

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 10 | № 2 | 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

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

Почетный 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

К публикации принимаются только статьи, подготовленные в соответствии с правилами редакции.
Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

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

CLINICAL AND EXPERIMENTAL MORPHOLOGY

SCIENTIFIC AND PRACTICAL PEER-REVIEWED JOURNAL

With the support of the Russian Society of Pathology

Volume 10 | No 2 | 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”

Tsyurupy st., 3,
Moscow, 117418, Russia

Editorial office address

Tsyurupy st., 3,
Moscow, 117418, 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

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

Honorary editor-in-chief

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

Deputies editors-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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mishnev, Olego 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

Editorial review board

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.



На заседании редакционной коллегии журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» 21 апреля 2021 года главным редактором журнала единогласно избрана Людмила Михайловна Михалева, доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии Научно-исследовательского института морфологии человека, внесшая большой вклад в организационную деятельность редколлегии и продвижение журнала в информационную базу Scopus.

Л.М. Михалева – создатель школы клинической морфологии. Область ее научных интересов – клиничко-морфологические аспекты воспалительных, опухолеподобных и опухолевых заболеваний, а также совершенствование критериев морфологической и молекулярно-генетической диагностики, внедрение результатов фундаментальных исследований в практическое здравоохранение. Под руководством Л.М. Михалевой проводится междисциплинарное изучение женского бесплодия, обусловленного хроническим эндометритом, урогенитальными инфекциями и эндометриозом, совершенствование технологии диагностики репродуктивного потенциала женщин в предгравидарном периоде. Разработаны алгоритмы ранней диагностики предраковых и раковых заболеваний органов пищеварения, оптимизирована диагностика раннего рака желудка и колоректального рака, усовершенствована клиничко-морфологическая диагностика хронического эндометрита, определены критерии ранней диагностики неопластической трансформации эндометриодных кистозных образований яичника. Она автор около 500 научных трудов: 330 статей, 4 монографий, 3 глав в книгах, а также 6 патентов. Людмила Михайловна является соавтором первого в России атласа «Патологическая анатомия COVID-19».

Mikhaleva Liudmila Mikhailovna was unanimously elected the editor-in-chief of the “Clinical and Experimental Morphology” journal at the editorial board meeting on April 21, 2021. Liudmila M. Mikhaleva is a Doctor of Medical Sciences, Professor, the Director of the Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Human Morphology”, and the Head of the Laboratory of Clinical Morphology at the same institution. She contributed a lot to organizing the work of the editorial board and the editors and the journal inclusion in the Scopus database.

Liudmila M. Mikhaleva is the founder of the clinical morphology school. Her research interests include clinical and morphological aspects of inflammatory diseases, tumor-like and neoplastic diseases as well as improving the criteria for morphological and molecular genetics diagnosis and the implementing the results of fundamental studies in practical healthcare. She guided interdisciplinary studies of female infertility caused by chronic endometritis, urogenital infections, and endometriosis and refine the pathology diagnosis for the female reproductive potential in the pre-conceptional period. She mastered the development of the diagnostic algorithms for precancerous and cancerous diseases of the digestive system; optimization of the morphological criteria to diagnose early gastric carcinoma and colorectal cancer; refinement of chronic endometritis clinical and morphological diagnosis; determination of the diagnostic criteria for early diagnosis of neoplastic transformation of ovarian endometrioid cysts. More than 500 papers including 330 articles, 4 monographs, 3 chapters in books, 6 patents have been received with her direct involvement. Liudmila Mikhailovna is a co-author of the first atlas in Russia “Pathology of COVID-19”.

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

- | | | |
|---|---|--|
| <i>И.В. Арутюнян, Т.К. Дубовая</i>
Криоконсервация тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины | 6 | <i>I.V. Arutyunyan, T.K. Dubovaya</i>
Cryopreservation of tissue-engineered constructs in regenerative medicine |
|---|---|--|

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCHES

- | | | |
|---|----|--|
| <i>I.V. Vasilenko, R.B. Kondratyuk, I.S. Grekov, A.M. Yarkov</i>
Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma | 13 | <i>И.В. Василенко, Р.Б. Кондратюк, И.С. Греков, А.М. Ярков</i>
Эпителиально-мезенхимальный переход в основных типах рака желудка |
| <i>Л.М. Михалева, А.Г. Коноплянников, Я.Ю. Кудрявцева, А.С. Оленев, Н.А. Грачева, А.Е. Бирюков, С.А. Михалев, Е.Н. Сонголова</i>
Экстрагенитальная неинфекционная патология в структуре материнской смертности г. Москвы | 21 | <i>L.M. Mikhaleva, A.G. Konoplyannikov, Y.Y. Kudryavtseva, A.S. Olenev, N.A. Gracheva, A.E. Biryukov, S.A. Mikhalev, E.N. Songolova</i>
Extragenital noninfectious pathology in the maternal mortality structure in Moscow |
| <i>О.В. Ковалева, А.Н. Грачев, П.А. Подлесная, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, Н.Ю. Соколов, З.З. Мамедли, Д.А. Кудлай, Н.Е. Кушлинский</i>
PU.1 – ядерный маркер иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы при колоректальном раке | 32 | <i>O.V. Kovaleva, A.N. Gratchev, P.A. Podlesnaya, M.A. Rashidova, D.V. Samoilova, N.Yu. Sokolov, Z.Z. Mamedli, D.A. Kudlay, N.E. Kushlinskii</i>
PU.1 is a nuclear factor of immunocompetent cells of tumor stroma in colorectal cancer |
| <i>Г.А. Демяшкин</i>
Морфологическая характеристика сперматогенеза у крыс после прицельного облучения разными дозами электронов | 40 | <i>G.A. Demyashkin</i>
Morphological features of spermatogenesis in rats after targeted irradiation with electrons of variable doses |
| <i>Е.С. Мишина, М.А. Затолокина, М.В. Мнихович</i>
Перестройка структурных компонентов дермы крысы в условиях дермотензии | 50 | <i>E.S. Mishina, M.A. Zatolokina, M.V. Mnikhovich</i>
Structural dermis remodeling in a skin expansion rat model |

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ CASE STUDIES

Г.А. Казарян, Д.В. Базаров, А.Ю. Григорчук,
А.А. Казарян, В.Ю. Савина, С.А. Леваков,
С.В. Пауков, А.Э. Мамедова, Г.Я. Азадова
Рецидивирующий напряженный катамениальный
пневмоторакс у пациентки с эндометриозом

57

G.A. Kazaryan, D.V. Bazarov, A.Yu. Grigorchuk,
A.A. Kazaryan, V. Yu. Savina, S.A. Levakov,
S.V. Paukov, A.E. Mamedova, G.Ya. Azadova
Recurrent catamenial tension pneumothorax
in a patient with endometriosis

МЕТОДЫ TECHNICAL NOTES

Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова,
К.А. Артемьева, А.Ю. Шелков
Оптимизация протокола получения культуры
дермальных фибробластов крыс

62

E.A. Ponomarenko, M.A. Diatroptova,
K.A. Artemyeva, A.Yu. Shelkov
Protocol optimization for obtaining the culture of rat
dermal fibroblasts

ЮБИЛЕИ ANNIVERSARIES

Андрей Петрович Милованов
(К 80-летию со дня рождения)

70

Andrey Petrovich Milovanov
on his 80th birthday

ХРОНИКА EVENTS

Всероссийская научная конференция
с международным участием
«Регенеративная биология и медицина»

71

All-Russian scientific conference
with international participation
“Regenerative Biology and Medicine”

РЕЦЕНЗИИ BOOK REVIEWS

Рецензия на монографию
Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов, Н.Ю. Двинских.
«Патоморфоз опухолей человека».

73

Review on the monograph
E.F. Lushnikov, A.Yu. Abrosimov, N.Yu. Dvinskikh
“Human tumor pathomorphosis”

Криоконсервация тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины

И.В. Арутюнян¹, Т.К. Дубовая²

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

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Трансплантация искусственно созданных тканей и органов становится частью нашей реальности. При этом исследователи вполне закономерно сталкиваются с общей для всех трансплантологов проблемой – необходимостью длительного хранения биомедицинского продукта (трансплантата) без потери его свойств. Принципиальная возможность криоконсервации клеток, адгезированных на поверхности различных носителей, была впервые показана около 20 лет назад, однако данные о технологии в целом до сих пор остаются несистематизированными и противоречивыми. Сравнение работ разных научных групп, занимающихся криоконсервацией тканеинженерных конструкций (ТИК), затруднено не только вследствие отсутствия стандартизованных протоколов, но и из-за различных подходов к оценке конечного результата. Целью настоящего обзора является анализ накопленного разными научными группами опыта криоконсервации ТИК с точки зрения разработки единых подходов к оценке эффективности метода, которые необходимы для дальнейшего развития данного направления регенеративной медицины. По мере накопления экспериментальных данных произошел принципиальный переход в оценке эффективности криоконсервации от выполнения минимальных требований к сохранности ТИК (ТИК после размораживания сохранила целостность, некоторая часть клеток жива и прикреплена к матриксу) к нацеленности на конечный результат (ТИК после размораживания сохранила свои функциональные свойства и готова к трансплантации). Множество используемых в настоящее время *in vitro* методов исследования, представленных в обзоре, позволяет искать новые пути повышения эффективности криоконсервации ТИК, однако, по нашему мнению, следующим этапом на пути внедрения технологии в клиническую практику должны стать исследования на экспериментальных животных.

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, криоконсервация, оценка эффективности

Для корреспонденции: Ирина Владимировна Арутюнян. E-mail: labrosta@yandex.ru

Для цитирования: Арутюнян И.В., Дубовая Т.К. Криоконсервация тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):6–12. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.2.6-12.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 20-02-00354.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 16.12.2020. Получена после рецензирования 20.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Cryopreservation of tissue-engineered constructs in regenerative medicine

I.V. Arutyunyan¹, T.K. Dubovaya²

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

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The transplantation of artificial tissues and organs is gradually becoming a part of our reality. At the same time, researchers are facing a problem common to all transplantologists, i.e. the need for a long-term storage of a biomedical product (transplant) without losing its properties. The possibility to cryopreserve cells adhered to various scaffolds' surface was first presented about 20 years ago. However, the data on the technology as a whole remains unsystematized and controversial. This review aimed to analyze the literature on tissue-engineered constructs (TEC) cryopreservation of different scientific groups to create a unified approach in assessing the technique's efficacy necessary for further regenerative medicine development. The comparison

of studies on TEC cryopreservation conducted by various research groups is hampered not only by the lack of standardized protocols but also by different approaches to assessing the result. As experimental data were accumulated, the cryopreservation efficacy was reassessed from meeting the basic requirements for the structure preservation (thawed TEC retains its integrity, cells are partially alive and attached to the matrix) to focusing on the final result (thawed TEC retains its functional properties and is ready to be transplanted). Many of the currently used *in vitro* research methods presented in the review allow one to look for new ways of increasing the TEC cryopreservation efficacy; however, in our opinion, the next step on the way to introducing the technology into clinical practice should be research on experimental animals.

Keywords: tissue engineered construction, cryopreservation, efficacy estimation

Corresponding author: Irina V. Arutyunyan. E-mail: labrosta@yandex.ru

For citation: Arutyunyan I.V., Dubovaya T.K. Cryopreservation of tissue-engineered constructs in regenerative medicine. Clin. exp. morphology. 2021;10(2):6–12. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.6-12 (In Russ.).

Funding. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 20-02-00354.

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

Received 16.12.2020. **Received in revised form** 20.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Мы живем в удивительное с точки зрения возможностей регенеративной медицины время: уже сейчас биотехнологи способны создавать в научных лабораториях эквиваленты кожи [1], хряща [2], костной [3], мышечной [4] и других тканей или целых органов [5, 6], состоящие из живых клеток и искусственного внеклеточного матрикса, которому можно задать конкретные физико-механические свойства. Аналитики говорят о наступлении новой эры в развитии тканевой инженерии, когда на первое место ставится не решение экспериментальной научной задачи, а конкретные потребности пациента, которые можно удовлетворить за счет трансплантации стандартизованного высокотехнологичного медицинского продукта [7].

Одной из причин, тормозящих развитие этой области медицины, являются высокие материальные и временные затраты на создание тканеинженерных конструкций (ТИК) и их доставку из специализированных лабораторий к пациенту. Персонализированные варианты имплантатов требуют проведения забора биоматериала у пациента, выделения, наращивания и характеристики аутогенных клеток, заселения матрикса-носителя, что может занимать до нескольких месяцев работы высококвалифицированных специалистов. В то же время при определенных состояниях реципиента (получившего, например, обширную травму кожи или другого органа) время, прошедшее от повреждения до трансплантации, играет решающую роль. В таких случаях допустимо применение ТИК с охарактеризованными донорскими (аллогенными) клетками, при этом оптимальным является использование биомедицинского продукта с продолжительным сроком годности (в англоязычной литературе – long shelf-life). Увеличение сроков хранения и возможность транспортировки ТИК к пациенту считаются необходимым условием коммерциализации данной области медицины, а следовательно, и ее дальнейшего развития [8].

В процессе подготовки ТИК возникает несколько возможностей для сохранения (в англоязычной литературе – preservation opportunities) [9], одна из которых –

криоконсервация готовой конструкции. Первые успешные работы в этом направлении были проведены около 20 лет назад, число публикаций по данной тематике растет, однако общее представление о возможностях метода до сих пор не сложилось. В первую очередь это связано с огромным разнообразием объектов исследования: научные группы работают с ТИК, отличающимися по клеточному составу (клеточные линии и первичные культуры, выделенные из разных тканей человека и животных), химическому составу и структуре скаффолда (матрикса-носителя), протоколам культивирования и криоконсервации. Больше того, не существует общепринятой методики оценки конечного результата, которая бы позволила сравнить эффективность этих протоколов. Если проанализировать работы по данной теме в историческом разрезе, становится очевидно, что сейчас уже недостаточно тех двух показателей – оценки доли выживших клеток и доли адгезированных клеток, – которыми пользовались исследователи в самом начале пути. Современные работы опираются не на формальный подход (ТИК после размораживания сохранила структуру, часть клеток жива и прикреплена к матриксу), а на конечный результат (ТИК после размораживания сохранила свои функциональные свойства и готова к трансплантации).

Целью настоящего обзора является анализ накопленного разными научными группами опыта криоконсервации ТИК с точки зрения разработки единых подходов к оценке эффективности метода, которые необходимы для дальнейшего развития данного направления регенеративной медицины.

Особенности криоконсервации ТИК

Криоконсервацию суспензий клеток, фрагментов тканей или даже целых органов в настоящее время можно считать рутинной процедурой: во всем мире успешно функционирует множество специализированных криобанков, которые в соответствии с отработанными протоколами обеспечивают безопасное хранение миллионов биообразцов с целью их дальнейшего экспериментального или клинического применения [10].

В то же время криоконсервация ТИК пока находится на стадии активного исследования, поэтому стандартизованных протоколов нет и хранение обеспечивают не криобанки, а научно-исследовательские лаборатории. Связано это с тем, что в отличие от клеток и тканей продукт хранения необходимо сначала создать (ориентируясь на решение конкретной клинической задачи) и охарактеризовать, что требует скоординированной работы клиницистов и специалистов в области производства биоматериалов и тканевой инженерии.

Принято считать, что ТИК состоит из трех основных компонентов – скаффолда, биологически активного компонента (факторы роста, цитокины и т.д.), зачастую импрегнированного в скаффолд, и клеточного компонента [6, 9]. Тем не менее во всех работах, опубликованных к настоящему времени, исследуется криоконсервация ТИК без включения биологически активных компонентов, то есть состоящих только из скаффолда и клеток. Такое упрощение, на наш взгляд, допустимо в начале исследовательского пути, но обязательно должно быть устранено в будущем.

Наиболее явное отличие ТИК по сравнению с суспензией клеток/кластеров клеток – их размер: объем отдельной единицы замораживаемого объекта варьирует в пределах от 0,05 мм³ для ТИК на основе микросфер [11] до 150 мм³ для ТИК на основе пористых носителей [12], в то время как для клеточных суспензий данный параметр не превышает 0,015 мм³ (примерный объем одного островка Лангерганса). Какие особенности процесса криоконсервации ТИК из этого следуют? Во-первых, крупный размер образца приводит к тому, что криопротекторная среда неравномерно распределена в его толще: адгезированные в глубине клетки не в полной мере защищены от криоповреждения вследствие низкой концентрации протектора, а клетки на поверхности могут быть подвергнуты токсическому действию криопротектора, особенно при использовании его высокой концентрации при витрификации. Во-вторых, для крупных объектов намного сложнее достигнуть требуемой для успешной криоконсервации оптимальной скорости охлаждения и нагревания. В-третьих, такой температурный градиент может привести к изменению линейных размеров скаффолда (неравномерное расширение или сжатие), что негативно скажется на адгезии клеток. И наконец, крупные размеры ТИК требуют поиска новых прикладных решений для создания стандартизованного протокола криоконсервации (подбор криопосуды, удаление криопротектора из всего объема скаффолда и т.д.). Однако мы уверены, что перечисленные трудности вполне решаемы на современном уровне развития криотехнологии, хотя и требуют тщательного анализа и отработки протоколов.

Накопленный опыт и нерешенные вопросы криоконсервации ТИК

На сегодняшний день опубликовано достаточно много работ по криоконсервации ТИК, большинство из

которых посвящено решению поставленных клиницистами конкретных задач – созданию и длительному хранению искусственных эквивалентов дермы, костной и хрящевой ткани. При этом многообразие предложенных экспериментальными лабораториями конструкций огромно. К примеру, в качестве клеточного компонента могут быть использованы как иммортализованные линии (мышинные миобласты C2C12 [13], мышинные фибробласты NIH/3T3 [14], человеческие остеобластоподобные клетки остеосаркомы SaOS-2 [11] и т.д.), так и первичные культуры клеток (остеобласты кролика [11], хондроциты телят [15], мультипотентные стромальные клетки (МСК) человека, выделенные из костного мозга [16], жировой ткани [12], пуповины [17], синовиальной жидкости [18]). В качестве скаффолда применяют материалы на основе полиуретана и полистирола [13], поликапролактона [19, 20], полилактида [15], полилактогликолида [11], гидроксипапатита [21], фиброина шелка [17], коллагена [12], альгината и хитозана [16], обогащенной тромбоцитами плазмы крови [18], а также децеллюляризованную ткань, например пищевод крысы [22] или частично деминерализованный свиной костный матрикс [23]. Носители могут быть изготовлены в форме нетканого волокнистого материала [13, 17, 20], монолитных [12] и пористых матриксов [12, 14, 15, 21, 23], тонких пленок [11], гидрогелей [18] и микросфер [11, 16]. В зависимости от вида носителя используют различные методы его заселения клетками: статичный [11–13, 17, 19–21, 23], динамический [15, 16], метод погружения при полимеризации геля [18] или при центрифугировании [14], а также множественные инъекции суспензии клеток в ткань [22].

Помимо перечисленных выше параметров (тип клеток, химический состав и структура скаффолда, способ соединения компонентов) отличаются и протоколы культивирования (длительность роста клеток на матриксе до замораживания, использование ростовой или дифференцировочных сред), а также протоколы криоконсервации (контролируемое медленное охлаждение или витрификация, состав криозащитных сред, длительность хранения до размораживания).

Такое многообразие объектов и методов исследования должно в конечном счете помочь ответить на, казалось бы, простые, но важные для дальнейшего развития данного направления биотехнологии вопросы. Какой протокол замораживания выбрать? Какой криопротекторный раствор менее токсичен? Как максимально полно удалить его из ТИК перед трансплантацией? Когда нужно индуцировать дифференцировку клеток в составе ТИК: до замораживания или после? Как влияет на эффективность криоконсервации архитектура скаффолда (например, геометрия волокон нетканого матрикса или размер пор у вспененных скаффолдов)? Будет ли получившийся биомедицинский продукт (ТИК после размораживания) безопасным и эффективным? Понятно, что каждое опубликованное на данный мо-

мент исследование дает ответы на эти вопросы только в отношении какой-то конкретной ТИК, однако по мере накопления данных в будущем можно будет сделать обобщающие выводы и разработать на их основе методические рекомендации.

Оценка эффективности криоконсервации ТИК

Сравнение работ разных научных групп, занимающихся криоконсервацией ТИК, затруднено не только вследствие отсутствия стандартизованных протоколов, но и из-за различных подходов к оценке конечного результата.

Если проанализировать публикации, можно заметить, что в самом начале исследовательского пути было достаточно подтверждения минимальной сохранности ТИК: (1) матрикс не изменил свои основные физические свойства, (2) часть клеток жива, (3) часть клеток адгезирована на матриксе. Для качественной оценки состояния ТИК после размораживания обычно применяют сканирующую электронную микроскопию [11, 13, 16, 17, 19, 20, 23] или флуоресцентную микроскопию после окрашивания клеток кальцеином АМ и бромидом этидия (или иными маркерами клеток с поврежденной мембраной) [12, 16, 18, 20, 21, 23], а для количественной оценки – метод прямого подсчета клеток с помощью цитометра (при этом можно использовать окрашивание трипановым синим для выявления погибших клеток). Применившие данный метод в своей работе Miyoshi et al. предложили ввести следующие количественные параметры: (1) эффективность иммобилизации (англ. immobilization efficiency), оцениваемая как отношение количества живых клеток, заселивших ТИК, к количеству живых клеток, использованных для заселения; (2) эффективность восстановления (англ. recovery rate), оцениваемая как отношение количества живых клеток после криоконсервации к количеству живых клеток до криоконсервации; (3) общая эффективность (англ. overall efficiency), оцениваемая как отношение количества живых клеток в составе ТИК после размораживания к количеству живых клеток, использованных для заселения [14].

Также для определения долей живых/погибших клеток удобен метод проточной цитометрии с применением красителей, связывающихся с нуклеиновыми кислотами или белками (например, иодидом пропидия, 7-AAD и т.д.), которые отличают живые клетки от погибших по степени целостности мембраны [17], однако для данного способа необходимо предварительное открепление всех клеток от скаффолда, что может быть затруднено в случае использования объемных носителей. Больше того, длительное воздействие диссоциирующих ферментов может повлиять на экспрессию поверхностных антигенов или даже вызвать гибель клеток, поэтому для выделения клеточной суспензии из готовой конструкции, как и из нативной ткани, рекомендуется использовать более мягкие коммерческие коктейли аккутазу или TrypLE [24].

При необходимости оценить жизнеспособность клеток, не открепляя их от матрикса, исследователи в более ранних работах проводили колориметрический МТТ-тест (этот метод стал золотым стандартом для определения жизнеспособности и пролиферативной активности клеток почти сразу после своего появления в 1980-х годах [25]) или его аналоги (ХТТ, МТС, ССК, WST и т.д.), также основанные на способности ферментов живых клеток восстанавливать соли тетразолия до формазановых красителей, но при этом более удобные в работе и обладающие большей чувствительностью и меньшей цитотоксичностью [11, 18, 19, 26]. Похожий принцип действия лежит в основе Alamar Blue-теста, в процессе которого живые клетки восстанавливают синий краситель резазурин до красного флуоресцирующего резорурфина, что позволяет применять для оценки результата ридеры в режиме абсорбции или флуоресценции [15, 20].

Действительно, это простые, доступные и релевантные методы, которые отлично подходят для оценки жизнеспособности культур, растущих на стандартной культуральной подложке, однако для клеток, адгезированных на 3D скаффолде, их нельзя назвать оптимальными. Дело в том, что структура скаффолда может влиять на биодоступность реактивов для клеток, расположенных в глубине носителя, а сам краситель – взаимодействовать с материалом скаффолда (например, коллагеном) [27]; следовательно, сравнение жизнеспособности клеток, адгезированных на различных по своей структуре или составу матриксах, будет некорректным. Больше того, все перечисленные методы основаны на ферментативной конверсии субстрата, а значит, на результат могут повлиять многие факторы, в том числе нарушения энергетического обеспечения клеток, изменения активности ферментов, процессов эндо-/экзоцитоза и внутриклеточного транспорта [28]. Очевидно, что воздействие криопротекторов и сверхнизких температур является стрессом для клеток, при этом последствия такого воздействия нельзя однозначно предсказать: к примеру, преинкубация гепатоцитов человека в охлажденной до +4°C среде, содержащей 1% ДМСО, в течение 90 минут перед замораживанием не повлияла на выживаемость клеток и их адгезивные свойства после размораживания, но значимо увеличила показатели МТТ-теста (на 29,7% по сравнению с контролем, $p < 0,01$) [29]. Таким образом, чтобы избежать неверной интерпретации результатов, подобные тесты следует использовать для определения метаболической активности клеток (англ. cell metabolic activity) ТИК после размораживания (как это делается в более современных работах [13, 16, 17]), а для оценки жизнеспособности клеток (англ. cell viability) релевантными можно считать не зависящие от активности ферментов тесты, например окрашивание нейтральным красным (метод основан на способности живых клеток накапливать этот слабый катионный краситель в лизосомах) или сульфородамино В (метод основан на способ-

ности красителя стехиометрически связываться с белками) [26, 30, 31].

По поводу оценки клеточной жизнеспособности или метаболической активности можно сделать еще одно важное замечание: нет каких-либо строгих временных рамок для проведения данных исследований, то есть время, прошедшее от размораживания ТИК до первого измерения, может варьировать от 0 часов (сразу после размораживания) [13] до 24 часов [11, 20] или даже нескольких суток [17]. На наш взгляд, измерение данных показателей в динамике более информативно, так как позволяет оценить время, требуемое для восстановления исходных свойств ТИК. Так, например, было показано, что сразу после размораживания суммарная метаболическая активность C2C12 миобластов, адгезированных на полиуретановом или полистироловом скаффолде, составляет около 40% от исходных показателей (ТИК до замораживания), а через 24 часа возрастает до 80% [13].

Динамика восстановления свойств ТИК после размораживания имеет огромное значение: именно это определяет принципиальный переход в оценке эффективности криоконсервации от выполнения минимальных условий (ТИК после размораживания сохранила целостность, некоторая часть клеток жива и прикреплена к матриксу) к нацеленности на конечный результат (ТИК после размораживания сохранила свои функциональные свойства и готова к трансплантации). Для оценки функциональных свойств ТИК после процедуры замораживания/оттаивания в современных работах проводят дополнительные исследования, которые можно разделить на несколько групп.

1. Подтверждение сохранности физико-механических свойств скаффолда. В качестве примера можно привести измерение предела прочности на разрыв и процента относительного удлинения [17], оценку пористости образца и шероховатости его поверхности, проведение механического теста на сжатие [19]. Необходимость данных исследований обусловлена тем, что проникающие криопротекторы потенциально способны влиять на материал скаффолда, так как многие из них (ДМСО, формамид, этиленгликоль) являются полярными органическими растворителями и могут при определенных условиях стимулировать деградацию полимера или вызывать изменения морфологии поверхности [32, 33].

2. Подтверждение сохранности функциональных свойств клеток. Чаще всего это оценка пролиферативной активности адгезированных на носителе клеток по уровню экспрессии гена *ki67* [16] или увеличению количества клеток, измеряемому в динамике по их суммарной метаболической активности [17] либо общему содержанию ДНК в ТИК с помощью реактивов PicoGreen [15, 16, 19, 20] или Hoechst [14, 23]. В случае использования МСК в качестве клеточного компонента ТИК считается необходимым подтвердить их мультипотентность: способность к направленной дифферен-

цировке *in vitro* в остеогенном, и/или хондрогенном, и/или адипогенном направлении [16–18].

3. Выявление изменений внутри клеток. В качестве параметра, отражающего состояние адгезированных на скаффолде клеток после процедуры размораживания, было предложено, например, оценивать строение их цитоскелета, в частности актиновых микрофиламентов. F-актин в значительной степени определяет форму клетки и ее передвижение по поверхности носителя и располагается преимущественно у внешней мембраны, поэтому в процессе криоконсервации подвергается воздействию внеклеточного льда и механической деформации подложки, что может приводить к его деполимеризации или локальной аккумуляции [17].

4. Выявление причин гибели клеток, например вследствие апоптоза либо нарушения целостности мембран [18], что определяет спектр образующихся постклеточных продуктов и индуцируемый ими иммунный ответ реципиента.

Изучение *in vitro* процессов, происходящих при замораживании/оттаивании ТИК, несомненно, поможет в поиске путей повышения эффективности криоконсервации конструкций, например за счет дополнительного покрытия скаффолдов факторами адгезии, подбора коктейля криопротекторов с наименьшими цитотоксическими свойствами, создания оптимального протокола охлаждения и т.д. Тем не менее следует помнить, что конечная цель исследований – получение биомедицинского продукта, который после размораживания (сразу или через определенное время) готов к трансплантации, обеспечивая при этом должный уровень безопасности и эффективности. Результаты трансплантации криоконсервированных ТИК лабораторным животным на данный момент в научной литературе нет. Будет ли отличаться функциональность свежеприготовленной и размороженной ТИК в месте имплантации (например, интенсивность миграции клеток в окружающие ткани, скорость резорбции матрикса и динамика его интеграции с собственными тканями реципиента, эффективность замещения поврежденных тканей, выраженность иммунного ответа и т.д.)? Именно эксперименты *in vivo* должны, по нашему мнению, ответить на этот вопрос и в итоге подтвердить эффективность технологии криоконсервации ТИК.

Заключение

Разработка эффективной технологии криоконсервации тканеинженерных конструкций может стать важным этапом развития регенеративной медицины благодаря повышению доступности высокотехнологичных биомедицинских продуктов. За прошедшие почти два десятилетия исследований в этой области накоплен значительный эмпирический материал, однако данные о технологии в целом до сих пор остаются несистематизированными и противоречивыми. Сравнение работ разных научных групп, занимающихся криоконсервацией тканеинженерных конструкций, затруднено не

только вследствие отсутствия стандартизованных протоколов, но и из-за различных подходов к оценке конечного результата. В то же время по мере накопления экспериментальных данных произошел принципиальный переход в оценке эффективности криоконсервации от выполнения минимальных требований к сохранности тканеинженерных конструкций (ТИК после размораживания сохранила целостность, некоторая часть клеток жива и прикреплена к матриксу) к нацеленности на конечный результат (ТИК после размораживания сохранила свои функциональные свойства и готова к трансплантации). Множество используемых в настоящее время *in vitro* методов исследования позволяет искать новые пути повышения эффективности криоконсервации тканеинженерных конструкций, однако, по нашему мнению, следующим этапом на пути внедрения технологии в клиническую практику должны стать исследования на экспериментальных животных.

Литература/References

- Rahmani Del Bakhshayesh A, Annabi N, Khalilov R, Akbarzadeh A, Samiei M, Alizadeh E et al. Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018;46(4):691–705. DOI: 10.1080/21691401.2017.1349778.
- Fu L, Yang Z, Gao C, Li H, Yuan Z, Wang F et al. Advances and prospects in biomimetic multilayered scaffolds for articular cartilage regeneration. *Regen Biomater.* 2020;7(6):527–42. DOI: 10.1093/rb/rbaa042.
- Ansari M. Bone tissue regeneration: Biology, strategies and interface studies. *Prog Biomater.* 2019;8(4):223–37. DOI: 10.1007/s40204-019-00125-z.
- Gilbert-Honick J, Grayson W. Vascularized and innervated skeletal muscle tissue engineering. *Adv Healthc Mater.* 2020;9(1):e1900626. DOI: 10.1002/adhm.201900626.
- Zhang YS, Yue K, Aleman J, Moghaddam KM, Bakht SM, Yang J et al. 3D Bioprinting for tissue and organ fabrication. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):148–63. DOI: 10.1007/s10439-016-1612-8.
- Hoffman T, Khademhosseini A, Langer R. Chasing the paradigm: Clinical translation of 25 years of tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2019;25(9–10):679–87. DOI: 10.1089/ten.TEA.2019.0032.
- Geris L, Papantonou I. The third era of tissue engineering: Reversing the innovation drivers. *Tissue Eng Part A.* 2019;25(11–12):821–6. DOI: 10.1089/ten.TEA.2019.0064.
- Brockbank KGM. Tissue Engineering Constructs and Commercialization. In: *Madame Curie Bioscience Database.* Austin (TX): Landes Bioscience; 2000–2013. Bookshelf ID: NBK6008. Brockbank KGM. Tissue. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6008/>
- Wang S, Elliott GD. Preservation strategies that support the scale-up and automation of tissue biomanufacturing. *Curr Stem Cell Rep.* 2018;4:138–48. DOI: 10.1007/s40778-018-0126-8.
- Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.* 2017;6(1):12–8. DOI: 10.1016/j.imr.2016.12.001.
- Kofron MD, Opsitnick NC, Attawia MA, Laurencin CT. Cryopreservation of tissue engineered constructs for bone. *J Orthop Res.* 2003;21(6):1005–10. DOI: 10.1016/S0736-0266(03)00103-7.
- Petrenko YA, Petrenko AY, Martin I, Wendt D. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts. *Cryobiology.* 2017;76:150–3. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.001.
- Batnyam O, Suye S, Fujita S. Direct cryopreservation of adherent cells on an elastic nanofiber sheet featuring a low glass-transition temperature. *RSC Adv.* 2017;7:51264–71. DOI: 10.1039/C7RA10604A.
- Miyoshi H, Ehashi T, Ohshima N, Jagawa A. Cryopreservation of fibroblasts immobilized within a porous scaffold: Effects of pre-culture and collagen coating of scaffold on performance of three-dimensional cryopreservation. *Artif Organs.* 2010;34(7):609–14. DOI: 10.1111/j.1525-1594.2009.00933.x.
- Farooque TM, Chen Z, Schwartz Z, Wick TM, Boyan BD, Brockbank KG. Protocol development for vitrification of tissue-engineered cartilage. *Bioprocessing.* 2009;8(4):29–36. DOI: 10.12665/j84.brockbank.
- Wu Y, Wen F, Gouk SS, Lee EH, Kuleshova L. Cryopreservation strategy for tissue engineering constructs consisting of human mesenchymal stem cells and hydrogel biomaterials. *Cryo Letters.* 2015;36(5):325–35. PMID: 26574680.
- Bissoyi A, Pramanik K, Panda NN, Sarangi SK. Cryopreservation of hMSCs seeded silk nanofibers based tissue engineered constructs. *Cryobiology.* 2014;68(3):332–42. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.008.
- Gurruchaga H, Saenz Del Burgo L, Garate A, Delgado D, Sanchez P, Orive G et al. Cryopreservation of human mesenchymal stem cells in an allogeneic bioscaffold based on Platelet Rich Plasma and synovial fluid. *Sci Rep.* 2017;7(1):15733. DOI: 10.1038/s41598-017-16134-6.
- Costa PF, Dias AF, Reis RL, Gomes ME. Cryopreservation of cell/scaffold tissue-engineered constructs. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(11):852–8. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0649.
- Wen F, Magalhães R, Gouk SS, Bhakta G, Lee KH, Huttmacher DW et al. Vitreous cryopreservation of nanofibrous tissue-engineered constructs generated using mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009;15(1):105–14. DOI: 10.1089/ten.tec.2008.0237.
- Liu BL, Mcgrath J, McCabe L, Baumann M. Cellular response of murine osteoblasts to cryopreservation: the influence of attachment to hydroxyapatite (HA) scaffolds. *Afr J Biotechnol.* 2006;5(21):2014–9. DOI: 10.5897/AJB06.202.
- Urbani L, Camilli C, Phylactopoulos DE, Crowley C, Natarajan D, Scottoni F et al. Multi-stage bioengineering of a layered oesophagus with in vitro expanded muscle and epithelial adult progenitors. *Nat Commun.* 2018;9(1):4286. DOI: 10.1038/s41467-018-06385-w.
- Yin H, Cui L, Liu G, Cen L, Cao Y. Vitreous cryopreservation of tissue engineered bone composed of bone marrow mesenchymal stem cells and partially demineralized bone matrix. *Cryobiology.* 2009;59(2):180–7. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.06.011.
- Reichard A, Asosingh K. Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry. *Cytometry A.* 2019;95(2):219–26. DOI: 10.1002/cyto.a.23690.

25. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
26. *van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD.* Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8:47. DOI:10.1186/s13104-015-1000-8.
27. *Bonnier F, Keating ME, Wróbel TP, Majzner K, Baranska M, Garcia-Munoz A et al.* Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(1):124–31. DOI:10.1016/j.tiv.2014.09.014.
28. *Stepanenko AA, Dmitrenko VV.* Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015;574(2):193–203. DOI:10.1016/j.gene.2015.08.009.
29. *Solanas E, Sostres C, Serrablo A, García-Gil A, Aranguren F, Jimenez P et al.* Incubation with dimethyl sulfoxide prior to cryopreservation improves functionality of thawed human primary hepatocytes. *Biopreserv Biobank.* 2012;10(5):446–53. DOI:10.1089/bio.2012.0015.
30. *Ates G, Vanhaecke T, Rogiers V, Rodrigues RM.* Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. *Methods Mol Biol.* 2017;1601:19–26. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9_2.
31. *Orellana EA, Kasinski AL.* Sulforhodamine B (SRB) assay in cell culture to investigate cell proliferation. *Bio Protoc.* 2016;6(21):e1984. DOI: 10.21769/BioProtoc.1984.
32. *Zhang X, Yang L, Zhang C, Liu D, Meng S, Zhang W et al.* Effect of polymer permeability and solvent removal rate on in situ forming implants: Drug burst release and microstructure. *Pharmaceutics.* 2019;11(10):520. DOI:10.3390/pharmaceutics11100520.
33. *Pashley DH, Carvalho RM, Tay FR, Agee KA, Lee KW.* Solvation of dried dentin matrix by water and other polar solvents. *Am J Dent.* 2002;15(2):97–102. PMID: 12092999.

Информация об авторах

Ирина Владимировна Арутюнян – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Татьяна Клеониковна Дубовая – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Author information

Irina V. Arutyunyan – Cand. Sci. (Biol), Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology.
<https://orcid.org/0000-0002-4344-8943>

Tatiana K. Dubovaya – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Histology, Embryology and Cytology, Pirogov Russian National Research Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-7936-180X>

Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma

I.V. Vasilenko, R.B. Kondratyuk, I.S. Grekov, A.M. Yarkov

M. Gorky Donetsk National Medical University, Donetsk

Introduction. The rapid development of basic science enabled us to significantly expand our understanding of various intercellular interactions. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is known to play a key role in certain tissue formation in the embryonic period. However, recent data show that EMT can also be observed in some pathological conditions, in particular, in various neoplasm development. This suggests that there are a number of alternative and fundamentally new mechanisms for the tumor formation and progression. Thus, EMT, which occurs in carcinomas, increases the invasiveness, immunoresistance, immunity to therapy, and the metastatic potential. Knowledge of EMT features and their timely recognition in morphological tumor diagnosis is of great predictive importance for patients. The aim of the research was to study the morphological features of epithelial-mesenchymal transition in the main types of gastric cancer.

Materials and methods. We studied specimens of gastric carcinomas (N=64) including 31 cases of diffuse type, 19 cases of intestinal type, and 14 cases of mixed type.

Results. All cases of the diffuse carcinoma group showed spread EMT features, which appeared already in the mucosa and completed with positive vimentin expression in 93.5% of cases. The malignant cell proliferative activity was low; however, in 29% of cases we detected areas of moderate or even high activity. In the intestinal type gastric cancer, EMT developed as a result of tumor progression, it arose more often in the deeper layers and was incomplete and focal. As a rule, the proliferative activity of tumor cells was high and moderate. Vascular invasion occurred more often in diffuse type (90.3%), less often in mixed type (71.4%), and even less often in the intestine type (55.8%) gastric carcinoma.

Conclusion. The variety of morphological features of EMT, its frequency, prevalence, completeness, and sequence in the development of various types of gastric cancer determines the features of their clinical manifestation and influences their further management.

Keywords: gastric cancer, diagnosis, histological main types, EMT, morphopathology

Corresponding author: Ilya S. Grekov. E-mail: ilya.grekov.1998@gmail.com

For citation: Vasilenko I.V., Kondratyuk R.B., Grekov I.S., Yarkov A.M. Epithelial-mesenchymal transition in main types of gastric carcinoma. 2021;10(2):13–20. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.13-20.

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

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

Received 15.12.2020. **Received in revised form** 25.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

УДК: 616.33-006.3-018.7-091.8

Эпителиально-мезенхимальный переход в основных типах рака желудка

И.В. Василенко, Р.Б. Кондратюк, И.С. Греков, А.М. Ярко

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

Введение. Стремительное развитие фундаментальной медицины позволило значительно расширить наши представления о различных межклеточных взаимодействиях. Известно, что эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) играет ключевую роль при формировании некоторых тканей в эмбриональном периоде. Тем не менее, по последним данным, процессы ЭМТ могут наблюдаться и при некоторых патологических состояниях, в частности при развитии разных новообразований. Это наталкивает на мысль, что существует целый ряд альтернативных и принципиально новых механизмов формирования и прогрессии опухолевых заболеваний. Так, ЭМТ, возникающая при карциномах, усиливает инвазивность, иммунорезистентность, невосприимчивость к терапии и метастатический потенциал последних. Знание особенностей подобных трансформаций и своевременное распознавание таких процессов при морфологической диагностике опухолей очень предиктивно значимы для пациентов. Целью настоящего исследования является изучение морфологических особенностей

эпителиально-мезинхимального перехода в основных типах рака желудка.

Материалы и методы. Изучены образцы 64 случаев рака желудка: 31 случай диффузного типа, 19 случаев кишечного типа и 14 случаев смешанного типа.

Результаты. Во всех случаях диффузного рака наблюдались признаки распространенной ЭМТ, которая появляется уже в слизистом слое и в 93,5% случаев завершается экспрессией виментина. Пролиферативная активность злокачественных клеток была низкой, но в 29% случаев отмечались участки умеренной или даже высокой активности. При кишечном типе рака желудка ЭМТ развивается в результате прогрессии опухоли, чаще в более глубоких слоях, и носит неполный и очаговый характер. Пролиферативная активность опухолевых клеток была, как правило, высокой и умеренной. Сосудистая инвазия чаще встречалась при раке диффузного типа (90,3%), реже – при раке смешанного типа (71,4%) и еще реже – при кишечном типе рака желудка (55,8%).

Выводы. Разнообразие морфологических особенностей ЭМТ, ее частота, распространенность, полнота и последовательность в развитии при различных видах рака желудка определяют особенности их клинического проявления.

Ключевые слова: рак желудка, диагностика, основные гистологические типы, ЭМТ, морфология

Для корреспонденции: Илья Сергеевич Греков. E-mail: ilya.grekov.1998@gmail.com

Для цитирования: Василенко И.В., Кондратюк Р.Б., Греков И.С., Ярков А.М. Эпителиально-мезинхимальный переход в основных типах рака желудка. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):13–20 (англ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.13-20.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 15.12.2020. **Получена после рецензирования** 25.01.2021. **Принята в печать** 11.02.2021.

Introduction

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) occurs during embryonic development, organogenesis, regeneration (wound healing), chronic inflammation with organ fibrosis, and in neoplasms [1–6]. The basic nature of this process is the loss of main epithelial features such as cell-cell adhesion, spindle shape acquisition by epithelial cells, diminished expression of cytokeratins, emerging capacity to express vimentin, and α -smooth muscle actin (α -SMA) with ability to migrate.

EMT drastically enhances carcinoma invasiveness and its metastatic potential, increases cellular viability preventing cells from apoptosis and aging, and also provides them with stem cell features, immunoresistance, and unresponsiveness to radiation and chemotherapy, which leads to aggressive behavior of these tumors [4, 6, 7]. Many routine cancer treatments may stimulate EMT and enhance invasion and metastasis [8].

Therefore, in tumor morphologic diagnosis, it is important to establish the EMT presence, its spread, and completeness. Completeness means that a cell not only diminishes or loses its epithelial features, but also gains those of mesenchymal tissues such as vimentin and α -SMA expression, and cell discohesion and motility [9, 10].

P. Lauren classification (1965) subdivides gastric carcinomas into 2 main histological types: diffuse and intestinal [11]. The so-called mixed type carcinoma has features of both types. These carcinomas differ in their etiology, pathogenesis, morphology, and presumably EMT specificities. Initially, gastric carcinoma develops in the mucosa with subsequent invasion into the submucosa, the muscularis propria, and the subserosa. That allows an investigator

to monitor the effects of morphological changes, including EMT features, as the tumor progresses.

Materials and methods

We studied specimens of 64 patients with gastric carcinomas, including 31 of diffuse type, 19 of intestinal type, and 14 of mixed type. Gross examination and sampling were performed: we excised strips from cardiac to pyloric margin of the tumors measuring approximately 1 cm in width and comprising the entire gastric wall thickness. The strips were consequently cut in pieces and fixed in formalin. The slides were made from paraffin-embedded blocks with subsequent staining with hematoxylin and eosin and alcian blue at a pH of 1.0 and 2.5 to detect sulfated and non-sulfated mucins. The PAS reaction was also performed. We used single pieces from both the center and the periphery of the tumors to assay them immunohistochemically. The specimens were cut into 4- μ m sections, subsequently deparaffinized in xylene, and hydrated. After PBS rinsing, endogenous peroxidase activity was blocked by 3% hydrogen peroxide in 100% methanol. The slides were incubated with diluted anti-E-cadherin antibody, AE1/AE3, cytokeratin 18, vimentin, α -SMA, Ki-67, and then secondary antibody. We utilized the visualization system EnVision FLEX (Dako, Copenhagen, Denmark).

Two criteria were used to evaluate EMT: prevalence (focal and widespread) and completeness. Incomplete EMT was accompanied by the loss of cell communication, change in shape to a fibroblast-like, decrease in or absence of epithelial marker expression (AE1/AE3, SC18, and E-cadherin), and complete acquisition of mesenchymal marker expression (vimentin and/or α -SMA).

By the presence of tumor emboli in the vessels, we assessed the tumor invasive potential, based on the work of T. Mita, T. Shimoda (2001), according to which tumor invasion of the lymphatic vessels in gastric cancer (GC) was the most significant determinant (OR 8.68) for lymph node metastases, which dramatically worsens the prognosis [12]. The invasiveness was compared with the EMT presence, its prevalence, and completeness. The proliferative activity index (Ki-67 expression) was estimated semi-quantitatively as weak (up to 15% positively stained cells), moderate (up to 40%), and high (above 40%).

Statistical processing was performed in the MedStat package using basic methods of mathematical statistics. Statistical analysis of the indicators obtained as a result of processing stabilograms showed that their distribution differed from normal (at the level of $p < 0.001$), in accordance with which, when conducting further statistical analysis, nonparametric criteria were used. The reliability of the relationship or differences in the indicators (p) were determined, and the nonlinear Kendall correlation coefficient (Tau) was used to assess the degree and reliability of the relationship between two related samples.

Results

Patients with main histological types of GC differed in age: 42% of diffuse type patients were fewer than 50 years old, but, at the same time, intestinal and mixed type patients comprised 21.4% and 21% in this age group, respectively.

All cases of diffuse GC showed the spread of EMT features. In the gastric mucosa, the tumor diffusely exhibited detachment of malignant cells from each other. Small areas where the connection between the cells was preserved in the deeper layers of the gastric wall were noted in 12 examined cases; more often they were observed in a form of short trabeculae, small groups, and, less often, in a form of solid, gland-like structures. In such areas, membranous and/or cytoplasmic expression of E-cadherin was preserved

as well as it was expressed in some malignant cells. In 8 cases, more commonly in the deeper layers of the gastric wall (the muscularis propria and the subserosa), we discovered malignant cells with a greater degree of atypia (big nuclei with dispersed chromatin, diminished amount of cytoplasm, and decreased mucin secretion).

All cases of diffuse GC type displayed changes in the shape of malignant cells: small signet ring cells became stellate spindle fibroblast-like cells. In 7 out of 31 cases (22.6%), elongated fibroblast-like malignant cells were detected in mucosa basal layers adjacent to the muscularis mucosa; in all other cases, we found them in the submucosa and deeper layers of the gastric wall. These cells often expressed cytokeratins, i.e. pancytokeratin AE1/AE3 or cytokeratin 18. However, in some malignant cells, cytokeratin expression was decreased to the point of complete loss. The loss of cytokeratin expression occurs even in the mucosa, but it may be selective. For example, it was absent in big signet ring cells, but still preserved in small malignant cells (Fig. 1 A). Already in the basal layer of the gastric mucosa, fibers of extracellular matrix (ECM) appeared next to fibroblast-like malignant cells in bigger numbers than in other parts of the gastric mucosa. In the submucosa, due to enlarged ECM volume, cancer acquired scirrhous features.

Almost in every case of diffuse GC type (29 out of 31 cases), EMT was complete. In other words, the expression of mesenchymal markers such as vimentin and α -SMA was detected in round signet ring cells as well as in fibroblast-like malignant cells (Fig. 1 B).

The change of cellular form and acquisition of mesenchymal phenotype—one of the main EMT features—have been connected to an increase in tumor invasiveness and metastatic potential (Fig. 1 C) [9, 10, 13]. We studied tumor invasiveness by the presence of intravascular malignant cells. In diffuse cancer cases, they were found in 28 out of 31 cases (90.3%).

Table | Таблица

Comparison of the EMT frequency, prevalence, and completeness and tumor cell vascular invasion in different histological GC types |
Сопоставление частоты, распространенности и полноты ЭМТ с инвазией сосудов опухолевыми клетками при разных гистологических типах рака желудка

EMT ЭМТ	Diffuse gastric carcinoma EMT 31 of 31 Диффузный рак желудка ЭМТ – 31 из 31		Intestinal gastric carcinoma EMT 18 of 19 Кишечный рак желудка ЭМТ – 18 из 19		Mixed gastric carcinoma EMT 14 of 14 Смешанный рак желудка ЭМТ – 14 из 14	
	with invasion с инвазией	no invasion без инвазии	with invasion с инвазией	no invasion без инвазии	with invasion с инвазией	no invasion без инвазии
Prevalent EMT Распространенная ЭМТ	28	3	–	–	3	–
Local EMT Очаговая ЭМТ	–	–	11	7	6	5
Complete EMT Полная ЭМТ	28	1	–	–	3	–
Incomplete EMT Неполная ЭМТ	–	2	11	7	7	4

As a rule, the morphology of the intraluminal tumor and the tumor outside the vessels was identical. Only in 5 cases of signet ring small-cell cancer, the intraluminal carcinoma had composition of a solid tumor (Fig. 1 C),

with one of them having gland-like structures suggesting the presence of EMT.

In all cases, the proliferative activity of malignant cells was low with a proliferation index below 5%, but in 9 cases

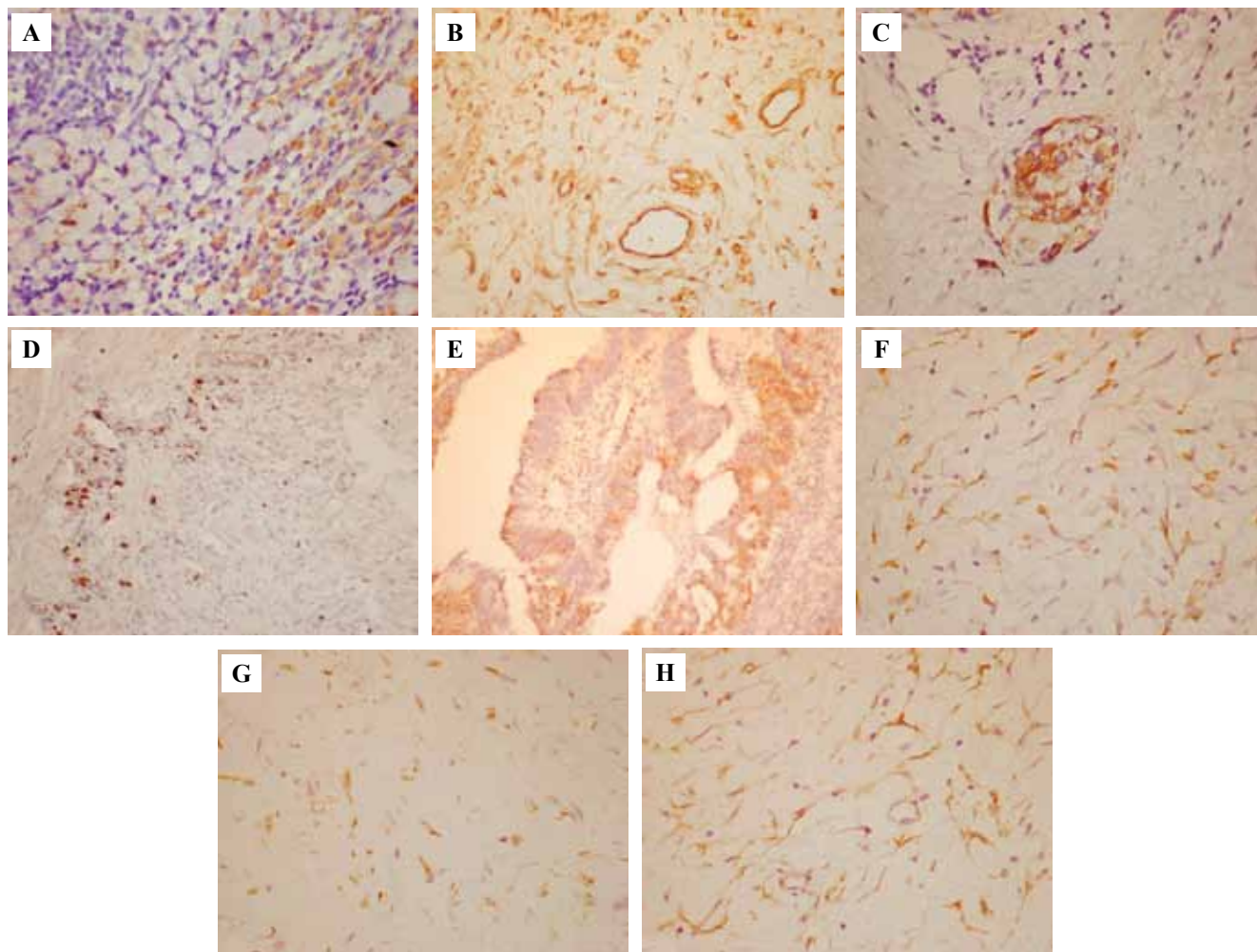


Fig. 1. Immunohistochemical features of Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer (GC).

A – selective loss of cytokeratin AE1/AE3 expression in signet cells but its preservation in small malignant cells (immunohistochemical [IHC] assay with antibodies to pancytokeratin AE1/AE3, $\times 400$); B – complete EMT in diffuse type GC, vimentin expression in signet cells and fibroblast-like malignant cells (IHC with vimentin antibodies, $\times 400$), C – invasion of fibroblast-like malignant cells with expression of cytokeratin 18 in the vessel wall. Intravascular malignant cells became round or signet cells (IHC with vimentin-18 antibodies, $\times 400$), D – low proliferative activity in diffuse type GC, increased in the invasion margin (IHC with Ki-67 antibodies, $\times 200$), E – prominent cellular atypia and high proliferative activity in intestinal type GC (IHC with Ki-67 antibodies, $\times 200$), F – fibroblast-like cells of mixed type GC, expressing cytokeratins AE1/AE3 (IHC with pancytokeratin AE1/AE3 antibodies, $\times 400$), G – vimentin expression in the same cells (IHC with vimentin antibodies, $\times 400$), H – α -SMA expression in the same cells (IHC with anti- α -SMA antibody, $\times 400$)

Рис. 1. Иммуногистохимические особенности эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ) при раке желудка (РЖ).

A – избирательная потеря экспрессии цитокератинов AE1/AE3 в перстневидных клетках, но сохранение ее в небольших злокачественных клетках (ИГХ с антителами к панцитокератину AE1/AE3, $\times 400$), B – полная ЭМТ в РЖ диффузного типа, экспрессия виментина в перстневидных и фибробластоподобных злокачественных клетках (окраска антителами к виментину, $\times 400$), C – инвазия фибробластоподобных злокачественных клеток с экспрессией цитокератина 18 в стенке сосуда; внутрисосудистые злокачественные клетки стали круглыми или перстневидными (окраска антителами к виментину-18, $\times 400$), D – низкая пролиферативная активность РЖ диффузного типа, повышенная в крае инвазии (окраска антителами к Ki-67, $\times 200$), E – выраженная клеточная атипия и высокая пролиферативная активность при РЖ кишечного типа (окраска антителами к Ki-67, $\times 200$), F – фибробластоподобные клетки РЖ смешанного типа, экспрессирующие панцитокератин AE1/AE3 (окраска антителами к панцитокератину AE1/AE3, $\times 400$), G – экспрессия виментина в тех же клетках (окраска антителами к виментину, $\times 400$), H – экспрессия α -актина гладких мышц в тех же клетках (окраска антителами к гладкомышечному α -актину, $\times 400$)

there were areas of moderate proliferative activity up to 20% and even high activity up to 46%. Almost in all cases, the increase in proliferative activity occurred in areas with small glandular and solid elements in deep layers of the gastric wall (most often the muscular one), at the margin of invasion, where cellular atypia was rising (Fig. 1 D).

At the tissue level, intestinal type GC was represented by well-differentiated adenocarcinoma with preservation of cell-to-cell connection and positive expression of E-cadherin. In 14 out of 19 cases, cellular atypia and proliferative activity (Fig. 1 E) were prominent or moderate and prominent; in 4 cases, moderate; and only in 1 case, mild and moderate. In the last case, the main features of EMT, i.e. cell-to-cell connection loss and cellular form change, were absent. Nevertheless, this tumor had small areas with high proliferative activity (proliferation index 35–40%) without decrease in pancytokeratin AE1/AE3 expression.

In the remaining 18 cases of intestinal type GC, EMT was noted; however, as opposed to diffuse type, it was focal and incomplete with negative vimentin expression. The foci of EMT were recognized at the invasion lateral margin or deeper, at the border with unchanged tissue; in only 3 cases, they occurred in basal layers of mucosa. They were characterized by changing cell-to-cell connections with formation of trabeculae, small groups, and separated cells, commonly round, less often stellate or fibroblast-like. Uncommonly, weakly expressed ECM was produced in only one case showing sclerosis in the serosa and tumor, i.e. concentric growth of connective tissue around malignant glands with abnormal polar differentiation such as mucin secretion at the basal pole of malignant cells with preserved cell-to-cell connection. In two more cases of intestinal type GC, mucin was produced at the basal pole of malignant cells and extracted into the stroma within the foci of EMT; no significant ECM was produced.

Mixed type GC was characterized by diverse histology. We observed adenocarcinomas of different grades at the tissue level and solid areas of undifferentiated polymorphic cancer, with 2 cases demonstrating small foci of signet ring carcinoma. EMT occurred in all cases and was mostly focal; only in 3 cases, it was diffuse. In the first case, it started into the submucosa and in the second one, into the muscularis propria. In the third case, it was starting into the subserosa and was complete: prominent fibrosis elongated markedly inside and almost indistinguishable from fibroblasts cells were expressing pancytokeratin AE1/AE3 (Fig. 1 F), vimentin (Fig. 1 G), and α -SMA (Fig. 1 H). A few of those cells were even expressing desmin.

In this and two other cases of focal EMT, it was complete, i.e. malignant cells expressed vimentin. It can be concluded that EMT is complete only in those foci where there is no synchronism between cytokeratin expression loss and vimentin expression appearance or where vimentin is detected in solid and glandular structures with preserved positive E-cadherin expression; in other words, with relatively “incomplete” EMT. When malignant cells change their form and size to such extent that they look like fibroblasts,

they produce prominently EMC, lose cytokeratin expression, while acquiring vimentin and α -SMA expression, so that these cells become indistinguishable from fibroblasts and myofibroblasts. The first EMT signs were detected in the submucosa in 9 out of 14 cases and in the muscularis propria in 5 out of 14 cases. In all 14 cases, we noted the cell discohesion with the entire loss of E-cadherin expression or only its cytoplasmic expression. The pancytokeratin AE1/AE3 expression was already decreased in trabeculae of malignant cells up to complete loss, but it could be preserved in separated cells or even in elongated fibroblast-like cells (Fig. 1 F). In all cases, the cellular form inside EMT foci was changed: they became stellate and fibroblast-like. In 2 cases, elongated shape of malignant cells was detected even in glandular walls before their separation. Seven cases showed fibroblast-like separated cells being surrounded by a significant number of thin ECM fibers.

In 10 out of 14 cases of mixed type GC (71.4%) we found vascular invasion.

Discussion

Diffuse and intestinal types GC differ from each other in their etiology and pathogenesis. Intestinal type develops through *Helicobacter pylori*-associated gastritis, intestinal metaplasia, and dysplasia, but diffuse type is apparently unrelated to *H. pylori* arising from morphologically normal gastric mucosa [14, 15]. Hereditary predisposition to GC has been established. Thus, the closest relatives of GC patients have a 2-fold increased risk of developing all forms of this tumor, whereas the relatives of diffuse type GC patients have a 7-fold higher risk compared to that of the control group [16]. Among diffuse type GC cases, there is a familial (hereditary) subgroup associated with E-cadherin mutation [17–19] and discohesive growth. In hereditary and sporadic diffuse type GC, genetic and/or epigenetic alteration of *CDH1* encoding E-cadherin are frequently detected [20].

All cases of diffuse type GC in our material showed that such an EMT feature as discohesion of malignant cells appears already in the mucosa.

Although *H. pylori* may potentiate EMT by different pathways in gastric carcinoma [21–23], in intestinal type GC, EMT develops as a result of tumor progression. Uncommonly, its features occur already in the mucosa, more often in the deeper layers.

The cellular form alteration and acquisition of fibroblast-like shape in diffuse type GC occurred in the mucosa near the muscularis mucosa in 22.6% of cases, where, according to B. Humar et al. [18], the activation of oncogene *c-Src* occurs already after malignant cell discohesion and this process has been associated with the submucosa invasion. In the intestinal type, the cellular form change appeared in the deeper layers, sometimes even with preserved cell-to-cell connection in the gland, but, at the same time, stroma invasion was seen.

In cases of diffuse type GC, malignant cells lost cytokeratin expression already in the mucosa, but the loss

might be selective: it might be absent in signet ring cells but preserved in small cells. Surprisingly, in malignant cells of diffuse type GC, the cytokeratin expression was often conserved in markedly elongated fibroblast-like cells in the submucosa and the muscularis propria, and in one case of the mixed type, even in the subserosa. Simultaneously, it often decreased and disappeared in trabeculae and groups of malignant cells in EMT foci of intestinal and mixed types.

Vimentin expression in malignant cells, which is considered to be complete EMT, was focally detected in almost all cases of diffuse type GC (93.5%), only in 3 cases of the mixed type, and was never observed in the intestinal type. It was recognized that vimentin expression correlated significantly with aggressive tumor behavior and unfavorable prognosis, but, on the other hand, cytokeratin expression loss may not correlate with malignant phenotype [9, 10, 24].

Abnormal polar differentiation occurred in all cases of diffuse type GC and was widespread because anomalous cellular adhesion and separation of cells lead to the loss of polarity. In cases of the intestinal type, abnormal polar differentiation was focal in a few cells detached from glands, whereas in 3 cases, the polarity loss was detected throughout the entire EMT and the mucin spread into the stroma. The mucin plays a crucial role in EMT development. Thus, the protein part of transmembrane mucin MUC-1 is considered to be an oncogene [25]. Hyaluronic acid, which is the main component of nonsulfated mucin, may induce EMT in tumors [26].

Therefore, cell discohesion and loss of polarity resulting from changes in cell contacts may not be the first EMT sign in cases of intestinal type GC compared to those of diffuse type GC. They are rather characterized by a decrease in cytokeratin expression, a change in cell shape, and a violation of polarity with the preservation of glandular morphology.

As we have already stated, many morphologic EMT features—separation of cells from each other, acquisition of fibroblast-like shape, and expression of mesenchymal markers—promote vascular invasion [27]. In our research, this process occurred more often in diffuse type GC (in 28 out of 31 cases, or 90.3%), less often in mixed type GC (in 10 out of 14 cases, or 71.4%), and even less often in intestinal type (in 11 out of 19 cases, or 57.8%). At the same time, in diffuse and mixed types, complete EMT (with vimentin and α -SMA expression) was accompanied by vascular invasion in 96.5% and 100% of cases, respectively. In our study, EMT completeness correlated with vascular invasion in the diffuse type ($\text{Tau}=0.802$, $p<0.01$) and in GC in general ($\text{Tau}=0.510$, $p<0.01$).

The relationship between proliferation and EMT is a difficult issue. The cell transformation from small signet ring to fibroblast-like shape in diffuse type GC occurs in basal parts of the mucosa, where, according to B. Humar et al. [18], oncogene *c-Src* activates, proliferation increases, and EMT manifests, which is necessary for malignant cells to invade through the muscularis mucosa [19]. In the intestinal type, we noted pancytokeratin expression loss

as an EMT feature, in foci of high proliferative activity. Consequently, high proliferative activity is required for EMT development. However, malignant cells after EMT are noticeable for low proliferative activity, which is typical for this process. During embryonic development and organogenesis there is an interchange of processes of cellular proliferation with an increase in their volume throughout mesenchymo-epithelial transition (MET) and processes of proliferative decreasing and elevated cellular mobility in EMT such as gastrulation [3, 4, 6]. In our cases, diffuse type GC with spread EMT showed low proliferation index ($\text{Ki-67}<5\%$), but in 9 cases there were areas of moderate proliferative activity, where cell-to-cell connection and E-cadherin expression were preserved. Probably, these are MET foci that may explain tumor growth in the gastric wall. It is also established that low proliferative index estimated with Ki-67 correlates with invasiveness, metastases, and worst prognosis GC [28].

Conclusion

A large number of EMT inductors and possible post-translational gene regulation form the basis for the diversity of morphological EMT features and their consequent development in different histological types of gastric cancer. These inductors activate different pathways and networks of signal transduction including many EMT-related transcription factors and their cooperation whereas post-translational gene regulation releases programs of structural and functional changes of malignant cells. EMT spread, completeness, and speed of development in these types of gastric cancer define their clinical behavior.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – I.V. Vasilenko, R.B. Kondratyuk, I.S. Grekov, A.M. Yarkov.

Collected the data and performed the analysis – R.B. Kondratyuk, I.V. Vasilenko, A.M. Yarkov, I.S. Grekov.

Wrote the paper – R.B. Kondratyuk.

Edited the manuscript – I.V. Vasilenko, R.B. Kondratyuk, I.S. Grekov, A.M. Yarkov.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – И.В. Василенко, Р.Б. Кондратюк, И.С. Греков, А.М. Ярков.

Сбор и обработка материала – Р.Б. Кондратюк, И.В. Василенко, А.М. Ярков, И.С. Греков.

Написание текста – Р.Б. Кондратюк.

Редактирование – И.В. Василенко, Р.Б. Кондратюк, И.С. Греков, А.М. Ярков.

References/Литература

1. Мнихович М.В., Вернигородский С.В., Буньков К.В., Мишина Е.С. Эпителиально-мезенхимальный переход, трансдифференциация, репрограммирование и метаплазия: современный взгляд на проблему. Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2018;13(2):145–152.
Mnihovich MV, Vernigorodskij SV, Bunkov KV, Mishina ES. Epithelially-mesenchymal transition transdifferentiation, reprogramming and metaplasia: modern view on the problem. Bulletin

- of Pirogov National Medical & Surgical Center. 2018;13(2):145–152 (In Russ.).
2. *Богущи Т.А., Калюжный С.А., Четыркина М.Р., Ястребова М.А., Щербakov А.М., Мамичев И.А. и др.* Экспрессия виментина в культурах клеток эпителиальных опухолей человека. Успехи молекулярной онкологии. 2018;5(2):24–30. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-24-30.
Bogush TA, Kaliuzhny SA, Chetyrkin MR, Yastrebova MA, Scherbakov AM, Mamichev IA et al. Vimentin expression in human cell lines of epithelial tumors. *Advances in Molecular Oncology*. 2018;5(2):24–30 (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-2-24-30.
 3. *Nieto MA.* The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Mol Cell Biol*. 2002;3(3):155–66. DOI: 10.1038/nrm757.
 4. *Nieto MA.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease: old views and new perspectives. *Int J Dev Biol*. 2009;53(8–10):1541–7. DOI: 10.1387/ijdb.072410mn.
 5. *Radisky DC.* Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt. 19):4325–6. DOI: 10.1242/jcs.02552.
 6. *Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA.* Epithelial-mesenchymal transition in development of disease. *Cell*. 2009;139(5):871–90. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
 7. *Weinberg RA.* Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis*. 2008;29(6):1092–5. DOI: 10.1093/carcin/bgn104.
 8. *de Wever O, Pauwels P, Craene B, Sabbah M, Emami S, Redeuilh G et al.* Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol*. 2008;130(3):481–94. DOI: 10.1007/s00418-008-0464-1.
 9. *Kato Y, Yashiro M, Noda S, Tendo M, Kashiwagi S, Doi Y et al.* Establishment and characterization of a new hypoxia-resistant cancer cell line, OCUM-12/Hypo, derived from a scirrhous gastric carcinoma. *Br J Cancer*. 2010;102(5):898–907. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605543.
 10. *Kim MA, Lee HS, Lee HE, Kim JH, Yang HK, Kim WH.* Prognostic importance of epithelial-mesenchymal transition-related protein expression in gastric carcinoma. *Histopathology*. 2009;54(4):442–51. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2009.03247.x.
 11. *Lauren P.* The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal types carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31–49. DOI: 10.1111/apm.1965.64.1.31.
 12. *Mita T, Shimoda T.* Risk factors for lymph node metastasis of submucosal invasive differentiated type gastric carcinoma: clinical significance of histological heterogeneity. *J Gastroenterol*. 2001;36(10):661–8. DOI: 10.1007/s005350170028.
 13. *Dai YH, Tang YP, Zhu HY, Lv L, Chu Y, Zhou YQ et al.* ZEB2 promotes the metastasis of gastric cancer and modulates epithelial mesenchymal transition of gastric cancer cells. *Dig Dis Sci*. 2012;57(5):1253–60. DOI: 10.1007/s10620-012-2042-6.
 14. *Hohenberger P, Gretshel S.* Gastric cancer. *Lancet*. 2003;362(9380):305–15. DOI: 10.1016/s0140-6736(03)13975-x.
 15. *Schier S, Wright NA.* Stem cell relationship and the origin of gastrointestinal cancer. *Oncology*. 2005;69 (Suppl1):9–13. DOI: 10.1159/000086625.
 16. *Lehtola J.* Family study of gastric carcinoma with special reference to histological types. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1978;50:3–54. PMID: 360367.
 17. *Baber ME, Save V, Carneiro F, Dwerryhous S, Lao-Sirieix P, Hardwick RH et al.* Histopathological and molecular analysis of gastrectomy specimens from hereditary diffuse gastric cancer patients has implications for endoscopic surveillance of individuals at risk. *J Pathol*. 2008;216(3):286–94. DOI: 10.1002/path.2415.
 18. *Humar B, Fukuzawa R, Blair V, Dunbier A, More H, Charlton A et al.* Destabilized adhesion in the gastric proliferative zone and c-Src kinase activation mark the development of early diffuse gastric cancer. *Cancer Res*. 2007;67(6):2480–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3021.
 19. *Humar B, Guilford P.* Hereditary diffuse gastric cancer: a manifestation of lost cell polarity. *Cancer Sci*. 2009;100(7):1151–7. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01163.x.
 20. *Shimada S, Mimata A, Sekine M, Mogushi K, Akiyama Y, Fukamachi H et al.* Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer. *Gut*. 2012;61(3):344–53. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300050.
 21. *Buti L, Spooner E, Van der Veen AG, Rappuoli R, Covacci A, Ploegh HL.* Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(22):9238–43. DOI: 10.1073/pnas.1106200108.
 22. *Yin Y, Grabowska AM, Clarke PA, Whelband E, Robinson K, Argent RH et al.* Helicobacter pylori potentiates epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer: links to soluble HB-EGF, gastrin and matrix and matrix metalloproteinase-7. *Gut*. 2010;59(8):1037–45. DOI: 10.1136/gut.2009.199794.
 23. *Zhu Y, Jiang Q, Lou X, Ji X, Wen Z, Wu J et al.* MicroRNAs up-regulated by CagA of Helicobacter pylori induce intestinal metaplasia of gastric epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7(4):e35147. DOI: 10.1371/journal.pone.0035147.
 24. *Iwatsuki M, Mimori K, Fukagawa T, Ishii H, Yokobori T, Sasako M et al.* The clinical significance of vimentin-expressing gastric cancer cells in bone marrow. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(9):2526–33. DOI: 10.1245/s10434-010-1041-0.
 25. *Kufe DW.* Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):874–85. DOI: 10.1038/nrc2761.
 26. *Chow G, Tauler J, Mulshine JL.* Cytokines and growth factors stimulate hyaluronan production: role of hyaluronan in epithelial to mesenchymal-like transition in non-small cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:485468. DOI: 10.1155/2010/485468.
 27. *Christiansen JJ, Rajasekaran AK.* Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006;66(17):8319–26. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410.
 28. *Lee HE, Kim MA, Lee BL, Kim WH.* Low Ki-67 proliferation index is an indicator of poor prognosis in gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2010;102(3):201–6. DOI: 10.1002/jso.21583.

Author information

Inna V. Vasilenko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Pathology Department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-9871-1596>

Roman B. Kondratyk – Cand. Sci. (Med.), Assistant Professor, Pathology Department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

<https://orcid.org/0000-0001-5928-8799>

Ilya S. Grekov – 6th year Student, Faculty of General Medicine No.2, M. Gorky Donetsk National Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-6140-5760>

Anton M. Yarkov – Assistant, Pathology Department, M. Gorky Donetsk National Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-3466-7271>

Информация об авторах

Инна Васильевна Василенко – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии Донецкого национального медицинского университета имени М. Горького.

Роман Борисович Кондратюк – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии Донецкого национального медицинского университета имени М. Горького.

Илья Сергеевич Греков – студент 6-го курса лечебного факультета № 2 Донецкого национального медицинского университета имени М. Горького.

Антон Михайлович Ярков – ассистент кафедры патологической анатомии Донецкого национального медицинского университета имени М. Горького.

Экстрагенитальная неинфекционная патология в структуре материнской смертности г. Москвы

Л.М. Михалева^{1,5}, А.Г. Конопляников^{2,6}, Я.Ю. Кудрявцева³, А.С. Оленев⁴,
Н.А. Грачева⁵, А.Е. Бирюков^{1,5}, С.А. Михалев⁶, Е.Н. Сонгорова⁷

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

² ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

⁴ Перинатальный центр ГБУЗ Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

⁵ ГБУЗ Городская клиническая больница № 31 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

⁶ ГБУЗ Центр планирования семьи и репродукции Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

⁷ ГБУЗ Городская клиническая больница № 67 имени Л.А. Ворохобова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Введение. Заболевания, непосредственно связанные с беременностью, все еще занимают лидирующую позицию в структуре материнской смертности, хотя во многих странах отмечается рост числа летальных исходов среди беременных от экстрагенитальной патологии. Значительное число смертей в данной группе связано с экологическими факторами, изменением образа жизни и общим ростом показателей соматических патологий. Цель исследования – изучить основные причины материнской смертности и определить место экстрагенитальной патологии на основании данных патологоанатомических вскрытий.

Материалы и методы. В исследование вошли 29 секционных наблюдений, изучены медицинская документация, протоколы вскрытия умерших беременных, рожениц и родильниц. Каждая причина смерти классифицировалась согласно критериям МКБ-10.

Проведены также клинико-морфологическое исследование с использованием дополнительных гистохимических методов окраски и постановка иммуногистохимических реакций.

Результаты. По данным патологоанатомических исследований, в Москве на долю экстрагенитальной патологии приходится до 40% материнских смертей. Лидирующую позицию занимают болезни системы кровообращения, среди которых были зарегистрированы такие заболевания как артериовенозная мальформация и аневризма сосудов головного мозга, инфаркт миокарда, порок сердца в виде незаращения овального окна межпредсердной перегородки, аневризма аорты и селезеночной артерии. Второе место занимают другие уточненные болезни и состояния, осложняющие беременность; в нашем исследовании в эту группу вошли злокачественные новообразования. На третьем месте находятся болезни органов пищеварения, следом за которыми расположены другие болезни крови и кроветворных органов и отдельные нарушения с вовлечением иммунного механизма, осложняющие беременность, а также болезни органов дыхания. Единичный случай связан с генерализованной вирусной инфекцией.

Заключение. Экстрагенитальная патология остается важной акушерской проблемой, а ведение пациенток с системными заболеваниями в ассоциации с беременностью требует мультидисциплинарного подхода к лечению.

Ключевые слова: материнская смертность, экстрагенитальная патология, артериовенозная мальформация, аневризма сосудов головного мозга, антифосфолипидный синдром

Для корреспонденции: Янина Юрьевна Кудрявцева. E-mail: yan4eg@inbox.ru

Для цитирования: Михалева Л.М., Конопляников А.Г., Кудрявцева Я.Ю., Оленев А.С., Грачева Н.А., Бирюков А.Е., Михалев С.А., Сонгорова Е.Н. Экстрагенитальная неинфекционная патология в структуре материнской смертности г. Москвы. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):21–31. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.2.21-31.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 04.12.2020. **Получена после рецензирования** 11.01.2021. **Принята в печать** 11.02.2021.

Extragenital noninfectious pathology in the maternal mortality structure in Moscow

L.M. Mikhaleva^{1,5}, A.G. Konoplyannikov^{2,6}, Y.Y. Kudryavtseva³, A.S. Olenev⁴,
N.A. Gracheva⁵, A.E. Biryukov^{1,5}, S.A. Mikhalev⁶, E.N. Songolova⁷

¹ Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

⁴ Perinatal Center of the City Clinical Hospital No. 24 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

⁵ City Clinical Hospital No. 31 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

⁶ Family Planning and Reproduction Center of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

⁷ L.A. Vorokhobov City Clinical Hospital No. 67 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

Introduction. Diseases directly related to pregnancy are still leading the maternal mortality structure, although in many countries there is an increase in the number of deaths from extragenital pathology among pregnant women. A significant number of lethal cases in this group are associated with environmental factors, lifestyle, and the overall increase in somatic diseases. The aim of the study was to determine the main causes of maternal mortality and investigate the role of extragenital pathology based on autopsy data.

Materials and methods. The study included 29 autopsy observations. We studied medical records, autopsy protocols of deceased pregnant women, women in labor, and puerperant women. Each cause of death was classified according to ICD-10. A clinical and morphological study was also carried out using additional histochemical and immunohistochemical staining methods.

Results. The data from pathological studies show that in Moscow, extragenital pathology accounts for up to 40% of maternal deaths. The leading cause of death is circulatory system diseases, including an arteriovenous malformation; a myocardial infarction; a congenital heart disease (patent foramen ovale); cerebral, aortic, and splenic artery aneurysms. The second most common one is other specified diseases and conditions complicating pregnancy. This group of diseases included malignant neoplasms. Less common causes of death are gastrointestinal diseases, other diseases of the blood and blood-forming organs and certain disorders involving the immune mechanism that complicate pregnancy, and also respiratory diseases. A single case is associated with a generalized viral infection.

Conclusion. Extragenital pathology remains an important obstetric problem, and the management of pregnant women with systemic diseases requires a multidisciplinary treatment approach.

Keywords: maternal mortality, extragenital pathology, arteriovenous malformation, cerebral aneurysm, antiphospholipid syndrome

Corresponding author: Yanina Y. Kudryavtseva. E-mail: yan4eg@inbox.ru

For citation: Mikhaleva L.M., Konoplyannikov A.G., Kudryavtseva Y.Y., Olenev A.S., Gracheva N.A., Biryukov A.E., Mikhalev S.A., Songolova E.N. Extragenital noninfectious pathology in the maternal mortality structure in Moscow. *Clin. exp. morphology.* 2021;10(2):21–31. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.21-31 (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 04.12.2020. **Received in revised form** 11.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Одним из наиболее значимых направлений деятельности Всемирной организации здравоохранения является защита материнства. На снижение показателей глобальной материнской смертности (МС) было направлено значительное количество ресурсов, что дало результаты [1]. Тем не менее стоит отметить, что снижение показателей МС было достигнуто главным образом за счет уменьшения числа умерших от акушерской патологии, то есть связанной непосредственно с патологией беременности и родов. В то же время показатели смертности от экстрагенитальной патологии остаются неизменными, а в некоторых странах даже отмечен их рост [2, 3]. Во многом это связано с общим ухудшением здоровья населения, социально-экономической ситуацией в стране, экологической обстановкой,

повышением психоэмоциональных нагрузок, ростом показателей инфекционных заболеваний, и в целом за последние 10 лет наблюдается тенденция к росту числа соматических заболеваний. По некоторым данным, около 80% женщин к моменту наступления беременности имеют зарегистрированные заболевания той или иной группы органов – сердечно-сосудистой, эндокринной системы, почек, органов дыхания и гепатобилиарной системы. Совершенствование диагностики, раннее эффективное и адекватное лечение улучшили прогноз, увеличили продолжительность жизни указанной группы пациенток, что привело к снижению частоты таких заболеваний в структуре экстрагенитальной патологии. Изменился и репродуктивный возраст, чаще стали рожать женщины более старшего возраста, имеющие различные приобретенные соматические болезни.

При незначительных ежегодных колебаниях среди нозологических причин МС в России экстрагенитальные заболевания несколько уступают прямым акушерским причинам смерти, причем значимое место в структуре причин материнской смертности в Москве играют инфекционные заболевания, в первую очередь ВИЧ-инфекция [4, 5].

Материалы и методы

Статья посвящена изучению проблемы смертности от экстрагенитальной патологии. В исследование были включены 29 умерших беременных, рожениц и родильниц, вскрытие которых проводилось на базе патологоанатомического отделения московской городской клинической больницы № 31 в период с 2013 по 2019 год. Средний возраст умерших – 32 года (от 21 года до 50 лет).

Был проведен анализ клинических данных, который включал изучение медицинской документации, историй родов, анамнез соматической патологии, результаты инструментальных и лабораторно-диагностических исследований. Патологоанатомическое вскрытие проводилось по стандартной методике, микроскопическое исследование расширено использованием дополнительных гистохимических окрасок и применением иммуногистохимических реакций.

Результаты и обсуждение

Полученные нами результаты подтверждают статистику по России, что говорит о высокой смертности при экстрагенитальной патологии от заболеваний системы кровообращения (O99.4; 14 случаев, 48,3%). На второе место выходят другие уточненные болезни и состояния, осложняющие беременность, деторождение и послеродовой период (O99.8; шесть случаев, 20,7%). Четыре наблюдения приходятся на болезни органов пищеварения (O99.6; 13,8%). Зарегистрированы два летальных исхода от других болезней крови и кроветворных органов и отдельных нарушений с вовлечением иммунного механизма, осложняющих беременность, деторождение и послеродовой период (O99.1; 6,9%). Аналогичное число случаев приходится на болезни органов дыхания (O99.5), единожды наблюдался летальный исход от вирусной инфекции (O98,5; 3,4%) (рис. 1).

Заболевания сердечно-сосудистой системы. Общеизвестным считается факт, что при беременности нагрузка на гомеостатические

системы будущей матери возрастает: снижается общее периферическое сосудистое сопротивление, возрастает объем циркулирующей крови (ОЦК) на 40–60%, увеличивается сердечный выброс на 40–50%, появляется плацентарная система кровообращения. Это является благоприятной средой как для манифестации скрыто протекающей патологии, так и для декомпенсации работы органов в условиях длительно текущего заболевания [6]. Ведущей причиной МС среди экстрагенитальных патологий являются болезни сердечно-сосудистой системы. В данную группу входит широкий спектр заболеваний: кардиомиопатии, ишемическая болезнь сердца, пороки клапанов сердца, болезни, связанные с нарушением проводимости сердца. В особую группу входят пациентки с наследственными синдромами поражения соединительной ткани (синдром Элерса–Данло, синдром Марфана), поскольку у них значительно повышается риск расслоения стенки аорты в ходе беременности. Последнее чаще всего встречается в 3-м триместре и обусловлено сочетанием гормонально опосредованных биохимических изменений, влиянием гемодинамических стрессов, вызванных беременностью, а также несостоятельностью коллагенового каркаса стенки аорты [7].

В нашем исследовании среди всех случаев МС от экстрагенитальной патологии почти половина приходится на болезни системы кровообращения (48%; 14 наблюдений).

Аневризма сосудов головного мозга. Значительная часть материнских смертей связана с разрывами

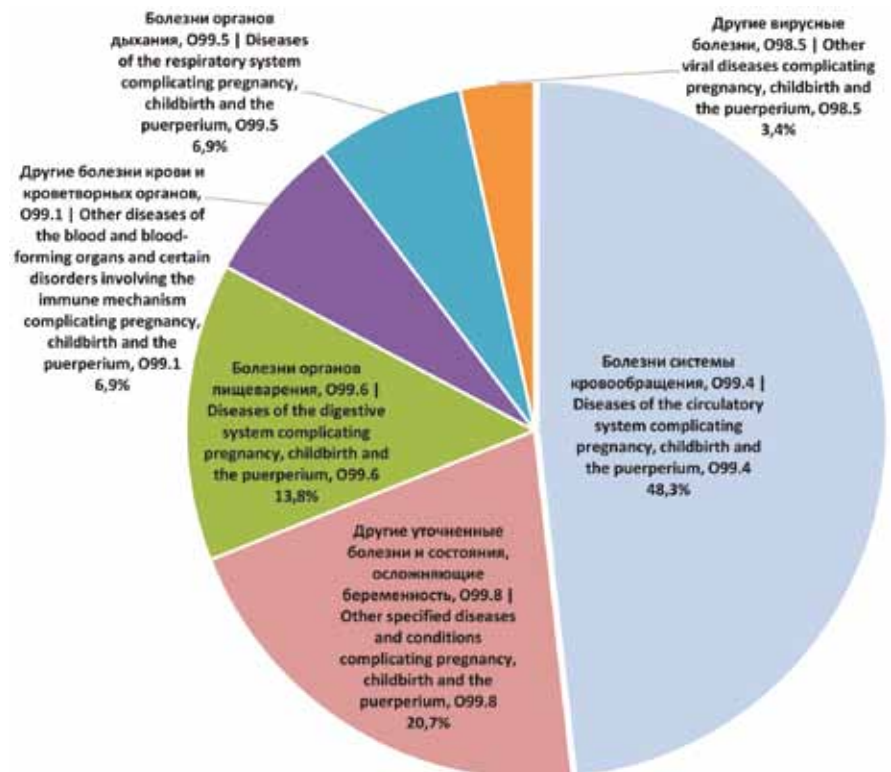


Рис. 1. Структура материнской смертности от экстрагенитальной патологии
Fig. 1. Maternal mortality structure associated with extragenital pathology

внутричерепных аневризм, а также кровоизлияниями, ассоциированными с артериовенозными мальформациями (АВМ). Среди женщин детородного возраста частота встречаемости внутримозговых аневризм составляет от 1,8 до 8% [8]. Частота распространения нетравматических субарахноидальных кровоизлияний (САК), ассоциированных с аневризмами, среди беременных, по разным данным, колеблется в пределах от трех до 11 случаев на 100 000 [9]. Среди этиологических факторов развития аневризмы выделяют генетическую теорию, в пользу которой говорят обнаруженные хромосомные аномалии и семейный анамнез патологии [10]. Также значимыми факторами риска являются гемодинамические нарушения и повреждение эндотелиальных клеток с последующим повышением проницаемости сосудистой стенки и развитием воспалительной реакции. Вопрос о влиянии беременности на развитие осложнений внутримозговых аневризм остается дискуссионным: одни ученые выделяют повышенный ОЦК при беременности как значимый фактор риска разрыва сосудистой стенки [11], другие исследователи показали отсутствие статистически значимого повышения частоты САК среди беременных [12].

В шести наблюдениях нами были выявлены нетравматические субарахноидально-паренхиматозно-вентрикулярные кровоизлияния, развившиеся в результате разрыва аневризмы сосудов головного мозга, осложненные вторичными ишемическими инфарктами, единичными кровоизлияниями с прорывом крови в желудочки мозга (рис. 2 А). Микроскопическое исследование образцов головного мозга показало наличие очагов кровоизлияний мягкой мозговой оболочки, обширные фокусы некротических и некробиотических изменений, с примесью лейкоцитов, с резко полнокровными кровеносными сосудами, с тромбозом части сосудов, периваскулярными участками некроза и кровоизлияниями (рис. 2 В). При дополнительной окраске артерий головного мозга по Маллори и ван Гизону отмечается очаговое истончение стенки с потерей мышечного слоя и внутренней эластичной мембраны, вокруг кровоизлияния без зерен гемосидерина.

Артериовенозные мальформации головного мозга представляют собой порочно развитые, патологически ветвящиеся шунты, объединяющие напрямую, в обход капилляров, артерии и вены. Протекая бессимптомно, данная патология манифестирует внутримозговым кровоизлиянием, зачастую в детородном возрастном периоде [13]. Распространенность заболевания в популяции колеблется от 0,4 до 0,8%, причем большинство авторов придерживаются мнения, что беременность не влияет на риск развития кровоизлияния из АВМ [14].

При изучении четырех наблюдений выявлены внутримозговые, паренхиматозно-субдуральные кровоизлияния с прорывом в желудочковую систему вследствие разрыва АВМ кровеносных сосудов головного мозга. При микроскопическом исследовании ткани мозга найдены мелкие некрозы и кровоизлияния, выраженный

перипеллюлярный отек. Участки мальформации представлены переплетающимися сосудами крупного, среднего и мелкого диаметра, местами располагающимися между магистральными сосудами, или образованы беспорядочными скоплениями артерий и вен (рис. 3 А).

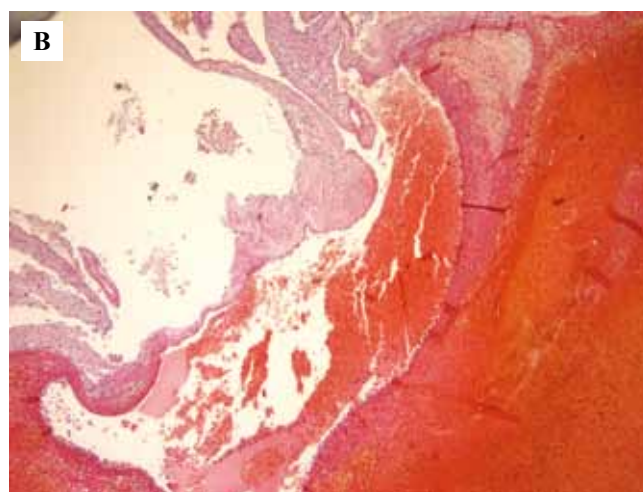
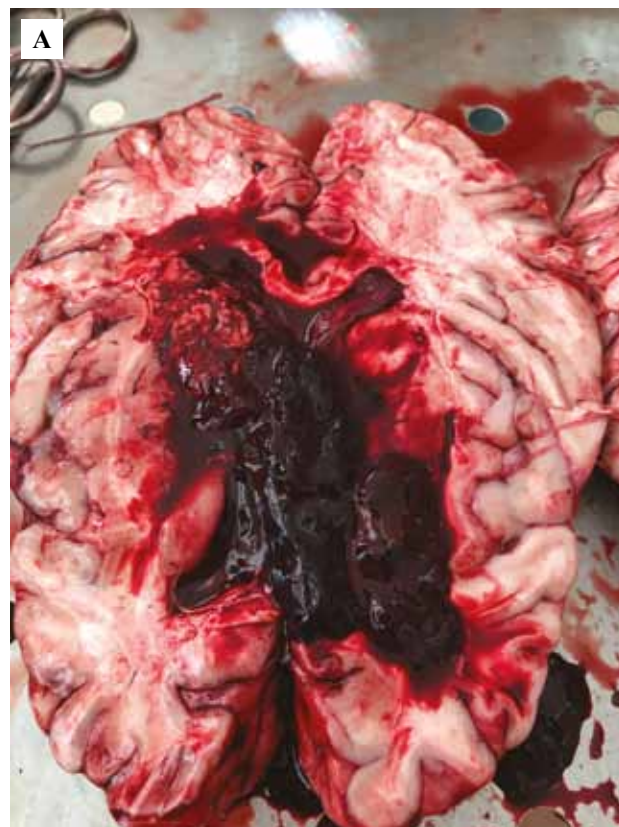


Рис. 2. Аневризма сосудов головного мозга.

А – внешний вид головного мозга с разрывом внутримозговой аневризмы и кровоизлиянием, В – обширные кровоизлияния в толще мягкой мозговой оболочки. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 2. Cerebrovascular aneurysm.

A – the brain with a ruptured intracerebral aneurysm and hemorrhage, B – massive hemorrhages in the pia mater. H&E stain, $\times 100$

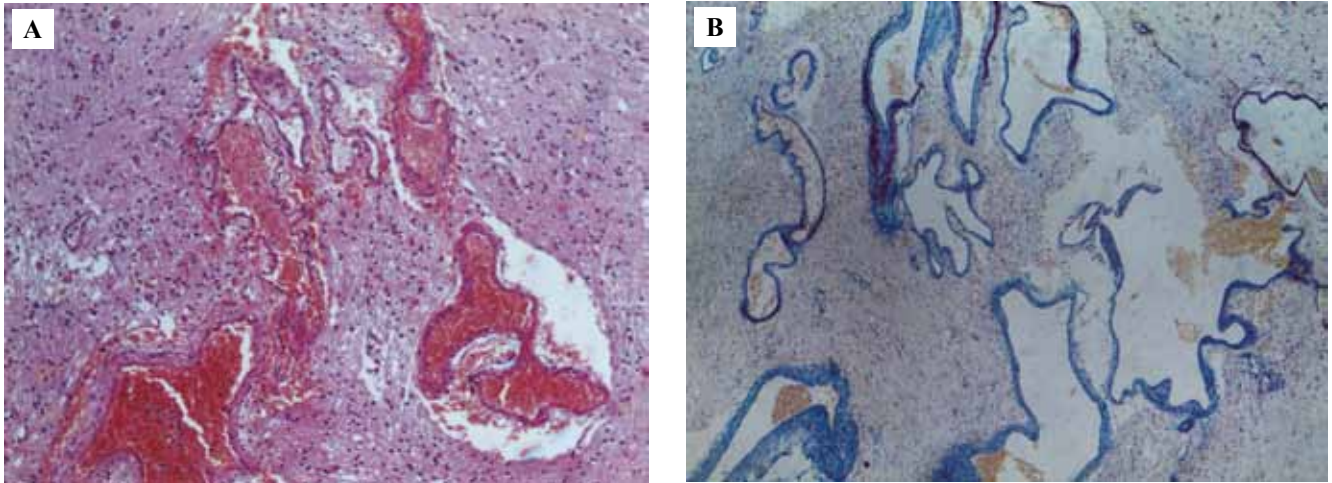


Рис. 3. Артериовенозные мальформации сосудов головного мозга.

А – хаотично расположенные скопления тонкостенных сосудов в ткани мозга. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.
В – аномальное распределение эластических волокон в стенке сосудов артериовенозной мальформации. Окраска по Маллори, $\times 200$

Fig. 3. Arteriovenous malformations of cerebral vessels.

A – chaotically located clusters of thin-walled plethoric vessels in the brain tissue. H&E stain, $\times 100$.
B – abnormal distribution of elastic fibers in the vessel wall of arteriovenous malformation. Mallory stain, $\times 200$

При использовании дополнительных гистохимических методов окраски (по Маллори) в области АВМ отмечаются неравномерное распределение эластических волокон во внутренней и наружной эластических мембранах сосудов, множественные фокусы кальциноза, а также субинтимальные очаги из гипертрофированных мышечных клеток – мышечные «подушки» (рис. 3 В).

Инфаркт миокарда. Статистика МС в США показывает крайне низкую частоту возникновения этой патологии (1:160 000 беременностей), однако за исследуемый период нами был выявлен один летальный исход от острого инфаркта миокарда (ИМ) [15]. Наиболее частой причиной развития ИМ среди беременных является спонтанное расслоение стенки коронарной артерии, на втором месте находится атеросклеротическое поражение сосудов, реже встречается тромбоз коронарной артерии без признаков атеросклеротического поражения [16].

Исследованный нами случай продемонстрировал развитие ИМ вследствие спонтанного расслоения стенки промежуточной артерии сердца: при патоморфологическом исследовании обнаружено разделение слоев внутри артериальной стенки посредством интрамуральной гематомы. Повышенная концентрация матриксных металлопротеиназ в стенке сосудов, что приводит к дезорганизации коллагена и появлению фокусов кистозного медианекроза и в целом негативно влияет на структурную целостность стенки [17].

Пороки сердца. Несмотря на значительные достижения в ранней диагностике, а также широкое применение хирургических методов лечения, до 2% беременностей протекает на фоне существующего порока сердца [18]. Наиболее распространенным из врожденных пороков

сердца (ВПС) является дефект межпредсердной перегородки. Длительно существующий межпредсердный шунт приводит к хронической перегрузке правых отделов сердца, повышает риск предсердной аритмии, способствует развитию сердечной недостаточности и легочной гипертонии.

В нашем исследовании был выявлен один случай ВПС – незаращение овального окна межпредсердной перегородки с дилатацией полостей предсердия с развитием легочного сердца. На вскрытии масса сердца достигала 400 г при толщине стенки правого желудочка 1 см, а левого 1,1 см. В области межпредсердной перегородки определялся округлый дефект диаметром до 2 см (рис. 4 А). При микроскопическом исследовании обнаружены гипертрофия части кардиомиоцитов правого желудочка, фрагментация, гипертрофические и атрофические явления мышечных волокон левого желудочка с перисосудистым фиброзом, полнокровием сосудов. Данный случай сопровождался развитием гипертонии малого круга кровообращения, что нашло отражение при микроскопическом исследовании образцов ткани легкого: мелкие ветви легочной артерии (артериолы) с утолщенными стенками и несколькими просветами по типу гломусов, периваскулярные мелкие лимфоцитарные инфильтраты (рис. 4 В).

Определенный интерес представляют два наблюдения патологии сосудистой стенки, обнаруженные на секции у умерших беременных женщин. В первом случае речь идет об аневризме грудного отдела дуги аорты, осложнившейся разрывом и двусторонним гемотораксом. Микроскопическое исследование выявило фокусы миксоматоза и медианекроза в стенке аорты, что в совокупности с данными анамнеза и сопутствующими заболеваниями укладывается в картину

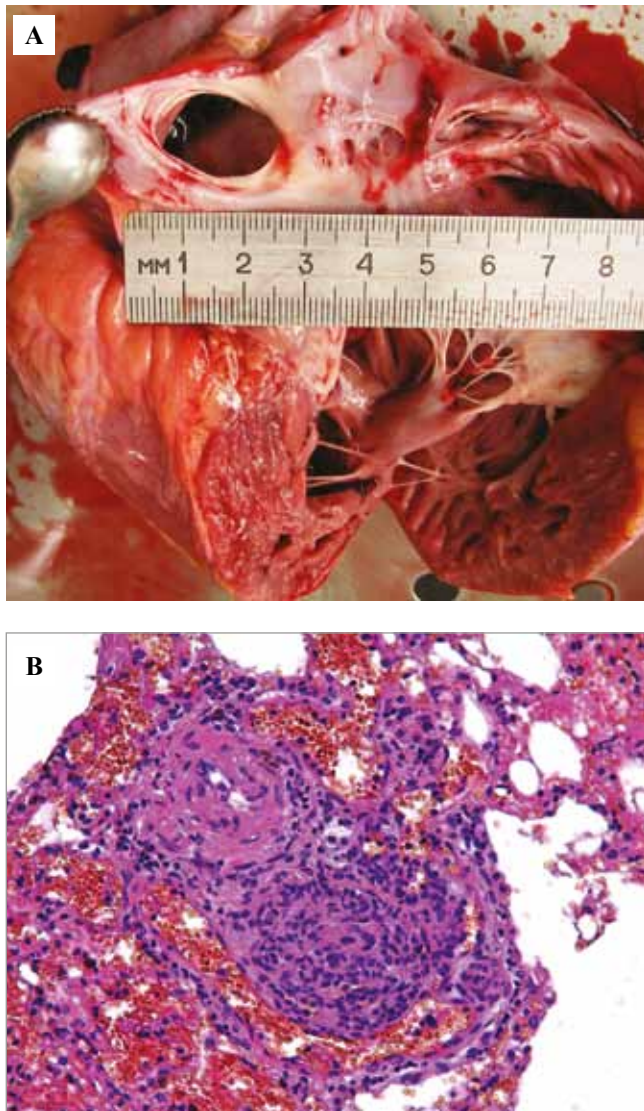


Рис. 4. Порок сердца.

А – внешний вид межпредсердной перегородки сердца с дефектом, В – легочные артериолы с гипертрофированными стенками по типу гломулов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 4. Congenital heart disease.

А – cardiac atrial septum with a defect, В – pulmonary arterioles with glomerus-type hypertrophic walls. H&E stain, $\times 200$

наследственной недифференцированной дисплазии соединительной ткани. Во втором наблюдении смерть пациентки наступила от разрыва врожденной аневризмы селезеночной артерии с образованием забрюшинной гематомы и прорывом крови в брюшную полость.

Другие уточненные болезни и состояния, осложняющие беременность, деторождение и послеродовой период. Еще одна группа заболеваний, занимающих второе место среди экстрагенитальной патологии, которая зачастую слишком поздно диагностируется и оказывает значительное влияние на показатели МС, – это онкологическая патология. Достоверная оценка распростра-

ненности представляется весьма затруднительной, так как не существует единого реестра пациенток, а также стандартизированных критериев учета. Исследования, посвященные исключительно раку во время беременности, сообщают о показателях заболеваемости 25–27 на 100 000 беременностей [19]. Трудности диагностики онкопатологии во время беременности связаны с тем, что многие симптомы могут маскироваться физиологическими проявлениями беременности либо напоминать клинику гестоза [20]. Ситуация усугубляется низкой настороженностью акушеров-гинекологов относительно онкологического процесса, что в отдельных случаях приводит к гиподиагностике. Рак молочной железы (40%), лимфома (12%) и рак шейки матки (10%) являются наиболее частыми зарегистрированными типами онкологии во время беременности [21].

В нашем исследовании были выявлены два случая лимфомы (В-крупноклеточная лимфома, Т-лимфобластная лимфома средостения), один случай с острым миелобластным лейкозом, запущенная форма рака яичников (рис. 5), опухоль головного мозга (астроцитомы). Еще один диагноз – рак желудка (недифференцированная карцинома) – был поставлен лишь у секционного стола.

Болезни органов пищеварения. Среди болезней желудочно-кишечного тракта наибольшую опасность для беременных представляют поражения печени и поджелудочной железы. По разным данным, диагноз «панкреатит» встречается с частотой от 1:1000 до 1:12 000 беременностей, а смертность может достигать 3,6% [22]. Возникновение панкреатита, а также приступы обострения у беременных наиболее часто ассоциированы с желчнокаменной болезнью и нарушением моторно-эвакуаторной функции билиарного тракта. Среди болезней печени лидирующую позицию занимает цирроз. Во время беременности для матери существует риск ухудшения синтетической функции печени и печеночной декомпенсации, включая развитие асцита, кровотечения из варикозно расширенных вен и энцефалопатии [23]. Смертность у беременных женщин с циррозом достигает 1,6%, а примерно в 10% диагностируется декомпенсация работы печени [24].

В нашем исследовании выявлены два наблюдения с панкреонекрозом (рис. 6 А). При патоморфологическом исследовании поджелудочной железы и парапанкреатической клетчатки на всем протяжении железы обнаружены мелкие и крупные очаги жирового некроза с небольшой инфильтрацией нейтрофилами (рис. 6 В). В одном случае был диагностирован цирроз печени, который подтвердился при микроскопическом исследовании в виде нарушения долькового строения с интенсивным фиброзом и формированием узлов регенерации (ложных долек с захватом нескольких печеночных долек – мультилобулярно), состоящих из пролиферирующих гепатоцитов с матовой цитоплазмой и пронизанных соединительнотканью прослойками и не-

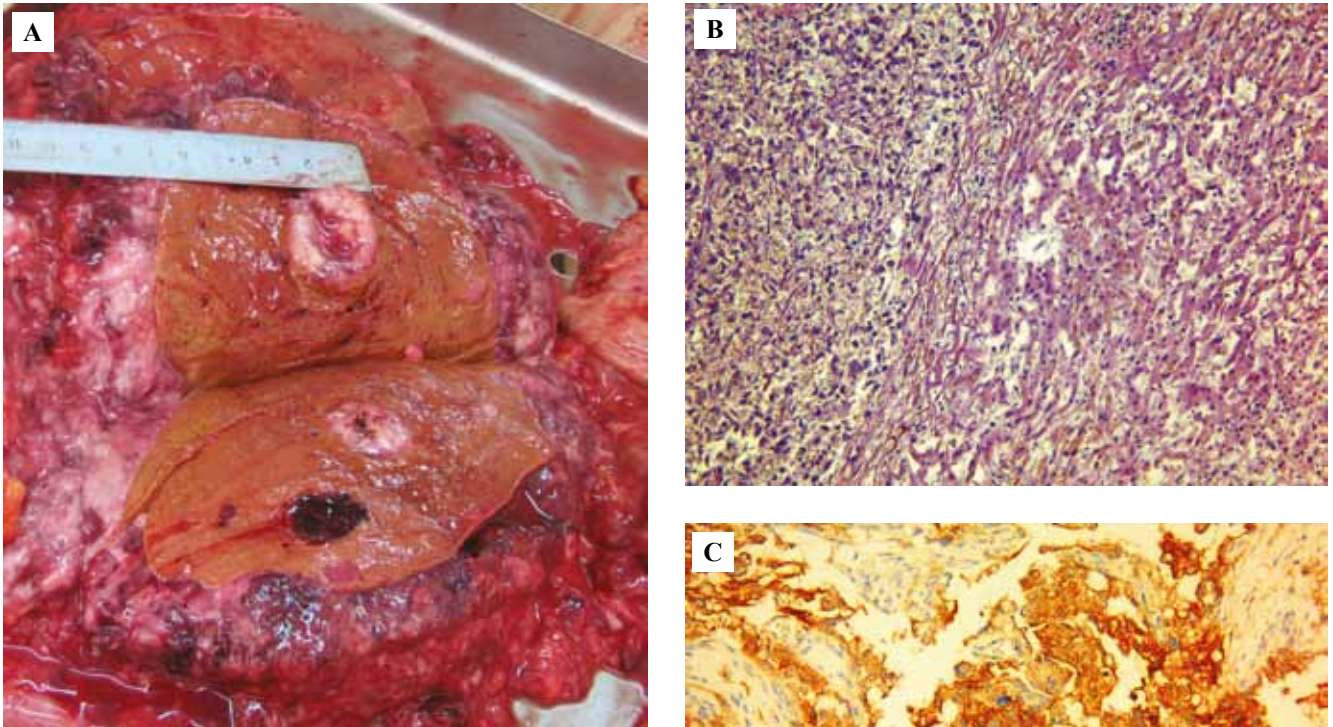


Рис. 5. Рак яичника.

А – внешний вид печени с метастазом рака яичника, В – метастаз рака яичника (опухоль желточного мешка) в печень. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$. С – иммуногистохимическое исследование ткани опухоли с антителами к PLAP, $\times 200$

Fig. 5. Ovarian cancer.

А – the liver with metastatic ovarian cancer. Gross image, В – metastasis of ovarian cancer (yolk sac tumor) to the liver. H&E stain, $\times 100$. С – immunohistochemical assay with PLAP antibodies in the tumor tissue, $\times 200$

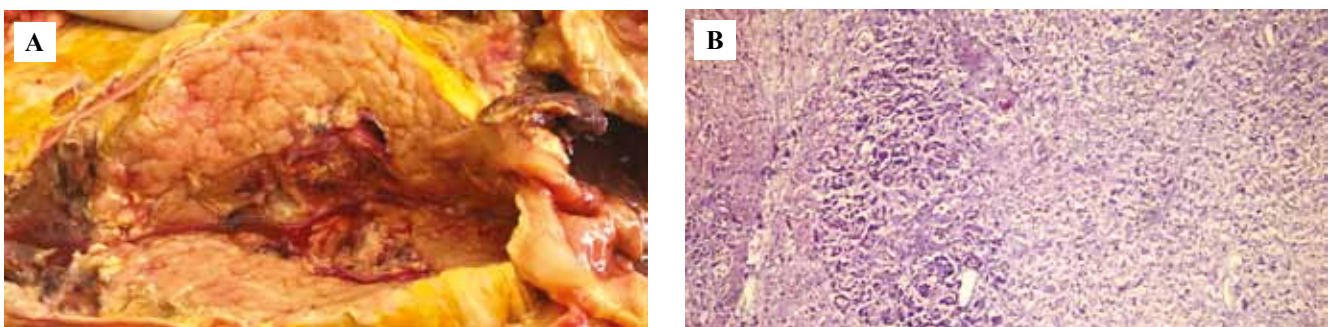


Рис. 6. Острый панкреатит.

А – внешний вид поджелудочной железы с фокусами стеатонекроза, В – участки коагуляционного некроза паренхимы поджелудочной железы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 6. Acute pancreatitis.

А – the pancreas with steatonecrosis foci. Gross image, В – coagulation necrosis areas in the pancreatic parenchyma. H&E stain, $\times 100$

большой инфильтрацией лимфоцитами. В синусоидах ложных долек отмечалась капилляризация синусоидов.

Из этой группы обращает на себя внимание интересный и довольно редкий случай с генерализованным пародонитом, гингивитом и остеомиелитом альвеолярных отростков обеих челюстей при наличии кариеса, осложнившийся одонтогенным сепсисом, септическим шоком, что подтвердилось при дополнительном бактериологическом исследовании крови из правого предсердия (*Streptococcus*, beta-haem. Group G).

Другие болезни крови и кроветворных органов и отдельные нарушения с вовлечением иммунного механизма, осложняющие беременность. За семилетний период исследования диагноз «антифосфолипидный синдром» был поставлен в двух случаях. Антифосфолипидный синдром (АФС) представляет собой аутоиммунное состояние, которое характеризуется тромбэмболическими явлениями и/или неблагоприятными исходами беременности в присутствии устойчивых циркулирующих антифосфолипидных антител. Антитела при этом заболевании направлены против отрицательно заряженных фосфолипидов или фосфолипид-белковых комплексов. Хотя антифосфолипидные антитела могут быть обнаружены у 1–5% от общей популяции, АФС диагностируется с предполагаемой частотой около 40–50 на 100 000 беременностей [25].

Патогенез тромбоза при АФС изучен недостаточно хорошо и включает взаимодействие многочисленных клеток и факторов. Основное звено патогенеза основано на активации эндотелиальных клеток, что приводит к провоспалительному и прокоагулянтному состоянию эндотелия с повышенной агрегацией лейкоцитов. Другие механизмы подразумевают участие моноцитов, тканевого фактора, фактора XI, тромбоцитов, аннексина и каскада комплемента, а также ингибирование фибринолитической и антикоагулянтной систем [26]. В настоящее время эксперты считают, что связывание антител с $\beta 2$ -гликопротеином I опосредует окислительный стресс, что приводит к разрушению клеточных мембран [27]. Еще один механизм предполагает, что неблагоприятные исходы при АФС связаны с трофобластическим повреждением и сниженной васкуляризацией плаценты с последующей плацентарной недостаточностью [28]. Нами данный диагноз был подтвержден благодаря наличию выраженного тромбогеморрагического синдрома (тромбоцитопения, флеботромбоз нижних конечностей, тромбоз ветвей легочной артерии, тромбоз сосудов миометрия), а также положительному анализу на волчаночный антикоагулянт (рис. 7 А). Микроскопически определялись признаки окклюзии сосудов в трех и более органах с наличием разных по составу тромбов (белые, эритроцитарные) (рис. 7 В).

Болезни органов дыхания. Определенные анатомо-физиологические изменения, происходящие с дыхательной системой, такие как высокое стояние диафрагмы, снижение экскурсии, уменьшение дыхательной поверхности легких, создают благоприятные условия

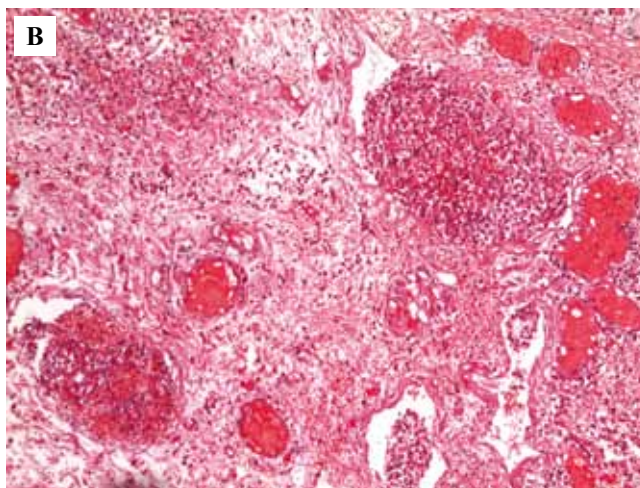


Рис. 7. Антифосфолипидный синдром.

А – внешний вид ткани легкого с множественными геморрагическими инфарктами, В – множественные смешанные тромбы в просвете легочных артериол. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 7. Antiphospholipid syndrome.

A – lung tissue with multiple hemorrhagic infarctions. Gross image, B – multiple mixed blood clots in the pulmonary arterioles' lumens. H&E stain, $\times 100$

для проникновения инфекционных агентов в дыхательную систему [29]. Материнская смертность от внебольничной пневмонии хотя и остается значительной, снизилась благодаря использованию антибиотиков до 4% и в большинстве наблюдается у пациенток с сопутствующими заболеваниями [30]. Наиболее распространенные бактериальные агенты, выявляемые при воспалительных заболеваниях легких среди беременных, включают *Streptococcus pneumoniae* в 17% случаев

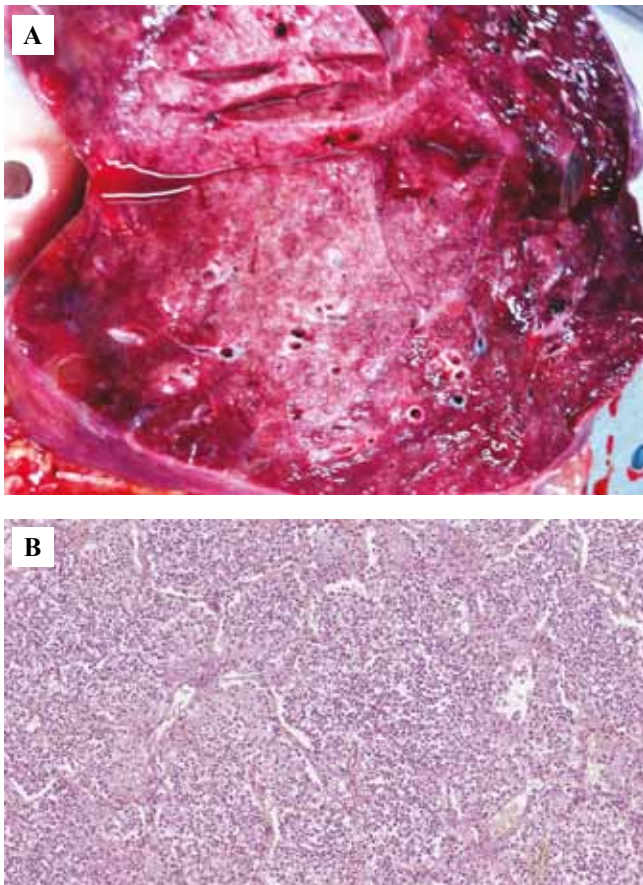


Рис. 8. Бактериальная пневмония.
А – внешний вид ткани легкого с очагами пневмонии,
В – диффузная лейкоцитарная внутриальвеолярная
инфильтрация. Окраска гематоксилином
и эозином, $\times 200$

Fig. 8. Bacterial pneumonia.
А – lung tissue with pneumonia foci,
В – diffuse leukocyte intraalveolar infiltration.
H&E stain, $\times 200$

и *Haemophilus influenzae*, обнаруженные в 6% наблюдений. Вирусная пневмония во время беременности диагностируется примерно в 5% случаев, причем наиболее распространенными вирусными возбудителями являются ветряная оспа и грипп. Другие идентифицированные организмы включают *Mycoplasma*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas*. Грибковые и протозойные организмы также могут приводить к легочной инфекции во время беременности, обычно поражая пациенток с ослабленным иммунитетом [31].

Нами зарегистрированы два наблюдения с двусторонней внебольничной бактериальной пневмонией (рис. 8 А). Возбудителем пневмонии в одном случае послужила *Klebsiella pneumoniae*, в другом диплококковая флора, причем во втором наблюдении пневмония развивалась на фоне наркомании (героиновая зависимость). Микроскопическое строение легочной ткани в обоих случаях характеризовалось отеком, десквамацией аль-

веолярного эпителия и выраженным лейкоцитарно-макрофагальным инфильтратом (рис. 8 В).

Выводы

Результаты нашего исследования подтверждают ведущую роль заболеваний системы кровообращения в структуре материнской смертности в Москве за 2013–2019 годы. Значительная часть болезней сердечно-сосудистой системы у таких пациенток является врожденной, что требует постоянного наблюдения и тщательной оценки рисков беременности. Оставшаяся часть заболеваний из этой группы зачастую протекает бессимптомно, что создает значительные сложности в своевременной диагностике. Определенную трудность в диагностике представляет группа онкологических заболеваний у беременных, требующих онконастороженности со стороны акушеров. Важная роль отводится своевременной диагностике такого грозного осложнения беременности как антифосфолипидный синдром, для подтверждения которого обязательно серологическое исследование. Таким образом, необходимость организации эффективного терапевтического наблюдения пациенток с экстрагенитальной патологией, готовящихся стать матерями, во всех возрастных и физиологических периодах их жизни очевидна и относится к наиболее актуальным вопросам современного здравоохранения.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Л.М. Михалева, А.Г. Коноплянников, А.С. Оленев.
Сбор и обработка материалов – Я.Ю. Кудрявцева.
Написание текста – Я.Ю. Кудрявцева, Н.А. Грачева, А.Е. Бирюков, С.А. Михалев.
Редактирование – Л.М. Михалева, Е.Н. Сонголова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – L.M. Mikhaleva, A.G. Konoplyannikov, A.S. Olenov.
Collected the data and performed the analysis – Y.Y. Kudryavtseva.
Wrote the paper – Y.Y. Kudryavtseva, N.A. Gracheva, A.E. Biryukov, S.A. Mikhalev.
Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva, E.N. Songolova.

Литература/References

1. Alkema L, Chou D, Hogan D, Zhang S, Moller AB, Gemmill A et al. Global, regional and national levels and trends in maternal mortality between 1990 and 2015. *Lancet*. 2016;387(10017):462–74. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00838-7.
2. Nair M, Nelson-Piercy C, Knight M. Indirect maternal deaths: UK and global perspectives. *Obstet Med*. 2017;10(1):10–5. DOI: 10.1177/1753495X16689444.
3. Storm F, Agampodi S, Eddleston M, Sorensen JB, Konradsen F, Rheinländer T. Indirect causes of maternal death. *Lancet Glob Health*. 2014;2(10):e566. DOI: 10.1016/s2214-109x(14)70297-9.
4. Михалева Л.М., Коноплянников А.Г., Кудрявцева Я.Ю., Оленев А.С., Грачева Н.А., Бирюков А.Е. и др. Акушерские причины материнской смертности. Результаты патологоанатомических исследований. Вопросы гинекологии, акушерства

- и перинатологии. 2020;19(4):99–109. DOI: 10.20953/1726-1678-2020-4-99-109.
- Mikhaleva LM, Konoplyannikov AG, Kudryavtseva YaYu, Olenov AS, Gracheva NA, Biryukov AE et al. Obstetrical causes of maternal mortality. Results of pathoanatomical examinations. *Gynecology, Obstetrics and Perinatology*. 2020;19(4):99–109 (In Russ.). DOI: 10.20953/1726-1678-2020-4-99-109.
5. Михалева Л.М., Коноплинников А.Г., Кудрявцева Я.Ю., Пархоменко Ю.Г., Оленев А.С., Тишкевич О.А. и др. Роль экстрагенитальной инфекционной патологии в структуре материнской смертности г. Москвы. Клиническая и экспериментальная морфология. 2020;9(3):34–42. DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.34-42.
Mikhaleva LM, Konoplyannikov AG, Kudryavtseva YY, Parhomenko YG, Olenov AS, Tishkevich OA et al. The role of extragenital infectious pathology in the structure of maternal mortality in Moscow. *Clinical and experimental morphology*. 2020;9(3):34–42 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.3.34-42.
 6. Kampman MA, Valente MA, van Melle JP, Balci A, Roos-Hesselink JW, Mulder BJ et al. Cardiac adaptation during pregnancy in women with congenital heart disease and healthy women. *Heart*. 2016;102(16):1302–8. DOI: 10.1136/heartjnl-2015-308946.
 7. Dolinak D. Chapter 23: Pregnancy. In: D Dolinak, EW Matshes, EO Lew. (eds.). *Forensic pathology: Principles and practice*. 1st ed. Burlington: Elsevier Academic Press. 2005. P. 509–526.
 8. James AH, Bushnell CD, Jamison MG, Myers ER. Incidence and risk factors for stroke in pregnancy and puerperium. *Obstet Gynecol*. 2005;106(3):509–16. DOI: 10.1097/01.AOG.0000172428.78411.b0.
 9. Takahashi JC, Iihara K, Ishii A, Watanabe E, Ikeda T, Miyamoto S. Pregnancy-associated intracranial hemorrhage: results of a survey of neurosurgical institutes across Japan. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(2):e65–71. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.08.017.
 10. Santiago-Sim T, Depalma SR, Ju KL, McDonough B, Seidman CE, Seidman JG et al. Genomewide linkage in a large Caucasian family maps a new locus for intracranial aneurysms to chromosome 13q. *Stroke*. 2009;40(3 Suppl):S57–60. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.534396.
 11. Salonen RH, Lichtenstein P, Bellocco R, Petersson G, Cnattingius S. Increased risks of circulatory diseases in late pregnancy and puerperium. *Epidemiology*. 2001;12(4):456–60. DOI: 10.1097/00001648-200107000-00016.
 12. Kim YW, Neal D, Hoh BL. Cerebral aneurysms in pregnancy and delivery: pregnancy and delivery do not increase the risk of aneurysm rupture. *Neurosurgery*. 2013;72(2):143–50. DOI: 10.1227/NEU.0b013e3182796af9.
 13. Stapf C, Mast H, Sciacca RR, Berenstein A, Nelson PK, Gobin YP et al. The New York Islands AVM Study: design, study progress, and initial results. *Stroke*. 2003;34(5):e29–33. DOI: 10.1161/01.STR.0000068784.36838.19.
 14. Porras JL, Yang W, Philadelphia E, Law J, Garzon-Muvdi T, Caplan JM et al. Hemorrhage risk of brain arteriovenous malformations during pregnancy and puerperium in a North American cohort. *Stroke*. 2017;48(6):1507–13. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.016828.
 15. James AH, Jamison MG, Biswas MS, Brancazio LR, Swamy GK, Myers ER. Acute myocardial infarction in pregnancy: a United States population-based study. *Circulation*. 2006;113(12):1564–71. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.576751.
 16. Roth A, Elkayam U. Acute myocardial infarction associated with pregnancy. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(3):171–80. DOI: 10.1016/j.jacc.2008.03.049.
 17. Nisell H, Hjemdahl P, Linde B. Cardiovascular responses to circulating catecholamines in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Clin Physiol*. 1985;5(5):479–93. DOI: 10.1111/j.1475-097x.1985.tb00779.x.
 18. Barbosa PJB, Lopes AA, Feitosa GS, Almeida RV, Silva RM, Brito JC et al. Prognostic factors of rheumatic mitral stenosis during pregnancy and puerperium. *Arq Bras Cardiol*. 2000;75(3):220–4. DOI: 10.1590/s0066-782x2000000900003.
 19. Eibye S, Kjær SK, Mellekjær L. Incidence of pregnancy associated cancer in Denmark, 1977–2006. *Obstet Gynecol*. 2013;122(3):608–17. DOI: 10.1097/AOG.0b013e3182a057a2.
 20. Anderson PO. Cancer chemotherapy. *Breastfeed Med*. 2016;11(4):164–5. DOI: 10.1089/bfm.2016.0042.
 21. Verma S, Goyal R. A case report on decidual cast. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*. 2016;5(12):4478–9. DOI: 10.18203/2320-1770.ijrcog20164366.
 22. Ramin KD, Ramin SM, Richey SD, Cunningham FG. Acute pancreatitis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;173(1):187–91. DOI: 10.1016/0002-9378(95)90188-4.
 23. Tan J, Surti B, Saab S. Pregnancy and cirrhosis. *Liver Transpl*. 2008;14(8):1081–91. DOI: 10.1002/lt.21572.
 24. Westbrook RH, Yeoman AD, O'Grady JG, Harrison PM, Devlin J, Heneghan MA. Model for end-stage liver disease score predicts outcome in cirrhotic patients during pregnancy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(8):694–9. DOI: 10.1016/j.cgh.2011.03.036.
 25. Cervera R. Antiphospholipid syndrome. *Thromb Res*. 2017;151(Suppl. 1):S43–7. DOI: 10.1016/S0049-3848(17)30066-X.
 26. Khamashta M, Taraborelli M, Sciascia S, Tincani A. Antiphospholipid syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2016;30(1):133–48. DOI: 10.1016/j.berh.2016.04.002.
 27. de Groot PG, Urbanus RT. Antiphospholipid syndrome – not a noninflammatory disease. *Semin Thromb Hemost*. 2015;41(6):607–14. DOI: 10.1055/s-0035-1556725.
 28. Schreiber K, Radin M, Sciascia S. Current insights in obstetric antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2017;29(6):397–403. DOI: 10.1097/GCO.0000000000000406.
 29. Grindheim G, Toska K, Estensen ME, Rosseland LA. Changes in pulmonary function during pregnancy: a longitudinal cohort study. *BJOG*. 2012;119(1):94–101. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2011.03158.x.
 30. Panting-Kemp A, Geller SE, Nguyen T, Simonson L, Nuwayhid B, Castro L. Maternal deaths in an urban perinatal network, 1992–1998. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(5):1207–12. DOI: 10.1067/mob.2000.108846.
 31. Lim WS, Macfarlane JT, Colthorpe CL. Treatment of community-acquired lower respiratory tract infections during pregnancy. *Am J Respir Med*. 2003;2(3):221–33. DOI: 10.1007/BF03256651.

Информация об авторах

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

Александр Георгиевич Конопляников – доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова; акушер-гинеколог ЦПСиР.

Янина Юрьевна Кудрявцева – ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института РУДН.

Антон Сергеевич Оленев – кандидат медицинских наук, главный внештатный специалист по акушерству и гинекологии, заведующий Перинатальным центром ГКБ № 24, доцент кафедры акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Медицинского института РУДН.

Наталья Александровна Грачева – кандидат медицинских наук, врач- патологоанатом ГКБ № 31.

Андрей Евгеньевич Бирюков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека; врач-патологоанатом ГКБ № 31.

Сергей Александрович Михалев – акушер-гинеколог; заведующий отделением платных медицинских услуг ЦПСиР.

Екатерина Николаевна Сонголова – кандидат медицинских наук, заместитель главного врача по акушерству и гинекологии ГКБ № 67 имени Л.А. Ворохобова.

Author information

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

Alexander G. Konoplyannikov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Pediatric Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University; Obstetrician and Gynecologist, Family Planning and Reproduction Center.
<https://orcid.org/0000-0001-9923-8833>

Yanina Yu. Kudryavtseva – Assistant, Pathology Department, Peoples' Friendship University of Russia.
<https://orcid.org/0000-0002-7218-0798>

Anton S. Olenov – Cand. Sci. (Med.), Chief External Expert in Obstetrics and Gynecology; Head of the Perinatal Center of City Clinical Hospital No. 24; Associate Professor, Obstetrics and Gynecology Department with Perinatology Course, Peoples' Friendship University of Russia.
<https://orcid.org/0000-0001-9632-6731>

Nataliya A. Gracheva – Cand. Sci. (Med.), Pathologist, City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0001-7286-6629>

Andrey E. Biryukov – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, Research Institute of Human Morphology; Pathologist, City Clinical Hospital No. 31.
<https://orcid.org/0000-0001-9700-3352>

Sergey A. Mikhalev – Obstetrician-Gynecologist, Head of the Department of Commercial Medical Services, Family Planning and Reproduction Center.
<https://orcid.org/0000-0002-4822-0956>

Ekaterina N. Songolova – Cand. Sci. (Med.), Deputy Chief Doctor in Obstetrics and Gynecology, L.A. Vorokhobov City Clinical Hospital No. 67.
<https://orcid.org/0000-0003-4366-2306>

PU.1 – ядерный маркер иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы при колоректальном раке

О.В. Ковалева¹, А.Н. Грачев¹, П.А. Подлесная¹, М.А. Рашидова¹, Д.В. Самойлова¹,
Н.Ю. Соколов¹, З.З. Мамедли¹, Д.А. Кудлай², Н.Е. Кушлинский¹

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Введение. Макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO), традиционно считаются проопухолевым фактором, способствующим росту многих новообразований. Тем не менее для колоректального рака (КРР) прогностическая значимость MAO до конца не определена, что может быть связано с отсутствием маркеров макрофагов, подходящих для данной опухоли. Цель исследования – изучение экспрессии ядерного маркера стромальных клеток PU.1 в КРР и ее ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками опухолей.

Материалы и методы. Иммуногистохимическим методом проведен анализ экспрессии PU.1, CD68 и CD20 в 85 первичных опухолях пациентов с КРР. Для определения статистически значимых различий в независимых группах использовали критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ экспрессии исследуемых белков проводили с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Экспрессия PU.1 и CD68 обнаружена в клетках стромы опухолей в 100% образцов, а CD20 – в 87%. Показано, что при КРР все CD68⁺ или CD20⁺ клетки экспрессируют PU.1, при этом PU.1 и CD20 статистически значимо ассоциированы со стадией заболевания ($p=0,036$; $p=0,002$) и наличием регионарных метастазов ($p=0,022$; $p=0,007$). Отмечена статистически значимая связь экспрессии PU.1 в опухоли с наличием отдаленных метастазов и локализацией новообразования в толстой кишке ($p=0,031$; $p=0,022$). Для CD20 также показана значимая ассоциация маркера с размером КРР ($p=0,025$). Экспрессия CD68 не связана с клинико-морфологическими характеристиками КРР. Кроме того, количество PU.1⁺ клеток в опухолях статистически значимо положительно коррелирует с CD68 ($r=0,231$, $p=0,036$) и CD20 ($r=0,267$, $p=0,015$).

Заключение. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что PU.1 можно рассматривать в качестве независимого маркера благоприятного прогноза при КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, экспрессия CD20, CD68, PU.1, макрофаги, В-клетки

Для корреспонденции: Ольга Владимировна Ковалева. E-mail: ovkovaleva@gmail.com

Для цитирования: Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А., Рашидова М.А., Самойлова Д.В., Соколов Н.Ю., Мамедли З.З., Кудлай Д.А., Кушлинский Н.Е. PU.1 – ядерный маркер иммунокомпетентных клеток опухолевой стромы при колоректальном раке. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):32–39. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32-39.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-09069.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 30.03.2021. Получена после рецензирования 14.04.2021. Принята в печать 21.04.2021.

PU.1 is a nuclear factor of immunocompetent cells of tumor stroma in colorectal cancer

O.V. Kovaleva¹, A.N. Gratchev¹, P.A. Podlesnaya¹, M.A. Rashidova¹, D.V. Samoilova¹,
N.Yu. Sokolov¹, Z.Z. Mamedli¹, D.A. Kudlay², N.E. Kushlinskii¹

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

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

Introduction. Tumor-associated macrophages (TAMs) are traditionally considered to be a pro-tumor factor that promotes the growth of various tumors; however, for colorectal carcinomas (CRC), the prognostic significance of TAMs has not been fully determined, which may be due to the lack of macrophage markers suitable for this tumor type. The aim of this work was to study the expression of the nuclear marker of stromal cells PU.1 in colorectal tumors and its association with the clinical and morphological tumor characteristics.

Materials and methods. We performed an immunohistochemical analysis to assess the expression of PU.1, CD68, and CD20 in 85 primary CRCs. The Mann-Whitney test was used to determine statistically significant differences in independent groups. Correlation analysis of the expression of the studied protein was carried out by determining the Spearman's rank correlation coefficient. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. We analyzed the expression of PU.1, CD68, and CD20 in CRC and detected positive PU.1 and CD68 expressions in tumor stromal cells in all of the studied samples. Expression of CD20 was observed in 87% of cases. We showed that in colorectal tumors all CD68+ or CD20+ cells express PU.1 and that PU.1 and CD20 were significantly associated with the disease stage ($p=0.036$ and $p=0.002$) and the presence or absence of regional metastases ($p=0.022$ and $p=0.007$). In addition, PU.1 showed a significant correlation with the distant metastases' presence and tumor localization ($p=0.031$ and $p=0.022$). Higher content of PU.1 was typical for colon tumors without metastases. CD20 also showed a significant association with tumor size ($p=0.025$). No significant correlations with clinical and morphological features were found for CD68. We also demonstrated that the number of PU.1+ cells in tumors significantly positively correlates with CD68 ($r=0.231$, $p=0.036$) and CD20 ($r=0.267$, $p=0.015$).

Conclusion. The results of this study indicate that PU.1 can be considered as an independent marker of a favorable prognosis in CRC patients.

Keywords: colorectal cancer, expression, CD20, CD68, PU.1, macrophages, B-cells

Corresponding author: Olga V. Kovaleva. E-mail: ovkovaleva@gmail.com

For citation: Kovaleva O.V., Gratchev A.N., Podlesnaya P.A., Rashidova M.A., Samoilova D.V., Sokolov N.Yu., Mamedli Z.Z., Kudlay D.A., Kushlinskii N.E. PU.1 is a nuclear factor of immunocompetent cells of tumor stroma in colorectal cancer. *Clin. exp. morphology.* 2021;10(2):32–39. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32–39 (In Russ.).

Funding. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 18-29-09069.

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

Received 30.03.2021. **Received in revised form** 14.04.2021. **Accepted** 21.04.2021.

Введение

Изучение противоопухолевого иммунитета стало неотъемлемой частью исследований, посвященных биологии рака. Активность иммунной системы может как защищать от возникновения опухолей, так и способствовать их появлению и развитию [1]. Макрофаги, ассоциированные с опухолью (MAO), традиционно считаются проопухолевым фактором, способствующим росту многих новообразований [2]. Для колоректального рака (КРР) прогностическая значимость MAO до конца не определена, но некоторые исследователи рассматривают их как фактор благоприятного прогноза для данного типа опухолей [3, 4]. Высокий уровень инфильтрации опухолей Т-клетками для многих типов новообразований, включая КРР, является фактором благоприятного прогноза [5, 6]. Инфильтрация опухоли CD20⁺ В-клетками считается благоприятным прогностическим фактором рака молочной железы, шейки матки, а также немелкоклеточного рака легкого [7–9]. Для КРР инфильтрация опухоли CD20⁺ клетками также может быть фактором благоприятного прогноза [10].

PU.1 представляет собой транскрипционный фактор, играющий важную роль в гемопоэзе. Экспрессия PU.1 необходима для нормального гемопоэза и наблюдается в различных гемопоэтических клетках, включая CD34⁺ клетки, макрофаги, В-лимфоциты, нейтрофилы, тучные клетки, ранние эритробласты и остеокласты. PU.1 регулирует экспрессию важных миелоидных генов, таких как рецепторы M-CSF, G-CSF

и GM-CSF. Уровень экспрессии PU.1 определяет развитие клетки-предшественника в макрофаг, гранулоцит или В-лимфоцит. Низкий уровень экспрессии PU.1 ассоциирован с В-клеточной дифференцировкой, в то время как высокий уровень экспрессии данного белка стимулирует развитие макрофагов. Опубликовано всего два исследования, посвященных экспрессии PU.1 в солидных опухолях и ее прогностической значимости [11, 12].

Так как PU.1 экспрессируется в разных типах клеток воспалительного инфильтрата опухолей, в представленном нами исследовании впервые проведено комплексное изучение экспрессии CD20, CD68 и PU.1 в опухолях пациентов с КРР, проанализирована их связь с клиническими и морфологическими характеристиками заболевания.

Материалы и методы

В исследование были включены 85 первичных пациентов с КРР, проходивших обследование и лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина. Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствуют стандартам этического комитета организации, Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям. От каждого включенного в исследование участника получено добровольное информированное согласие. Клинический диагноз у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли со-

гласно Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019), у всех выявлена аденокарцинома толстой кишки. Детальное описание исследуемой выборки представлено в таблице 1.

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование экспрессии CD68, PU.1 и CD20 выполнено по стандартной методике на срезах опухолевой ткани. Для демаскировки антигена использовали Tris-EDTA буфер pH 9,0 («ПраймБиоМед», Россия). Первичные антитела к PU.1 (4G6; «ПраймБиоМед», Россия, разведение 1:200), CD68 (GR021, 61-0184 Genemed, США, разведение 1:100) и CD20 (RM272, SAB5600082, Sigma-Aldrich, США, разведение 1:1000) инкубировали в течение 30 минут. Использовали систему детекции PrimeVision Ms/Rb HRP/DAV (78-310004, «ПраймБиоМед», Россия) и двухцветную систему детекции Power Stain Ms/HRP – Rb/AP (52-0023, Genemed, США) согласно инструкции производителя.

Полученные препараты оценивали с помощью микроскопа BX53 (Olympus, Япония), камеры INFINITY2-2C (Lumenera, Канада) и программного обеспечения Infinity analyze (Lumenera, Канада). Экспрессию CD68, PU.1 и CD20 оценивали в строме опухоли. В каждом случае оценку количества CD68, PU.1 и CD20 положительных клеток осуществляли при $\times 400$ в 5 независимых полях зрения путем прямого подсчета. Содержание CD68, PU.1 и CD20 в строме опухоли выражали как среднее значение количества клеток в поле зрения.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ GraphPad Prism v. 9. Проверку вариационных рядов на нормальность производили с помощью критериев Колмогорова–Смирнова и Д'Агостино. Для определения статистически значимых различий в независимых группах использовали критерий Манна–Уитни. Корреляционный анализ экспрессии исследуемых белков проводили с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия PU.1, CD20, CD68 в опухолях пациентов с KPP

Экспрессию PU.1 и CD68 выявили в 100% исследованных образцов KPP, а CD20 – в 87% случаев (74 из 85). Анализ результатов исследования показал, что среднее содержание PU.1⁺ клеток в образце составляет 28,7 (3,2–67,2) клетки в поле зрения. Содержание CD68⁺ клеток составило 25,6 (9,6–44,8) в поле зрения, CD20⁺ клеток – 10,3 (2,6–57,4). Таким образом, В-клетки обнаружены в опухолях пациентов с KPP в значительно меньшем количестве по сравнению с другими типами

Таблица 1 | Table 1

Клинико-морфологические характеристики пациентов с KPP | Clinical and pathological features of 85 CRC patients

Характеристика Feature	Абс. (Отн.) Abs. (Relative)
Возраст Age	
≤60	30 (35%)
>60	55 (65%)
Пол Sex	
мужской male	46 (54%)
женский female	39 (46%)
Стадия заболевания Stage	
I–II	57 (67%)
III–IV	28 (33%)
Размер первичной опухоли Primary tumor size	
T1–2	27 (32%)
T3–4	58 (42%)
Наличие регионарных метастазов Nodal status	
N–	62 (73%)
N+	23 (27%)
Наличие отдаленных метастазов Metastases	
M–	73 (86%)
M+	12 (14%)
Степень дифференцировки опухоли Tumor grade	
G1	21 (25%)
G2/3	64 (75%)
Локализация опухоли Tumor localization	
прямая кишка rectum	30 (35%)
толстая кишка colon	55 (65%)

клеток воспалительного инфильтрата. Распределение содержания клеток между образцами и примеры ИГХ окрашивания представлены на рисунке 1.

Из приведенных фотографий следует, что CD68⁺ макрофаги располагаются равномерно в строме опухоли. CD20⁺ клетки могут как диффузно локализоваться в строме опухоли, так и образовывать очаговые лимфоидные инфильтраты. CD20⁺ плазмочитарные лимфоидные инфильтраты обнаружены в 55% образцов (47 из 85). PU.1 экспрессируется разными типами клеток, преимущественно макрофагами и В-клетками с различной интенсивностью. Макрофаги характеризуются максимальной экспрессией PU.1 по сравнению с В-клетками.

Далее провели попарное двойное окрашивание PU.1/CD20 и PU.1/CD68 для того, чтобы определить, экспрессируют ли PU.1 все CD20⁺ и CD68⁺ клетки. Результаты окрашивания представлены на рисунке 2.

Проведенный анализ показал, что все CD68⁺ или CD20⁺ клетки экспрессируют PU.1.

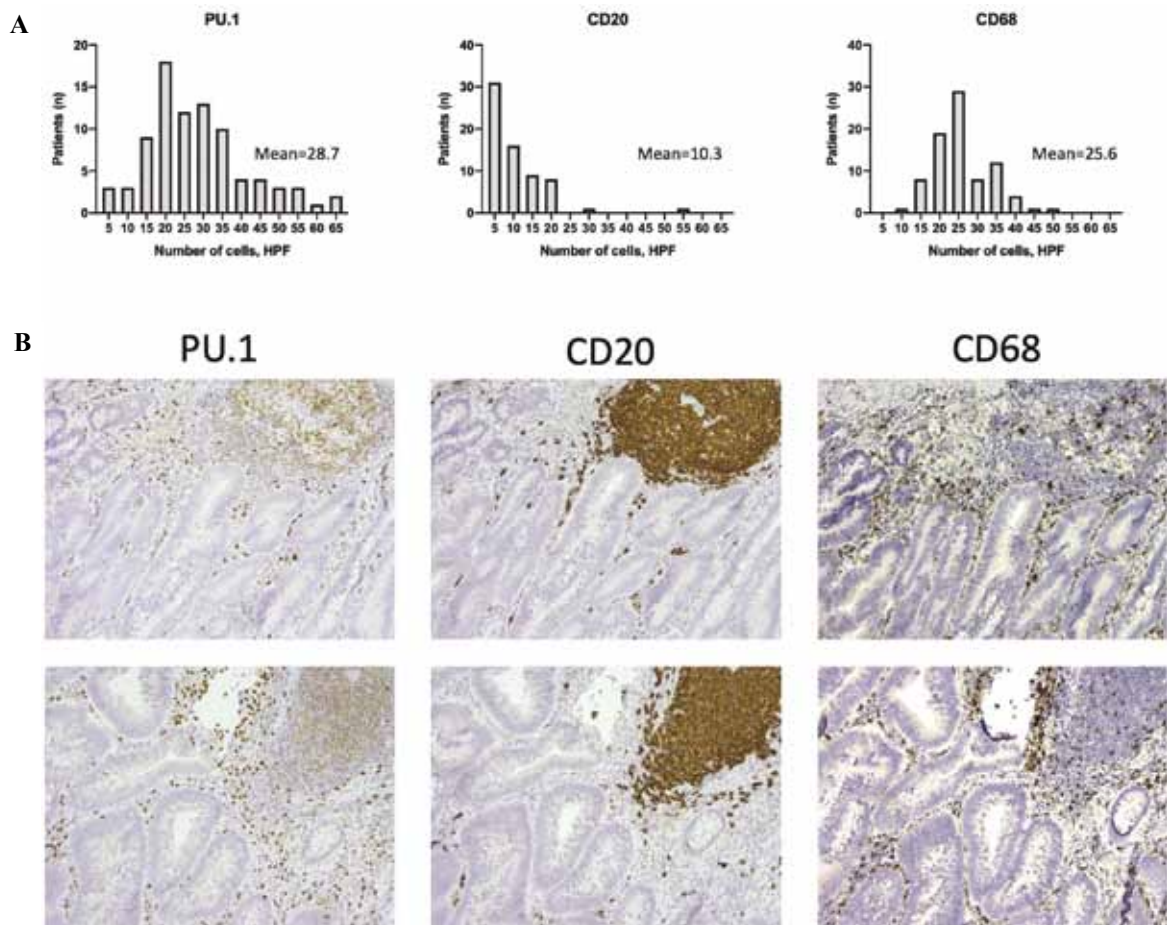


Рис. 1. Экспрессия CD68, PU.1 и CD20 в строме КРП.

А – распределение содержания CD68⁺, PU.1⁺ и CD20⁺ клеток у 80 пациентов с КРП, В – пример индивидуального окрашивания CD68, PU.1 и CD20 в строме КРП (×100)

Fig. 1. CD68, PU.1, and CD20 expression in the CRC stroma.

А – distribution of infiltrating CD68⁺, PU.1⁺, and CD20⁺ cells in the cohort of 80 CRC patients, В – staining pattern illustration of CD68, PU.1, and CD20 in the CRC stroma (×100)

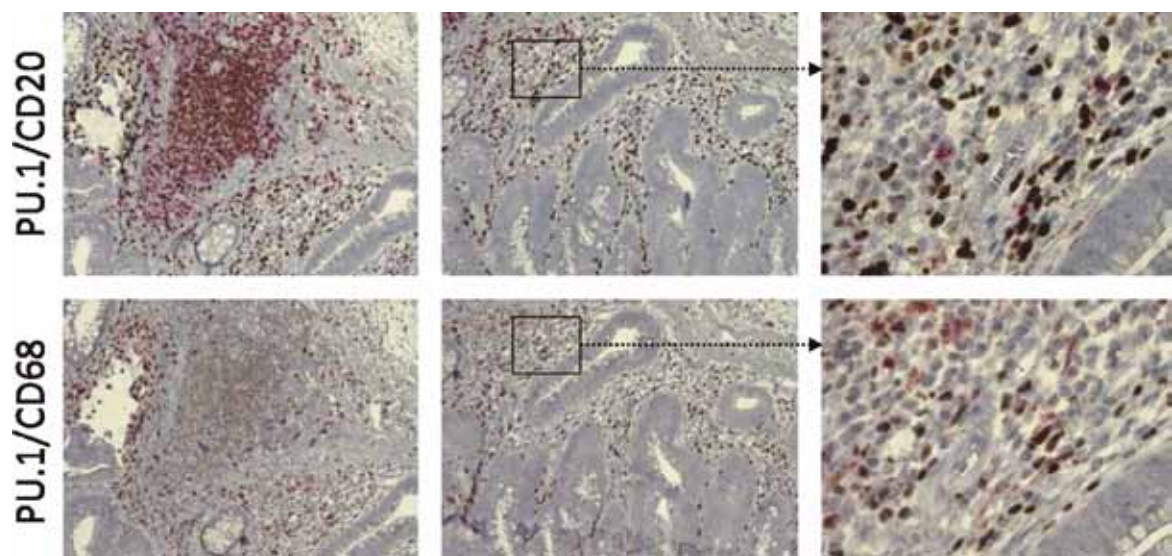


Рис. 2. Двойное окрашивание PU.1/CD20 и PU.1/CD68 в строме опухолей пациентов с КРП. PU.1 – коричневое окрашивание, CD20 и CD68 – красное окрашивание (×100, правая панель ×400)

Fig. 2. Double staining PU.1/CD20 and PU.1/CD68 in the CRC stroma. PU.1 – brown staining, CD20 and CD68 – red staining (×100, right panel ×400)

Ассоциация содержания CD68, PU.1 и CD20 с клиническими и морфологическими характеристиками КРР

Провели анализ содержания CD68, PU.1 и CD20 положительных клеток в строме КРР с учетом основных клинико-морфологических характеристик заболевания. Результаты представлены в таблице 2.

Показано, что PU.1 и CD20 статистически значимо ассоциированы со стадией КРР и наличием регионарных метастазов, при этом для начальных стадий заболевания и при отсутствии метастазов в лимфоузлах наблюдали большее количество PU.1⁺ и CD20⁺ клеток. Помимо этого, для PU.1 выявлена статистически значимая связь маркера с наличием отдаленных метастазов и локализацией новообразования в толстой кишке. Большее количество PU.1⁺ клеток характерно для опухолей толстой кишки при отсутствии метастазов. Для CD20 также показана

статистически значимая ассоциация маркера с размером опухоли. Для CD68 не выявлены значимые связи с основными клиническими и морфологическими характеристиками КРР. Необходимо отметить, что наличие в опухоли CD20⁺ очаговых лимфоидных инфильтратов не связано с клинико-морфологическими характеристиками КРР (данные не представлены).

Провели корреляционный анализ экспрессии PU.1, CD20 и CD68 в опухолях пациентов с КРР. Результаты представлены в таблице 3.

На основании анализа полученных данных следует отметить, что содержание PU.1⁺ клеток в КРР статистически значимо положительно коррелирует с CD68 ($r=0,231$, $p=0,036$) и CD20 ($r=0,267$, $p=0,015$). Кроме того, необходимо указать на положительную корреляционную связь между содержанием CD68⁺ и CD20⁺ клеток в строме КРР.

Таблица 2 | Table 2

Ассоциация содержания PU.1, CD20 и CD68 с учетом клинических и морфологических характеристик КРР | PU.1, CD20, and CD68 associated with clinical and morphological features of CRC

Факторы Factors	N	PU.1		CD20		CD68	
		Среднее (мин.–макс.) Mean (min–max)	p	Среднее (мин.–макс.) Mean (min–max)	p	Среднее (мин.–макс.) Mean (min–max)	p
Возраст Age							
≤60	30	26,74 (5,2–64,6)	0,293	8,17 (0–28,4)	0,995	23,77 (0–40,6)	0,188
>60	55	29,71 (3,2–67,2)		8,22 (0–57,4)		26,5 (9,6–44,8)	
Пол Sex							
мужской male	46	29,39 (5,2–67,2)	0,666	7,16 (0–22)	0,717	24,4 (0–44,2)	0,476
женский female	39	27,8 (3,2–64,6)		9,44 (0–57,4)		26,3 (12–44,8)	
Стадия заболевания Stage							
I–II	57	30,52 (3,2–67,2)	0,036	9,8 (0–57,4)	0,002	25,3 (0–44,8)	0,690
III–IV	28	24,88 (5,2–64,6)		4,8 (0–19,2)		25,13 (12–40,6)	
Размер опухоли Tumor size							
T1–T2	27	30,24 (5,8–61)	0,451	10,1 (0–28,4)	0,025	24,2 (0–44,2)	0,608
T3–T4	58	27,92 (3,2–67,2)		7,29 (0–57,4)		25,7 (9,6–44,8)	
Наличие регионарных метастазов Nodal status							
N0	62	30,64 (3,2–67,2)	0,022	9,4 (0–57,4)	0,007	25 (0–44,8)	0,744
N+	23	23,32 (5,2–57,2)		4,8 (0–19,2)		25,9 (16–40,6)	
Наличие отдаленных метастазов Metastases							
M0	73	29,63 (3,2–67,2)	0,031	8,7 (0–57,4)	0,087	25,6 (0–44,8)	0,148
M+	12	22,77 (5,2–64,6)		4,8 (0–14,2)		23 (12–33,6)	
Степень дифференцировки опухоли Tumor grade							
G1	21	29,11 (12,6–61)	0,849	9,9 (0–57,4)	0,543	23,6 (0–44,8)	0,295
G2/3	64	28,51 (3,2–67,2)		7,62 (0–28,4)		25,8 (9,6–44,2)	
Локализация опухоли Tumor localization							
прямая кишка rectum	30	23,95 (5,2–53,2)	0,022	7,88 (0–57,4)	0,538	25 (0–44,8)	0,672
толстая кишка colon	55	31,23 (3,2–67,2)		8,79 (0–28,4)		25,6 (12–44,2)	

Таблица 3 | Table 3

**Корреляционный анализ экспрессии PU.1, CD20 и CD68 |
PU.1, CD20, and CD68 expression correlation analysis**

Маркеры Markers	PU.1	CD20	CD68
PU.1			
г		0,333	0,231
р		0,002	0,036
CD20			
г	0,333		0,267
р	0,002		0,015
CD68			
г	0,231	0,267	
р	0,036	0,015	

Обсуждение

КРР является актуальной проблемой современной онкологии, требующей разработки новых терапевтических стратегий. Ввиду повсеместного распространения иммунотерапевтических методов лечения в последнее время все больше внимания уделяют исследованию состава опухолевого микроокружения. С одной стороны, большое число научных работ посвящено опухолюассоциированным фибробластам, а с другой – иммунному компоненту стромы опухоли. Анализируя воспалительный инфильтрат, в большинстве работ исследовали макрофаги, ассоциированные с опухолью. Прогностическая роль количества MAO при КРР неоднозначна. Так, одни исследователи выявили связь MAO с прогрессией заболевания [13], в то время как другие указывают на их благоприятную прогностическую значимость [3]. Помимо исследования макрофагов большое число работ посвящено анализу прогностической значимости различных типов Т-клеток в опухолях [14]. По данным литературы, изучение инфильтрации опухоли В-клетками при КРР представлено небольшим числом исследований, при этом высокое содержание В-клеток в опухоли чаще ассоциировано с благоприятным прогнозом заболевания [10]. PU.1 относится к семейству транскрипционных факторов E26, необходимых для развития иммунной системы, и кодируется геном *Sp11*. PU.1 участвует в гемопоэзе, его экспрессия определяет развитие лимфоидных и миелоидных клеток, в особенности макрофагов, гранулоцитов, дендритных клеток, а также играет важную роль в дифференцировке иммунных клеток по лимфоидному типу. Высокий уровень экспрессии PU.1 характерен для миелоидных клеток [15], в то время как В-клетки экспрессируют его в меньшем количестве [16]. Несколько более низкий уровень экспрессии маркера отмечен в гранулоцитах, мегакариоцитах, тучных клетках и незрелых клетках эритроидного ряда. Зрелые Т-лимфоциты не экспрессируют PU.1. В контексте солидных опухолей изучение прогностической и клинической значимости экспрессии PU.1 проведено для рака молочной железы и глиом [11, 12], причем для обеих нозологий показана связь экспрессии маркера с прогрессией и неблагоприятным

прогнозом. Учитывая тот факт, что PU.1 продуцируется как макрофагами, так и В-клетками, нами проведено комплексное исследование экспрессии PU.1⁺, CD68⁺ и CD20⁺ клеток в строме КРР. Анализ полученных нами данных выявил высокий уровень инфильтрации опухолей у пациентов с КРР иммунными клетками. Содержание макрофагов в опухоли в целом было значительно больше по сравнению с В-клетками. Кроме того, обнаружено, что все клетки, экспрессирующие на своей поверхности общий макрофагальный маркер CD68 и маркер В-клеток – CD20, также экспрессируют PU.1. На основании этого можно сделать вывод, что все макрофаги и В-клетки, инфильтрирующие КРР, PU.1 положительны. Дополнительно провели корреляционный анализ и выявили, что содержание PU.1⁺ клеток в опухолях статистически значимо положительно коррелирует с CD68 ($r=0,231$, $p=0,036$) и CD20 ($r=0,267$, $p=0,015$). Необходимо отметить, что не все PU.1⁺ клетки экспрессируют CD68 или CD20, что свидетельствует о наличии в опухоли дополнительной популяции PU.1⁺ клеток. Таким образом, оценка экспрессии PU.1 в опухоли может служить самостоятельным прогностическим фактором при КРР независимо от CD68 и CD20. Проведенный анализ содержания PU.1⁺, CD68⁺ и CD20⁺ клеток и их ассоциации с клиническими и морфологическими характеристиками КРР показал, что PU.1 и CD20 статистически значимо ассоциированы со стадией заболевания и наличием регионарных метастазов. Для начальных стадий заболевания и при отсутствии метастазов в лимфоузлах наблюдается большее количество PU.1⁺ и CD20⁺ клеток, что согласуется с данными литературы о благоприятном влиянии большого количества CD20⁺ клеток на течение заболевания [17]. Помимо этого, для PU.1 показана статистически значимая корреляционная связь с наличием отдаленных метастазов и локализацией новообразования в толстой кишке. Большее содержание PU.1 характерно для опухолей толстой кишки и при отсутствии метастазов. Для CD20 также показана значимая ассоциация с размером опухоли – новообразования меньшего размера содержат большее количество В-клеток. Для CD68 ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками КРР не выявлены. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что экспрессию PU.1 в КРР можно рассматривать как независимый фактор благоприятного прогноза.

Заключение

В настоящем исследовании показано, что во всех колоректальных карциномах присутствуют значительные количества иммунокомпетентных клеток, экспрессирующих ядерный маркер, характерный для макрофагов, гранулоцитов и В-клеток, – PU.1, а также маркер макрофагов – CD68 и В-клеток – CD20. Количество PU.1⁺ клеток коррелировало с клинико-морфологическими характеристиками опухоли, указывающими на благоприятный прогноз заболевания; аналогичные

корреляции выявили и для количества CD20⁺ клеток. При этом для CD68 такие корреляции не наблюдали. Таким образом, маркер PU.1 у пациентов с КРР следует рассматривать как независимый стромальный фактор благоприятного прогноза.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.Н. Грачев, Д.А. Кудлай, Н.Е. Кушлинский.
Сбор и обработка материала – П.А. Подлесная, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, Н.Ю. Соколов, З.З. Мамедли.
Написание текста – О.В. Ковалева.
Редактирование – О.В. Ковалева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.N. Gratchev, D.A. Kudlay, N.E. Kushlinskii.
Collected the data and performed the analysis – P.A. Podlesnaya, M.A. Rashidova, D.V. Samoilova, N.Yu. Sokolov, Z.Z. Mamedli.
Wrote the paper – O.V. Kovaleva.
Edited the manuscript – O.V. Kovaleva.

Литература/References

1. *Ostrand-Rosenberg S.* Immune surveillance: A balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet. Dev.* 2008;18(1):11–8. DOI: 10.1016/j.gde.2007.12.007.
2. *Qian BZ, Pollard JW.* Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010;141(1):39–51. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.014.
3. *Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R.* High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(5):1472–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2073.
4. *Jakubowska K, Koda M, Kisielewski W, Kańczuga-Koda L, Famulski W.* Prognostic significance of inflammatory cell response in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2019;18(1):783–91. DOI: 10.3892/ol.2019.10343.
5. *Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H et al.* CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(16):3491–4. PMID: 9721846.
6. *Diederichsen AC, Hjelmberg Jv, Christensen PB, Zeuthen J, Fenger C.* Prognostic value of the CD4⁺/CD8⁺ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52(7):423–8. DOI: 10.1007/s00262-003-0388-5.
7. *Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund LT.* Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5220–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0133.
8. *Nedergaard BS, Ladekarl M, Nyengaard JR, Nielsen K.* A comparative study of the cellular immune response in patients with stage IB cervical squamous cell carcinoma. Low numbers of several immune cell subtypes are strongly associated with relapse of disease within 5 years. *Gynecol Oncol.* 2008;108(1):106–11. DOI:10.1016/j.ygyno.2007.08.089.
9. *Schmidt M, Böhm D, von Törne C, Steiner E, Puhl A, Pilch H et al.* The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68(13):5405–13. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-07-5206.
10. *Berntsson J, Nodin B, Eberhard J, Micke P, Jirstrom K.* Prognostic impact of tumour-infiltrating B cells and plasma cells in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2016;139(5):1129–39. DOI:10.1002/ijc.30138.
11. *Xu Y, Gu S, Bi Y, Qi X, Yan Y, Lou M.* Transcription factor PU.1 is involved in the progression of glioma. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3753–9. DOI:10.3892/ol.2018.7766.
12. *Lin J, Liu W, Luan T, Yuan L, Jiang W, Cai H et al.* High expression of PU.1 is associated with Her-2 and shorter survival in patients with breast cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(6):8220–6. DOI:10.3892/ol.2017.7204.
13. *Feng Q, Chang W, Mao Y, He G, Zheng P, Tang W et al.* Tumor-associated macrophages as prognostic and predictive biomarkers for postoperative adjuvant chemotherapy in patients with stage II colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(13):3896–907. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-18-2076.
14. *Kuwahara T, Hazama S, Suzuki N, Yoshida S, Tomochika S, Nakagami Y et al.* Intratumoural-infiltrating CD4⁺ and FOXP3⁺ T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2019;121(8):659–65. DOI:10.1038/s41416-019-0559-6.
15. *Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell.* 2010;38(4):576–89. DOI:10.1016/j.molcel.2010.05.004.
16. *Pang SHM, de Graaf CA, Hilton DJ, Huntington ND, Carotta S, Wu L et al.* PU.1 is required for the developmental progression of multipotent progenitors to common lymphoid progenitors. *Front Immunol.* 2018;9:1264. DOI:10.3389/fimmu.2018.01264.
17. *Meshcheryakova A, Tamandl D, Bajna E, Stift J, Mittlboeck M, Svoboda M et al.* B cells and ectopic follicular structures: novel players in anti-tumor programming with prognostic power for patients with metastatic colorectal cancer. *PloS One.* 2014;9(6):e99008. DOI:10.1371/journal.pone.0099008.

Информация об авторах

Ольга Владимировна Ковалева – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Алексей Николаевич Грачев – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биологии стромальных клеток опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Полина Алексеевна Подлесная – лаборант-исследователь лаборатории биологии стромальных клеток опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Мадина Абдуллаевна Рашидова – лаборант-исследователь лаборатории биологии стромальных клеток опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Дарья Викторовна Самойлова – младший научный сотрудник лаборатории биологии стромальных клеток опухолей
НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Николай Юрьевич Соколов – кандидат медицинских наук, врач-химиотерапевт НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Заман Заурович Мамедли – кандидат медицинских наук, заведующий отделением онкопроктологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Дмитрий Анатольевич Кудлай – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии Института фармации им. А.П. Нелюбина
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Николай Евгеньевич Кушлинский – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий лабораторией клинической
биохимии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Author information

Olga V. Kovaleva – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Regulation of Cellular and Viral Oncogenes, N.N. Blokhin National
Medical Research Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>

Alexei N. Gratchev – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Tumor Stromal Cell Biology, N.N. Blokhin National Medical Research
Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>

Polina A. Podlesnaya – Research Assistant, Laboratory of Tumor Stromal Cell Biology, N.N. Blokhin National Medical Research
Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0003-2312-5546>

Madina A. Rashidova – Research Assistant, Laboratory of Tumor Stromal Cell Biology, N.N. Blokhin National Medical Research
Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0002-3267-4232>

Daria V. Samoilova – Junior Researcher, Laboratory of Tumor Stromal Cell Biology, N.N. Blokhin National Medical Research
Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0001-5639-0835>

Nikolay Yu. Sokolov – Cand. Sci. (Med.), Medical Oncologist, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0002-0706-9575>

Zaman Z. Mamedli – Cand. Sci. (Med.), Head of the Oncoproctology Department, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0002-9289-1247>

Dmitriy A. Kudlay – Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Pharmacology, A.P. Nelyubin Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First
Moscow State Medical University (Sechenov University).
<https://orcid.org/0000-0003-1878-4467>

Nikolay E. Kushlinskii – Dr. Sci. (Med.), Professor, Academician of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry, N.N. Blokhin
National Medical Research Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

Морфологическая характеристика сперматогенеза у крыс после прицельного облучения разными дозами электронов

Г.А. Демяшкин^{1,2}

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Москва, Россия

² ФGAOY BO Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Введение. Одной из современных проблем человечества является развитие мужского бесплодия. По последним оценкам, от данного заболевания страдают 186 миллионов человек в мире, а его распространенность увеличивается по мере взросления. Данные литературы по влиянию лучевой терапии на мужскую репродуктивную систему неоднозначны. За последнее десятилетие научно-технический прогресс определенно ускорил развитие методов лучевой терапии, и в связи с появлением новых аппаратов возникает необходимость тщательного подбора новых режимов дозирования. Цель исследования – морфологическая оценка сперматогенеза после прицельного облучения разными дозами электронов (экспериментальное исследование).

Материалы и методы. Крыс породы Вистар (n=70) однократно подвергали прицельному ионизирующему облучению на импульсном ускорителе электронов NOVAC 11 дозами 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр и 12 Гр и через неделю оценивали сперматогенез при помощи метода световой микроскопии.

Результаты. В образцах крыс опытных групп выявили уменьшение количества половых клеток, признаки дегенеративных изменений и лизиса сперматид и сперматозоидов, а также появление интенсивных пикнотичных ядер у первичных сперматоцитов, резкое снижение количества сперматогоний, клеток Сертоли и Лейдига без изменения их структуры. Наиболее глубокое поражение канальцев, вплоть до аплазии сперматогенного эпителия и обширной вакуолизации, наблюдали в группах облучения 8–12 Гр.

Заключение. В семенниках прослеживаются дозозависимые прогрессирующие патоморфологические изменения гистоархитектоники, уменьшение количества сперматогоний и других половых клеток уже на 7-е сутки после облучения импульсным ускорителем электронов NOVAC 11.

Ключевые слова: облучение электронами, мужское бесплодие, сперматогенез, семенные шары

Для корреспонденции: Григорий Александрович Демяшкин. E-mail: dr.dga@mail.ru

Для цитирования: Демяшкин Г.А. Морфологическая характеристика сперматогенеза у крыс после прицельного облучения разными дозами электронов. Клини. экп. морфология. 2021;10(2):40–49. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.40-49.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 30.11.2020. Получена после рецензирования 26.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Morphological features of spermatogenesis in rats after targeted irradiation with electrons of variable doses

G.A. Demyashkin^{1,2}

¹ National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

Introduction. Today, a primary concern of humanity is male infertility. Recent figures suggest that the disease affects 186 million people worldwide, and its prevalence increases as men get older. In literature the radiation therapy effect on the male reproductive system is debated. Over the past decade, scientific and technological progress has definitely accelerated the development of the radiation therapy methods, and as new devices have emerged, there is a need to carefully select new dosing regimens. The aim of the experimental study was to evaluate morphological spermatogenesis indicators after targeted irradiation with electrons of variable doses.

Materials and methods. Wistar rats (n=70) were once subjected to targeted ionizing irradiation on a pulsed electron accelerator NOVAC 11 with doses of 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy, and 12 Gy, and a week later spermatogenesis was assessed with light microscopy.

Results. In the experimental groups, we revealed a decrease in the number of germ cells; signs of degenerative changes and lysis of spermatids and spermatozoa; the appearance of intense pyknotic nuclei in primary spermatocytes; and a sharp decrease in the number of spermatogonia and Sertoli and Leydig cells without change in their structure. In the irradiation groups of 8–12 Gy, there was the deepest damage to the tubules, up to spermatogenic epithelium aplasia, and extensive vacuolization.

Conclusion. In the testes, we observed dose-dependent progressive pathological changes in tissue structure as well as a decrease in the number of spermatogonia and other germ cells on day 7 after irradiation with a pulsed electron accelerator NOVAC 11.

Keywords: electron irradiation, male infertility, spermatogenesis, seminal globs

Corresponding author: Grigory A. Demyashkin. E-mail: dr.dga@mail.ru

For citation: Demyashkin G.A. Morphological features of spermatogenesis in rats after targeted irradiation with electrons of variable doses. *Clin. exp. morphology.* 2021;10(2):40–49. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.40-49 (In Russ.).

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

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

Received 30.11.2020. **Received in revised form** 26.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Одна из современных проблем человечества – развитие мужского бесплодия. По последним оценкам, от данного заболевания страдают 186 миллионов человек в мире, а его распространенность увеличивается по мере взросления [1, 2]. Кроме того, мужское бесплодие является причиной более чем половины всех случаев бездетности в мире [3]. Полиэтиологичность этой нозологии, сложность патогенеза, а также функциональное взаимодействие яичка с другими регуляторными внутриорганными системами создают большие трудности в разработке адекватных методов лечения [4].

Среди факторов риска мужского бесплодия особое внимание следует уделить радиоактивному воздействию. Люди, находящиеся в зонах радионуклидного загрязнения вблизи объектов атомной промышленности или переживающие последствия прошлых техногенных катастроф, могут подвергаться внешнему облучению в разных дозах.

В клинической практике с успехом применяются методы лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований. Злокачественное поражение органов репродуктивной системы занимает лидирующие позиции в структуре онкологической смертности. На рак яичек приходится 1% злокачественных новообразований (ЗНО) у мужчин. Однако, несмотря на небольшой процент, в 2018 году было зарегистрировано 9310 новых случаев, из-за чего рак яичек остается самой распространенной солидной опухолью у мужчин в возрасте 20–34 лет [5].

Возвращаясь к упоминавшейся ранее лучевой терапии, следует сказать, что она в последние годы получила наиболее широкое распространение среди способов лечения ЗНО яичек. Ее применение возможно как внешне (дистанционная лучевая терапия), так и внутренне (брахитерапия).

В дистанционной лучевой терапии применяются следующие установки: кобальтовые аппараты, подводящие гамма-излучение высокой энергии, линейные ускорители электронов, производящие как высокоэнер-

гетическое тормозное излучение, так и прямое облучение электронами, а также установки с более редким излучением, таким как ионное, протонное и нейтронное [6]. Преимуществом прицельной радиотерапии является минимизация риска повреждения соседних органов при использовании максимально возможной облучающей дозы. Поскольку показатели эффективности лучевой терапии высоки, для пациентов обычно ожидается благоприятный прогноз и увеличение продолжительности жизни.

Тем не менее с внедрением новых диагностических и лечебных методов рентгенологии и радиологии встает вопрос об их безопасности. Применение лучевой терапии влечет за собой негативные последствия для организма человека [7], поэтому подбор оптимальных доз излучения, их своевременная корректировка и нивелирование токсичности данной терапии – ключевые моменты, которые влияют на оптимизацию лечения и становятся все более важными задачами современной онкологии.

Данные литературы по влиянию лучевой терапии на мужскую репродуктивную систему неоднозначны. С одной стороны, лучевая терапия (ЛТ) доказанно влечет за собой риск возникновения бесплодия [8]. С другой стороны, известно, что сперматогонии типа А иногда выживают после ЛТ, что позволяет в конечном счете наблюдать восстановление сперматогенеза [9].

Результаты исследований свидетельствуют о более агрессивном воздействии прицельной радиации в сравнении с общим облучением, однако они не дают конкретного ответа на вопросы, как быстро происходит апоптоз мужских гамет, на каких стадиях сперматогенеза они наиболее уязвимы и как долго сохраняются эти патоморфологические признаки.

Несмотря на многочисленные теории и предположения по данным вопросам, все существующие экспериментальные модели нуждаются в усовершенствовании. За последнее десятилетие научно-технический прогресс определенно ускорил развитие методов лучевой тера-

пии, и в связи с появлением новых аппаратов возникает необходимость тщательного подбора новых режимов дозирования, а значит, моделирование нарушений сперматогенеза у лабораторных животных с использованием минимальных доз радиации является ключевой задачей для подробного изучения данной проблемы.

Цель исследования – морфологическая оценка сперматогенеза после прицельного облучения разными дозами электронов (экспериментальное исследование).

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводили на базе Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба.

Животные для исследования *in vivo*. Самцов крыс Вистар (масса 220 ± 20 граммов; возраст 9–10 недель; $n=70$) содержали в виварии при контролируемой температуре ($+22^\circ\text{C}$) и световом периоде (12L:12D) со свободным доступом к воде и стандартному корму. Крысы случайным образом были разделены на контрольную (I; $n=10$) и опытные (II–VII; $n=10$ в каждой) группы в зависимости от дозы однократного прицельного облучения электронами тазового сегмента в проекции семенников: II – 2 Гр, III – 4 Гр, IV – 6 Гр, V – 8 Гр, VI – 10 Гр и VII – 12 Гр.

Все манипуляции осуществляли согласно Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (ЕЭС, Страсбург, 1985), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ЕЭС, Страсбург, 1986), Руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS), Правилам лабораторной практики и приказу Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 043 от 11.08.2020 г.

Облучение проводили в отделе радиационной биофизики МРНЦ им. А.Ф. Цыба на импульсном ускорителе электронов NOVAC 11 (Sordina IORT Technologies, Италия). Данная установка позволяет получить пучок электронов с энергией 4, 6, 8, 10 МэВ; пучок возможно отколлимировать до $\varnothing 30\text{--}100$ мм с шагом по 10 мм; частоту бенчей в пучке можно регулировать от 1 до 24 Гц с шагом по 1 Гц. Исходя из представленных требований, для облучения были выбраны энергия 10 МэВ и частота 9 Гц, размер поля – $\varnothing 100$ мм. Согласно проведенным дозиметрическим исследованиям, пучок электронов с такой энергией проникает на глубину не более 50 мм в водно-эквивалентном материале (рис. 1 А). Данный выбор позволяет гарантированно провести облучение зоны интереса требуемой дозой, а поле $\varnothing 100$ мм дает возможность уменьшить паразитную дозу на соседние ткани.

Перед облучением крысам опытных групп однократно вводили кетамин (50 мг/кг, внутримышечно) и ксилазин (5 мг/кг, внутривентриально). Крыс под анестезией помещали на предметный стол по одной, в положении лежа на спине, с расставленными в стороны лапами, чтобы в зону облучения попадали семенники, а легкие и сердце оставались в зоне радиационной тени (рис. 1 В). Тубус подводили к облучаемой области таким образом, чтобы его срез находился не выше 2 мм от кожи, а сам тубус был перпендикулярен ее плоскости.

Животных всех групп (I–VII) через 7 дней выводили из эксперимента путем введения высоких доз анестетика. После плановой эвтаназии у крыс были изъяты семенники согласно дизайну эксперимента.

Морфологический блок. После извлечения оценивали внешний вид семенников и состояние паренхимы на разрезе (кровенаполнение, воспалительные изменения, атрофия и т.д.), взвешивали (масса в граммах и отношение массы семенников к массе тела) и измеряли. Затем семенники нарезали параллельно сагиттальной плоскости через каждые 2 мм, фиксировали в растворе Буэна, после проводки (аппарат гистологической проводки тканей, Leica Biosystems, Германия) заливали

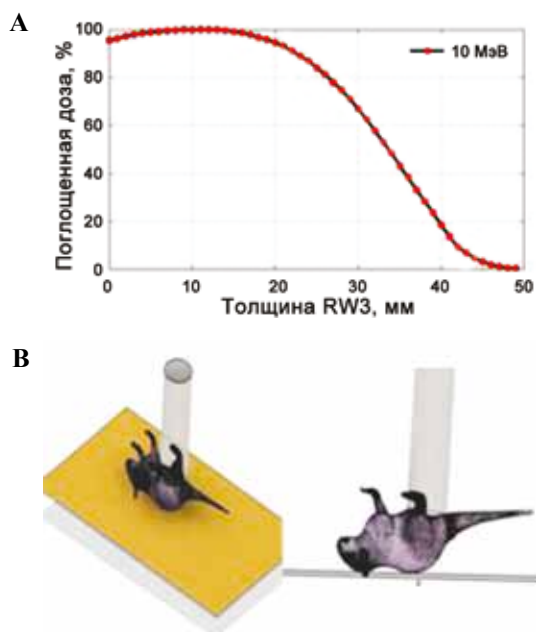


Рис. 1. Методика облучения крыс.

А – изменение поглощенной дозы по глубине водно-эквивалентного материала при облучении электронами с энергией 10 МэВ на ускорителе NOVAC 11, В – модель расположения крысы при облучении на ускорителе электронов NOVAC 11

Fig. 1. Irradiation technique in a rat model.

А – change in the absorbed dose by the depth of water-equivalent material when irradiated by electrons with an energy of 10 MeV at the NOVAC 11 accelerator, В – model of the rat location when irradiated at the NOVAC 11 electron accelerator

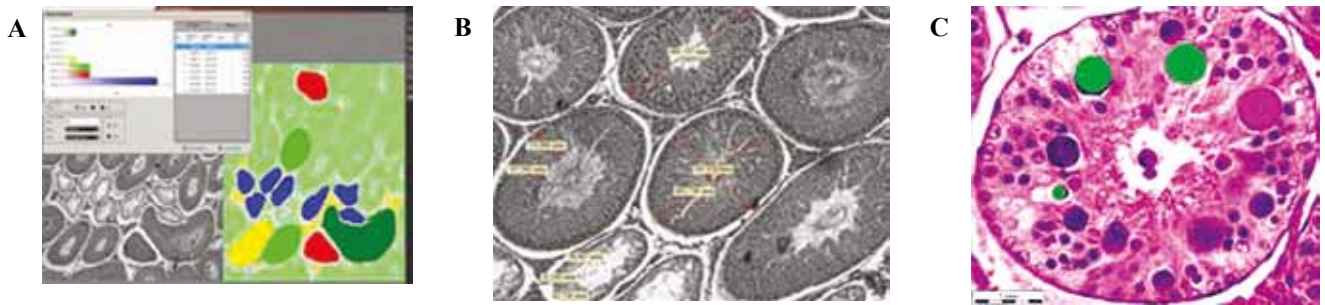


Рис. 2. Морфометрические данные семенников с использованием программного обеспечения для обработки и анализа изображений Leica Application Suite (LAS).

А, В – сравнительные измерения семенных канальцев, С – измерение семенных шаров.

Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 2. Morphometric data of testes using Leica Application Suite (LAS) image processing and analysis software.

A, B – comparative measurements of seminal tubules, C – measurement of seminal globules, H&E stain, $\times 100$

в парафиновые блоки, из которых готовили серийные срезы (толщина 2 мкм), депарафинировали, дегидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином для гистологического исследования.

Морфологический и морфометрический анализ проводили в 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа при $\times 100$ и $\times 400$ в четырех случайных срезах с каждого образца, перемещая предметные стекла с равными интервалами вдоль осей X и Y, с использованием полуавтоматического анализатора изображения. Цифровые изображения гистологических срезов для морфометрических исследований получали с помощью системы видеомикроскопии (микроскоп Leica DM3000, Германия; камера DFC450 C; компьютер Platrun LG), а морфометрические данные – с использованием программного обеспечения для обработки и анализа изображений Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0 (рис. 2 А–С). В каждом из полей рассчитывали следующие параметры: площадь и диаметр извитых семенных канальцев, высота сперматогенного эпителия (калибровочной решеткой и линейным измерительным зондом), подсчет клеток сперматогенного эпителия в одном извитом семенном канальце, клеток Сертоли и Лейдига.

Сперматогенный цикл крыс, включающий в себя 14 последовательных стадий и характеризующийся определенным количеством половых клеток в сочетании с фазой развития сперматид, оценивали по методике Клермонта с соавторами [10]. При этом гаметы идентифицировали по месту расположения в той или иной клеточной ассоциации и хорошо изученным цитологическим параметрам ядер (диаметр, характер распределения хроматина и хромосом).

Оценку сперматогенного эпителия проводили с использованием критериев С. Джонсона [11]: 10 баллов – физиологический сперматогенез; 9 – дезорганизация сперматогенного эпителия, много поздних сперматид; 8 – сперматозоидов в семенном канальце ≤ 5 , единичные поздние сперматиды; 7 – сперматозоиды и поздние сперматиды отсутствуют, много ранних сперматид;

6 – сперматозоиды и поздние сперматиды отсутствуют, единичные ранние сперматиды; 5 – сперматозоиды и сперматиды отсутствуют, много сперматоцитов; 4 – сперматозоиды и сперматиды отсутствуют, единичные сперматоциты; 3 – только сперматогонии; 2 – отсутствие половых клеток, только клетки Сертоли; 1 балл – отсутствие элементов сперматогенного эпителия (тубулярная атрофия/аплазия).

Статистический анализ. Полученные данные обрабатывали при помощи компьютерной программы SPSS 12.0 (IBM Analytics, США). Все данные представлены как $M \pm m$. Гипотезу нормальности распределения значений в выборках проверяли при помощи теста Колмогорова–Смирнова, после чего использовали t-тест Стьюдента для малых выборок, непараметрический U критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Различия между выборками считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Масса тела животных всех экспериментальных групп уменьшилась в среднем на 25% по сравнению с массой крыс контрольной группы.

Масса и объем семенников значительно уменьшились во всех группах, в 2,0 раза и более, после облучения электронами по сравнению с контрольной, что составляет в среднем 0,4% потери от общей массы тела ($p < 0,05$) (табл. 1).

После облучения электронами во всех опытных группах (II–VII) обнаружили снижение площади семенных канальцев, их диаметра, а также высоты сперматогенного эпителия по сравнению с образцами нормальных семенников (табл. 2). Большинство семенных канальцев соответствовало преимущественно III, а также II и IV типам сперматогенного цикла.

При световой микроскопии срезов семенников крыс контрольной группы наблюдали нормальную гистологическую архитектуру с физиологическим сперматогенезом; оценка по С. Джонсону – $10 \pm 0,82$ балла (табл. 2, 3, рис. 3).

Таблица 1 | Table 1

**Масса и объем семенников
при разных дозах облучения, $p < 0,05$ |
The weight and volume of testes at different
exposure doses, $p < 0,05$**

Группы Groups	Вес семенников, г Testes weight, g	Объем семенников Testes volume
Контроль Control	1,5±0,1	1397,5±140,3
2 Гр 2 Gy	0,8±0,05	688,3±74,2
4 Гр 4 Gy	0,75±0,06	598,7±87,5
6 Гр 6 Gy	0,68±0,09	530,5±68,3
8 Гр 8 Gy	0,55±0,05	463,0±43,1
10 Гр 10 Gy	0,48±0,05	456,5±47,4
12 Гр 12 Gy	0,44±0,08	449,0±46,2

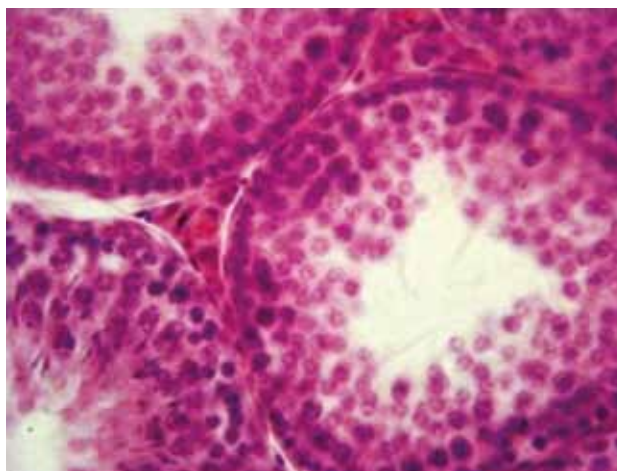


Рис. 3. Семенник крысы контрольной группы.

Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 3. The rat testes in the control group. H&E stain, ×400

Таблица 2 | Table 2

**Морфометрические данные семенных канальцев после облучения электронами, $p < 0,05$ |
Morphometric data of seminal tubules after electron irradiation, $p < 0,05$**

Доза облучения, Гр Radiation dose, Gy	Площадь семенных канальцев, мкм ² Area of seminiferous tubules, μm ²	Диаметр семенных канальцев, мкм Diameter of the seminiferous tubules, μm	Высота сперматогенного эпителия, мкм Height of spermatogenic epithelium, μm
Контроль Control	224151,32±44,3	344,4±34,4	110,9±13,05
2	173252,09±11,07	310,57±5,1	68,2±12,67
4	96743,16±6,4	293,08±33,2	63,1±61,7
6	50844,94±6,1	243,85±28,5	44,3±57,3
8	43783,46±7,1	228,19±35,4	39,4±15,9
10	37423,12±7,1	219,74±35,4	33,5±61,7
12	32396,19±7,1	207,34±35,4	27,9±61,7

В семенниках крыс опытных групп выявили уменьшение количества половых клеток, признаки дегенеративных изменений и лизиса сперматид и сперматозоидов, а также появление пикнотических ядер у первичных сперматоцитов; резкое снижение количества сперматогоний, клеток Сертоли и Лейдига без изменения их структуры (табл. 3). Сперматогенный эпителий сморщен, в межканальцевом пространстве интерстициальный отек и стаз в просветах кровеносных сосудов, лимфатические сосуды расширенные. Наиболее глубокое поражение канальцев, вплоть до аплазии сперматогенного эпителия и обширной вакуолизации, наблюдали в группах облучения 8–12 Гр. Прогрессировали деструкция и сморщивание канальцев, аплазия эпителия и его вакуолизация (табл. 2, рис. 5).

В образцах группы облучения дозой 2 Гр на долю поврежденных семенных канальцев (площадь 28079,84 мкм², диаметр 189,083 мкм; $p < 0,05$) с дезор-

Таблица 3 | Table 3

**Оценка сперматогенеза по С. Джонсону, при $p < 0,05$ |
Assessment of spermatogenesis according to the Johnsen
system, $p < 0,05$**

Доза облучения, Гр Radiation dose, Gy	Доля канальцев с аплазией Proportion of tubules with aplasia	Оценка канальцев по С. Джонсону, баллы Johnsen, score
Контроль Control	0	10,0±0,8
2	1/8	8,0±0,4
4	1/6	7,0±0,4
6	1/4	5,5±0,4
8	1/3	5,0±0,1
10	1/2	4,0±1,1
12	2/3	3,0±1,1

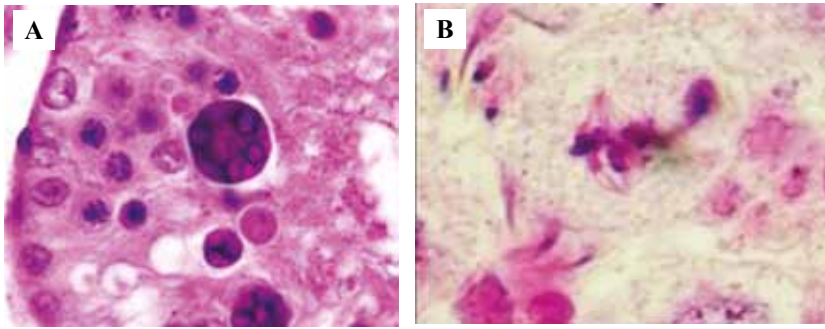


Рис. 4. Семенной каналец при облучении 10 Гр: А – семенные шары (площадь 6,43 мкм², диаметр 2,4 мкм; $p < 0,05$); В – митоз в первичном сперматоците. Окраска гематоксилином и эозином $\times 100$

Fig. 4. Seminal tubule under 10-Gy irradiation: A – seminal balls on the left (area 6.43 mm², diameter 2.4 mm; $p < 0.05$); B – mitosis within primary spermatocyte. H&E stain, $\times 100$

ганизацией эпителия и потерей полярности клеток приходилось до 1/8 части семенника (1–2 поперечных среза канальцев в поле зрения); средний балл по С. Джонсону – $8,0 \pm 0,4$ при $p < 0,05$ (табл. 3).

В микропрепаратах семенников группы облучения дозой 4 Гр дегенерации подверглась почти 1/6 всех семенных канальцев (3–4 поперечных среза в поле зрения), появились вакуолизованные первичные сперматоциты. Количество сперматид снижено, сперматозоиды отсутствуют; средний балл по С. Джонсону – $7,00 \pm 0,4$ при $p < 0,05$ (табл. 3).

В образцах семенников группы 6 Гр просвет канальцев расширен и заполнен клеточным детритом (дегенерированные половые клетки), четкие границы между клетками сперматогенного эпителия потеряны. Подобные изменения наблюдались в 1/4 части всех канальцев (5–7 поперечных срезов в поле зрения). Тем не менее количество сперматоцитов, а также клеток Сертоли и Лейдига снижено незначительно по сравнению с предыдущими опытными образцами (табл. 4); средний балл по С. Джонсону – $5,5 \pm 0,4$ при $p < 0,05$ (табл. 3).

В группе облучения 8 Гр в 1/3 семенных канальцев наблюдали появление высокодегенерированных сперматид и сперматоцитов, объединенных в семенные шары (площадь $0,7 \text{ мкм}^2$, диаметр $0,9 \text{ мкм}$; $p < 0,05$) – крупные структуры с множественными

пикнотичными ядрами и интенсивно окрашенной оксифильной цитоплазмой (7–8 поврежденных канальцев в поле зрения). Площадь единичных первичных сперматоцитов составила $0,8 \text{ мкм}^2$ при $p < 0,05$, а диаметр $0,9 \text{ мкм}$ при $p < 0,05$, что в 1,1 раза больше, чем в норме. Средний балл по С. Джонсону – $5,00 \pm 0,1$ при $p < 0,05$ (табл. 3).

При 10 Гр вакуолизованные сперматоциты с опустошенной цитоплазмой обнаружены почти в половине семенных канальцев. В большинстве половых клеток наблюдали пузырчатость ядерной мембраны, кариопикноз и гетерохромазию ядер. При этом часть первичных сперматоцитов утратила связь с клетками Сертоли и находилась в просвете канальца в виде детрита. Кроме того, количество клеток Сертоли и Лейдига снижено, их цитоплазма бледная, отечная, с пикнотическими ядрами. Средний балл по С. Джонсону – $4,00 \pm 1,1$ при $p < 0,05$ (табл. 3). Семенные шары были крупнее в сравнении с группой облучения 8 Гр (площадь $1,0 \text{ мкм}^2$, диаметр $1,1 \text{ мкм}$), наблюдали также патологические митозы (рис. 4).

Самые крупные вакуоли сперматоцитов обнаружили в семенных канальцах группы облучения дозой 12 Гр (площадь сперматоцитов достигала $3,71 \text{ мкм}^2$ при $p < 0,05$). Количество семенных шаров возросло вдвое, их размер варьировал от $0,859 \text{ мкм}^2$ до 8 мкм^2 ,

Таблица 4 | Table 4

Количество половых клеток в семенных канальцах при облучении разными дозами электронов, при $p < 0,05$ |
The number of germ cells in the seminal tubules under electron irradiation at different doses, $p < 0.05$

Доза облучения, Гр Radiation dose, Gy	Сперматогонии (А и В) Spermatogonia (A and B)	Сперматоциты Spermatocytes	Сперматиды Spermatids	Клетки Сертоли Sertoli cells	Клетки Лейдига Leydig cells
Контроль Control	$117,0 \pm 0,31$	$110,0 \pm 0,11$	$163,0 \pm 0,13$	$12,0 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,06$
2	$42,0 \pm 0,11$	$105,0 \pm 0,1$	$150,0 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,07$
4	$40,0 \pm 0,2$	$90,0 \pm 0,1$	$124,0 \pm 0,11$	$9,0 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,2$
6	$38,0 \pm 0,2$	$78,0 \pm 0,3$	–	$9,0 \pm 0,11$	$6,0 \pm 0,22$
8	$25,0 \pm 0,13$	$68,0 \pm 0,2$	–	$9,0 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,07$
10	$18,0 \pm 0,1$	$55,0 \pm 0,13$	–	$8,0 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$
12	$14,0 \pm 0,13$	$43,0 \pm 0,13$	–	$8,0 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,07$

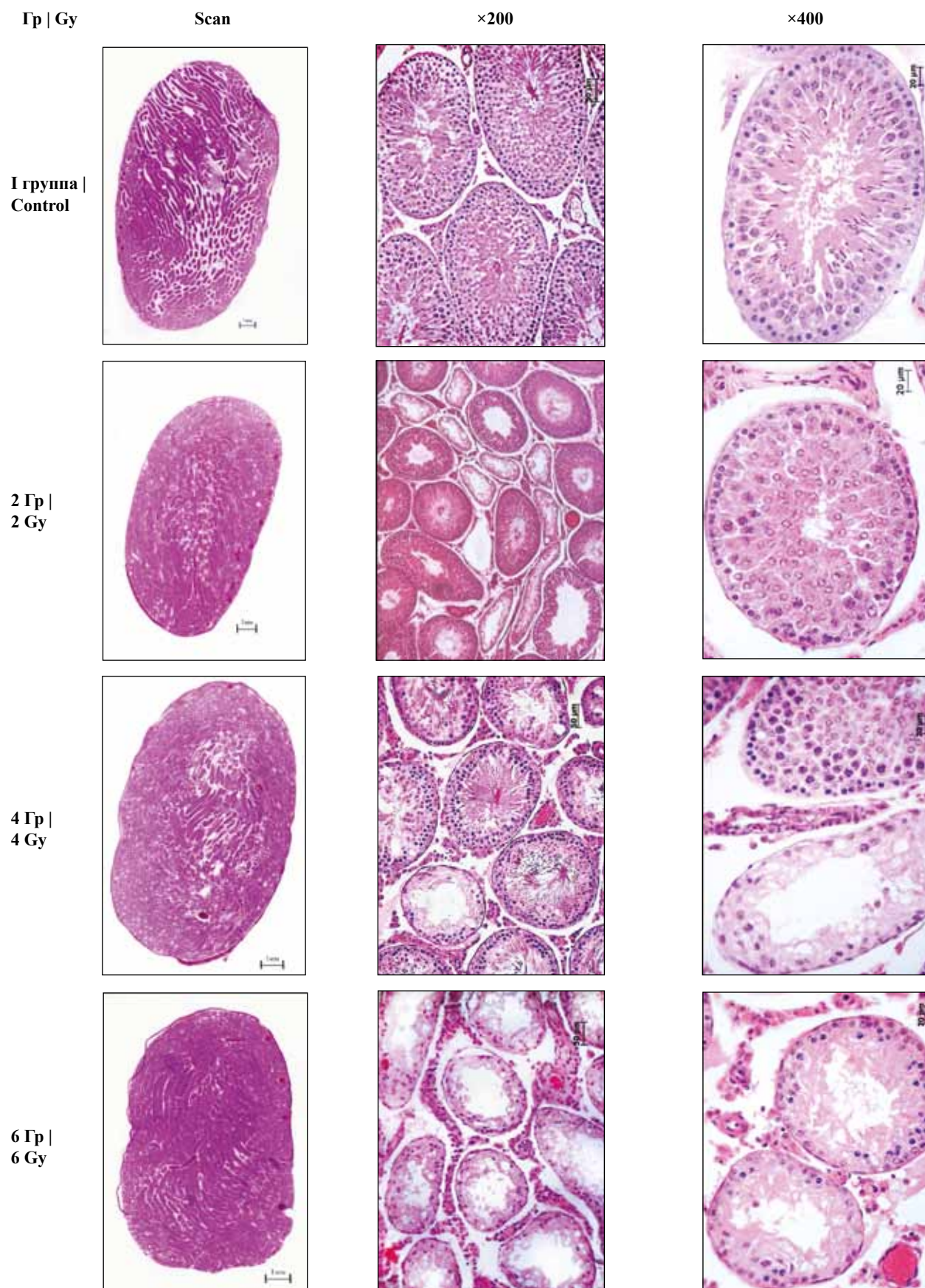


Рис. 5. Семенники крыс экспериментальных групп при разных дозах облучения. Окраска гематоксилином и эозином
 Fig. 5. Rat testes in experimental groups at variable radiation doses. H&E stain

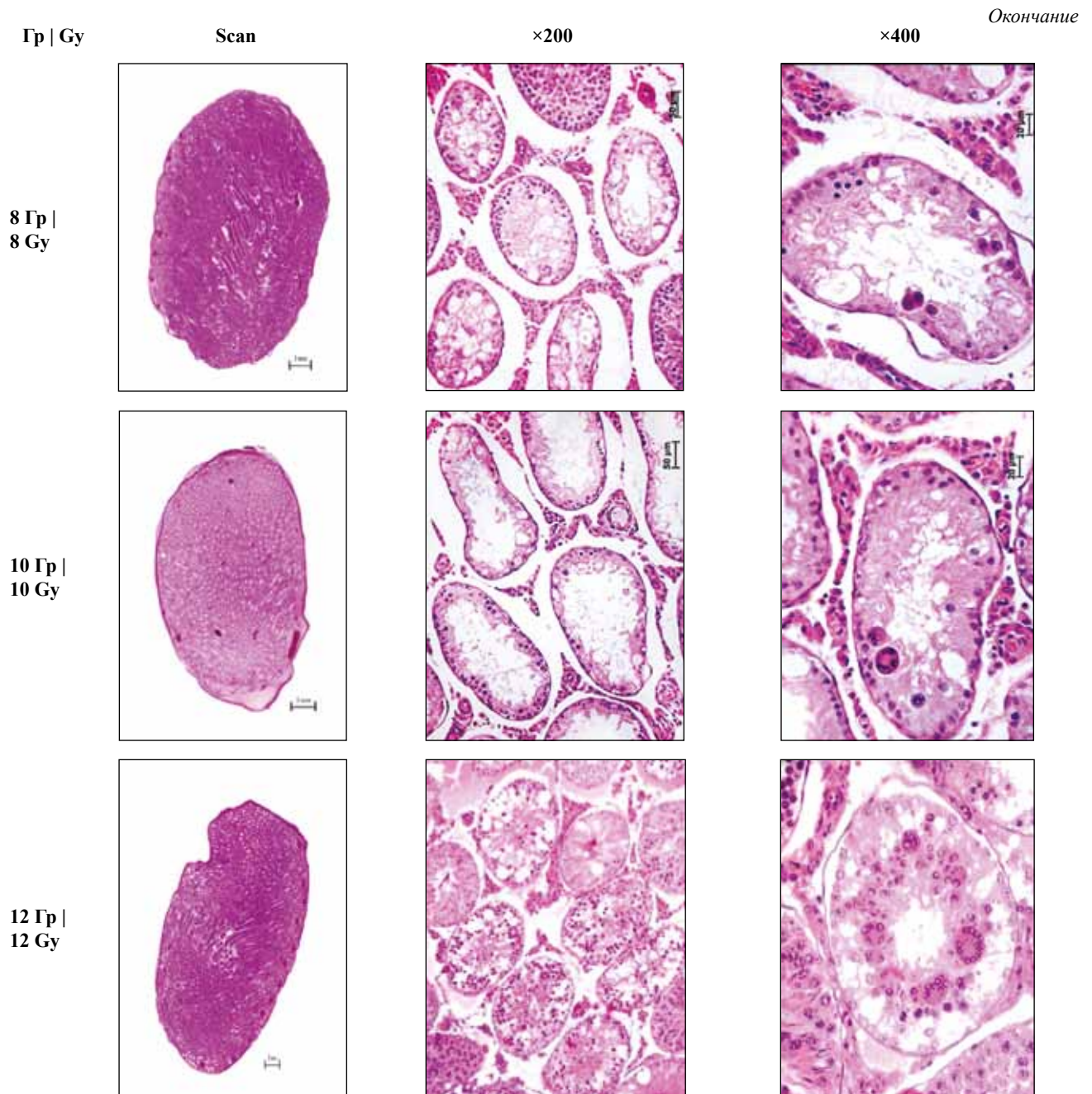


Рис. 5. Семенники крыс экспериментальных групп при разных дозах облучения. Окраска гематоксилином и эозином
Fig. 5. Rat testes in experimental groups at variable radiation doses. H&E stain

что в 5,0–10,0 раза больше, чем площадь первичного сперматоцита. Размеры аплазированных семенных канальцев существенно меньше (площадь 14123,72 мкм², диаметр 76,142 мкм; высота сперматогенного эпителия 14,2±12,1 при $p < 0,05$), чем в предыдущих группах; в связи с этим наблюдали увеличение интерстициального компонента семенников с отеком. В этой группе чаще встречались патологические митозы. Повреждение семенных канальцев составило 3/4. Средний балл по С. Джонсону – 3,00±1,1 при $p < 0,05$ (табл. 3).

Обсуждение

В настоящей экспериментальной работе впервые изучено воздействие прицельного облучения электронами с энергией 10 МэВ в различных дозах на сперматогенез крыс. Актуальность проведенного исследования обусловлена появлением в онкологической практике современных аппаратов для лучевой терапии и необходимостью подбора правильных режимов дозирования, а также созданием наиболее перспективных моделей по изучению нарушений сперматогенеза.

При использовании лучевой терапии в лечении злокачественных опухолей часто происходит повреждение ДНК половых клеток [8, 12]. В связи с этим необходимо повышать безопасность облучения и сведение к минимуму нежелательных побочных эффектов, что является одной из ключевых задач современной радиотерапии.

В настоящей работе шесть опытных групп (II–VII) подвергались однократному прицельному облучению электронами в дозах 2, 4, 6, 8, 10 и 12 Гр, соответственно, после чего были проведены морфологический и морфометрический анализ, результаты которого продемонстрировали прогрессирующее снижение количества и площади семенных канальцев, уменьшение толщины сперматогенного эпителия, снижение числа половых клеток, особенно выражено эти признаки наблюдали при сублетальных дозах.

Полученные нами результаты в целом находят отражение в последних исследованиях в области радиологии, хотя имеются и некоторые существенные отличия. По данным литературы, в семенниках мышей, прицельно облученных умеренными дозами (около 4 Гр), только половые клетки на премейотических стадиях переходят в состояние апоптоза [13]. Однако есть исследования, в которых уже при 2 Гр прицельного облучения (линейный ускоритель Elekta, модель Synergy) истощается пул сперматид и сперматозоидов, то есть постмейотическая стадия сперматогенеза [14]. Аналогичный эффект достигается при 4 Гр общего облучения [15]. При прицельном облучении в дозе 2 Гр (на кобальтовой установке Theatron 780C, Atomic Energy of Canada Limited, Kanata, ON, Канада) дегенерации и аплазии подверглись половые клетки как на пре-, так и на постмейотических стадиях развития [16].

В настоящей работе при использовании импульсного ускорителя электронов NOVAC 11 обнаружено в первую очередь снижение количества сперматогоний при минимальной дозе облучения. Подобный эффект сопровождался появлением пикнотических ядер. Тем не менее семенные канальцы сохранили свою целостность и структурированность сперматогенного эпителия. Наблюдаемый эффект можно объяснить более «мягким» воздействием электронов на ткани семенника и импульсным воздействием в отличие от гамма-облучения.

Повышение дозы до 4 и 6 Гр проявлялось еще большим усугублением аплазии и появлением вакуолизованных сперматоцитов и клеточного детрита в просвете семенных канальцев.

В то время как дозу 6 Гр при прицельном облучении можно считать пограничной, дозы 8, 10 и 12 Гр оказывают крайне негативное влияние на сперматогенез [15].

Описанное некоторыми авторами появление дегенерированных сперматоцитов и сперматид при общем гамма-облучении дозами 8–10 Гр [15] в данном случае наблюдалось при прицельном облучении 8 Гр: при указанной дозе нарушается не только премейотический этап сперматогенеза, но и постмейотический. О тяже-

лой деструкции сперматогенного эпителия свидетельствуют образование семенных шаров и дислокация вакуолизованных сперматоцитов в просвет семенных канальцев, а также наличие клеток с пикнотическими ядрами. Аналогичные результаты были получены другими исследователями [17]. Вероятно, при повышении облучающей дозы до сублетальной нивелируются некоторые различия между мощным гамма-облучением и более слабым – ускорителем электронов, вследствие чего используемая высокая доза проявляется одинаково негативно при обоих видах облучения.

Возможно, доза 8 Гр является не только сублетальной, но и фатальной для большинства половых клеток – выявленная конденсация гетерохроматина в ядрах сохранившихся гамет при дозе облучения 10 Гр говорит об индуцированном радиацией повреждении ДНК [18]. Данные признаки обычно встречаются при воздействии низких доз прицельного облучения (<5 Гр), но при использовании других установок [13]. Скорее всего, при облучении электронами на ускорителе NOVAC 11 пороговая доза значительно выше в связи с более щадящим режимом дозирования.

При кобальтовом гамма-облучении в дозе 14 Гр (установка Shohada-E-Tajrish) некоторые авторы сообщали об отсутствии половых клеток в большинстве семенных канальцев или наличии лишь недифференцированных сперматогоний в базальном отсеке [19]. Практически аналогичная морфологическая картина в настоящем исследовании наблюдалась при дозе 12 Гр, однако сперматогенный потенциал все еще сохранялся.

Таким образом, можно предположить, что эффекты облучения, степень и глубина поражения сперматогенного эпителия являются дозозависимыми. Другие не менее важные факторы эффективности облучения – вид излучения (бета-облучение, гамма-облучение и т.д.), его направленность (общее, прицельное), активность и сила установки, а также стадия сперматогенеза. Данное предположение подтверждается результатами морфометрического анализа – снижением массы семенников, диаметра семенных канальцев и высоты сперматогенного эпителия из-за уменьшения количества дифференцированных половых клеток, что зависит от характера радиационного воздействия при разных режимах дозирования [19, 20].

Заключение

В семенниках прослеживаются дозозависимые прогрессирующие патоморфологические изменения гистоархитектоники, уменьшение количества сперматогоний и других половых клеток уже на 7-е сутки после облучения. С повышением дозы облучения увеличивается количество клеток с пикнозом ядер. Наличие в базальном отделе семенных канальцев единичных низкодифференцированных сперматогоний говорит о возможном восстановлении сперматогенеза даже при суб- и летальных дозах облучения электронами, то есть

данный процесс можно считать обратимым, а также использовать в качестве модели гипосперматогенеза. Зафиксированные морфологические изменения сперматогенеза при воздействии импульсного ускорителя электронов NOVAC 11 являются более щадящими в отличие от других ранее используемых установок.

Литература/References

1. *Inhorn MC, Patrizio P.* Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2015;21(4):411–26. DOI: 10.1093/humupd/dmv016.
2. *Walsh TJ.* Male reproductive health and prostate cancer risk. *Curr Opin Urol.* 2011;21(6):506–13. DOI: 10.1097/MOU.0b013e32834bdf14.
3. *Choy JT, Eisenberg ML.* Male infertility as a window to health. *Fertil Steril.* 2018;110(5):810–4. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.08.015.
4. *Демяшкин Г.А.* Апоптоз в семенных канальцах человека в норме и при идиопатическом бесплодии. *Цитология.* 2018;60(3):208–218. DOI: 10.31116/tsitol.2018.03.07.
Demyashkin GA. Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologia.* 2018;60(3):208–218 (In Russ.). DOI: 10.31116/tsitol.2018.03.07.
5. *Siegel RL, Miller KD, Jemal A.* Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21442.
6. *Титович Е.В., Потепалов П.О., Петкевич М.Н., Киселев М.Г.* Алгоритм определения компонентов сеанса лучевой терапии для различных методов облучения онкологических пациентов на этапе их предлучевой подготовки. Приборы и методы измерений. 2017;8(1):73–80. DOI: 10.21122/2220-9506-2017-8-1-73-80.
Titovich EV, Patsiapalau PA, Piatkevich MN, Kiselev MG. The algorithm for determining timing of radiotherapy session components for different methods of oncology patients irradiation at the stage of radiotherapy planning. *Pribory i metody izmerenii [Devices and Methods of Measurements].* 2017;8(1):73–80 (In Russ.). DOI: 10.21122/2220-9506-2017-8-1-73-80.
7. *Stoneham S, Murray M, Thomas B, Williamson M, Sweeney C, Fraizer L.* AYA testis cancer: The unmet challenge. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66(8):e27796. DOI: 10.1002/pbc.27796.
8. *Meistrich ML.* Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril.* 2013;100(5):1180–6. DOI:10.1016/j.fertnstert.2013.08.010.
9. *Sineath RC, Mehta A.* Preservation of fertility in testis cancer management. *Urol Clin North Am.* 2019;46(3):341–51. DOI: 10.1016/j.ucl.2019.04.010.
10. *Clermont Y, Leblond CP, Messier B.* Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 1959;48(Suppl):37–55. PMID: 13810668
11. *Johnsen SG.* Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 325 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25. DOI: 10.1159/000178170
12. *Le W, Qi L, Li J, Wu D, Xu J, Zhang J.* Low-dose ionizing irradiation triggers a 53BP1 response to DNA double strand breaks in mouse spermatogonial stem cells. *Syst Biol Reprod Med.* 2016;62(2):106–13. DOI: 10.3109/19396368.2015.1125561.
13. *Mauduit C, Siah A, Foch M, Chapet O, Clippe S, Gerard JP et al.* Differential expression of growth factors in irradiated mouse testes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;50(1):203–12. DOI: 10.1016/s0360-3016(01)01461-4.
14. *Topcu A, Mercantepe F, Rakici S, Tumkaya L, Uydu HA, Mercantepe T.* An investigation of the effects of N-acetylcysteine on radiotherapy-induced testicular injury in rats. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2019; 392(2):147–157. DOI: 10.1007/s00210-018-1581-6.
15. *Shaban NZ, Ahmed Zahran AM, El-Rashidy FH, Abdo Koudous AS.* Protective role of hesperidin against γ -radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis. *J Biol Res (Thessalon).* 2017;24:5. DOI: 10.1186/s40709-017-0059-x.
16. *Marzban M, Anjamshoa M, Jafari P, Masoumi H, Ahadi R, Fatehi D et al.* Effects of gamma rays on rat testis tissue according to the morphological parameters and immunohistochemistry: Radioprotective role of silymarin. *Electron Physician.* 2017;9(6):4524–32. DOI: 10.19082/4524.
17. *Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, Göktas G, Ozbey G, Uluoglu C et al.* Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(7):621–8. DOI: 10.1590/s0100-879x2009000700006.
18. *Singh P, Raman MJ.* Dynamics of radiation induced γ H2AX foci in chromatin subcompartments of mouse pachytene spermatocytes and round spermatids. *Mol Reprod Dev.* 2014;81(6):484–96. DOI: 10.1002/mrd.22314.
19. *Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ.* The morphological changes of adult mouse testes after 60Co γ -radiation. *Iran Biomed J.* 2008;12(1):35–42. PMID: 18392093.
20. *Jiang Z, Xu B, Yang M, Li Z, Zhang Y, Jiang D.* Protection by hydrogen against gamma ray-induced testicular damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2013;112(3):186–91. DOI: 10.1111/bcpt.12016.

Информация об авторе

Григорий Александрович Демяшкин – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела радиационной патоморфологии, Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, врач-патологоанатом, доцент кафедры патологической анатомии им. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Author information

Grigory A. Demyashkin – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Department of Radiation Pathomorphology, National Medical Research Radiological Centre; Associate Professor, A.I. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.
<http://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Перестройка структурных компонентов дермы крысы в условиях дерматотензии

Е.С. Мишина¹, М.А. Затолокина¹, М.В. Мнихович²

¹ ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава России, Курск, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Введение. Дерматотензия известна как один из эффективных способов получения материала для закрытия обширных дефектов при аллопластике и хорошо зарекомендовала себя в разных областях хирургии, косметологии и травматологии. При этом остается актуальным вопрос перестройки кожного лоскута при растяжении и возможного предела применения такого метода. В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение адаптационных перестроек волокнистого остова дермы крысы в условиях дерматотензии.

Материалы и методы. Материалом для настоящего исследования послужила кожа половозрелых крыс – самцов линии Вистар (n=30) после ее двухнедельного растяжения. Изучение кожи проводилось при помощи комплексного морфологического подхода с применением световой, электронной микроскопии, а также иммуногистохимического метода для определения типов коллагена.

Результаты. В ходе проведенного исследования выявлены выраженные реактивные изменения структурных компонентов кожи в области дерматотензии. На 14-й день от начала эксперимента наблюдались уменьшение толщины клеточных слоев эпидермиса, растяжение волокнистых структур дермы, частичная дезорганизация и их повреждение. Одновременно происходил запуск клеточных механизмов регенерации и активации коллагеногенеза, морфологическим субстратом которого стало достоверное увеличение, в 2,7 раза, численной плотности фибробластов, вырабатывающих вещества для построения волокнистых структур, 5-кратное увеличение макрофагов, являющихся катализатором функциональной деятельности фибробластов, и перераспределение типов коллагеновых волокон с преобладанием структур коллагена III типа.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о перестройке прежде всего волокнистого компонента дермы, заключающейся в репаративно-восстановительных процессах, которые необходимо учитывать в клинической практике для достижения не только эстетического эффекта, но и последующего адекватного функционирования и жизнедеятельности кожного лоскута.

Ключевые слова: дерматотензия, волокнистый остов дермы, перестройка, кожа, перерастяжение

Для корреспонденции: Екатерина Сергеевна Мишина. E-mail: katusha100390@list.ru

Для цитирования: Мишина Е.С., Затолокина М.А., Мнихович М.В. Перестройка структурных компонентов дермы крысы в условиях дерматотензии. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):50–56. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.2.50-56.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 12.01.2021. Получена после рецензирования 26.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Structural dermis remodeling in a skin expansion rat model

E.S. Mishina¹, M.A. Zatulokina¹, M.V. Mnikhovich²

¹ Kursk State Medical University, Kursk, Russia

² Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. Skin expansion is known to be the most effective way to obtain skin for alloplastic closing of large defects, and it has proven to be successfully used in various fields of surgery, cosmetology, and traumatology. At the same time, the issues of skin flap restructuring when it is stretched and possible range of its application are still relevant. In this regard, the aim was to study the adaptive skin rearrangements of the fibrous skeleton in a murine skin expansion model.

Materials and methods. We used the skin of mature male Wistar rats (N=30) after a 2-week stretching. We utilized a complex morphological light and electron microscopy approach as well as an immunohistochemical method to determine the types of collagen and to study the alterations in skin samples.

Results. We revealed pronounced reactive changes in the skin structural components in the skin expansion area. On day 14, we observed a decrease in the epidermal cell layer thickness as well as stretching, partial

disorganization, and damage of dermal fibrous structure. At the same time, cellular mechanisms of regeneration and activation of collagen synthesis were launched, the morphological substrate of which was (1) a significant 2.7-fold increase in the number density of fibroblasts, which produce substances for building fibrous structures, (2) a five-fold increase in macrophages, which are a catalyst for the fibroblast functional activity and (3) a collagen fiber types' redistribution with Type III collagen structures' predominance.

Conclusion. The results indicate, first of all, the restructuring of the dermal fibrous component, which implies reparative and restorative processes. These must be taken into account in clinical practice to achieve not only an esthetic effect but also the subsequent adequate functioning and vital activity of the skin flap.

Keywords: skin expansion, fibrous dermis, remodeling, skin, hyperextension

Corresponding author: Ekaterina S. Mishina. E-mail: katusha100390@list.ru

For citation: Mishina E.S., Zatolokina M.A., Mnikhovich M.V. Structural dermis remodeling in a skin expansion rat model. Clin. exp. morphology. 2021;10(2):50–56. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.50-56 (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 12.01.2021. **Received in revised form** 26.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Использование кожи в качестве аллопластического материала получило широкое применение в лечении различных хирургических патологий. Для получения кожного лоскута основными методами являются использование аппарата Илизарова или баллонных методик [1–6]. В доступной нам литературе приведены в основном результаты, наблюдаемые в клинической практике, и отсутствуют данные о морфологических изменениях кожи в результате растяжения [7–19].

В связи с этим целью работы стало изучение адаптационной перестройки волокнистого остова дермы крысы в условиях дерматотензии.

Материалы и методы

Материалом для исследования стала кожа передней поверхности голени 30 лабораторных животных – крыс-самцов линии Вистар, которым через 5 суток после флекссионной остеоклазии берцовых костей осуществляли удлинение голени при помощи аппарата Илизарова с суточным темпом 0,5 мм за четыре приема. Животных выводили из эксперимента через 14 суток distraction. В качестве контроля исследовали кожный покров интактных животных.

Все животные находились в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утверждены постановлением главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29.08.2014 № 51). Уход и содержание, а также выведение животных из эксперимента осуществлялись в соответствии со стандартами, описанными директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, а также правилами, утвержденными приказом Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Для световой микроскопии материал фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина. За-

ливку в парафин и микротомирование осуществляли по стандартным прописям. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Маллори.

Для определения типов коллагена препараты, окрашенные сириусом красным, исследовали в поляризованном свете с использованием поляризационного микроскопа Altami Polar 2 («Альтами», Россия) при $\times 100$. Оценка соотношения типов коллагена (ТК) основывалась на отличиях в цветовой гамме, характерной для каждого типа и переходных форм: I тип коллагена – красный, III тип – зеленый. Определение соотношения коллагена I и III типа осуществлялось с использованием программного комплекса Altami Studio 3.0 («Альтами», Россия) и ImageJ 1,47a (National Institute of Health, США) на основании изучения цветовой гистограммы выбранного участка в каждом поле зрения.

Толщину, численную плотность клеток дермы рассчитывали на 1 мм^2 , предварительно подсчитывая количество клеток в поле зрения микроскопа при общем $\times 440$.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) кожу фиксировали 10% забуференным нейтральным формалином, обезвоживали в замороженном состоянии в спиртах возрастающих концентраций. После спиртового обезвоживания образцов использовали метод сушки в критической точке с помощью аппарата Quorum K350 (Quorum gala instrument GmbH, Германия). Подготовленные таким образом образцы монтировали на специальный алюминиевый столик токопроводящим углеродным клеем, напыляли золотом или платинопалладиевым сплавом в напылительной установке Quorum Q150TS (Quorum gala instrument GmbH, Германия) и просматривали в сканирующем электронном микроскопе S 3400N (Hitachi, Япония).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel 2003 [2]. В связи с малой выборкой ($n=30$) в экспериментальных группах и ненормальным распределением выборки по Колмогорову–Смирнову для определения достоверности отличий средних значений применяли критерий Манна–Уитни для независимых выборок и считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в период дистракции происходит перестройка структурных компонентов кожи (рис. 1 А), проявляющаяся истончением эпидермиса и нарушением его стратификации. Толщина дермы достоверно уменьшалась по сравнению с таковой в контрольной группе в 3,3 раза (табл. 1). Интересно отметить, что волокнистые структуры делятся

на несколько типов – в верхних и нижних слоях волокна без преимущественной организации (рис. 1 В, D). Средний слой растянут параллельно направлению воздействия растягивающих сил. В сосочковом слое в основном преимущественно тонкие разветвленные коллагеновые волокна, формирующие нежные сетчатые структуры. В сетчатом слое волокна имеют больший диаметр (рис. 1 С, E). Наряду с крупными пучками

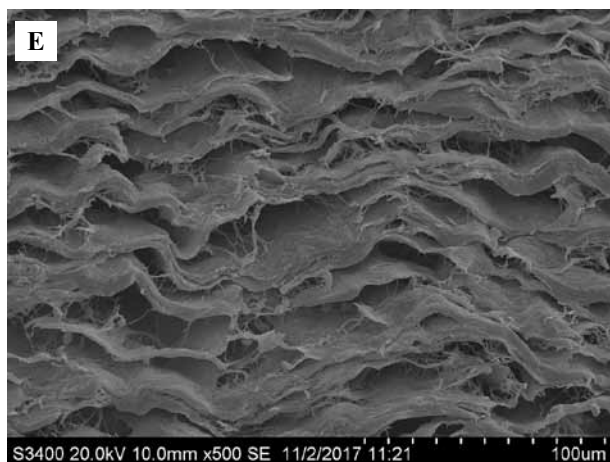
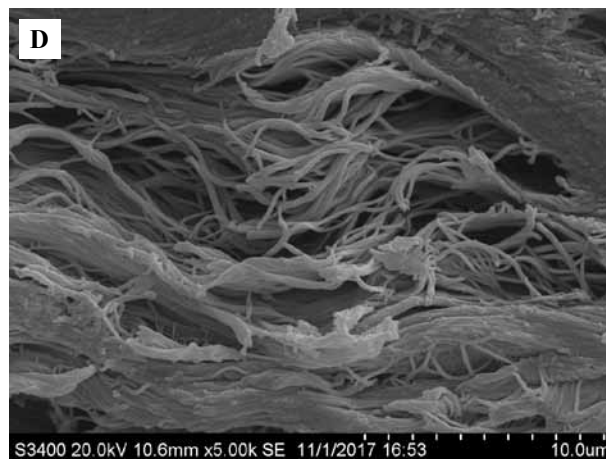
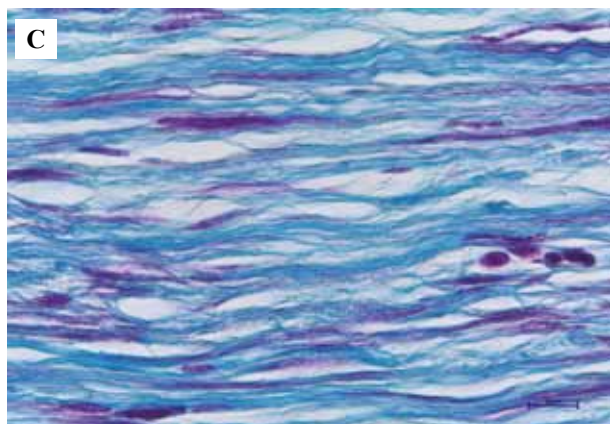
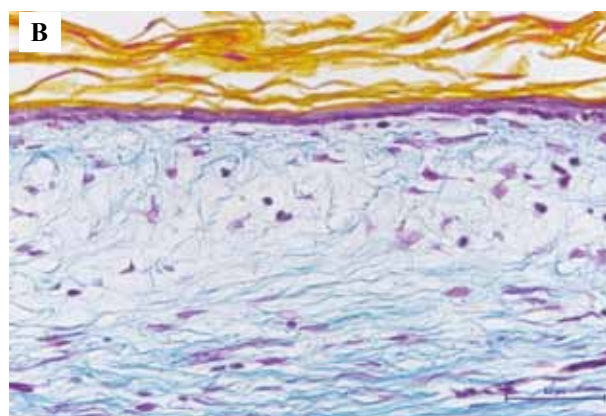
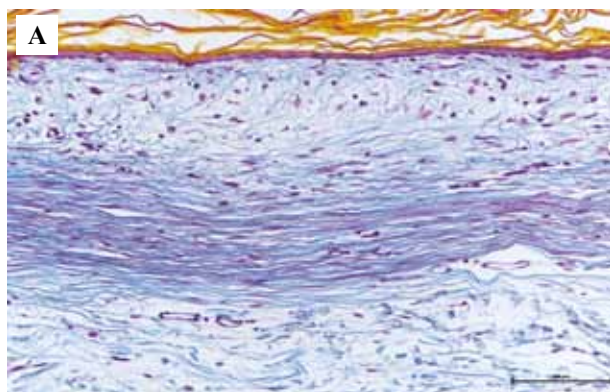


Рис. 1. Микроскопические и ультраструктурные характеристики кожи крыс экспериментальной группы. А – микрофотография кожи после дерматотензии, окраска по Маллори, $\times 100$, В – истончение эпидермиса и тонкие, рыхло расположенные волокнистые структуры в субэпидермальном слое, окраска по Маллори, $\times 400$, С – фрагмент дермы с однонаправленными волокнистыми структурами, окраска по Маллори, $\times 400$, D – сосочковый слой дермы, СЭМ, $\times 5000$, E – волокнистые структуры дермы с преимущественной анизотропией, СЭМ, $\times 500$

Fig. 1. Microscopic and ultrastructural features in the murine experimental group. A – skin microscopic image after skin expansion, Mallory staining, $\times 100$. B – thinning of the epidermis and thin, loosely located fibrous structures in the subepidermal layer. Mallory staining, $\times 400$. C – dermis with unidirectional fibrous structures. Mallory staining, $\times 400$. D – dermal papillary layer. SEM, $\times 5000$. E – dermal fibrous structures with predominant anisotropy. SEM, $\times 500$

Таблица 1 | Table 1

Количественные характеристики структурных компонентов кожи, Ме (25; 75) |
Quantitative characteristics of the structural skin components, Me (25; 75)

Исследованные параметры Investigated parameters	Контроль Control	Дистракция 14 суток 14-day distraction
Толщина эпидермиса, мкм Epidermis thickness, μm	30,5 (22,8; 38,1)	12,90 (9,6; 16,1)*
Толщина дермы, мм Derma thickness, mm	2,47 (1,85; 3,05)	0,73 (0,54; 0,91)
Численная плотность клеток, на 1 мм ² дермы Cell numerical density, per 1 mm ² of the dermis		
Фibroциты Fibrocytes	37,6 (28,2; 47)	19,5 (14,62; 24,37)*
Фibroбласты Fibroblasts	15,3 (11,47; 19,12)	41,7 (31,27; 52,12)*
Макрофаги Macrophages	6,70 (5,02; 8,37)	33,0 (24,75; 41,25)*
Тучные клетки Mast cells	7,03 (5,27; 8,78)	10,23 (7,67; 12,78) *

* Статистически значимые отличия от группы контроля ($p \leq 0,05$)

* Statistically significant differences from the control group ($p \leq 0.05$)

Таблица 2 | Table 2

Распределение типов коллагена в дерме кожи, Ме (25; 75) |
Collagen type distribution in the skin dermis, Me (25; 75)

Вид эксперимента Type of experiment	Площадь поля в тысячах пикселей Field area in thousand pixels	Плотность пикселей красного цвета I тип Density of Red pixel Type I	Плотность пикселей зеленого цвета III тип Density of Green pixel Type III	Соотношение коллагена I/III Collagen ratio I/III
Контроль Control	235,2 (176,4; 294)	25,1 (18,8; 31,370)	7,6 (5,7; 9,5)	3,3 (2,47; 4,12)
Дистракция Distraction	348,2 (261,15; 435,25)*	8,62 (6,46; 10,77)*	11,9 (8,92; 14,87)	0,72 (0,54; 0,9)*

* Статистически значимые отличия от группы контроля ($p \leq 0,05$)

* Statistically significant differences from the control group ($p \leq 0.05$)

волокон определялись более тонкие сетчатые структуры и микрофибрилярный компонент, обнаруживающийся вокруг фибробластов.

На границе сетчатого слоя и гиподермы наблюдалась деструкция волокнистого остова. При этом активный неоколлагенез не отмечен. В сосочковом и наружной части сетчатого слоев дермы визуализируется значительное количество сосудов микроциркуляторного русла, преимущественно капиллярного типа.

К окончанию периода дистракции в клеточном компоненте соединительной ткани дермы отмечалось достоверное ($p \leq 0,05$) повышение численной плотности фиброцитов, макрофагов и тучных клеток, количественные показатели которых представлены в таблице 1. В сосочковом слое наблюдалась активная макрофагальная реакция, менее выраженная в сетчатом слое кожи. Вблизи кровеносных сосудов микроцирку-

ляторного русла отмечены скопления тучных клеток (табл. 1).

При изучении срезов дермы кожи в поляризационном микроскопе в группе контрольных животных выявлена равномерно высокая плотность волокнистых структур, среди которых в преобладающем большинстве визуализировались коллагеновые волокна I типа (табл. 2).

В экспериментальной группе животных, в условиях дермотензии, наблюдалось значительное снижение общей плотности коллагеновых волокон с наименьшей их представленностью в поверхностных слоях дермы.

При изучении этого же фрагмента кожи в поляризационном микроскопе определялись очень слабое красное свечение и небольшое зеленое свечение, что свидетельствовало не только о снижении плотности волокон, но и об изменении соотношения типов коллагена.

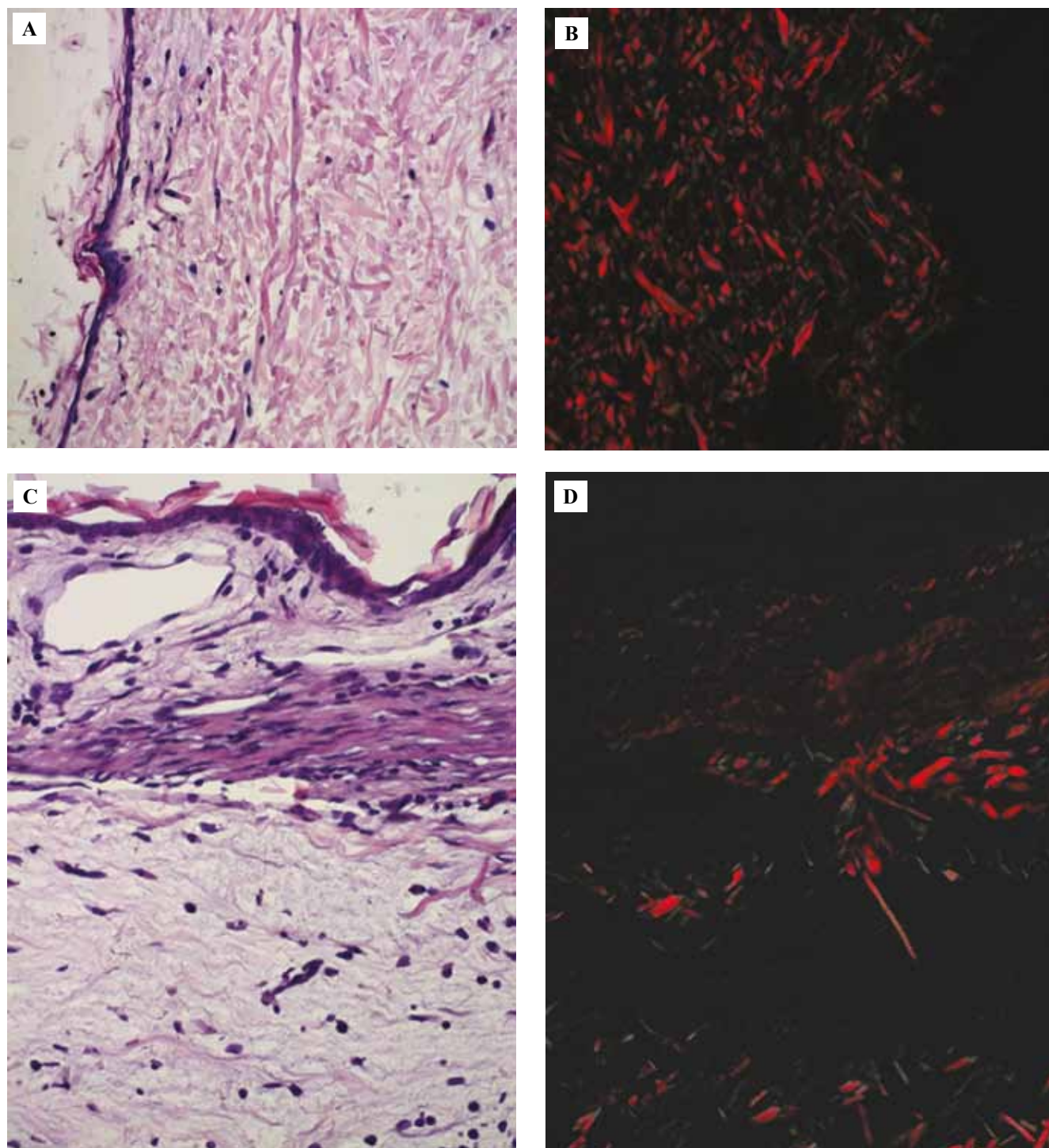


Рис. 2. Кожа крыс экспериментальной и контрольной групп при световой и поляризационной микроскопии.

- А – микрофотография кожи крыс контрольной группы, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$,
 В – коллагеновые волокна дермы кожи крыс контрольной группы, поляризационная микроскопия, $\times 100$,
 С – микрофотография кожи крыс при дистракции, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$,
 D – коллагеновые волокна дермы кожи крыс контрольной группы, поляризационная микроскопия, $\times 200$

Fig. 2. Rat skin of the experimental and control groups under light and polarizing microscopy.

- A – skin microscopic image in rats of the control group. H&E stain, $\times 100$.
 B – collagen fibers of the skin dermis in rats of the control group, polarizing microscopy, $\times 100$.
 C – microscopic image of rat skin with skin expansion, H&E stain, $\times 200$.
 D – dermal collagen fibers in rats of the control group, polarizing microscopy, $\times 200$

При анализе данных морфометрии, представленных в таблице 2, выявлено достоверное ($p \leq 0,05$) уменьшение коллагена I типа в 2,9 раза и увеличение коллагена III типа в 1,5 раза.

Выводы

Дермотензия, активно применяемая в медицинской практике, приводит к выраженным реактивным изменениям структурных компонентов кожи. В результате distraction происходит уменьшение толщины всех слоев кожи с частичной дезорганизацией коллагеновых волокон в дерме на фоне увеличения количества клеток в зоне растяжения. Выявленное 1,5-кратное увеличение волокон, содержащих коллаген III типа, свидетельствует о неоколлагенезе и запуске процессов восстановления поврежденных волокнистых структур дермы.

Показанные морфологические и морфометрические особенности структурной организации кожи в условиях дермотензии могут служить критериями оценки фазности репаративных процессов и учитываться при разработке этапности и скорости растяжения для обоснования их внедрения в клиническую практику.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.С. Мишина, М.А. Затолокина.

Сбор и обработка материала – Е.С. Мишина, М.А. Затолокина, М.В. Мнихович.

Написание текста – Е.С. Мишина.

Редактирование – Е.С. Мишина, М.А. Затолокина, М.В. Мнихович.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.S. Mishina, M.A. Zatolokina.

Collected the data and performed the analysis – E.S. Mishina, M.A. Zatolokina, M.V. Mnikhovich.

Wrote the paper – E.S. Mishina.

Edited the manuscript – E.S. Mishina, M.A. Zatolokina, M.V. Mnikhovich.

Литература/References

1. *Chang H, Kwon ST, Chung CY, Choi IH, Ahn HT, Cho KH.* Changes in skin during distraction osteogenesis of the tibia in sprague-dawley rats: Verification of epidermal proliferation by immunohistochemical methods. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2007;41(3):97–102. DOI: 10.1080/02844310701214438.
2. *Eckes B, Krieg T.* Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22(3 Suppl 33):73–6. PMID: 15344602.
3. *Мартель И.И., Гребенюк Л.А., Долганова Т.И.* Устранение обширного мягкотканного дефекта бедра посредством дермотензии по технологии Г.А. Илизарова. *Гений ортопедии.* 2016;4:109–113. DOI: 10.18019/1028-4427-2016-4-109-113.
Martel II, Grebenyuk LA, Dolganova TI. Elimination of an extensive femoral soft-tissue defect using dermotension according to Ilizarov technology. *Genij Ortopedii.* 2016;(4):109–113 (In Russ.). DOI: 10.18019/1028-4427-2016-4-109-113.
4. *Gülses A, Sencimen M, Ayna M, Gierloff M, Açil Y.* Distraction histogenesis of the maxillofacial region. *Oral Maxillofac Surg.* 2015;19(3):221–8. DOI: 10.1007/s10006-015-0495-4.
5. *Madhuri V, Dhanraj P.* Correction of post burns contracture of wrist with Ilizarov method. *Burns.* 1998;24(6):576–8. DOI: 10.1016/s0305-4179(98)00055-2.
6. *Grebenyuk LA, Grebenyuk EB.* Express diagnosis of mechanical limb skin condition during prolonged dosed stretching in orthopedics. In: DG Poitout (ed.). *Biomechanics and Biomaterials in Orthopedics.* 2nd ed. London: Springer-Verlag, 2006. P. 241–251. DOI: 10.1007/978-1-84882-664-9.
7. *Hiraki S, Nakamura I, Okazaki H, Nakamura K, Kurokawa T.* Skin behavior during leg lengthening in patients with achondroplasia and hypochondroplasia: a short-term observation during leg lengthening. *J Orthop Sci.* 2006;11(3):267–71. DOI: 10.1007/s00776-006-1014-0.
8. *Banerjee R, Waterman B, Nelson J, Abdelfattah A.* Reconstruction of massive midfoot bone and soft tissue loss as a result of blast injury. *J Foot Ankle Surg.* 2010;49(3):301–4. DOI: 10.1053/j.jfas.2010.02.011.
9. *Omelyanenko NP, Mishina ES, Kovalev AV, Volkov AV.* Structural dynamics of the fibrous basis of reparative regenerate during spontaneous healing of the skin wound. *Bull Exp Biol Med.* 2018;166(2):274–8. DOI: 10.1007/s10517-018-4331-3.
10. *Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM.* The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Res Technol.* 2018;24(2):165–74. DOI: 10.1111/srt.12424.
11. *Engbretsen KA, Johansen JD, Kezic S, Linneberg A, Thyssen JP.* The effect of environmental humidity and temperature on skin barrier function and dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016;30(2):223–49. DOI: 10.1111/jdv.13301.
12. *Kalra A, Lowe A, Al-Jumaily A.* An overview of factors affecting the skin's Young's Modulus. *J Aging Sci.* 2016;4(2):1000156. DOI: 10.4172/2329-8847.1000156.
13. *Kruglikov IL, Scherer PE.* Skin aging as a mechanical phenomenon: The main weak links. *Nutr Healthy Aging.* 2018;4(4):291–307. DOI: 10.3233/NHA-170037.
14. *Kruglikov IL, Scherer PE.* General theory of skin reinforcement. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182865. DOI: 10.1371/journal.pone.0182865.
15. *Maiti R, Gerhardt LC, Lee ZS, Byers RA, Woods D, Sanz-Herrera JA et al.* In vivo measurement of skin surface strain and sub-surface layer deformation induced by natural tissue stretching. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;62:556–69. DOI: 10.1016/j.jmbm.2016.05.035.
16. *Mueller MJ, Maluf KS.* Tissue adaptation to physical stress: A proposed “Physical Stress Theory” to guide physical therapist practice, education, and research. *Phys Ther.* 2002;82(4):383–403. DOI: 10.1093/ptj/82.4.383.
17. *Shah N, Cain G, Naji O, Goff J.* Skin infections in athletes: Treating the patient, protecting the team. *J Fam Pract.* 2013;62(6):284–91. PMID: 23828800.
18. *Singh B, Maibach H.* Climate and skin function: An overview. *Skin Res Technol.* 2013;19(3):207–12. DOI: 10.1111/srt.12043.
19. *Svoboda M, Bilková Z, Muthný T.* Could tight junctions regulate the barrier function of the aged skin? *J Dermatol Sci.* 2016;81(3):147–52. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2015.11.009.

Информация об авторах

Екатерина Сергеевна Мишина – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии Курского государственного медицинского университета.

Мария Алексеевна Затолокина – доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии Курского государственного медицинского университета.

Максим Валерьевич Мнихович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории НИИ морфологии человека.

Author information

Ekaterina S. Mishina – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Histology, Embryology, and Cytology, Kursk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-3835-0594>

Maria A. Zatolokina – Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Histology, Embryology, and Cytology, Kursk State Medical University.

<https://orcid.org/0000-0002-9553-1597>

Maksim V. Mnikhovich – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Central Pathology Laboratory, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0001-7147-7912>

Рецидивирующий напряженный катамениальный пневмоторакс у пациентки с эндометриозом

*Г.А. Казарян¹, Д.В. Базаров¹, А.Ю. Григорчук¹, А.А. Казарян²,
В.Ю. Савина¹, С.А. Леваков², С.В. Пауков², А.Э. Мамедова², Г.Я. Азадова²*

¹ ФГБНУ Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

Катамениальный пневмоторакс – редкая причина спонтанного пневмоторакса у женщин репродуктивного возраста и одно из проявлений торакального эндометриоза. Несмотря на большой интерес со стороны исследователей во всем мире, четкая тактика лечения такой патологии до сих пор не выработана. Проведение торакоскопической ревизии плевральной полости, а также выявление и последующая гистологическая верификация очагов эктопического эндометриоза играют ключевую роль в определении тактики лечения этой категории пациенток. В предлагаемой работе описано клиническое наблюдение успешного лечения пациентки с рецидивирующим напряженным катамениальным пневмотораксом с последующим мультидисциплинарным анализом заболевания.

Ключевые слова: катамениальный пневмоторакс, торакальный эндометриоз, гистологическое исследование

Для корреспонденции: Григорий Александрович Казарян. E-mail: dr.kazaryan@yahoo.com

Для цитирования: Казарян Г.А., Базаров Д.В., Григорчук А.Ю., Казарян А.А., Савина В.Ю., Леваков С.А., Пауков С.В., Мамедова А.Э., Азадова Г.Я. Рецидивирующий напряженный катамениальный пневмоторакс у пациентки с эндометриозом. Клинический экспериментальная морфология. 2021;10(2):57–61. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.57-61.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского (№ 0394-2021-0004).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 22.03.2021. Получена после рецензирования 06.04.2021. Принята в печать 21.04.2021.

Recurrent catamenial tension pneumothorax in a patient with endometriosis

*G.A. Kazaryan¹, D.V. Bazarov¹, A.Yu. Grigorchuk¹, A.A. Kazaryan²,
V. Yu. Savina¹, S.A. Levakov², S.V. Paukov², A.E. Mamedova², G.Ya. Azadova²*

¹ B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

Catamenial pneumothorax is a rare cause of spontaneous pneumothorax in women of reproductive age and one of the thoracic endometriosis manifestations. Researchers have shown an increased interest in catamenial pneumothorax but a clear treatment strategy for this pathology has not been developed yet. The thoracoscopic revision of the pleural cavity, as well as the identification and subsequent histological verification of ectopic endometriosis foci, play a crucial role in patient management. This case report describes the successful treatment of a patient with recurrent catamenial tension pneumothorax and following multidisciplinary analysis.

Keywords: catamenial pneumothorax, thoracic endometriosis, histological examination

Corresponding author: Grigoriy A. Kazaryan. E-mail: dr.kazaryan@yahoo.com

For citation: Kazaryan G.A., Bazarov D.V., Grigorchuk A.Yu., Kazaryan A.A., Savina V.Yu., Levakov S.A., Paukov S.V., Mamedova A.E., Azadova G.Ya. Recurrent catamenial tension pneumothorax in a patient with endometriosis. Clin. exp. morphology. 2021;10(2):57–61. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.57-61 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery (No. 0394-2021-0004).

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

Received 22.03.2021. Received in revised form 06.04.2021. Accepted 21.04.2021.

Введение

Эндометриоз является хроническим гормонально зависимым прогрессирующим заболеванием, характеризующимся наличием эктопической эндометриодной ткани. По данным литературы, до 10% женщин репродуктивного возраста имеют эндометриодные эктопические очаги различной степени клинической активности [1–3]. Наиболее часто при эндометриозе поражаются яичники, маточные трубы и брюшина, однако эндометриодные очаги также выявляют в кишечнике, сердце, легких, коже и других атипичных локализациях [4, 5].

Катамениальный пневмоторакс (КП) (от греч. *katamenios* – возобновляющийся ежемесячно) – редкая форма спонтанного пневмоторакса у женщин среднего репродуктивного возраста. Для заболевания характерны частые рецидивы, которые возникают за 24 часа до начала или через 72 часа после начала менструации. Поражение диафрагмы при эндометриозе ведет к развитию торакального катамениального синдрома, который включает в себя боли в груди во время менструации, пневмоторакс, гемоптизис и гемоторакс. Рецидивы КП достаточны частые и могут достигать 70% [4, 5]. Тем не менее ввиду того, что эта патология в практике торакального хирурга встречается эпизодически, зачастую таких пациенток ведут по общепринятым протоколам, выполняя плевральные пункции и не выявляя буллы в легких, редко прибегают к оперативным вмешательствам. В свою очередь, это приводит к частым рецидивам пневмоторакса, в том числе напряженным. Как пример приводим следующее клиническое наблюдение.

Клиническое наблюдение

Пациентка К., 1986 года рождения, страдает наружным генитальным эндометриозом в течение многих лет. В анамнезе беременностей не было, эндометриоз диагностирован на основании УЗИ, а также по данным лапароскопического оперативного вмешательства по поводу параовариальных кист в 2011 году, где выявлены эндометриодные гетеротопии на тазовой брюшине и яичниках. Специфическое лечение на тот момент пациентка не получала.

В 2019 году перенесла два эпизода рецидивирующего спонтанного пневмоторакса, по поводу чего было выполнено дренирование плевральной полости; этиология пневмоторакса не установлена.

Пациентка обратилась в РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского с целью выработки тактики лечения. Учитывая рецидивирующий характер пневмоторакса, наличие эндометриоза в анамнезе, заподозрен КП. С целью гистологической верификации экстрагенитальных очагов эндометриоза, а также проведения хирургического лечения было принято решение об оперативном вмешательстве во второй фазе менструального цикла, поскольку выявление эндометриодных очагов более вероятно именно в этот период. 6 декабря 2019 года

выполнена торакоскопическая операция. Интраоперационно выявлены сквозные дефекты диафрагмы размерами от 0,5 × 0,6 до 0,3 × 0,4 см (рис. 1 А). Последние иссечены в пределах здоровых тканей с целью гистологической верификации. Выполнены пластика диафрагмы с использованием фторопластового фетра и плеврэктомия для профилактики рецидивов пневмоторакса.

При гистологическом исследовании микропрепарата в биоптатах диафрагмы обнаружены очаги фиброза с мелкими отложениями гемосидерина, очаговой пролиферацией мезотелия плевры (рис. 1 В), таким образом, был диагностирован фиброз, так как эндометриодный эпителий не выявлен, это не позволило подтвердить клинический диагноз эндометриоза.

В связи с расхождением клинического и патологоанатомического диагнозов проведено иммуногистохимическое исследование очагов эндометриоза. Реакции

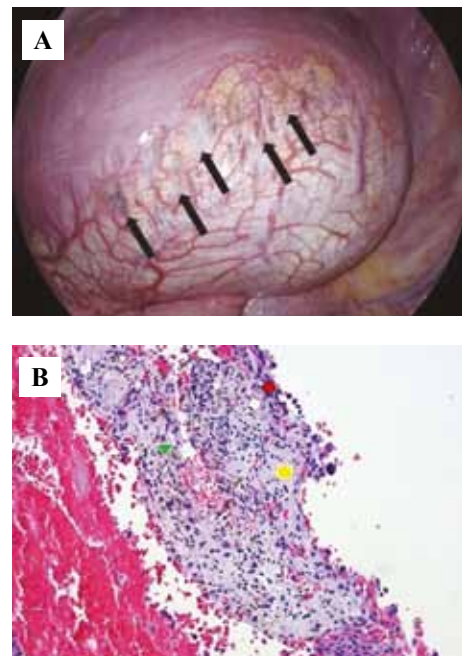


Рис. 1. Макроскопическое и микроскопическое изображение эндометриодных очагов в диафрагме. А – интраоперационное фото: эндометриодные очаги на куполе диафрагмы (указаны стрелкой), В – гистологическое исследование интраоперационного материала. На фото представлен очаг фиброза (■) плевры, в толще которого присутствует пигмент гемосидерин (▼), на поверхности отмечается пролиферирующий мезотелий (●). Окраска гематоксилином и эозином, ×200

Fig. 1. Gross intraoperative appearance and microscopic image of the endometrioid lesions in the diaphragm. A – intraoperative photo: endometrioid foci on the diaphragm dome (indicated by the arrow), B – histological examination of the intraoperative material. The image shows the fibrotic focus of the pleura (■), in the thickness of which there is hemociderin pigment present (▼); on the surface, there is a proliferating mesothelium (●). H&E stain, ×200

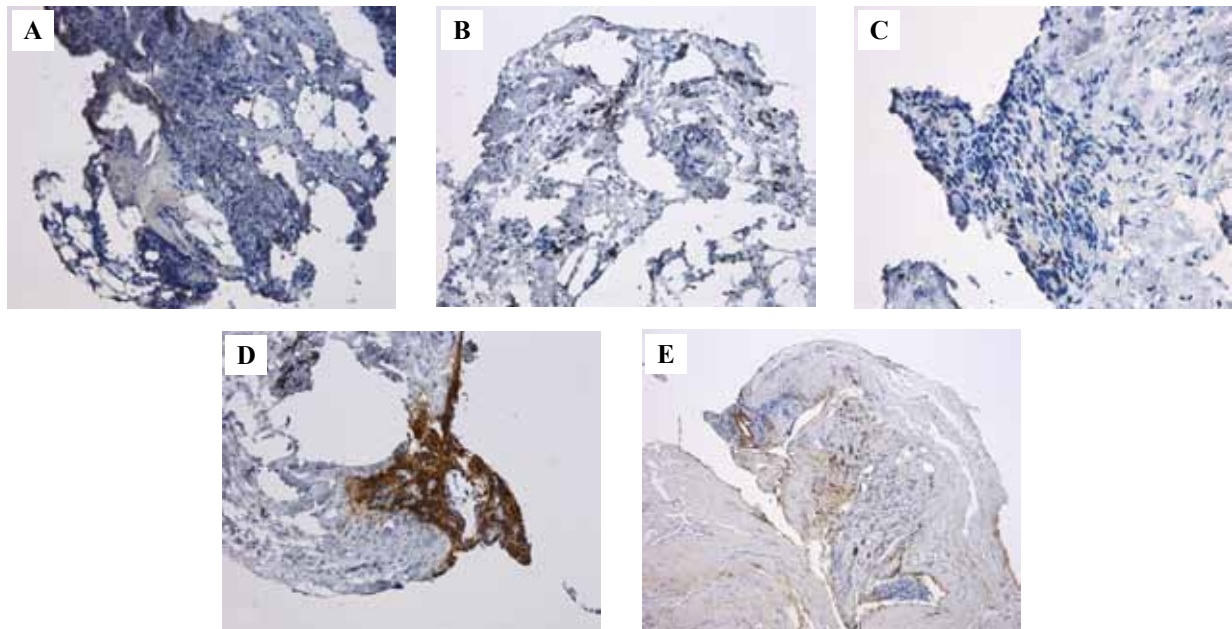


Рис. 2. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование.

- А – степень выраженности реакции +++ . Реакция с антителами к общим цитокератинам, $\times 400$.
 В – степень выраженности реакции +++ . Реакция с антителами к рецепторам эстрогена, $\times 400$.
 С – степень выраженности реакции +++ . Реакция с антителами к рецепторам прогестерона $\times 400$.
 D – степень выраженности реакции +++ . Реакция с антителами к антигену CD10, $\times 400$.
 E – степень выраженности реакции +++ . Реакция с антителами к антигену HBME1, $\times 400$

Fig. 2. Immunohistochemical (IHC) assay.

- A – reaction severity degree is estimated at +++ . Reaction with antibodies to common cytokeratins, $\times 400$. B – reaction severity degree is +++ . Reaction with antibodies to estrogen receptors, $\times 400$. C – reaction severity degree is +++ . Reaction with antibodies to progesterone receptors. D – reaction severity degree is +++ . Reaction with antibodies to antigen CD10, $\times 400$.
 E – reaction severity degree is +++ . Reaction with antibodies to HBME1, $\times 400$

с антителами к общим цитокератинам (рис. 2 А), рецепторам эстрогена (ER) (рис. 2 В), рецепторам прогестерона (PR) (рис. 2 С), антигену CD10 (рис. 2 D) дали положительную реакцию в части клеток. Проведена реакция с антителами к маркерам мезотелия (HBME1), которая оказалась положительной в клетках мезотелия (рис. 2 E).

Таким образом, гистологическое исследование подтвердило диагноз «стромальный эндометриоз». После выписки из стационара пациентка получала гормональную терапию диеногестом 2 мг в сутки в непрерывном режиме в течение 6 месяцев. К моменту написания данной статьи у пациентки достигнута полная ремиссия заболевания. За время наблюдения в послеоперационном периоде в течение 14 месяцев рецидивов пневмоторакса не обнаружено. Пациентка наблюдается у репродуктолога, планирует беременность.

Обсуждение

В основе патогенеза торакального эндометриоза лежит маточно-перитонеальный рефлюкс [4]. Заброс менструальной крови и имплантация клеток эндометрия в стенки брюшной полости, в том числе в поддиафрагмальное пространство, приводят к диссеминации процесса. Наиболее часто поражения встречаются справа – в 91,7% случаев, слева – в 4,8%, а билатеральное

поражение отмечается редко, примерно у 3,5% пациенток. Такая статистика объясняется особенностями циркуляции жидкости в брюшной полости. Сочетание торакального и генитального эндометриоза имеет место у 58,8% пациенток с катамениальным пневмотораксом [5–7]. Распространение воздуха и развитие спонтанного пневмоторакса во время менструации происходят по следующей цепочке: трансгенитальный – трансабдоминальный – трансдиафрагмальный путь. Катамениальный пневмоторакс появляется в результате поражения и перфорации диафрагмы эндометриоидными гетеротопиями [8, 9].

При гистологическом исследовании дифференциальная диагностика торакального эндометриоза, как правило, проводится между метастатической аденокарциномой и мезотелиомой. Казалось бы, наличие стромального компонента, окружающего железы, позволяет исключить диагноз «аденокарцинома» или «мезотелиома», однако при эндометриозе эпителий может проявляться в виде клеточных атипий. В ходе иммуногистохимического исследования, проводимого при торакальном эндометриозе, возможны перекрестные реакции с эстрогеном и прогестероном, а также с кальретинином и нейроэндокринными маркерами. Тесное взаимодействие между патоморфологами и клиницистами, на наш взгляд, может решить проблему по-

становки правильного диагноза. В исследовании, проведенном в 1998 году, Douglas B. Flieder описал девять случаев торакального эндометриоза: всем пациенткам были проведены биопсия пораженных участков и подробное гистологическое и иммуногистохимическое исследование. Во всех случаях диагноз торакального эндометриоза подтвержден на основании клинических и патоморфологических данных [10]. Настоящая работа в очередной раз показывает необходимость расширенного патоморфологического исследования биопсийного материала для правильной диагностики относительно редких и сложных для распознавания заболеваний.

Заключение

Проблема торакального эндометриоза и катамениального пневмоторакса лежит в зоне ответственности как патоморфологов, так и клиницистов – торакальных хирургов, акушеров-гинекологов. Тщательный сбор анамнеза, а также внимательная ревизия плевральной полости и проведение биопсии всех выявленных изменений с последующей гистологической и иммуногистохимической верификацией позволяют своевременно и достоверно поставить диагноз и выбрать правильную тактику лечения.

Литература/References

1. Maurer ER, Schaal JA, Mendez FL Jr. Chronic recurring spontaneous pneumothorax due to endometriosis of the diaphragm. *J Am Med Assoc.* 1958;168(15):2013–4. DOI: 10.1001/jama.1958.63000150008012c.
2. Shrestha B, Shrestha S, Peters P, Ura M, Windsor M, Naidoo R. Catamenial pneumothorax, a commonly misdiagnosed thoracic condition: Multicentre experience and audit of a small case series with review of the literature. *Heart Lung Circ.* 2019;28(6):850–7. DOI: 10.1016/j.hlc.2019.01.012.
3. Bień A, Rzońca E, Zarajczyk M, Wilkosz K, Wdowiak A, Iwanowicz-Palus G. Quality of life in women with endometriosis: A cross-sectional survey. *Qual Life Res.* 2020;29(10):2669–77. DOI: 10.1007/s11136-020-02515-4.
4. Романов М.Д., Куреева Е.М. Легочный эндометриоз: лечебная тактика. *Новости хирургии.* 2018;26(1):103–108. DOI: 10.18484/2305-0047.2018.1.103. Romanov MD, Kireeva EM. Pulmonary endometriosis: treatment tactics. *Novosti Khirurgii (Surgery News).* 2018;26(1):103–108. (In Russ.). DOI: 10.18484/2305-0047.2018.1.103.
5. Marjański T, Sowa K, Czaplą A, Rzyman W. Catamenial pneumothorax – a review of the literature. *Kardiochir Torakochirurgia Pol.* 2016;13(2):117–21. DOI: 10.5114/kitp.2016.61044.
6. Suardika A, Astawa Pemayun TG. New insights on the pathogenesis of endometriosis and novel non-surgical therapies. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2018;19(3):158–64. DOI: 10.1017/S0967199420000830.
7. Nezhat C, Lindheim SR, Backhus L, Vu M, Vang N, Nezhat A et al. Thoracic endometriosis syndrome: A review of diagnosis and management. *JLS.* 2019;23(3):e2019.00029. DOI: 10.4293/JLS.2019.00029.
8. Zondervan KT, Becker CM, Missmer SA. Endometriosis. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1244–56. DOI: 10.1056/NEJMra1810764.
9. Viti A, Bertoglio P, Roviglione G, Clarizia R, Ruffo G, Ceccaroni M et al. Endometriosis involving the diaphragm: A patient-tailored minimally invasive surgical treatment. *World J Surg.* 2020;44(4):1099–104. DOI: 10.1007/s00268-019-05320-4.
10. Flieder DB, Moran CA, Travis WD, Koss MN, Mark EJ. Pleuro-pulmonary endometriosis and pulmonary ectopic deciduosis: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 10 cases with emphasis on diagnostic pitfalls. *Hum Pathol.* 1998;29(12):1495–503. DOI: 10.1016/s0046-8177(98)90021-1.

Информация об авторах

Григорий Александрович Казарян – младший научный сотрудник отделения торакальной хирургии и онкологии РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Дмитрий Владимирович Базаров – доктор медицинских наук, заведующий отделением торакальной хирургии и онкологии РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Александр Юрьевич Григорчук – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения торакальной хирургии и онкологии РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Александр Александрович Казарян – студент 6-го курса лечебного факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Виктория Юрьевна Савина – младший научный сотрудник 1-го патоморфологического отделения РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского.

Сергей Александрович Леваков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Сергей Вячеславович Пауков – кандидат медицинских наук, доцент кафедры акушерства и гинекологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Айнур Эльхан кызы Мамедова – аспирант кафедры акушерства и гинекологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Гюллар Ясир кызы Азадова – аспирант кафедры акушерства и гинекологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет).

Author information

Grigoriy A. Kazaryan – Junior Researcher, Department of Thoracic Surgery and Oncology, B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery. <https://orcid.org/0000-0002-0545-9078>

Dmitry V. Bazarov – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Thoracic Surgery and Oncology, B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery.

<https://orcid.org/0000-0002-2888-419X>

Aleksandr Yu. Grigorchuk – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Department of Thoracic Surgery and Oncology, B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery.

<https://orcid.org/0000-0001-7742-2568>

Aleksandr A. Kazaryan – 6th-year Student, Medical Faculty, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-8556-1143>

Victoria Yu. Savina – Junior Researcher, 1st Pathology Department, B.V. Petrovsky National Research Centre of Surgery.

<https://orcid.org/0000-0003-3494-2867>

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

<https://orcid.org/0000-0002-4591-838X>

Sergei V. Paukov – Cand. Sci. (Med), Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0001-8428-284X>

Ainur E. Mamedova – Postgraduate Student, Department of Obstetrics and Gynecology, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-9642-4523>

Gullar Ya. Azadova – Postgraduate Student, Department of Obstetrics and Gynecology, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

<https://orcid.org/0000-0002-5553-6334>

Оптимизация протокола получения культуры дермальных фибробластов крыс

Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова, К.А. Артемьева, А.Ю. Шелков

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва, Россия

Введение. Получение первичных культур фибробластов необходимо для проведения экспериментальных исследований по изучению базовых механизмов реакции клеток на различные стимулы. Несмотря на широкое использование культур фибробластов, методы их получения из кожи не стандартизированы. Целью исследования был подбор оптимальных условий для получения культуры фибробластов из соединительнотканной основы кожи – дермы крыс с помощью ферментативной дезагрегации ткани.

Материалы и методы. Культуру фибробластов получали из дермы крыс Вистар массой тела 60–65 граммов в возрасте 5–6 недель и массой 160–180 граммов в возрасте 8–10 недель. Проведена серия экспериментов по получению культуры фибробластов с подбором типа коллагеназы, ее концентрации и времени воздействия.

Результаты. Представлен оптимизированный протокол получения дермальных фибробластов крыс, обсуждаются проблемы получения культуры и практические аспекты ее использования.

Заключение. При получении первичной культуры фибробластов кожи крыс следует учитывать ряд факторов – тип фермента, его концентрацию, время воздействия, возраст животных, зону забора кожного лоскута. У молодых крыс оптимальный результат получен при выделении клеток из аксиллярной зоны с применением коллагеназы II типа в концентрации 1 мг/мл и времени воздействия 90 минут. При использовании лоскута кожи, полученного со спины взрослого животного, ферментативное воздействие коллагеназой II типа в концентрации 5 мг/мл в течение 120 минут было оптимальным.

Ключевые слова: культура фибробластов, дерма, протоколы получения, крысы

Для корреспонденции: Елена Алексеевна Пономаренко. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

Для цитирования: Пономаренко Е.А., Диатроптова М.А., Артемьева К.А., Шелков А.Ю. Оптимизация протокола получения культуры дермальных фибробластов крыс. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):62–69. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.62-69.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека (№ АААА-А17-117013050045-5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 30.12.2020. Получена после рецензирования 25.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

Protocol optimization for obtaining the culture of rat dermal fibroblasts

Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova, К.А. Artemyeva, А.Ю. Shelkov

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. Obtaining primary cultures of fibroblasts is necessary for conducting experimental studies to investigate the basic cell response mechanisms to various stimuli. Despite the widespread use of fibroblast cultures, methods for obtaining them from the skin are not standardized. The aim of the study was to find the optimal conditions to obtain a fibroblast culture from rat skin using enzymatic tissue disaggregation.

Materials and methods. The fibroblast culture was obtained from the dermis of 18 male Wistar rats (N=12, 5–6-week-old, and 60–65 g body weight; N=6, 8–10-week-old rats, and 160–180 g body weight). A series of experiments was carried out to obtain a fibroblast culture with selecting the collagenase type and defining its concentration and exposure time.

Results. An optimized protocol to obtain rat dermis fibroblasts is presented. Moreover, the problems of obtaining a culture and practical aspects of its use are discussed.

Conclusion. When obtaining a primary culture of rat skin fibroblasts we should consider the following factors: the type of the enzyme, its concentration, and exposure time; the age of the animals; the area of skin graft collection. In young rats, the optimal result was achieved when the cells were isolated from the axillary zone using collagenase type II at a 1 mg/ml concentration during a 90-minute exposure. In adult animals,

the enzymatic effect of collagenase type II on the skin graft obtained from the back was optimal at a 5 mg/ml concentration during a 120-minute exposure.

Keywords: fibroblast culture, dermis, preparation protocols, rats

Corresponding author: Elena A. Ponomarenko. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

For citation: Ponomarenko E.A., Diatropova M.A., Artemyeva K.A., Shelkov A.Yu. Protocol optimization for obtaining the culture of rat dermal fibroblasts. Clin. exp. morphology 2021;10(2):62–69. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.62-69 (In Russ.).

Funding. The work was carried out within the framework of State Assignment to Research Institute of Human Morphology (No. AAAA-A17-117013050045-5).

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

Received 30.12.2020. **Received in revised form** 25.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Введение

Первичные культуры различных клеток, используемые в экспериментальной работе, получают из нормальных и патологически измененных тканей животных. Для последующей работы клетки при выделении и субкультивировании должны максимально сохранять свои морфологические характеристики и функциональную активность. Таким образом, создаются условия для моделирования клеточных реакций *in vitro*. Универсальной биологической моделью для изучения процессов, лежащих в основе роста и пролиферации клеток, их метаболизма и передачи внутри- и внеклеточных сигналов, являются фибробласты [1]. Культура фибробластов также позволяет изучать *in vitro* секреторную активность клеток как в физиологических условиях, так и при воздействии различных факторов по уровню продукции специфических белков, цитокинов, факторов роста, компонентов внеклеточного матрикса [2]. Фибробласты локализованы в соединительнотканном каркасе всех органов и тканей – сердца, желудочно-кишечного тракта, легких, скелетных мышц и т.д. Одним из источников их получения является кожа. Выявлены значительные отличия в архитектонике и регенераторном потенциале дермы разных участков тела [1].

Фибробласты кожи крысы можно получить методом первичного эксплантата и ферментативной дезагрегации. Метод первичного эксплантата разработан в 1907 году Р.Г. Харрисоном [3]. Этапы этого метода включают получение биоптата кожи, фрагмент которой помещают на покровное стекло в каплю плазмы крови с добавлением гетерологичной сыворотки, и заключение в часовое стекло. Гетерологичная сыворотка индуцирует коагуляцию плазмы. Преципитат плазмы и сыворотка способствуют фиксации тканевого фрагмента на стекле. Компоненты преципитата содержат белки и факторы роста, которые обеспечивают пролиферацию и миграцию фибробластов [3]. Прикреплению эксплантата также способствуют шероховатая поверхность исчерченной чашки Петри, обработка пластика полилизин или фибронектином [3, 4]. Одним из вариантов метода является измельчение кожи на мелкие фрагменты, 3–4 мм, и помещение их под покровное стекло в культуральный сосуд с питатель-

ной средой [5, 6]. Недостатки этого метода – низкая адгезивность тканей, сложности селекции клеток во время роста, а также относительно медленный процесс миграции клеток из первичного эксплантата [3].

Распространенный в исследованиях метод – ферментативная дезагрегация кожи крыс с целью более быстрого получения достаточного количества дермальных фибробластов. Однако при этом существует риск ферментативного повреждения клеток. Метод применяется при достаточном объеме ткани, когда потеря клеток во время дезагрегации не играет значительной роли для получения культуры. В качестве фермента обычно используют коллагеназу. Этот фермент подходит для работы с тканями, содержащими большое количество волокон [3]. Иногда для дезагрегации тканей и получения фибробластов применяют трипсин [5, 7].

Метод ферментативной дезагрегации с целью получения фибробластов включает забор участка кожи с последующим удалением эпидермиса и расщеплением дермы на мелкие фрагменты, инкубацию их с протеолитическими ферментами – коллагеназой, трипсином. При этом тип ферментов, их концентрация и время воздействия широко варьируют [3, 5, 8, 9]. Некоторые авторы рекомендуют в состав полной среды добавлять фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), положительно влияющий на рост клеток и синтез фибронектина, коллагена, эластина, а также трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor, TGF- β), который оказывает модулирующее влияние на функции клеток, включая хемотаксис, и стимулирует синтез коллагена [10, 11].

Способы получения культуры фибробластов как методом первичного эксплантата, так и ферментативной дезагрегации ткани не стандартизированы [4, 5, 8, 9, 12, 13], поэтому целью работы было создание оптимального протокола получения фибробластов кожи крысы.

Материалы и методы

В работе использовали крыс Вистар: 12 самцов массой тела 60–65 граммов в возрасте 5–6 недель и шесть самцов массой 160–180 граммов в возрасте 8–10 недель, полученных из филиала «Столбовая» Научного центра

биомедицинских технологий ФМБА России. При работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755 и Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований (1985), а также правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 267). На проведение исследования было получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 2 от 19.01.2020). Кожный лоскут у крыс иссекали под общим наркозом. Внутримышечно вводили золетил (Virbac, Франция) в дозе 15 мг/кг.

Проведен ряд экспериментов по подбору времени ферментативного воздействия. Использовали коллагеназу II типа (Gibco № 17101-015, США) в диапазоне доз 0,5–1 мг/мл, время воздействия составляло 1–1,5–2 часа, при этом фрагменты кожи крысы были размерами менее 1 мм. Полученную культуру фибробластов оценивали под цифровым инвертированным микроскопом (Carl Zeiss Axiovert 40 MAT, Германия). Концентрацию клеток после энзиматического снятия с пластика подсчитывали в камере Горяева. Морфологию дермальных фибробластов оценивали в нативных культурах и препаратах, окрашенных по Романовско-Гимзе («Абрис», Россия).

Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием клеточной суспензии 0,4% раствором трипанового синего («ПанЭко», Россия) в соотношении 1:20.

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе Sigma Stat 3.5 (Systat Software,

Inc., США). Использовали метод парных сравнений. Результаты представляли в виде медианы и квартилей. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Выделение фибробластов из кожи крыс осуществляли путем ферментативного воздействия (трипсин, коллагеназа II), затем их культивировали в чашках Петри. Критерием эффективности служило формирование полного монослоя фибробластов через 7–10–14 дней.

Дермальные фибробласты при адгезии выглядели распластанными, приобретали удлинённую, веретеновидную форму и преимущественно образовывали отростки первого и второго порядка. В центральной, наиболее широкой части клетки определялось овальное с четкими контурами ядро, в котором визуализировалось от двух до четырёх ядрышек (рис. 1).

Анализ жизнеспособности дермальных фибробластов показал, что доля погибших клеток в ходе выделения невысока, выживаемость составила $\geq 98\%$. Субкультивирование клеток было возможным в группах со сформированным к требуемому сроку монослоем (табл.).

Несмотря на полученный положительный результат, хотелось бы обсудить ряд методических сложностей и вопросов, которые возникали при получении фибробластов кожи у крыс. При выделении фибробластов кожи крыс определяется ряд методических сложностей, что требует обсуждения.

Таблица | Table

Подбор условий выделения фибробластов кожи крыс разного возраста |
Selecting conditions for dermal fibroblast isolation in rats of different ages

Возраст животных Age of animals	Концентрация коллагеназы II типа, мг/мл Concentration of type II collagenase, mg/ml	Время воздействия фермента, ч Time of enzyme exposure, h	Результат, наличие монослоя клеток через 7 суток Result, presence of a cell monolayer after 7 days	Результат, наличие монослоя клеток через 10 суток Result, presence of a cell monolayer after 10 days	Результат, наличие монослоя клеток через 14 суток Result, presence of a cell monolayer after 14 days	Количество клеток, полученных из 1 см ² кожи, ×10 ⁶ Number of cells obtained from 1 cm ² skin, ×10 ⁶	Жизнеспособность клеток, % Viability cells, %, Me (Q1; Q3)
5–6 недель 5–6 weeks	0,5	1	–	–	–	2,1 (1,6; 2,3)*	98,0 (98,0; 98,75)
5–6 недель 5–6 weeks	1,0	1,5	Есть Achieved	Есть Achieved	Есть Achieved	3,6 (2,7; 4,1)	98,5 (98,0; 99,0)
5–6 недель 5–6 weeks	1,0	2	–	–	–	2,3 (2,2; 3,1)*	98,5 (98,0; 99,0)
8–10 недель 8–10 weeks	5,0	2	–	Есть Achieved	Есть Achieved	4,6 (3,8; 5,6)	98,0 (97,25; 98,75)

* – статистически значимые отличия от группы успешно сформированного монослоя фибробластов у крыс в возрасте 5–6 недель

* – statistically significant differences from the successfully formed fibroblast monolayer group in 5–6-week-old rats

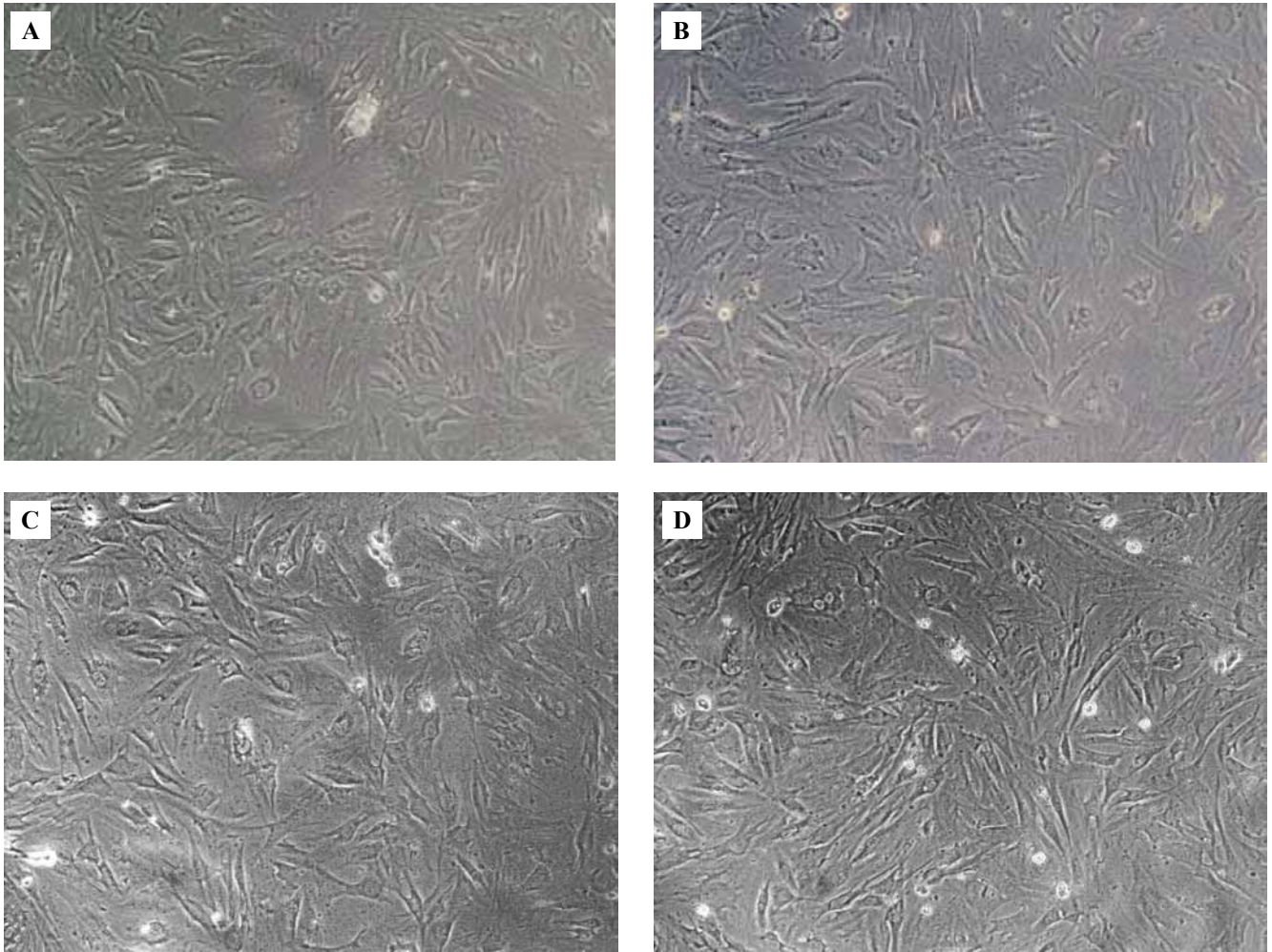


Рис. 1. Монослой дермальных фибробластов крыс после выделения. Фазово-контрастная микроскопия, $\times 400$.

A – 5–6 недель (7 суток), B – 5–6 недель (14 суток), C – 8–10 недель (10 суток), D – 8–10 недель (14 суток)

Fig. 1. Rat dermal fibroblast monolayer after isolation. Phase-contrast microscopy, $\times 400$

A – 5–6 weeks (day 7), B – 5–6 weeks (day 14), C – 8–10 weeks (day 10), D – 8–10 weeks (day 14)

Одна из проблем была связана с тем, из какой зоны поверхности тела проводить забор кожи. При выделении фибробластов кожи у мышей G.G. Walmsley et al. (2016) использовали биоптат кожи спины размерами 60×100 мм [14]. В.М. Murphy et al. (2019) получали фибробласты у 4-дневных мышей, поэтому забирали всю кожу [13]. Кожный лоскут из области спины крыс грубый, с большим количеством коллагеновых волокон, поэтому возникали сложности при его подготовке к этапу ферментативной обработки. Альтернативное решение было предложено А. Seluanov et al. (2010). Эта группа исследователей выделяла фибробласты кожи у нескольких видов животных, включая лабораторных крыс и мышей. Авторы проводили забор участка кожи размером 1 см^2 в подмышечной области, в связи с тем что кожа в этой зоне более тонкая и содержит меньше жировой ткани [8].

В вопросе выбора способа удаления волосяного покрова единого мнения нет. Предлагают удалять шерсть с помощью машинки для стрижки волос [14] или кре-

ма для депиляции (Surgicream, American International Industries) [15]. По нашим наблюдениям, тщательное удаление волос предпочтительно, но не обязательно. При первичной обработке фрагмент кожи инкубировали с ферментами: раствором трипсина 0,25% (при 4°C) в течение 8–12 часов или диспазы 0,125–2% (от 1 до 24 часов) [7, 9], затем удаляли эпидермис и оставшиеся фрагменты волос с волосяными фолликулами. Для облегчения удаления эпидермиса и жировой ткани также применяется трипсин 0,25% раствор с добавлением 1мМ ЭДТА. Обработку трипсином биоптата кожи выполняют классически с преинкубацией в течение 8–12 часов при 4°C , затем 15 минут при 37°C , далее проводится механическое удаление с помощью скальпеля [3, 13, 15]. Для удаления эпидермиса также возможна инкубация в 0,25% растворе трипсина фрагмента кожи в течение 30–60 минут или 1,5–2 часов при 37°C [5, 15]. Некоторые авторы пропускают этап удаления эпидермиса, так как в последующем используются среды, которые не подходят для культивирова-

ния клеток эпидермиса, например DMEM, DMEM/F12, M199 [8, 9, 13].

Необходимо обратить внимание на меры асептики при работе с фрагментом кожи животного. Так, большинство исследователей, А. Seluanov, В.М. Murphy, G.G. Walmsley [8, 13, 15], обрабатывали инструменты и кожу животного перед забором материала 70% спиртом, тогда как S.R. Gillespie и D.M. Owens [15] для обеззараживания участка кожи использовали 1% раствор бетадина в течение 2 минут и последующее промывание стерильной водой. При заборе фрагмента кожи мы применяли спирт, а при подготовке кожи к измельчению – 10% бетадин (EGIS Pharmaceuticals Plc, Венгрия).

Процесс измельчения кожного лоскута довольно трудоемок. А. Seluanov et al. [8] использовали скрещенные скальпели для получения мелких фрагментов, этот же прием описан у Р.Я. Фрешни [3] в рамках методики получения первичных культур. G.G. Walmsley et al. для измельчения кожи применяли лезвие бритвы и ножницы [14]. Мы при выполнении этого этапа работы сначала разрезали кожу на узкие полоски, потом прямыми ножницами каждую измельчали до фрагментов размерами 2–3 мм. Для дальнейшего измельчения фрагментов использовали остроконечные вертикально изогнутые глазные ножницы. Чем меньше в результате получают фрагменты кожи, тем лучше проходит их ферментативная дезагрегация.

Для последующей ферментативной обработки ткани важны выбор фермента и его концентрация. Единого мнения по этому вопросу у исследователей нет. Классическим вариантом считают применение коллагеназы I [9, 13]. Ряд авторов, В.М. Murphy et al. [13], А. Takashima et al. [5], В.А. Зуев [9], для выделения фибробластов кожи использовали коллагеназу I типа. Некоторые исследователи применяли другие ферменты. Так, А. Seluanov et al. [8] проводили выделение фибробластов кожи и легких с помощью Liberase Blendzyme 3 (смесь коллагеназы I и II типа). G.G. Walmsley et al. при получении фибробластов кожи у мышей использовали коллагеназу IV типа [14]. Производители этого фермента рекомендуют применять коллагеназу I типа, но, как следует из опыта названных выше авторов, возможно использование коллагеназы других типов. В нашей работе успешно была применена коллагеназа II типа (Gibco, США).

Концентрация коллагеназы, применяемой для ферментативной дезагрегации кожи, по данным разных авторов, варьирует, а в зависимости от концентрации изменяется и время ее воздействия. Так, В.М. Murphy et al. [13] применяли коллагеназу I типа в концентрации 10 мг/мл в сочетании с трипсином и ДНКазой I, и время воздействия составило 30 минут. А. Seluanov et al. использовали Liberase Blendzyme 3 (коллагеназа I и II) в концентрации 0,14 ед, Wunsch/мл – 1 мг/мл, время воздействия при этом составило 30–90 минут [8]. G.G. Walmsley et al. применяли коллагеназу IV типа

в концентрации 1 мг/мл и инкубировали фрагменты кожи в течение часа [14]. Выбор концентрации фермента и времени воздействия зависит от вида животного, производителя и серии фермента.

Коллагеназа относится к протеолитическим ферментам. Она расщепляет связи между нейтральными аминокислотами (X) и глицином в аминокислотной последовательности *Pro-X-Gly-Pro* в коллагене. Получают ее в основном из фильтрата культуры *Clostridium histolyticum*. Фильтрат содержит не менее семи различных протеаз с молекулярной массой 68–130 кДа. Кроме изоформ коллагеназ в нем также отмечается примесь казеиназы, кlostрипаина, трипсина, желатиназы, эластазы и т.д. Существует несколько типов очищенных коллагеназ (I–XI), и они различаются по специфичности и способности к разрушению природного коллагена и синтетических субстратов. Так, коллагеназа I типа используется для выделения клеток из кожи, легких, жировой ткани, надпочечников. Коллагеназа II типа применяется для изоляции клеток сердца, щитовидной и слюнных желез, печени, костей и хрящевой ткани. Коллагеназу типа IV и VIII применяют для выделения клеток из печени, а типы V и XI дают хороший результат при выделении островков Лангерганса из поджелудочной железы [16]. Подбор коллагеназы, что отмечают и производители (Sigma, Merck, Worthington), и ее необходимой концентрации (от 0,1 до 5 мг/мл) во многом является эмпирическим. Также экспериментально подбирают время диссоциации тканей: от 15 минут до нескольких часов [5, 9, 12, 13].

Следует отметить, что коллагеназа активируется ионами кальция (концентрация ионов в растворе должна составлять 5 мМ), но ингибируется ЭГТА, ЭДТА, бета-меркаптоэтанолом, глутатионом, тиогликолевой кислотой и 8-гидроксихинолином [16]. Более высокая удельная активность коллагеназы может вызвать гибель клеток. В этом случае уменьшают концентрацию фермента или добавляют БСА, сыворотку (до 0,5% и 5–10%, соответственно), чтобы стабилизировать клетки для дальнейшего выделения [3, 17].

При ферментативной обработке степень дезагрегации фрагментов кожи может быть полной или частичной [8, 12]. В случае полной дезагрегации ткани исследователи предупреждают о возможности переваривания клеток, в связи с тем что промежуток времени от одного состояния к другому небольшой – всего 10–15 минут [12].

Вопрос применения клеточного сита для отделения непереваренной ткани и клеточной суспензии является спорным. Непереваренные фрагменты тканей, или микроэсплантаты, могут также быть источниками фибробластов. По данным А. Seluanov et al., фибробласты мигрируют из фрагментов ткани на 2–5-й день [8]. В то же время фильтрация суспензии через клеточное сито может вызвать дополнительное осаждение на нем фибробластов, хотя этот прием используется в некоторых протоколах [14, 15].

Проблемой при выделении фибробластов кожи, на наш взгляд, является сложность прикрепления кожных фрагментов. Так, S.M. Keira et al. рекомендуют помещать фрагменты ткани на чашки Петри с исчерченным дном, размещать их под ламинарным потоком на 40 минут для адгезии ткани и только потом добавлять среду культивирования [4]. Большинство авторов не используют дополнительные покрытия, так как фибробласты хорошо адгезируются к пластику, но в качестве альтернативы рассматривают обработку последнего коллагеном и фибронектином [3, 13].

В нашем эксперименте при ферментативном методе получения фибробластов непереваренные фрагменты кожи находились в культуральной среде во взвешенном состоянии. Они не прикреплялись к поверхности чашки Петри, что было подтверждено микроскопически. Традиционный метод культивирования фибробластов с использованием плазмы крови в качестве покрытия поверхности пластика дает хорошие результаты прикрепления неполностью дезагрегированных фрагментов кожи [3]. С этой целью проводили забор крови у крысы из хвостовой вены в объеме 2 мл в стандартную пробирку с ЭДТА. Кровь центрифугировали и использовали плазму в качестве покрытия дна чашек Петри. Затем их оставляли на 1–2 часа в ламинарном шкафу или использовали сразу. Помещали суспензию клеток с непереваренными фрагментами кожи на 3–5 минут и затем добавляли полную питательную среду. При таком подходе непереваренные участки кожи при ферментативном получении фибробластов быстро прикреплялись к поверхности, что создавало оптимальные условия для получения культуры клеток.

Был проведен ряд экспериментов по подбору времени ферментативного воздействия (табл.). Через 1,5–2 часа воздействия коллагеназы II типа фрагменты кожи легко разрушались и проходили через стандартный наконечник пипетки объемом 1000 мкл. В результате серии экспериментов выявлено, что лимитирующим фактором для получения фибробластов оказался возраст животного. Для крыс в возрасте 5–6 недель при получении культуры фибробластов достаточной концентрацией коллагеназы II типа является 1 мг/мл, а для крыс в возрасте 8–10 недель – 5,0 мг/мл.

В результате нами разработан итоговый оптимизированный протокол выделения дермальных фибробластов кожи крысы в возрасте 5–6 недель массой тела 50–60 граммов.

Протокол выделения дермальных фибробластов

Шерсть в подмышечной области сбривали. Поверхность обрабатывали 96% спиртом и проводили забор одного лоскута кожи размером 1 см² с последующим ушиванием краев раны. Фрагмент кожи помещали в среду ДМЕМ («ПанЭко», Россия).

1. Фрагмент кожи крысы в предварительно подогретом до 37° С растворе 0,25% трипсин–ЭДТА («ПанЭко», Россия) помещали на 30–60 минут в СО₂-инкубатор.

2. С помощью скальпеля удаляли эпидермис и с внутренней стороны подкожную клетчатку.

3. Для предотвращения бактериального роста фрагменты кожи переносили в 10% раствор бетадина (EGIS Pharmaceuticals Plc, Венгрия) на 5 минут, затем дважды промывали средой.

4. С помощью ножниц кожный лоскут измельчали до 2–3 мм и затем остроконечными вертикально изогнутыми глазными ножницами до получения однородной массы.

5. Полученную из кожи массу однородной консистенции помещали в среду ДМЕМ с коллагеназой II типа (Gibco № 17101-015, США) в концентрации 1 мг/мл на 1,5 часа в СО₂-инкубатор при 37°С. Периодически, каждые 15–20 минут, пробирку встряхивали.

6. После завершения инкубации раствор с непереваренными фрагментами кожи пипетировали, используя наконечники с широким и узким просветом, с целью дополнительной механической дезагрегации ткани.

7. На следующем этапе к раствору ДМЕМ с ферментом коллагеназой II типа и взвеси клеток и непереваренных фрагментов кожи добавляли среду ДМЕМ с 10% ЭТС (эмбриональная телячья сыворотка) и центрифугировали (325 g, 5 минут).

8. Клетки ресуспендировали в 1 мл среды ДМЕМ с содержанием 10% ЭТС, 40 мкг/мл гентамицина и 2мМ глутамина («ПанЭко», Россия).

9. Затем клетки помещали в пластиковую чашку Петри (10 см в диаметре) и добавляли полную среду ДМЕМ.

10. Далее фибробласты инкубировали в течение 7 дней до формирования полного монослоя (рис. 1). На этом этапе при микроскопическом исследовании выявлены прикрепившиеся клетки – фибробласты и фрагменты кожи – микроэксплантаты, которые служат дополнительными источниками фибробластов.

Все использованные среды подогрели до 37°С.

С возрастом, по достижении крысами массы тела 80 граммов и более, культуру клеток фибробластов кожи с помощью данного протокола получить не удалось, поэтому нами был разработан протокол для получения фибробластов у половозрелых крыс массой 160–180 граммов. Метод включает забор участка кожи размерами 1 × 1 см со спины крысы после предварительного сбривания шерстного покрова и обработки кожи 70° спиртом. Выбор участка кожи был обусловлен большим количеством коллагеновых волокон и фибробластов. Фрагмент кожи крысы помещали на 30 минут в предварительно прогретый до 37°С 0,25% раствор трипсина, в СО₂-инкубатор. Затем с помощью скальпеля удаляли эпидермис и подкожную клетчатку. Кожу измельчали и помещали в среду ДМЕМ с содержанием глюкозы 4,5 г/л, L-глутамин (Capricorn Scientific, Германия) с коллагеназой II типа в концентрации 5 мг/мл на 2 часа в СО₂-инкубатор, встряхивая пробирку через каждые 15–20 минут. Раствор с непереваренными кусочками кожи пипетировали и добавляли

раствор ДМЕМ с 10% ЭТС, центрифугировали при 112 g 7 минут. Клетки ресуспендировали в среде ДМЕМ с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 2мМ L-глутамина, 40 мкг/мл гентамицина и 10% ЭТС и помещали в чашку Петри или в культуральный флакон. В течение 10 дней формировался полный монослой фибробластов (рис. 1 С).

Заключение

При получении первичной культуры фибробластов кожи крыс следует учитывать ряд факторов – тип фермента, его концентрацию, время воздействия, возраст животных, зону забора кожного лоскута. Оптимальный результат получен при использовании кожного лоскута из аксиллярной области у крыс в возрасте 5–6 недель массой тела 60–65 граммов, применении коллагеназы II типа в концентрации 1 мг/мл, и времени воздействия 90 минут. Для взрослых животных массой тела 160–180 граммов при обработке кожи, полученной из области спины, была оптимальной ферментативная дезагрегация коллагеназой II типа в концентрации 5 мг/мл в течение 120 минут.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова.

Сбор и обработка материала – Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова, К.А. Артемьева, А.Ю. Шелков.

Написание текста – Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова.

Редактирование – Е.А. Пономаренко, М.А. Диатроптова, К.А. Артемьева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova.

Collected and processed the data – Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova, К.А. Artemyeva, А.Ю. Shelkov.

Wrote the paper – Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova.

Editing the manuscript – Е.А. Ponomarenko, М.А. Diatroptova, К.А. Artemyeva.

Литература/References

1. Кузьмичева В.И., Волова Л.Т., Гильмиярова Ф.Н., Быков И.М., Авдеева Е.В., Колотьева Н.А. Фибробласты как объект изучения пролиферативной активности *in vitro*. Наука и инновации в медицине. 2020;5(3):210–215. DOI: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-210-215.
Kuzmicheva VI, Volova LT, Gilmiyarova FN, Bykov IM, Avdeeva EV, Kolotieva NA. Fibroblasts as the subject of proliferative activity research *in vitro*. Science and innovations in medicine. 2020;5(3):210–215 (In Russ.). DOI: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-210-215.
2. Суховой Ю.Г., Костоломова Е.Г., Унгер И.Г., Акунеева Т.В., Антекаръ И.А. Модель влияния гипоксии на клеточную составляющую и синтез компонентов внеклеточного матрикса в культуре фибробластов. Российский иммунологический журнал. 2019;13(22):939–941. DOI: 10.31857/S102872210006535.
Suhovej UG, Kostolomova EG, Unger IG, Akuneeva TV, Antekar IA. Model of influence hypoxias on the cellular component

- and synthesis components extracellular matrix in culture fibroblasts. Russian Journal of Immunology. 2019;13(22):939–941 (In Russ.). DOI: 10.31857/S102872210006535-3.
3. *Freshney RI.* Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 676 p. DOI: 10.1002/9780470649367.
 4. *Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Santos IAN.* Experimental model for fibroblast culture. Acta Cir Bras. 2004;19:11–6. DOI: 10.1590/S0102-86502004000700004.
 5. *Takashima A.* Establishment of fibroblast cultures. Curr Protoc Cell Biol. 2001; Chapter 2:Unit 2.1. DOI:10.1002/0471143030.cb0201s00.
 6. *Sacco AM, Belviso I, Romano V, Carfora A, Schonauer F, Nurzynska D et al.* Diversity of dermal fibroblasts as major determinant of variability in cell reprogramming. J Cell Mol Med. 2019;23(6):4256–68. DOI:10.1111/jcmm.14316.
 7. *Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI.* Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. J Cell Physiol. 2004;200(1):134–45. DOI: 10.1002/jcp.10474.
 8. *Seluanov A, Vaidya A, Gorbunova V.* Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents. J Vis Exp. 2010;44:2033. DOI: 10.3791/2033.
 9. *Zuev VA, Dyatlova AS, Lin'kova NS, Kvetnoi IM, Belushkina NN, Pal'tsev VA.* Skin fibroblasts as the object for clinical diagnosis of Parkinson's disease in persons of different ages. Bull Exp Biol Med. 2019;167(1):177–81. DOI: 10.1007/s10517-019-04485-1.
 10. *Clark RA, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM.* Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta. Journal Cell Sci. 1995;108(Pt 3):1251–61. PMID: 7622608.
 11. *Naim R, Sadick H, Bayerl C, Bran G, Hörmann K.* Angiogenic factors in external auditory canal cholesteatoma-fibroblast cell culture. HNO. 2005;53(11):952–6. DOI: 10.1007/s00106-005-1252-z.
 12. *Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM et al.* Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. J Immunol. 2007;179(3):1595–604. DOI: 10.4049/jimmunol.179.3.1595.
 13. *Murphy BM, Weiss TJ, Burd CE.* Rapid generation of primary murine melanocyte and fibroblast cultures. J Vis Exp. 2019;148:10.3791/59468. DOI: 10.3791/59468.
 14. *Walmsley GG, Maan ZN, Hu MS, Atashroo DA, Whittam AJ, Duscher D et al.* Murine dermal fibroblast isolation by FACS. J Vis Exp. 2016;107:53430. DOI: 10.3791/53430.
 15. *Gillespie SR, Owens DM.* Isolation and characterization of cutaneous epithelial stem cells. Methods Mol Biol. 2019;1879:87–99. DOI: 10.1007/7651_2018_171.
 16. *Van Wart HE.* Clostridium Collagenases. In: ND Rawlings and G Salvesen (eds.). Handbook of proteolytic enzymes. Hayward: Academic Press, 2013(1):607–611. DOI:10.1016/B978-0-12-382219-2.00126-5.
 17. *McManus D, Novaira HJ, Hamers AAJ, Pillai AB.* Isolation of lamina propria mononuclear cells from murine colon using Collagenase E. J Vis Exp. 2019;151:10.3791/59821. DOI: 10.3791/59821.

Информация об авторах

Елена Алексеевна Пономаренко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Марина Анатольевна Диатроптова – младший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

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

Author information

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-9672-7145>.

Marina A. Diatroptova – Junior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-0858-8369>.

Ksenia A. Artemyeva – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-1014-752X>.

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

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

Андрей Петрович Милованов (к 80-летию со дня рождения)

Andrey Petrovich Milovanov on his 80th birthday

2 мая 2021 года исполнилось 80 лет Андрею Петровичу Милованову – Заслуженному деятелю науки Российской Федерации, выдающемуся отечественному патологоанатому, основателю школы плацентологии, доктору медицинских наук, профессору, члену-корреспонденту Российской академии естественных наук, члену совета старейшин Российского общества патологоанатомов.

В 1964 году А.П. Милованов окончил лечебный факультет 2-го Московского государственного медицинского института имени Н.И. Пирогова, в 1968-м поступил в ординатуру, а затем в аспирантуру НИИ морфологии человека, с которым связал всю свою научную деятельность, пройдя путь от младшего научного сотрудника до заведующего лабораторией и отделом. В 1972 году А.П. Милованов защитил кандидатскую диссертацию, уникальные материалы которой затем были обобщены в монографии «Патоморфология ангиодисплазий конечностей», а в 1979-м – докторскую диссертацию на тему «Морфофункциональная перестройка малого круга кровообращения у жителей Северо-Востока СССР и ее роль в патогенезе хронических неспецифических заболеваний легких». В 1990 году ему было присвоено ученое звание профессора, в 2005-м – почетное звание Заслуженного деятеля науки Российской Федерации.

В 1975–1980 годах А.П. Милованов руководил научно-организационным отделом института, а затем возглавлял лабораторию морфометрии патологических процессов (1980–1982), патологической анатомии болезней детского возраста (1982–1998), патологии женской репродуктивной системы (1998–2016). С февраля 2016 года по настоящее время А.П. Милованов – главный научный сотрудник лаборатории патологии репродукции.

Андрей Петрович определил возникновение и развитие нового направления научно-практических морфологических исследований – плацентологии. Его научно-исследовательская деятельность посвящена различным аспектам становления и развития системы мать–плацента–плод, морфогенезу цитотрофобластической инвазии, механизмам атипичной плацентации, роли интерфероногенеза в репродукции, патологии плацентарного ложа матки при ранних и поздних гестозах, преждевременной отслойке плаценты, морфологическим основам фетоплацентарной недостаточности, становлению плацентарного барьера, формированию системы гемостаза в маточно-плацентарной области, патогенезу ретрохориальных гематом. Изучение функциональной активности экстраэмбриональных структур в норме и при патологии беременности позволило сформулировать оригинальную концепцию об определяющей роли микроокружения в жизнеобеспечении эмбриона человека.



Профессор А.П. Милованов – автор более 200 научных работ, в том числе 11 монографий. Приоритетные результаты были представлены в первом отечественном руководстве для врачей «Патология системы мать– плацента–плод» (1999), коллективных монографиях «Экстраэмбриональные и околоплодные структуры при нормальной и осложненной беременности» (2004) и «Беременность ранних сроков. От прегравидарной подготовки к здоровой гестации» (2018), пособиях для врачей «Внутриутробное развитие человека» (2006), руководстве для врачей «Причины и дифференцированное лечение раннего невынашивания беременности» (2011). Научную работу Андрей Петрович Милованов сочетал с практической деятельностью, выполняя обязанности внештатного главного детского патологоанатома Минздрава СССР (1981–1991), а потом Минздрава России (1993–2000). При его участии разработаны методические указания «Принципы построения и заключительного клинического и патологоанатомического диагнозов при материнской смертности» (2001), клинические рекомендации «Эмболия амниотической жидкостью: интенсивная терапия и акушерская тактика» (2017). Исследования в этой области обобщены в руководствах для врачей «Анализ причин материнской смертности» (2008) и «Причины и резервы снижения материнской смертности на современном этапе» (2014).

Андрей Петрович внес большой вклад в подготовку научных кадров и специалистов. Он вел курсы усовершенствования врачей по разделу «Плацентология» в Российской медицинской академии последипломного образования и Институте повышения квалификации ФМБА России, под его руководством защищены 17 докторских и 33 кандидатские диссертации. А.П. Милованов является членом диссертационного совета при Институте морфологии человека, входит в состав редколлегии журнала «Архив патологии» и редакционного совета журнала «Клиническая и экспериментальная морфология».

За выдающиеся достижения в теоретической и практической морфологии Андрей Петрович Милованов удостоен звания Заслуженного деятеля науки Российской Федерации (2005), награжден медалью имени Рудольфа Вирхова (2007), почетной медалью А.Д. Сперанского (2015).

Коллектив Института морфологии человека, редколлегия журнала «Клиническая и экспериментальная морфология», коллеги и ученики поздравляют Андрея Петровича с юбилеем, желают ему доброго здоровья, многих лет творческой деятельности и новых свершений!

Всероссийская научная конференция с международным участием «Регенеративная биология и медицина»

All-Russian scientific conference with international participation “Regenerative Biology and Medicine”

15–16 апреля 2021 года в Москве на базе НИИ морфологии человека в режиме онлайн прошла Всероссийская научная конференция с международным участием «Регенеративная биология и медицина». В ней приняли участие ученые из разных городов Российской Федерации, Белоруссии, Великобритании и Швейцарии. Участников конференции при открытии приветствовали директор НИИ морфологии человека профессор Л.М. Михалева, научный руководитель НИИ морфологии человека член-корреспондент РАН, профессор, доктор медицинских наук Л.В. Кактурский, руководитель секции медико-биологических наук отделения медицинских наук Российской академии наук, академик РАН, профессор, доктор медицинских наук А.М. Дыгай, директор Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова академик РАН, профессор, доктор медицинских наук Г.Т. Сухих, директор Института регенеративной медицины, декан факультета фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и президент Национального общества регенеративной медицины, глава экспертного совета Минздрава России по регенеративной медицине, научной платформы Минздрава «Регенеративная медицина» и технологической платформы «Медицина будущего», академик РАН, профессор, доктор биологических наук В.А. Ткачук.

На конференции были заслушаны 58 устных докладов, выставлены и обсуждены 24 стендовых доклада, 53 участника представили свои сообщения только в виде тезисов. В рамках конкурса награждены почетными грамотами молодые ученые, сделавшие лучшие устные (В.В. Козин, А.С. Полтавец, А.В. Панова) и стендовые (А.А. Шаймарданова, И.М. Кабдеш, П.А. Крохичева) доклады.

Пленарные доклады были посвящены фундаментальным проблемам регенеративной биологии

и медицины (академик РАН В.А. Ткачук, профессор Е.Г. Скурихин, профессор М.А. Александрова, доктор биологических наук Е.Р. Андреева, доктор медицинских наук А.В. Ельчанинов, член-корреспондент РАН Б.Г. Юшков, профессор Д.В. Гольдштейн), в том числе молекулярным аспектам регенерации (профессор Ю.А. Романов, профессор В.Л. Катанаев, доктор биологических наук Д.Н. Силачев) и новейшим методам тканевой инженерии – формативной биофабрикации и роботической биопечати (кандидат медицинских наук В.А. Миронов, кандидат медицинских наук И.Ю. Малышев).

Тематика секционных заседаний оказалась очень разнообразной и охватывала различные прикладные и теоретические аспекты регенеративной биологии и медицины. Это дало участникам конференции возможность ознакомиться с результатами исследований как по близкой им тематике, так и в других областях, что несомненно будет способствовать расширению кругозора ученых и появлению новых идей. Модераторами конференции стали ведущие специалисты в области регенерации. Были затронуты такие важные темы, как новые методы изучения регенерации костной и хрящевой ткани (профессор Г.Н. Берченко, кандидат медицинских наук А.В. Ковалев), регуляции восстановительных процессов (доктор биологических наук В.П. Ямскова, кандидат биологических наук А.В. Ло-





хонина, Д.А. Артемова, К.Р. Бутов, А.А. Власова, А.С. Полтавец, Е.Д. Студеникина), регенерации патологически измененных органов (кандидат биологических наук Т.В. Сухачева, кандидат биологических наук Д.А. Арешидзе). Несколько докладов было посвящено регенерации у беспозвоночных и низших позвоночных животных (доктор биологических наук И.Ю. Долматов, кандидат биологических наук В.В. Козин, В.А. Гарипова, Е.В. Шафеи).

На соответствующих секциях рассматривали свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (кандидат биологических наук Ю.Г. Суздальцева, кандидат биологических наук И.Э. Неганова, PhD А.В. Кондрашов, М. Тарунина, А.В. Панова) и разные экспериментальные модели изучения регенерации (кандидат биологических наук А.А. Пантелеев, кандидат ветеринарных наук Д.Б. Авдеев, кандидат биологических наук М.С. Краснов, кандидат биологических наук Н.Б. Тихонова, Р. Алатраш, Н.В. Андрианова, К.А. Да-

риенко, О.Н. Чернова). В программе конференции были широко представлены результаты исследований в области клеточных технологий (доктор биологических наук Е.Ю. Плотников, доктор медицинских наук Д.Ю. Гребнев, кандидат медицинских наук И.Ю. Маклакова, кандидат биологических наук С.В. Надеждин, К.Ю. Пешкова, А.А. Костенников, А.В. Котова, П.И. Бобылева, Д.К. Матвеева) и тканевой инженерии (кандидат медицинских наук А.В. Васильев, кандидат медицинских наук И.Р. Гильмутдинова, Е.В. Пресняков, Е.А. Пахомова, И.А. Недорубова, К.С. Кушнерев, М.О. Мавликеев, М.С. Божокин).

В целом следует отметить высокий методический уровень большинства докладов. Дистанционный модуль мероприятия позволил расширить возможности общения специалистов из разных городов и стран, что существенно повысило уровень конференции.

К сожалению, объем публикации не позволяет достаточно полно осветить разнообразное содержание материалов конференции. Тем не менее с ними можно ознакомиться – запись заседаний конференции будет несколько месяцев доступна по адресу <<https://norp2030.ru/event/regenerativnaya-biologiya-i-meditsina/>>. Тезисы и стендовые доклады размещены на сайте НИИ морфологии человека <morfolhum.ru>.

*Г.Б. Большакова, доктор биологических наук,
заведующая лабораторией роста и развития
НИИ морфологии человека*

Рецензия на монографию

Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов, Н.Ю. Двинских.

«Патоморфоз опухолей человека».

М.: СИМК, 2021. 224 с., ил.

Review on the monograph

E.F. Lushnikov, A.Yu. Abrosimov, N.Yu. Dvinskikh.

“Human tumor pathomorphosis”

Вышла в свет монография, посвященная патоморфозу опухолей человека. Ее авторы – признанные авторитеты в области патологической анатомии.

Современные хирургические пособия, лекарственная и лучевая терапия, гормонотерапия, иммунотерапия существенно изменили естественное течение и исход многих онкологических болезней, что обозначено понятием «лечебный патоморфоз» опухолей. Впервые в виде монографии обобщен опыт исследования патоморфоза ведущих медицинских учреждений России в сопоставлении с данными зарубежных исследований (в зарубежной литературе применяют термин «ответ опухоли на проводимую терапию»).

Монография состоит из введения, четырех глав, включающих основы патологоанатомического исследования патоморфоза опухолей, диагностику и оценку патоморфоза, его проявлений и механизмов, патоморфоз опухолей отдельных органов, и заключения. В издании приведены 60 фотографий микропрепаратов, представлены рисунки на светооптическом и электронномикроскопическом уровне. Издание великолепно оформлено на высоком полиграфическом уровне.

В монографии нашли отражение новые взгляды на современные представления о молекулярно-гене-

тическом потенциале и прогнозе заболеваний, которые следует учитывать патологоанатомам в повседневной практике. Вопрос патоморфоза опухолей освещен с философских позиций, и это делает монографию «Патоморфоз опухолей человека» академическим изданием.

В главе, посвященной различным видам опухолей, отражены изменения, внесенные в международную TNM-классификацию злокачественных опухолей 8-го пересмотра, а также коды заболеваний по МКБ-10.

Монография предназначена для врачей – патологоанатомов, онкологов, осуществляющих повседневную морфологическую диагностику опухолей, подвергающихся различным терапевтическим воздействиям. Она безусловно будет полезна радиологам, ординаторам, аспирантам, молодым врачам. Отечественные патологоанатомы получили систематизированное руководство по оценке патоморфоза опухолей.

*Е.М. Непомнящая,
доктор медицинских наук, профессор*





КОНСУЛЬТАТИВНО- ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР



НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЕ РАБОТЫ

КОНСУЛЬТАТИВНЫЕ УСЛУГИ НАУЧНЫМ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИМ ОРГАНИЗАЦИЯМ

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Патоморфологические исследования биопсийного и операционного материала
- Патоморфологическое исследование материала ветеринарных клиник и экспериментального материала
- Иммуногистохимические исследования
- Иммуноферментный анализ гормонов тиреоидной и репродуктивной панели, онкомаркеров, цитокинов, факторов роста, иммуноглобулинов
- Биохимические исследования ферментов и метаболитов
- Проточная цитофлуориметрия субпопуляций лимфоцитов и маркеров активации
- Фотодокументирование результатов исследования
- Оценка эффективности лекарственных средств на экспериментальных моделях заболеваний человека

НАШИ ПРИОРИТЕТЫ:

- ВЫСОКОЕ КАЧЕСТВО морфологических ИССЛЕДОВАНИЙ
- ПРОФЕССИОНАЛИЗМ сотрудников и СООТВЕТСТВИЕ оборудования и методов научных исследований МЕЖДУНАРОДНЫМ СТАНДАРТАМ

Контакты:

Адрес: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3
Телефон: (499)120-94-79
Телефон/факс: (499)120-80-65
E-mail: morfolhum@mail.ru

www.morfolhum.ru

Лицензия Федеральной службы надзора
в сфере здравоохранения и социального развития
№ ФС-99-01-007950 от 10 апреля 2012

