспоминают Татьяну Григорьевну Бархину. Сегодня мы все ощущаем потерю нашего ведущего научного сотрудника, коллеги и большого друга.

Л.М. Михалева,
профессор, доктор медицинских наук
Т.В. Безуглова,
кандидат биологических наук