

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 10 | № 4 | 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
имени академика А.П. Авцына»
117418, Москва,
ул. Цюрупы, д. 3

Адрес редакции

117418, Москва,
ул. Цюрупы, д. 3

Заведующая редакцией
Куликова К.А.

Научный редактор
Васюкова О.А.

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
имени академика А.П. Авцына»

Главный редактор

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

Почетный редактор

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

Заместители главного редактора

Зайратьяниц 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

Коришнов 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

Николенко В.Н., 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

Волошук 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 4 | 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 “A.P. Avtsyn Research
Institute of Human Morphology”

Tsyurupy st., 3,
Moscow, 117418, Russia

Editorial office address

Tsyurupy st., 3,
Moscow, 117418, Russia

Managing editor Kulikova K.A.
Science editor Vasyukova O.A.

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 “A.P. Avtsyn 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

Deputy 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
Russian Academy of Sciences, 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 Russian Academy of Sciences,
Dr. Sci. Med., Professor,
Moscow, Russia

Nikolenko, Vladimir N., 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

Saveliev, Sergey V., Dr. Sci. Biol., Professor,
Moscow, Russia

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

Editorial review board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

А.П. Сысоева, Н.П. Макарова, Е.Е. Краевая
Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека

5 *A.P. Sysoeva, N.P. Makarova, E.E. Kraevaya*
The role of seminal plasma extracellular vesicles in changes in the morphofunctional characteristics of human spermatozoa

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCH

В.В. Литвинов, Л.М. Лемкина, Г.Г. Фрейнд, В.П. Коробов
Морфологическая характеристика экспериментальной катетер-ассоциированной инфекции на фоне иммуносупрессии и применения низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков – варнерина

14 *V.V. Litvinov, L.M. Lemkina, G.G. Freynd, V.P. Korobov*
Morphological characteristics of an experimental catheter-associated infection following immunosuppression and the use of a low-molecular cationic peptide of the lantibiotic family – warnerin

С.В. Чепур, М.А. Тюнин, В.А. Мясников, И.И. Алексева, О.О. Владимирова, Н.С. Ильинский, А.С. Никишин, В.А. Шевченко, А.В. Смирнова
Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований

25 *S.V. Chepur, M.A. Tyunin, V.A. Myasnikov, I.I. Alekseeva, O.V. Vladimirova, N.S. Ilinskiy, A.S. Nikishin, V.A. Shevchenko, A.V. Smirnova*
Organ and tissue damage related to SARS-CoV-2: the biological model for experimental (preclinical) trials on golden hamsters *Mesocricetus auratus*

А.С. Константинов, К.В. Шелехова
Взаимосвязь структуры микроциркуляторного русла и метастатического потенциала локализованных форм колоректального рака

35 *A.S. Konstantinov, K.V. Shelekhova*
Correlation of microvasculature structure with metastatic potential of localized forms of colorectal cancer

П.А. Елясин, С.В. Залавина, А.Н. Машак, Е.В. Овсянко, С.В. Айдагулова
Иммуногистохимическое исследование эффектов тяжелых металлов на слизистую оболочку тонкой кишки крыс препубертатного возраста

45 *P.A. Elyasin, S.V. Zalavina, A.N. Mashak, E.V. Ovsyanko, S.V. Aidagulova*
Immunohistochemical study of the effects of heavy metals on the intestinal mucosa in prepubertal rats

H.V. Gasparyan, S.A. Buloyan, A.E. Pogosyan, L.M. Arshakyan, L.S. Harutyunyan, R.G. Paronikyan, I.M. Nazaryan, Sh.Sh. Dashyan, E.G. Paronikyan
Pathological investigation of neuroprotective activity of new derivatives of fused pyrazolyl-thienopyridines in Corazol-induced seizures

С.О. Генинг, И.И. Антонеева, Т.В. Абакумова, Т.П. Генинг, Е.В. Слесарева
Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток CD44, CD133 и ALDH в первичной опухоли на фоне платиносодержащей химиотерапии при раке яичников

Н.Б. Тихонова, А.П. Милованов, В.В. Алексанкина, Т.В. Фокина, М.Н. Болтовская, А.П. Алексанкин
Участие жировой ткани в заживлении сквозной операционной раны стенки матки крысы

53 *Г.В. Гаспарян, С.А. Буляян, А.Е. Погосян, Л.М. Аршакян, Л.С. Арутюнян, Р.Г. Пароникян, И.М. Назарян, Ш.Ш. Дашян, Е.Г. Пароникян*
Патоморфологическое исследование нейропротекторной активности новых производных конденсированных пиразолил-тиенопиридинов при судорогах, индуцированных коразолом

63 *S.O. Gening, I.I. Antoneeva, T.V. Abakumova, T.P. Gening, E.V. Slesareva*
Expression of cancer stem cell markers CD44, CD133, and ALDH in a primary tumor before and after platinum-containing chemotherapy in ovarian cancer

72 *N.B. Tikhonova, A.P. Milovanov, V.V. Aleksankina, T.V. Fokina, M.N. Boltovskaya, A.P. Aleksankin*
The role of adipose tissue in the healing of rat uterine wall after a full-thickness surgical incision

ПАМЯТНЫЕ ДАТЫ SPECIAL DAYS AND TRIBUTES

К 100-летию со дня рождения
Беллы Соломоновны Гусман
(1921–1983)

81 To the 100th anniversary
of Bella S. Gusman
(1921–1983)

Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека

А.П. Сысоева, Н.П. Макарова, Е.Е. Краевая

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

Долгое время роль семенной плазмы в процессе оплодотворения у человека оставалась недооцененной. Многочисленные исследования, связанные с разработкой методов культивирования эмбрионов человека *in vitro*, касались только качества мужских и женских гамет. Тем не менее в последние годы с развитием омиксных технологий стало понятно, что семенная плазма существенно влияет на морфофункциональные характеристики сперматозоидов. В первую очередь это касается регулирующей функции внеклеточных везикул, выделяемых клетками репродуктивного тракта мужчин. В связи с этим целью работы стала попытка проанализировать современные данные о влиянии внеклеточных везикул семенной плазмы на морфофункциональные характеристики сперматозоидов в решении проблем бесплодия, связанных с мужским фактором в репродуктивной медицине. В обзор включены исследования и результаты, описанные в научных статьях, найденных в базах Pubmed, Google Scholar, Cochrane Library по данной теме, опубликованные за последние 5 лет. Немногочисленные исследования, посвященные влиянию внеклеточных везикул семенной плазмы на морфофункциональные характеристики мужских половых клеток, показывают, что внеклеточные везикулы действуют как функциональные регуляторы мужской фертильности, а их дисфункция может быть причиной бесплодия. Именно использование внеклеточных везикул семенной плазмы в клинических условиях может значительно повысить успех программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий, и особенно это касается случаев, где причиной отсутствия беременности является нарушение сперматогенеза.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, экзосомы, биомаркеры, семенная плазма, сперматозоиды, вспомогательные репродуктивные технологии, клеточная биология, морфология

Для корреспонденции: Наталья Петровна Макарова. E-mail: np.makarova@gmail.com

Для цитирования: Сысоева А.П., Макарова Н.П., Краевая Е.Е. Роль внеклеточных везикул семенной плазмы в изменении морфофункциональных характеристик сперматозоидов человека. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):5–13. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.5-13.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 15.06.2021. Получена после рецензирования 22.07.2021. Принята в печать 22.09.2021.

The role of seminal plasma extracellular vesicles in changes in the morphofunctional characteristics of human spermatozoa

A.P. Sysoeva, N.P. Makarova, E.E. Kraevaya

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

For a long time, the role of seminal plasma during human fertilization remained underestimated. Numerous studies related to the development of different methods for human embryo *in vitro* cultivation were generally concerned with the quality of male and female gametes. However, in recent years, the development of Omix technologies provided a new insight into great seminal plasma influence on the morphofunctional characteristics of spermatozoa. This is especially true for the regulatory function of extracellular vesicles secreted by male reproductive tract cells. In this work, we attempted to analyze current data on the influence of extracellular seminal plasma vesicles on the morphofunctional characteristics of spermatozoa to solve male infertility topical issues. The review includes studies by foreign and Russian research groups that were

conducted within the past 5 years and found in PubMed, Google Scholar, and Cochrane Library databases. Very few studies demonstrate that seminal plasma vesicles act as functional regulators of male fertility and their dysfunction may lead to infertility. The use of seminal plasma extracellular vesicles in clinical practice may significantly increase the success of IVF programs, especially in impaired spermatogenesis.

Keywords: extracellular vesicles, exosomes, biomarkers, seminal plasma, spermatozoa, assisted reproductive technology, cell biology, morphology

Corresponding author: Natalia P. Makarova. E-mail: np.makarova@gmail.com

For citation: Sysoeva A.P., Makarova N.P., Kraevaya E.E. The role of seminal plasma extracellular vesicles in changes in the morphofunctional characteristics of human spermatozoa. *Clin. exp. morphology.* 2021;10(4):5–13. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.5-13 (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 15.06.2021. **Received in revised form** 22.07.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Использование различных методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) решило часть проблем, связанных с мужским и женским бесплодием. Например, метод ИКСИ (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, Intra Cytoplasmic Sperm Injection, ICSI) обеспечил прямую передачу отцовского генетического материала в яйцеклетку и получение эмбрионов у пар, бесплодие которых обусловлено мужским фактором. В связи с этим долгое время ролью семенной плазмы (СП) в регуляции процессов оплодотворения и развития эмбрионов в значительной степени пренебрегали. Тем не менее недавно обнаружены факторы, которые однозначно убеждают ученых в роли семенной плазмы в развитии эмбриона человека. В первую очередь это касается регулирующей функции внеклеточных везикул, выделяемых клетками репродуктивного тракта мужчины.

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой частицы, ограниченные клеточной мембраной с цитоплазматическим содержимым, которые секретируются почти всеми типами клеток, от прокариот до эукариот. Внеклеточные везикулы были обнаружены во многих биологических жидкостях организма человека (кровь, моча, слюна, грудное молоко, фолликулярная жидкость и сперма). Выделяют три типа внеклеточных везикул: 1) микровезикулы, или экзосомы, образующиеся во внеклеточном пространстве за счет расщепления плазматической мембраны, 2) экзосомы цитоплазматического происхождения, содержащие белки, РНК и липиды; их мембрана образуется в результате впячивания внутрь эндосомальной мембраны, 3) апоптотические тельца [1].

Семенная плазма человека состоит из смеси внеклеточных везикул, которые происходят из различных дополнительных мужских репродуктивных органов, таких как простата, придаток яичка и семенные пузырьки. Внеклеточные везикулы не только иммуномодулируют женские половые пути при прохождении сперматозоидов по репродуктивным путям в процессе оплодотворения, но также повышают подвижность сперматозоидов [2], разжижают сперму, защищают

от инфекций [3]. Показано, что ВВ регулируют функции сперматозоидов путем связывания и слияния с их мембраной, позволяя им интегрировать цитозольные и мембранные составляющие в клетку. Ведутся споры о необходимых условиях для связывания и слияния везикул, таких как pH, присутствие факторов капациации или ответ на прогестерон [4]. Кроме того, перенос белка от везикул к сперматозоидам возможен только при наличии определенного значения pH, температуры и наличия цинка [5–8].

В обзоре современных данных литературы основное внимание уделяется участию именно внеклеточных везикул СП в регуляции функций сперматозоидов, влияющих на их способность к оплодотворению.

Протеомный и экзосомный профили семенной плазмы человека

Семенная плазма долгое время считалась пассивной средой, необходимой только для доставки сперматозоидов в женский репродуктивный тракт, однако последние достижения протеомных технологий позволили идентифицировать тысячи белков, и в настоящее время не остается сомнений в том, что СП значительно влияет на функции сперматозоидов и мужскую фертильность [9]. Белки СП участвуют в формировании семенного сгустка при эякуляции и процессе разжижения спермы благодаря содержанию белков семеногелина (SEMG), фибронектина (FN1) и KLK3. Семеногелин-1 (SEMG1) и семеногелин-2 (SEMG2) являются наиболее распространенными белками СП и служат основными компонентами эякуляционного сгустка, который препятствует преждевременной капациации и активации сперматозоидов, и благодаря своим буферным свойствам (pH 7,35–7,50) обеспечивают защитную среду от кислой среды влагалища [10–13].

Белки СП также участвуют в регуляции подвижности сперматозоидов, гиперактивации и акросомной реакции; они обеспечивают защиту от окислительных процессов и обладают иммунодепрессивными свойствами, вызывая эффективное ингибирование лимфоцитов, макрофагов и системы комплементов [9, 14–16].

Семенная плазма преимущественно состоит из белков с диапазоном концентраций от 35 до 55 мг/мл [1, 7]. Большая часть белков, обнаруженных в семенной жидкости, происходит из семенных пузырьков, причем SEMG1, SEMG2, FN1 и лактотрансферрин (LTF) являются преобладающими белками, секретируемыми этими железами [17].

Синтаза оксида азота (NOS1), ингибиторы протеаз, такие как серпин, ингибитор протеина С (PCI), и различные цитокины, включая трансформирующий фактор роста (TGFB), также секретируются семенными пузырьками. При этом один из наиболее распространенных белков в СП, альбумин (ALB), который составляет около одной трети содержания белка в сперме, частично имеет простатическое происхождение [17, 18]. Простата также является основным источником глутаматкарбоксипептидазы-2 (фолатгидролаза, FOLH1 или простатоспецифический мембранный антиген, PSMA), арахидонат-15-липоксигеназы В (ALOX15B), глутамин-глутамилтрансферазы 4 (TGM4), простат-специфического белка 94 (PSP-94, ингибин-микро-семинопротеин), АСРР и калликреина hK3e (KLK3), сериновой протеазы, известной как PSA. Другие белки, обнаруженные в СП, имеют эпидидимальное происхождение, включая простагландин-Н2 D-изомеразу (простагландин-D2-синтаза или простагландин-D-синтаза липокалинового типа; PTGDS), кластерин (CLU), эпидидимальный секреторный белок E1 (NPC2), MIF, человеческий лейкоцитарный антиген G (HLA-G), белок спермы P34H и ряд белков антиоксидантной системы, таких как эпидидимальная секреторная глутатионпероксидаза 5 (GPX5) и глутамилтранспептидаза (GGT1) [7, 17, 19]. Транскеталазеподобный белок 1 (TKTL1), фосфоглицераткиназа 2 (PGK2), С-цепь L-лактатдегидрогеназы (LDHC), экспрессируемый в яичках белок 101 (TEX101) и акросомный белок SP1 (ACRV1) происходят из секреции яичек [14, 20], в то время как муцин (MUC), которого очень много в семенной жидкости, является белком, характерным для куперовой железы. Многие белки, присутствующие в СП, происходят из различных половых желез. Например, ALB, который помимо простаты обнаруживается в яичках и придатке яичка, LTF, также образующийся в эпидидимисе, или протеин, ингибирующий пролактин (PIP), источником которого является не только семенной пузырек, но также семенники или придаток яичка [17, 21]. KLK3, в основном выделяемый простатой, также производится железой Литтре, а экспрессия белка SPAM1 (PH-20) была обнаружена в придатке яичка и самом яичке [17].

Таким образом, идентифицированные белки СП происходят из разных органов мужской репродуктивной системы. Тем не менее при исследовании СП следует учитывать, что 10 более распространенных белков в семенной жидкости, включая SEMG1, SEMG2 и ALB, составляют примерно 80% всей массы белка,

что затрудняет обнаружение других белков с низким содержанием [11, 14].

Как уже было сказано, помимо растворимых молекул и внеклеточных компонентов значительное количество белков, обнаруженных в СП, является цитоплазматическими, что связано с присутствием семенных экзосом в этой жидкости. Семенные экзосомы составляют 3% от общего белка семенной плазмы и в основном включают эпидидимосомы и простасомы [1]. Эти везикулы могут быть выделены из эякулята с помощью центрифугирования после удаления сперматозоидов с последующими различными этапами ультрацентрифугирования надосадочной жидкости [22–24]. Данный метод позволяет анализировать протеом СП, связанный исключительно с этими внеклеточными пузырьками. Еще в 2008 году A.G. Utleg et al. [25] проанализировали экзосомы от пяти здоровых мужчин и сообщили о наличии 139 белков. Самыми многочисленными группами белков были следующие.

1. Ферменты (с особым обилием протеаз, таких как АСРР, GGT1), а также ферменты аминопептидаза N (APN), аминопептидаза P (APP), неприлизин (MME), дипептидилпептидаза IV (DPP4), FOLH1 и KLK3. Высказано предположение, что APN и MME регулируют подвижность сперматозоидов человека посредством модуляции уровней энкефалина и тахикинина [17].

2. Транспортные/структурные белки с преобладанием пяти членов семейства аннексинов (ANXA1, 3, 5, 6 и 11), участвующих в регуляции Ca^{2+} , мембранном переносе, реорганизации липидов в мембране и эндцитозе, такие как актин А (ACTA), актин В (ACTB), профилин I (PRO1) и профилин II (PRO2), LTF, FN1 и тубулины (TBA1) и (TBB2).

3. Белки GTP, включая белки семейства RAS (RAB и RAP), участвующие в регуляции транспорта везикул.

4. Белки шаперонов, включая белки, связанные с тепловым шоком, HSP27 (HS27), HSP70 (HS71, HS72 и HS76) и HSP90 (HS9A и d HS9B).

5. Белки сигнальной трансдукции, включая кальмодулин (CALM), CLU, UBQ, цинк-альфа-2-гликопротеин (AZGP1, также известный как ZA2G) и MIF.

Более поздние и более масштабные работы команды C. Yang et al. в 2017 году [11] показали наличие в образцах везикул СП 1474 различных белков, ассоциированных с основными биологическими процессами, такими как метаболизм, рост и транспорт клеток, поддержание энергетического метаболизма, что согласуется с предыдущими исследованиями [8, 11, 24, 26]. Кроме того, были обнаружены белки-маркеры экзосом: HSP70, CD81, связанный с апоптозом ген 2-взаимодействующий белок X (ALIX), АСТВ, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), фосфоглицератдегидрогеназа (PHGDH) и галектин-3-связывающий белок (LGALS3BP) [11, 27]. Исследование, проведенное L. Vojtech et al., показало, что семенные экзосомы человека содержат особый набор малых некодирующих

РНК, которые модулируют репродуктивный тракт самок, поддерживая развитие эмбриона [5].

Внеклеточные везикулы семенной плазмы как биомаркеры мужского бесплодия

Внутреннее содержание внеклеточных экзосом потенциально может служить биомаркером мужского бесплодия [9, 11]. Последние разработки протеомных инструментов и усовершенствование процесса выделения экзосом сделали возможным идентифицировать значительное количество экзосомальных белков. Многие из фактически предложенных семенных биомаркеров оказались особенно полезными, например, для определения причин варикоцеле [28] или азооспермии (отсутствие сперматозоидов в эякуляте). При последнем диагнозе отсутствие сперматозоидов в сперме может возникать при аномалиях сперматогенеза и при гормональных нарушениях организма, в частности при необструктивной азооспермии (НОА) или обструктивной азооспермии (ОА), ассоциированной с обструкцией семенных путей [14]. Обнаружение биомаркеров к НОА и ОА очень важно для уточнения показаний к экстракции сперматозоидов из яичек (TESE) и предотвращения повторных множественных биопсий, поскольку >50% истинной НОА позволяет восстановить сперматогенез [14].

К. Yamakawa et al. [29] проанализировали протеом СП 10 фертильных и 10 бесплодных мужчин с азооспермией (семеро с НОА и трое с ОА) и идентифицировали четыре возможных биомаркера НОА: стабиллин-2 (STAB2), гуанин-нуклеотидвысвобождающий белок (GNRP) и PIP, которые отсутствовали в образцах пациентов с НОА, и один маркер обструктивной азооспермии, эпидидимальный белок NPC2 (белок С2 болезни Ниманна-Пика), отсутствующий у пациентов с ОА. Последний маркер был предложен в качестве клинического для дифференциации НОА от ОА.

В 2013 году A.D. Rolland et al. [20] провели интересное исследование и обнаружили, что белки TKTL1, PGK2 и LDHC специфически экспрессируются в половых клетках яичек на разных стадиях развития сперматозоидов. Эти белки были достоверно обнаружены в СП от фертильных доноров, но практически не идентифицировались в СП у мужчин после вазэктомии и у пациентов с азооспермией, что позволило исследователям предположить их потенциальную роль как биомаркеров состояния семенного эпителия и как сигнальных молекул задержки созревания половых клеток у пациентов с бесплодием.

Общие характеристики нормальной и субфертильной спермы установлены Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ, 2010) для систематического анализа качества спермы [30]. Приблизительно у 40–60% мужчин имеются нарушения показателей спермограммы. Протеомный анализ СП пациентов с астенозооспермией представляет собой богатый источник биомаркеров мужского бесплодия, что дает возможность предположить, что функциональные анома-

лии придатка яичка и простаты могут способствовать астенозооспермии. СП здоровых доноров и пациентов с астенозооспермией проанализировали и идентифицировали 741 белок [7, 17]. Из них 45 белков было активировано, а 56 белков подавлено у пациентов с астенозооспермией, по сравнению с группой мужчин с нормозооспермией, где такого эффекта замечено не было. Протеомные изменения в семенной жидкости у пациентов с астенозооспермией в основном были связаны с метаболизмом, производством АТФ и нарушениями генерации метаболитов-предшественников АТФ, поскольку цикл Кребса оказался наиболее пострадавшим метаболическим путем. Среди идентифицированных белков был дегликаза DJ-1, белок, снижающий окислительный стресс, который был сильно подавлен у пациентов с астенозооспермией и предложен в качестве биомаркера для этого состояния. Снижение экспрессии DJ-1 сопровождалось увеличением уровней АФК, фактора, связанного с мужским бесплодием [7, 22].

В работе Y. Wu et al. 2019 года [12] также был проанализирован протеом СП мужчин с нормо- и астенозооспермией (524 белка). Авторы показали, что у пациентов с астенозооспермией 22 белка было подавлено, включая LDCH, SORD, ANXA2 и калликреин-2 (KLK2), а семь белков активировано, включая связанный с тепловым шоком белок HSP72. Измененная экспрессия белков, участвующих в процессах сворачивания и деградации, наблюдалась и в предыдущих протеомных анализах у мужчин с астенозооспермией. Большинство этих молекул является белками теплового шока (HSP), молекулярными шаперонами, которые опосредуют укладку других белков и предотвращают их агрегацию. Достоверная связь между измененной экспрессией HSP и нарушением подвижности сперматозоидов до конца не изучена, однако некоторые исследования связывают HSP с мужским бесплодием [31]. Важно также отметить, что в исследовании Y. Wu et al. наиболее дифференциально экспрессируемые белки при астенозооспермии были локализованы во внеклеточном пространстве и заключены во внеклеточные везикулы [12].

Существует достаточно много работ, описывающих нарушенную регуляцию белков у пациентов с тератозооспермией, олигозооспермией и олиготератозооспермией по сравнению с мужчинами с нормозооспермией [8, 32]. Среди них муцин-6 (MUC6), предшественник орозомукоида 1 (ORM1), предшественник эпидидимального гликопротеина изоформы 1 и гомолог CRISP1 у пациентов с тератозооспермией, CLU и LGALS3BP – у пациентов с олигозооспермией, однако тканевый ингибитор металлопротеиназы (TIMP) и AZGP1 (белок, участвующий в регуляции подвижности сперматозоидов) были значительно активированы у данной группы пациентов. Интересно также, что белки KLK3 и SEMG1 были активированы у пациентов с олиготератозооспермией, а белок LTF – у пациентов с тератозооспермией, вне зависимости от показателей concentra-

ции сперматозоидов в эякуляте. Белок DJ-1 отсутствует у пациентов с олиготератозооспермией и дифференциально экспрессируется у других групп пациентов. Эти результаты показывают, что экспрессия белков семенной плазмы напрямую зависит от концентрации и морфологии сперматозоидов, что дает возможность использовать некоторые из белков в качестве биомаркеров бесплодия [17, 24].

В случае олигоастенозооспермии E. Giacomini et al. [33] в своем исследовании сообщили о недостаточной экспрессии белков NPC2 и LGALS3BP и сверхэкспрессии липокалина-1 (LCN-1) и формы PIP в СП у таких пациентов по сравнению с пациентами с нормозооспермией.

Нарушение экспрессии белков при олигоастенозооспермии в основном отражает проблемы с развитием и метаболизмом сперматозоидов, транспортом веществ, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами семенной плазмы. Результаты разных исследований указывают на возможность использовать белки, например NPC2, PIP, PTGDS, LTF, AZGP1, ECM1 и KL3, в качестве биомаркеров статуса мужской фертильности [11, 24, 32, 33].

Интересную работу, осветившую тему внеклеточных везикул в эякуляте и их влияние на характеристики сперматозоидов, провели V. Murdica et al. в 2019 году [24]. Для их исследования были отобраны 42 пациента в возрасте от 18 до 50 лет – им выполнили расширенный анализ спермы, по результатам которого выделили три группы: 33 мужчины с нормальными показателями спермы (НС), 10 мужчин с тяжелой астенозооспермией (АС) и четверо с поствазэктомической азооспермией (ВАЗ). Пациенты с варикоцеле, воспалением мочеполовой системы, инфекциями семенных путей и курящие не были включены в исследование [24]. У групп пациентов с НС и АС была отобрана семенная плазма для выделения и анализа экзосом, содержащихся в эякуляте. Группы были схожи по следующим параметрам: период воздержания, рН, объем спермы, концентрация и жизнеспособность сперматозоидов. Критерии эякулята оценивали по данным ВОЗ [30]. Группы различались только по количеству прогрессивно подвижных сперматозоидов, которое было значительно ниже у мужчин с АС по определению. Для того чтобы исключить вклад популяции экзосом из яичек или придатков яичка в эксперимент, была включена сперма от пациентов с ВАЗ [23].

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) выявила не только наличие везикул округлой формы, но также канальцев и других мембранных частиц. Везикулы, полученные из семенной плазмы пациентов с НС и АС, имели схожую форму, размер и электронную плотность. В частности, размер везикул обеих групп варьировал от 50 до 150 нм, большинство из которых было меньше 100 нм. Везикулы из семенной плазмы пациентов с азооспермией также имели схожие параметры размеров и формы с везикулами пациентов с

нормо- и астенозооспермией. Аналогично параметры везикул пациентов с НС и ВАЗ оказались близки. Таким образом, V. Murdica et al. предположили, что секреция экзосом не зависит от наличия или статуса сперматозоидов в семенной жидкости [24].

Методы выделения чистой фракции внеклеточных везикул из семенной плазмы

В классическом методе выделения ВВ используется разделение частиц в соответствии с их плавучей плотностью путем центрифугирования. На первом этапе осаждаются частицы с высокой плавучей плотностью, такие как крупные клетки, клеточный дебрис, апоптотические тельца и агрегаты биополимеров. Для того чтобы не допустить потерю везикул, вызванную совместным оседанием компонентов плазмы, и уменьшить загрязнение препаратов продуктами лизиса клеток, этот этап также включает в себя несколько подэтапов, а именно центрифугирование при 300–400 g в течение 10 минут для осаждения основной части клеток, при 2000 g для удаления клеточного мусора, а при 10 000–14 000 g для удаления агрегатов биополимеров, апоптотических тельца и других структур с плавучей плотностью выше, чем у ВВ. Разная скорость вращения (от 100 000 до 200 000 g) также используется для окончательного осаждения ВВ [34]. Белки, не относящиеся к ВВ, в осадке удаляются путем суспендирования с последующим вторичным ультрацентрифугированием [35]. Полученный препарат ВВ дополнительно очищается, выделенные микрочастицы отбираются в соответствии с их размером путем микрофльтрации суспензии с использованием фильтров с диаметром пор 0,1 мкм, 0,22 мкм или 0,45 мкм [34, 35]. Важно отметить, что дополнительные этапы очистки ВВ (промывание и микрофльтрация) не только повышают чистоту, но и снижают их целевое количество. В частности, J. Webber et al. [36] показали, что промывание снижает выход ВВ (потери, вызванные неполным осаждением и агрегацией в осадке); выделенная таким образом фракция незначительно отличается по чистоте (соотношение ВВ к общему белку) по сравнению с той, что не подвергается дополнительному промыванию. Тем не менее отмывание везикул может быть необходимым для выделения чистой фракции ВВ, которые предназначены для определенного типа исследований [36, 37].

Применение внеклеточных везикул семенной плазмы для изменения морфофункциональных характеристик сперматозоидов

V. Murdica et al. в 2019 году исследовали влияние внеклеточных везикул СП на подвижность и процесс капацитации сперматозоидов [24]. Были изучены ВВ эякулята двух групп мужчин: нормальная подвижность и сниженная подвижность. Выделенные из СП ВВ инкубировали со сперматозоидами и отбирали пробы в разные моменты времени (через 15 минут, 1 час и 4 часа). Оказалось, что внеклеточные везикулы,

выделенные из семенной плазмы пациентов с нормозооспермией и азооспермией, вызванной вазэктомией, значительно увеличивали количество прогрессивно подвижных сперматозоидов, а вот экзосомы пациентов с астенозооспермией не только не оказали какого-либо положительного эффекта, но и вызвали еще большее снижение подвижности сперматозоидов. Далее авторы добавили ВВ, полученные из СП мужчин с нормозооспермией, к собственным сперматозоидам и вернули им былую подвижность. Аналогичным образом было показано увеличение количества сперматозоидов, которые подверглись акросомной реакции, после добавления ВВ. Этот эффект был наиболее очевиден у экзосом от пациентов с нормозооспермией, в то время как добавление экзосом от мужчин с астенозооспермией не привело к улучшению показателей. Увеличение фракции подвижных сперматозоидов, активация капацитации и стимуляция акросомальной реакции, вероятно, происходят за счет переноса различных факторов из ВВ в сперматозоиды [17, 38, 39].

В своей работе V. Murdica et al. доказали гипотезу, которая заключается в том, что сперматозоиды, отделенные от СП человека, могут связывать и поглощать экзосомы. С помощью флуоресцентной микроскопии и меченных липофильным красителем экзосом авторы обнаружили, что уже через 15 минут сперматозоиды связывают ВВ, а через 1 час и 4 часа этот процесс активно выражен. Эксперимент также показал, что экзосомы из образцов эякулята пациентов с нормозооспермией обладали лучшей связывающей способностью, чем экзосомы от пациентов с астенозооспермией [24, 40, 41].

Еще одна интересная работа, описывающая влияние внеклеточных везикул эякулята на характеристики сперматозоидов, опубликована X. Zhang et al. в 2020 году [42]. Авторы показали, что ВВ семенной плазмы и их содержимое обладают антибактериальными, антиоксидантными и иммуносупрессивными свойствами и могут участвовать в биологических процессах, косвенно влияя на функции сперматозоидов. ВВ снижают избыточную продукцию АФК, ослабляют окислительный стресс в семенной жидкости и переносят ионы Ca^{2+} для регулирования индуцированной подвижности сперматозоидов [2, 43]. Взаимодействуя напрямую со сперматозоидами, ВВ могут играть решающую роль в их созревании в придатке яичка, а также оказывать влияние на функционирование и оплодотворяющую способность мужских половых клеток [9, 44]. Интересно, что ВВ, выделенные из эякулята пациентов с олигоастенозооспермией, демонстрируют другие профили микроРНК и белков по сравнению с эякулятом пациентов с нормозооспермией [45, 46]. Эти исследования показывают, что ВВ действуют как функциональные регуляторы мужской фертильности, а их дисфункция может быть причиной мужского бесплодия.

Наряду с этим X. Zhang et al. показали, что внутриклеточный гомеостаз кальция является ключевым компонентом в контроле подвижности сперматозоидов, а

приток кальция важен для поддержания прогрессивной подвижности и функционирования сперматозоидов [42], особенно для акросомальной реакции и гиперактивации [47–49]. Все эти процессы крайне важны для нормального оплодотворения ооцита. Авторы также проводили изучение катионного канала сперматозоидов – CatSper, состоящего из белков катионных каналов, экспрессируемых исключительно в зрелых мужских половых клетках. В экспериментах с самцами мышей было показано, что канал CatSper важен для мужской фертильности: животные с дефицитом CatSper и мужчины с мутациями в гене *CatSper* бесплодны из-за отсутствия гиперактивации сперматозоидов [50, 51]. Авторы изучили механизм, с помощью которого ВВ регулируют передачу сигналов кальция в эякуляте человека с акцентом на участие канала CatSper. Для оценки влияния экзосом на подвижность сперматозоидов выделяли семенную плазму с ВВ и семенную плазму без экзосом. Паттерны движения сперматозоидов оценивали с помощью системы компьютерного анализа CASA (WLJY-9000, WeiLi. Co., Ltd., Китай). Регистрировали общую подвижность, прогрессивную подвижность (PR), криволинейную скорость (VCL), прямолинейную скорость (VSL), среднюю скорость движения (VAP), линейность (LIN) и другие параметры сперматозоидов [42]. Анализатор Flow NanoAnalyzer и вестерн-блоттинг показали присутствие универсальных маркеров экзосом CD9 и CD63 во взвеси выделенных ВВ из СП. Трансмиссионная электронная микроскопия также подтвердила, что экзосомы содержали липидный бислой и выглядели как круглые частицы в ожидаемом диапазоне размеров экзосом. В своей работе X. Zhang et al. показали, что добавление экзосом в культуральную среду со сперматозоидами значительно усиливает их гиперактивацию посредством кальциевого канала CatSper. Кроме того, способность сперматозоидов проникать в искусственную вязкую среду (модель среды женского репродуктивного тракта – 1% метилцеллюлоза) – еще один параметр, связанный с гиперактивацией сперматозоидов, – усиливалась после добавления ВВ и снижалась ингибитором CatSper Mi [42].

С учетом того, что ВВ улучшают подвижность сперматозоидов и их функциональную активность посредством передачи сигналов ионов кальция, X. Zhang et al. дополнительно исследовали потенциальное клиническое применение ВВ из СП. Авторы обнаружили, что повышение концентрации ионов (Ca^{2+})_i было значительно ниже в пробах экзосом, полученных из семенной жидкости пациентов с астенозооспермией, чем в СП пациентов с нормозооспермией. Общая подвижность сперматозоидов, прогрессивная подвижность, параметры VCL, VSL и VAP были заметно выше в интактной семенной плазме с нормальными показателями эякулята, чем в семенной плазме без экзосом, выделенных и удаленных при подготовке эксперимента. В соответствии с этими результатами ВВ у мужчин с нормозооспермией улучшали прогрессивную

подвижность и способствовали проникновению и движению в вязкой среде сперматозоидов от пациентов с астенозооспермией. Авторы показали, что ВВ из СП частично восстанавливают подвижность и функции сперматозоидов у пациентов с нарушениями секреции и специфического функционирования везикул семенной плазмы [33, 52].

Заключение

Физиологическое значение внеклеточных везикул, выделенных из семенной плазмы, для регуляции функции сперматозоидов остается интересной и сложной темой. Экзосомы вместе с другими компонентами семенной плазмы и жидкостями женских половых путей могут изменять показатели сперматозоидов, необходимые для оплодотворения. Развитие омиксных технологий в медицине позволит идентифицировать биомаркеры, связанные с дисфункцией внеклеточных везикул эякулята, влияющих на мужскую фертильность.

Немногочисленные протеомные исследования показали изменения экспрессии экзосомальных белков у пациентов с патозооспермией. Эти работы служат основой для изучения роли экзосомальных белков и внеклеточных везикул в определенных состояниях, связанных с мужским бесплодием. Доступные в настоящее время молекулярные маркеры способны идентифицировать причину мужского бесплодия, но идентификация экзосомальных маркеров еще больше повысит понимание дефектов сперматозоидов в результате дисфункции дополнительных половых органов и желез. Использование внеклеточных везикул семенной плазмы в клинических условиях может значительно повысить успех программ лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий, и особенно это касается случаев, где причиной отсутствия беременности является нарушение сперматогенеза.

Литература/References

1. *Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;14(4):27066. DOI: 10.3402/jev.v4.27066.
2. *Park KH, Kim BJ, Kang J, Nam TS, Lim JM, Kim HT et al.* Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Sci Signal.* 2011;4(173):ra31. DOI: 10.1126/scisignal.2001595.
3. *Schjenken JE, Robertson SA.* The female response to seminal fluid. *Physiol Rev.* 2020;100(3):1077–117. DOI: 10.1152/physrev.00013.2018.
4. *Verze P, Cai T, Lorenzetti S.* The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol.* 2016;13(7):379–86. DOI: 10.1038/nrurol.2016.89.
5. *Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP et al.* Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11):7290–304. DOI: 10.1093/nar/gku347.
6. *Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krahlting M et al.* The CatSper channel: A polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J.* 2012;31(7):1654–65. DOI: 10.1038/emboj.2012.30.
7. *Samanta L, Parida R, Dias TR, Agarwal A.* The enigmatic seminal plasma: A proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):41. DOI: 10.1186/s12958-018-0358-6.
8. *Agarwal A, Ayaz A, Samanta L, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM et al.* Comparative proteomic network signatures in seminal plasma of infertile men as a function of reactive oxygen species. *Clin Proteomics.* 2015;12(1):23. DOI: 10.1186/s12014-015-9094-5.
9. *Machtinger R, Laurent LC, Baccarelli AA.* Extracellular vesicles: Roles in gamete maturation, fertilization and embryo implantation. *Hum Reprod Update.* 2016;22(2):182–93. DOI: 10.1093/humupd/dmv055.
10. *Andersen JM, Herning H, Witczak O, Haugen TB.* Anti-Müllerian hormone in seminal plasma and serum: Association with sperm count and sperm motility. *Hum Reprod.* 2016;31(8):1662–7. DOI: 10.1093/humrep/dew121.
11. *Yang C, Guo WB, Zhang WS, Bian J, Yang JK, Zhou QZ et al.* Comprehensive proteomics analysis of exosomes derived from human seminal plasma. *Andrology.* 2017;5(5):1007–15. DOI: 10.1111/andr.12412.
12. *Wu Y, Yuan Y, Chen L, Wang M, Yang Y, Wang Y et al.* Quantitative proteomic analysis of human seminal plasma from normozoospermic and asthenozoospermic individuals. *Biomed Res Int.* 2019;2019:2735038. DOI: 10.1155/2019/2735038.
13. *García-Rodríguez A, de la Casa M, Peinado H, Gosálvez J, Roy R.* Human prostasomes from normozoospermic and non-normozoospermic men show a differential protein expression pattern. *Andrology.* 2018;6(4):585–96. DOI: 10.1111/andr.12496.
14. *Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP.* Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol.* 2014;11(5):278–88. DOI: 10.1038/nrurol.2014.74.
15. *Szczykutowicz J, Kaluża A, Kaźmierowska-Niemczuk M, Ferens-Sieczkowska M.* The potential role of seminal plasma in the fertilization outcomes. *Biomed Res Int.* 2019;2019:5397804. DOI: 10.1155/2019/5397804.
16. *Dias TR, Samanta L, Agarwal A, Pushparaj PN, Panner Selvam MK, Sharma R.* Proteomic signatures reveal differences in stress response, antioxidant defense and proteasomal activity in fertile men with high seminal ROS levels. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1):203. DOI: 10.3390/ijms20010203.
17. *Candenas L, Chianese R.* Exosome composition and seminal plasma proteome: A promising source of biomarkers of male infertility. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7022. DOI: 10.3390/ijms21197022.
18. *Drake RR, White KY, Fuller TW, Igwe E, Clements MA, Nyalwidhe JO et al.* Clinical collection and protein properties of expressed prostatic secretions as a source for biomarkers of prostatic disease. *J Proteomics.* 2009;72(6):907–17. DOI: 10.1016/j.jprot.2009.01.007.

19. Dacheux JL, Dacheux F, Druart X. Epididymal protein markers and fertility. *Anim Reprod Sci.* 2016;169:76–87. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.034.
20. Rolland AD, Lavigne R, Daully C, Calvel P, Kervarrec C, Freour T et al. Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Hum Reprod.* 2013;28(1):199–209. DOI: 10.1093/humrep/des360.
21. Camargo M, Intasqui P, Bertolla RP. Understanding the seminal plasma proteome and its role in male fertility. *Basic Clin Androl.* 2018; 28:6. DOI: 10.1186/s12610-018-0071-5.
22. Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R. Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics.* 2017;162:125–34. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.08.018.
23. Murdica V, Cermisoni GC, Zarovni N, Salonia A, Viganò P, Vago R. Proteomic analysis reveals the negative modulator of sperm function glycodelin as over-represented in semen exosomes isolated from asthenozoospermic patients. *Hum Reprod.* 2019;34(8):1416–27. DOI: 10.1093/humrep/dez114.
24. Murdica V, Giacomini E, Alteri A, Bartolacci A, Cermisoni GC, Zarovni N et al. Seminal plasma of men with severe asthenozoospermia contain exosomes that affect spermatozoa motility and capacitation. *Fertil Steril.* 2019;111(5):897–908. e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2019.01.030.
25. Utleg AG, Yi EC, Xie T, Shannon P, White JT, Goodlett DR et al. Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate.* 2003;56(2):150–61. DOI: 10.1002/pros.10255.
26. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol.* 2006;7(5):R40. DOI: 10.1186/gb-2006-7-5-r40.
27. Aalberts M, van Dissel-Emiliani FM, van Adrichem NP, van Wijnen M, Wauben MH, Stout TA et al. Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. *Biol Reprod.* 2012;86(3):82. DOI: 10.1095/biolreprod.111.095760.
28. Panner Selvam MK, Agarwal A, Sharma R, Samanta L, Gupta S, Dias TR et al. Protein fingerprinting of seminal plasma reveals dysregulation of exosome-associated proteins in infertile men with unilateral varicocele. *World J Mens Health.* 2021;39(2):324–37. DOI: 10.5534/wjmh.180108.
29. Yamakawa K, Yoshida K, Nishikawa H, Kato T, Iwamoto T. Comparative analysis of interindividual variations in the seminal plasma proteome of fertile men with identification of potential markers for azoospermia in infertile patients. *J Androl.* 2007;28(6):858–65. DOI: 10.2164/jandrol.107.002824.
30. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization, 2010. 271 p.
31. Bracke A, Peeters K, Punjabi U, Hoogewijs D, Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online.* 2018;36(3):327–39. DOI: 10.1016/j.rbmo.2017.12.005.
32. Liu X, Wang W, Zhu P, Wang J, Wang Y, Wang X et al. In-depth quantitative proteome analysis of seminal plasma from men with oligoasthenozoospermia and normozoospermia. *Reprod Biomed Online.* 2018;37(4):467–79. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.06.025.
33. Giacomini E, Ura B, Giolo E, Luppi S, Martinelli M, Garcia RC et al. Comparative analysis of the seminal plasma proteomes of oligoasthenozoospermic and normozoospermic men. *Reprod Biomed Online.* 2015;30(5):522–31. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.01.010.
34. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. Isolation of extracellular vesicles: General methodologies and latest trends. *Biomed Res Int.* 2018;2018:8545347. DOI: 10.1155/2018/8545347.
35. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;3:3.22. DOI: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
36. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *J Extracell Vesicles.* 2013;10:2. DOI: 10.3402/jev.v2i0.19861.
37. Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1152–62. DOI: 10.1172/JCI81129.
38. Caballero J, Frenette G, d'Amours O, Belleannee C, Lacroix-Pepin N, Robert C et al. Bovine sperm raft membrane associated glioma pathogenesis-related 1–like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. *J Cell Physiol.* 2012;227(12):3876–86. DOI: 10.1002/jcp.24099.
39. Ebert B, Kisiela M, Maser E. Human DCXR—another “moonlighting protein” involved in sugar metabolism, carbonyl detoxification, cell adhesion and male fertility? *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015;90(1):254–78. DOI: 10.1111/brv.12108.
40. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(2):193–208. DOI: 10.1007/s00018-017-2595-9.
41. Baskaran S, Panner Selvam MK, Agarwal A. Exosomes of male reproduction. *Adv Clin Chem.* 2020;95:149–63. DOI: 10.1016/bs.acc.2019.08.004.
42. Zhang X, Song D, Kang H, Zhou W, Chen H, Zeng X. Seminal plasma exosomes evoke calcium signals via the CatSper channel to regulate human sperm function. *BioRxiv.* 2020.2020.05.21.094433. DOI: 10.1101/2020.05.21.094433.
43. Noda T, Ikawa M. Physiological function of seminal vesicle secretions on male fecundity. *Reprod Med Biol.* 2019;18(3):241–6. DOI: 10.1002/rmb2.12282.
44. Du J, Shen J, Wang Y, Pan C, Pang W, Diao H et al. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget.* 2016;7(37):58832–47. DOI: 10.18632/oncotarget.11315.
45. Lin Y, Liang A, He Y, Li Z, Li Z, Wang G et al. Proteomic analysis of seminal extracellular vesicle proteins involved in asthenozoospermia by iTRAQ. *Mol Reprod Dev.* 2019;86(9):1094–105. DOI: 10.1002/mrd.23224.
46. Abu-Halima M, Ludwig N, Hart M, Leidinger P, Backes C, Keller A et al. Altered micro-ribonucleic acid expression profiles of extracellular microvesicles in the seminal plasma of patients with oligoasthenozoospermia. *Fertil Steril.* 2016;106(5):1061–9.e3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.06.030.

47. *Pereira R, Sá R, Barros A, Sousa M.* Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl.* 2017;19(1):5–14. DOI: 10.4103/1008-682X.167716.
48. *Batruch I, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, Lo KC, Diamandis EP et al.* Analysis of seminal plasma from patients with non-obstructive azoospermia and identification of candidate biomarkers of male infertility. *J Proteome Res.* 2012;11(3):1503–11. DOI: 10.1021/pr200812p.
49. *Chung JJ, Miki K, Kim D, Shim SH, Shi HF, Hwang JY et al.* CatSperzeta regulates the structural continuity of sperm Ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *Elife.* 2017;6:e23082. DOI: 10.7554/eLife.23082.
50. *Lishko PV, Mannowetz N.* CatSper: A unique calcium channel of the sperm flagellum. *Curr Opin Physiol.* 2018;2:109–13. DOI: 10.1016/j.cophys.2018.02.004.
51. *Mannowetz N, Miller MR, Lishko PV.* Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(22):5743–8. DOI: 10.1073/pnas.1700367114.
52. *Tamessar CT, Trigg NA, Nixon B, Skerrett-Byrne DA, Sharkey DJ, Robertson SA et al.* Roles of male reproductive tract extracellular vesicles in reproduction. *Am J Reprod Immunol.* 2021;85(2):e13338. DOI: 10.1111/aji.13338.

Информация об авторах

Анастасия Павловна Сысоева – эмбриолог отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Наталья Петровна Макарова – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Елизавета Евгеньевна Краева – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова.

Author information

Anastasia P. Sysoeva – Clinical Embryologist, Professor B.V. Leonov Department of Assistive Technologies in the Treatment of Infertility, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia. <https://orcid.org/0000-0002-6502-4498>

Natalia P. Makarova – Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Professor B.V. Leonov Department of Assistive Technologies in the Treatment of Infertility, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia. <https://orcid.org/0000-0003-1396-7272>

Elizabeth E. Kraevaya – Cand. Sci. (Med.), Junior Researcher, Professor B.V. Leonov Department of Assistive Technologies in the Treatment of Infertility, V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology of Ministry of Health of Russia. <https://orcid.org/0000-0002-8140-0035>

Морфологическая характеристика экспериментальной катетер-ассоциированной инфекции на фоне иммуносупрессии и применения низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков – варнерина

В.В. Литвинов¹, Л.М. Лемкина², Г.Г. Фрейнд¹, В.П. Коробов^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

² ФГБУН Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь, Россия

³ ФГАОУ ВО Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Введение. Развитие катетер-ассоциированной инфекции связано с колонизацией микроорганизмами поверхности имплантированного катетера путем формирования биопленки, что значительно повышает их устойчивость к антисептикам и антибиотикам, особенно в условиях иммуносупрессии. Одним из классов соединений, способных справляться с биопленкообразованием, являются низкомолекулярные антибактериальные пептиды. Цель исследования – морфологическая характеристика модели катетер-ассоциированной инфекции у лабораторных мышей на фоне иммуносупрессии с оценкой эффективности использования антибактериального низкомолекулярного катионного пептида варнерина.

Материалы и методы. Исследование проведено на белых беспородных мышах весом 25–30 граммов, которым под кожу спины были имплантированы фрагменты внутрисосудистых катетеров длиной 1,0 см. Предварительно животным проводили иммуносупрессию циклофосфамидом. В экспериментах использовали бактерии *Staphylococcus epidermidis* 33 в виде их взвесей или биопленок, предварительно выращенных на отрезках катетеров, и препарат низкомолекулярного катионного пептида варнерина. Животных всех групп выводили из экспериментов путем передозировки эфира на 1-е, 2-е и 3-и сутки, после чего проводили забор мягких тканей вокруг катетеров для гистологических и иммуногистохимических исследований с использованием антител к CD34, виментину, CD68, CD3 и CD20.

Результаты. Введение варнерина в область имплантации катетеров приводило к исчезновению или значительному уменьшению скоплений бактерий в этих зонах, также в инфильтратах отмечалось статистически значимое увеличение количества нейтрофилов и уменьшение содержания фибробластов. Особенности клеточных реакций вокруг катетеров с бактериальной обсемененностью при введении варнерина подтверждены иммуногистохимически.

Заключение. При формировании модели катетер-ассоциированной инфекции в условиях иммуносупрессии антибактериальная эффективность низкомолекулярного катионного пептида варнерина проявляется в характерных морфологических изменениях состава воспалительного инфильтрата вокруг инфицированных отрезков катетеров.

Ключевые слова: моделирование катетер-ассоциированной инфекции, морфология воспаления, антибактериальный низкомолекулярный катионный пептид варнерин

Для корреспонденции: Валерий Викторович Литвинов. E-mail: drlitvinov@mail.ru

Для цитирования: Литвинов В.В., Лемкина Л.М., Фрейнд Г.Г., Коробов В.П. Морфологическая характеристика экспериментальной катетер-ассоциированной инфекции на фоне иммуносупрессии и применения низкомолекулярного катионного пептида семейства лантибиотиков – варнерина. Клин. эксп. морфология. 2021;10(4):14–24. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.4.14-24.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Молекулярные механизмы адаптации микроорганизмов к факторам среды» (№ АААА-А19-119112290009-1) с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Исследования материалов и вещества» Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.05.2021. Получена после рецензирования 03.06.2021. Принята в печать 15.06.2021.

Morphological characteristics of an experimental catheter-associated infection following immunosuppression and the use of a low-molecular cationic peptide of the lantibiotic family – warnerin

V.V. Litvinov¹, L.M. Lemkina², G.G. Freynd¹, V.P. Korobov^{2,3}

¹ Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University of Ministry of Health of Russia, Perm, Russia

² Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

³ Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

Introduction. Catheter-associated infection is caused by microorganism colonization of the surface of the implanted catheter with a biofilm formation that significantly increases their resistance to antiseptics and antibiotics, especially in immunosuppression. Low-molecular antibacterial peptides are compounds capable of combating biofilm formation. The aim of the study was to describe morphological characteristics of a catheter-associated infection model on laboratory mice secondary to immunosuppression and to assess the efficacy of the low-molecular cationic antibacterial peptide (warnerin).

Materials and methods. An experiment included white outbred mice (25–30 g body weight) under ether anesthesia that received 1.0-cm fragments of intravascular catheters under the skin of the backs. The animals underwent preliminary immunosuppression with cyclophosphamide. We used *Staphylococcus epidermidis* 33 (in the form of suspensions or biofilms previously grown on catheter segments) and low-molecular cationic peptide warnerin. All animals were sacrificed by ether overdose on days 1, 2, and 3 after the manipulation. We took the tissues surrounding the catheter for histological and immunohistochemical studies with antibodies to CD34, vimentin, CD68, CD3, and CD20.

Results. The warnerin administration at the site of the catheter implantation led to disappearance of or a significant decrease in the number of bacterial. In the infiltrate, the number of neutrophils significantly increased, whereas that of fibroblasts decreased. Immunohistochemistry confirmed the features of the cellular reactions around the catheters with bacterial contamination with warnerin administration.

Conclusion. In a model of catheter-associated infection in immunosuppressed mice, the warnerin antibacterial manifests in characteristic histological alterations in the inflammatory infiltrate composition.

Keywords: catheter-associated infection model, morphology of inflammation, warnerin antibacterial cationic peptide

Corresponding author: Valeriy V. Litvinov. E-mail: drlitvinov@mail.ru

For citation: Litvinov V.V., Lemkina L.M., Freynd G.G., Korobov V.P. Morphological characteristics of an experimental catheter-associated infection following immunosuppression and the use of a low molecular cationic peptide of the lantibiotic family – warnerin. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):14–24. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.14-24 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment on the topic “Molecular mechanisms of adaptation of microorganisms to environmental factors” (No. AAAA-A19-119112290009-1) using the equipment of Center for Collective Use Research of Materials and Substances, Perm Federal Research Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences.

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

Received 20.05.2021. **Received in revised form** 03.06.2021. **Accepted** 15.06.2021.

Введение

Неуклонный рост катетеризации центральных вен характеризуется увеличением числа осложнений, среди которых наиболее часты катетер-ассоциированные инфекции (КАИ) [1, 2]. Эти осложнения определяют необходимость проведения дорогостоящего лечения в отделениях реанимации и интенсивной терапии, уступая по частоте образования только пневмониям и инфекциям брюшной полости [3].

Основная причина КАИ (до 90% случаев) – распространение микроорганизмов кожных покровов по наружным поверхностям вдоль каналов установленных катетеров. Преобладают в составе микрофлоры кожи коагулазонегативные стафилококки, среди которых на протяжении многих лет доминирующими возбуди-

телями КАИ являются бактерии вида *Staphylococcus epidermidis* [4–6]. Непосредственная колонизация поверхности имплантированных катетеров осуществляется путем формирования микроорганизмами биопленок, в составе которых устойчивость бактерий к действию факторов внешней среды значительно повышается, в том числе к антисептикам и антибиотикам. Показано, что спустя 10–14 дней после установки катетеров около 15% их поверхности покрывается биопленками, а через 30 дней этот показатель достигает уже 40% и бактериальные пленки начинают формироваться в том числе интралюминально [7].

Сформированная биопленка характеризуется наличием двух фаз – малоподвижной, состоящей из делящихся бактериальных клеток и межклеточного матри-

са, и планктонной, которая ответственна за развитие клинических проявлений инфекции [8, 9]. Поздние кластеры бактерий могут отделяться от биопленки и способствовать развитию сепсиса, частота которого у пациентов с КАИ достигает от 15 до 55% [3, 10]. Наиболее часто сепсис развивается у иммунокомпрометированных пациентов, которых постоянно становится больше в связи с развитием медицинских технологий (диализ, химиотерапия, трансплантация органов) и ростом числа социально значимых заболеваний (ВИЧ-инфекция, наркомания, алкоголизм) [1–3, 5, 10]. Особенно высок риск развития КАИ у новорожденных с незрелой иммунной системой – он значительно выше, чем у взрослых (9,6 и 4,6 случая на 1000 катетер/дней, соответственно) [11, 12].

Моделирование КАИ чаще всего проводят на лабораторных мышах, реже на крысах и кроликах. Разработаны различные способы моделирования КАИ. Наиболее часто отрезок катетера помещают подкожно в область спины, боковой поверхности брюшка животных или внутрибрюшинно [13, 14]. В ряде работ использовано расширенное моделирование КАИ путем установки катетера в просвет сосуда лабораторного животного [15, 16]. Исследования с характеристикой локальных морфологических изменений мягких тканей вокруг катетеров немногочисленны [13, 14], что определяет необходимость изучения реакций макроорганизма на их внедрение. При этом следует отметить, что имеющиеся данные об особенностях развития катетер-ассоциированных инфекций у иммунокомпрометированных пациентов, а также высокий регенераторный потенциал таких лабораторных животных как мыши свидетельствуют о необходимости и целесообразности проведения моделирования КАИ с использованием иммуносупрессии. Проведенные нами ранее эксперименты по моделированию КАИ у мышей при иммуносупрессии циклофосфамидом выявили более выраженный рост скоплений микроорганизмов с меньшей выраженностью и более четким разделением суточных фаз воспаления, что в итоге позволило более полно оценить морфологические проявления воспаления в зонах имплантации отрезков катетера. Это стало обоснованием проведения дальнейшего моделирования КАИ на фоне иммуносупрессии [17].

Исследованиями последних лет показано, что одним из классов соединений, способных справляться с биопленкообразованием на поверхностях катетеров, являются низкомолекулярные антибактериальные пептиды (АБП), которые продуцируются микроорганизмами для подавления ближайшего бактериального окружения [18, 19]. Особенности молекулярной структуры позволяют АБП взаимодействовать с биологическими мембранами, содержащими молекулы с амфипатическими свойствами, а также с отрицательно заряженными поверхностными структурами бактерий [20, 21]. Клетки животных имеют мембраны со слабо выра-

женным поверхностным зарядом, и, следовательно, с ними АБП практически не взаимодействуют [22]. Показано, что АБП не только проявляют свое литическое действие в отношении планктонных культур, но и способны разрушать уже сформировавшиеся бактериальные пленки, в частности стафилококков [20, 23]. Кроме того, выявлено, что некоторые АБП оказываются особенно эффективными на начальном этапе образования биопленок [19, 21, 24]. Учитывая естественное происхождение этих соединений, а также механизм их антибактериального действия, следует отметить низкую частоту формирования к ним резистентности [19, 21, 25].

Недавно сотрудниками Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН выделен новый антибактериальный пептид семейства лантибиотиков – варнерин (патент № 2200195, 2003 год). Пептид синтезируется и выделяется в среду культивирования коагулазонегативными стафилококками вида *Staphylococcus warneri* IEGMKL-1. Изучены биохимические свойства пептида и его антибактериальное действие на чувствительные и антибиотикорезистентные штаммы *S. epidermidis* [26].

При моделировании КАИ с предварительной обработкой отрезков стерильных катетеров варнерином и их дальнейшей подкожной имплантацией лабораторным животным было установлено, что варнерин существенно влияет на процессы регенерации, вероятно, за счет своих хемоаттрактантных свойств, описанных ранее у других АБП [17]. В связи с этим сведения об антибактериальном действии варнерина в условиях *in vivo* представляют особый интерес.

Цель исследования – представить морфологическую характеристику модели катетер-ассоциированной инфекции у лабораторных мышей на фоне иммуносупрессии с оценкой эффективности использования низкомолекулярного катионного антибактериального пептида варнерина для подавления инфицирования имплантированного материала.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 24 самцах белых беспородных мышей массой 25–30 граммов. Животных содержали в виварии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН по одной особи в клетке при температуре +18–25°C, естественном освещении, свободном доступе к воде и пище. Все манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Исследование одобрено локальным этическим комитетом Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера (протокол № 3 от 25 марта 2015 года). Процессы формирования бактериями *Staphylococcus epidermidis* 33 биопленок путем инкубации отрез-

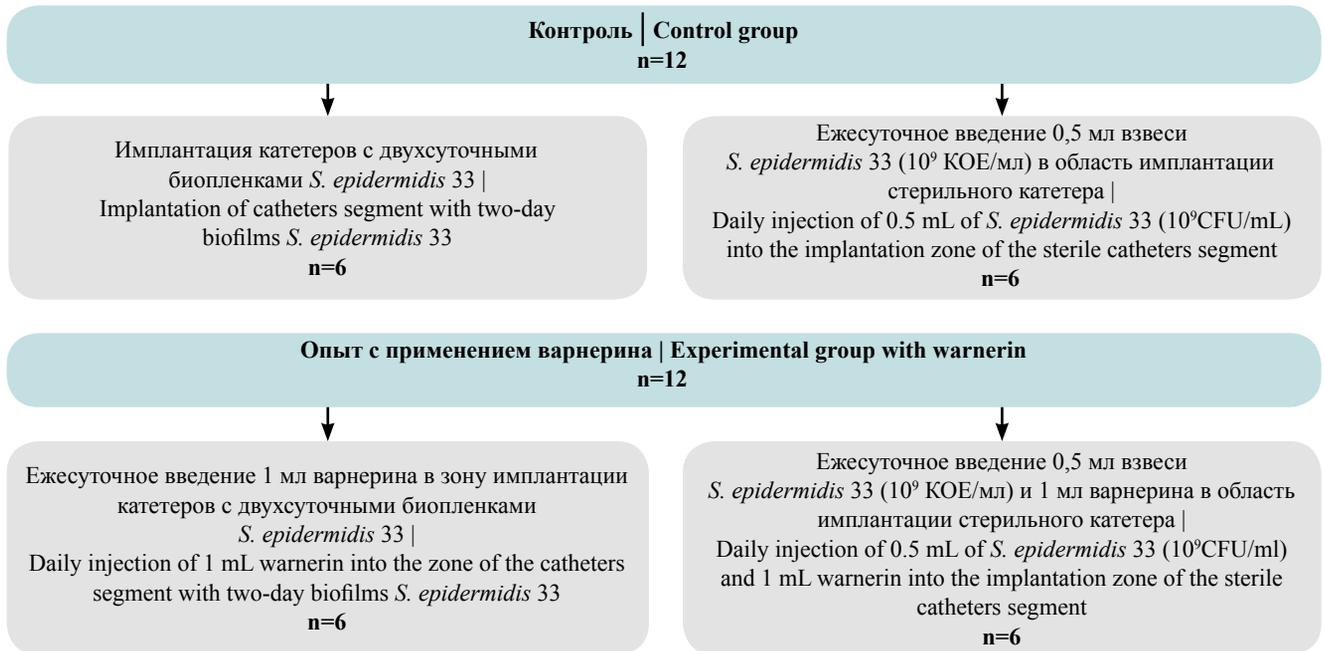


Рис. 1. Схема моделирования катетер-ассоциированной инфекции
Fig. 1. Scheme for modeling a catheter-associated infection

ков катетеров в их суспензиях (10^9 КОЕ/мл) в течение 48 часов при температуре 37°C предварительно были изучены на венозных катетерах разных фирм. Результаты этих исследований показали, что формирование бактериальных пленок наиболее интенсивно проявлялось на тефлоновых катетерах фирмы Arxmed International (Нидерланды). Это послужило основой выбора катетеров данного производителя для использования в экспериментах на животных.

Для иммуносупрессии до проведения имплантации катетеров животным внутримышечно вводили циклофосфамид («ВЕРОФАРМ», Россия) в дозе 200 мг/кг ежедневно в течение 5 суток. Выбор данной дозы был обусловлен наибольшим изменением массы вилочковой железы у мышей того же веса и возраста, выявленным нами в предварительных экспериментах.

В экспериментах использовали препарат низкомолекулярного катионного пептида варнерина серии 54 (лаборатория биохимии развития микроорганизмов ИЭГМ УроРАН, патент № 2200195 от 2003 года) с активностью 512 000 условных единиц (128 мг/мл).

Животных разделили на две группы по 12 особей каждая: контрольная группа – мыши без применения пептида и опытная группа – мыши, которым вводился варнерин (рис. 1). Для имплантации отрезков катетеров у наркотизированных животных (внутрибрюшинное введение 20% раствора ксилазина – Interchemie, Нидерланды, 0,15 мл на 1 кг веса) сбрасывали шерсть на участке спины и глазным скальпелем делали им прокол кожи. В образовавшийся раневой канал под кожу имплантировали фрагменты пластиковых катетеров длиной 1,0 см, кожные дефекты заклеивали медицинским клеем БФ-6 («Вертекс», Россия).

В контрольной группе части животных ($n=6$) подкожно вводили отрезки катетеров со сформированными на них *in vitro* био пленками *S. epidermidis* 33, а другой части животных ($n=6$) – отрезки стерильных катетеров с последующим ежесуточным инъецированием в операционные раны суспензий бактерий *S. epidermidis* 33 в объеме 0,5 мл, содержащей 10^9 КОЕ/мл.

В опытной группе животных разделили на подгруппы аналогично контрольной, но дополнительно в место имплантации отрезков катетеров подкожно ежесуточно в одно и то же время трое суток подряд вводили стерильный водный раствор варнерина в объеме 1 мл.

Животных всех групп выводили из эксперимента путем передозировки эфирного наркоза в конце 1-х, 2-х и 3-х суток (по две особи в конце каждых суток из каждой группы). Во время проведения экспериментов число животных оставалось постоянным. Для проведения гистологических исследований забирали участки тканей вокруг отрезков катетеров, которые фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов. Обработку препаратов проводили по общепринятой методике, окрашивая их гематоксилином и эозином, пикрофуксином по ван Гизону и по Броун–Хопксу для выявления скоплений микроорганизмов.

На готовых гистологических срезах (6–8 срезов от каждого животного из разных зон отрезка катетера) на световом уровне при увеличении микроскопа $\times 400$ или $\times 1000$ оценивали общую морфологическую картину окружающих катетер тканей. При проведении морфометрического анализа, выполненного с использованием программы ImageJ 1.42, в образцах просматривали по 10 полей зрения, оценивая соотношения различных типов клеток с использованием закрытой тестовой

системы из 25 точек. Количество и видовой состав клеточных элементов анализировали с определением макрофагально-гранулоцитарного коэффициента, оценивая соотношение числа макрофагов к числу нейтрофильных гранулоцитов в инфильтрате.

При проведении иммуногистохимического исследования использовали стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод и соответствующий набор детекции (Diagnostic BioSystems, США). Срезы инкубировали во влажной камере в течение 60 минут при температуре +37°C с моноклональными антителами к маркеру прогениторных клеток (CD34 – Diagnostic BioSystems, США), виментину (Vimentin – Spring Bioscience, США), рецепторам макрофагов (CD68 – Diagnostic BioSystems, США), рецепторам Т-лимфоцитов (CD3 – Diagnostic BioSystems, США) и рецепторам В-лимфоцитов (CD20 – Diagnostic BioSystems, США).

В связи с особенностями исследуемого материала (воспалительный инфильтрат в ткани вокруг пластикового катетера) результаты иммуногистохимического исследования оценивались полуколичественным методом на основании наличия или отсутствия положительной окраски соответствующих клеточных элементов инфильтрата и тканей вокруг катетера: положительный результат оценивали знаком +, отрицательный знаком –, а промежуточный, соответственно, знаком ±.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США). Выборки описывали через медиану и межквартильные размахи. Сравнение значений исследуемых показате-

лей между группами животных проводили при помощи непараметрического рангового однофакторного критерия Краскела–Уоллиса, попарные сравнения – с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При имплантации катетеров с предварительно выращенными на них бактериальными пленками ежедневное введение животным варнерина со 2-х суток приводило к исчезновению скоплений микроорганизмов, возрастанию относительного содержания нейтрофилов в инфильтрате с уменьшением макрофагально-гранулоцитарного коэффициента, а также достоверному уменьшению количества фибробластов ($p = 0,00776$), чего не наблюдалось в аналогичной подгруппе без использования варнерина (табл. 1, рис. 2, 3). Иммуногистохимически на 3-и сутки в прилегающих к отрезкам катетеров зонах тканей не выявлялись Т- и В-лимфоциты, отсутствовала реакция на CD34, а реакция на виментин была слабоположительной, что также не наблюдалось и в группе без применения варнерина (табл. 2).

Увеличение количества нейтрофильных гранулоцитов в инфильтратах связано с хемотаксическим эффектом остатков клеточных стенок бактерий, лизированных под влиянием варнерина. Известно, что антибактериальные пептиды могут способствовать секвестрации липополисахаридов бактерий [20, 21],

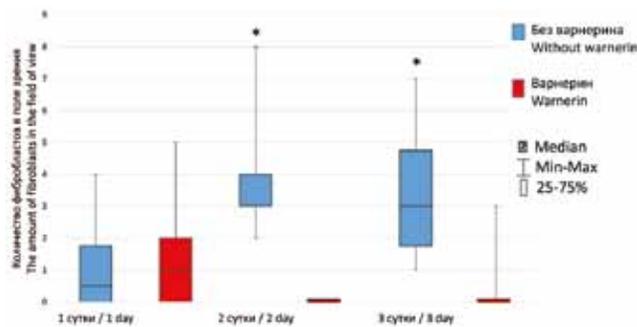


Рис. 2. Изменение количества фибробластов в клеточном инфильтрате при имплантации отрезков катетеров со сформированными на них биопленками бактерий *S. epidermidis* 33 и ежедневном введении низкомолекулярного катионного пептида варнерина * Различия достоверны между группами животных с применением варнерина и без его использования ($p < 0,05$)

Fig. 2. Changes in the number of fibroblasts in the cell infiltrate during implantation of catheter segments with *S. epidermidis* 33 bacterial biofilms formed on them and daily administration of a low-molecular cationic peptide warnerin

* The differences are significant between the groups of animals with and without warnerin administration ($p < 0,05$)

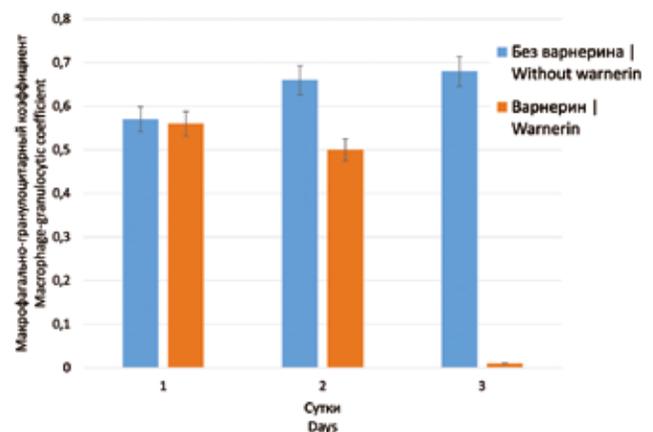


Рис. 3. Изменение макрофагально-гранулоцитарного коэффициента при имплантации отрезков катетеров с биопленками стафилококков и ежедневном введении низкомолекулярного катионного пептида варнерина

Fig. 3. Change in macrophage-granulocyte coefficient upon implantation of catheter segments with staphylococcal biofilms and daily administration of a low-molecular cationic peptide warnerin

Таблица 1 | Table 1

**Изменения абсолютного и процентного соотношения клеточного состава инфильтрата
окружающих отрезки катетеров тканей в экспериментальных группах животных, Me (0,25; 0,75) |
Changes in the absolute and relative numbers of the composition of cellular infiltrate in the tissues surrounding
the catheter in experimental groups, Me (0.25; 0.75)**

Группы Groups	Сутки Day	n	A/R	Клеточные элементы Me (0,25; 0,75) Cells Me (0.25; 0.75)				
				макрофаги macrophages	нейтрофилы neutrophils	фибробласты fibroblasts	лимфоциты lymphocytes	М/Г M/G
Контроль Control group								
Катетеры с биопленками Catheters segment with biofilms	1	2	A	3 (2,25–3,75)	4,5 (2,25–10,5)	0,5 (0–1,75)	1,5 (1–2,75)	
			R	26 (16–27,75)	45 (30,25–59)	2,5 (0–15,5)	22,5 (8,25–42)	0.57
	2	2	A	2 (2–2)	3 (2–3)	3 (3–4)	2 (2–2)	
			R	20 (10–22)	30 (18–33)	30 (18–45)	17 (17–18)	0.66
	3	2	A	1,5 (1–3,75)	2,5 (1,75–3,75)	3 (1,75–4,75)	4,5 (2,25–6,5)	
			R	16 (7–30,5)	23,5 (18,25– 26,75)	30 (11,75–47)	28 (12–44,25)	0.68
Ежесуточное введение стафилококка в область катетера Daily staphylococci injection into the catheter zone	1	2	A	2,5 (1,25–3,75)	1 (1–2,5)	1 (0,25–1)	2,5 (1,25–3)	
			R	35,5 (33–41,75)	23,5 (12,5–35,25)	9,5 (1,75–13,5)	36 (19–38)	1.51
	2	2	A	2 (1–3)	0 (0–2)	1 (1–1)	0 (1–1)	
			R	40 (33–50)	0 (0–40)	20 (11–50)	0 (0–11)	-
	3	2	A	2 (0,75–3,75)	1 (0–1,25)	2 (0–3)	0,5 (0–4)	
			R	32 (18,75–42,5)	11 (4,5–35,5)	16,5 (0–32,75)	6 (0–28,75)	2.9
Опыт с применением варнерина Experimental group with warnerin								
Ежесуточное введение варнерина в область катетера с биопленками Daily warnerin injection into the catheter segment zone with biofilm	1	2	A	1 (1–1)	2 (1–4,25)	1 (0–2)	1 (0–2,25)	
			R	18,5 (8–30)	33 (25–57,75)	10,5 (0–30)	23,5 (0–35)	0.56
	2	2	A	1 (0,5–1,5)	3 (1,5–4)	0 (0–0)*	1 (0,5–1,5)	
			R	25 (3,5–29)	50 (41,5–68,5)	0 (0–0)	20 (6–25)	0.5
	3	2	A	0 (0–1,75)	2,5 (1–3)	0 (0–1)*	1 (0–1)	
			R	0 (0–28,25)	50 (21,25–71,25)	0 (0–22)	17 (0–25)	0
Ежесуточное введение стафилококка и варнерина в область катетера Daily staphylococci and warnerin injection into the catheter zone	1	2	A	1 (0,25–1,75)	4 (1,5–6,75)	0 (0–1)	0 (1,5–2,75)	
			R	10,5 (2–20)	66,5 (30–77,25)	0 (0–17)	15,5 (0–23,75)	0.16
	2	2	A	1,5 (0,75–2)	4,5 (3,5–6,25)	0 (0–1,5)	1,5 (0–2,5)	
			R	13,5 (8,25–16,25)	61,5 (50–72)	0 (0–15,25)	18,5 (0–29,25)	0.22
	3	2	A	1 (0,25–1,75)	2,5 (1,25–5)*	0 (0–1)	2 (2–3)	
			R	15 (2,75–20)	42 (22,75–59,25)	0 (0–13,75)	34 (25–42,25)	0.35

* $p \leq 0,05$ по сравнению с аналогичными сутками аналогичной подгруппы без применения варнерина

n – число исследуемых животных

A – абсолютное количество клеточных элементов

R – относительное количество клеточных элементов

M/G – макрофагально-гранулоцитарный коэффициент

* $p \leq 0.05$ compared to the similar subgroup without warnerin administration on the same day

n – the number of laboratory animals

A – absolute number of cellular elements

R – relative number of cellular elements

M/G – macrophage-granulocytic coefficient

Иммуногистохимические реакции окружающих отрезков катетера тканей в экспериментальных группах животных | Immunohistochemical reactions in tissues surrounding the catheter segment in experimental groups

Группы Groups	Сутки Day	ИГХ маркеры IHC markers				
		CD68	CD34	CD3	CD20	Vimentin
Группа без применения варнерина Control group without warnerin						
Катетеры с биопленками Catheters with biofilms	1	+	+	–	+	+
	2	+	+	±	+	+
	3	+	+	±	+	+
Ежесуточное введение стафилококка в область катетера Daily staphylococci injection into the catheter zone	1	+	+	–	+	+
	2	+	+	±	+	+
	3	+	+	+	+	+
Группа с применением варнерина Experimental group with warnerin						
Ежесуточное введение варнерина в область катетера с биопленками Daily warnerin injection into the catheter zone with biofilms	1	+	+	–	±	+
	2	+	+	–	–	+
	3	+	–	–	–	±
Ежесуточное введение стафилококка и варнерина в область катетера Daily staphylococci and warnerin injection into the catheter zone	1	+	+	+	±	+
	2	+	+	+	–	+
	3	+	+	±	+	+

+ наличие окрашивания соответствующих клеточных или тканевых элементов инфильтрата вокруг катетера
 – отсутствие окрашивания соответствующих клеточных или тканевых элементов инфильтрата вокруг катетера
 ± промежуточный результат

+ the presence of staining of the corresponding cellular or tissue elements of the infiltrate around the catheter
 – lack of staining of the corresponding cellular or tissue elements of the infiltrate around the catheter
 ± intermediate result

а сами молекулы этих пептидов являются сильными хемотаксантами для гранулоцитов [19, 25].

Исследованиями ряда авторов [8, 27] показано, что в составе биопленок микроорганизмов присутствуют вещества, блокирующие таксис и дифференцировку Т- и В- лимфоцитов. Возможно, что активное разрушение биопленок под действием варнерина на 3-и сутки приводит к высвобождению подобных соединений, способствующих удалению из окружающих отрезков катетера тканей дифференцированных форм лимфоцитов, что и наблюдалось на 3-и сутки в данной подгруппе.

Известно, что синтез и модификация виментина – важнейшего белка промежуточных филаментов соединительной ткани – во многом осуществляются с участием провоспалительных цитокинов. При этом высокая экспрессия виментина свидетельствует об активации процессов репарации и увеличении пула мезенхимальных клеточных элементов в очаге воспаления [28]. Показано, что развитие воспалительных процессов сопровождается повышением экспрессии адгезивных молекул эндотелиоцитами (CD34), что обеспечивает аккумуляцию лейкоцитов в микроциркуляторном русле зоны воспаления и их экстравазацию в ткань, а высокий уровень экспрессии CD34 свидетельствует об активации воспалительных и репаративных процессов

в тканях [29]. Важно отметить способность антибактериальных пептидов ингибировать синтез провоспалительных цитокинов [18, 30]. По-видимому, низкая экспрессия виментина, CD34 и, соответственно, слабая выраженность фибропластической реакции в инфильтратах могут быть обусловлены непосредственным действием варнерина.

С учетом способности разрушенных микроорганизмов стимулировать выработку цитокинов и пептидную природу вводимого варнерина можно предположить недостаточность ингибирующего действия варнерина при избытке провоспалительных цитокинов, что и наблюдается в данном случае в виде слабоположительной реакции на виментин. При этом в целом в данной подгруппе экспериментов отмечались достаточно выраженные эффекты антибактериального действия варнерина (рис. 4).

При ежесуточном введении взвесей стафилококков и варнерина в область имплантации отрезков стерильных катетеров (вторая подгруппа) рост числа микроорганизмов на 3-и сутки экспериментов становился минимальным (рис. 3), в воспалительном инфильтрате наблюдалось значительное количество нейтрофильных гранулоцитов ($p=0,0472$) и относительно небольшое количество фибробластов, что отличало характеристики

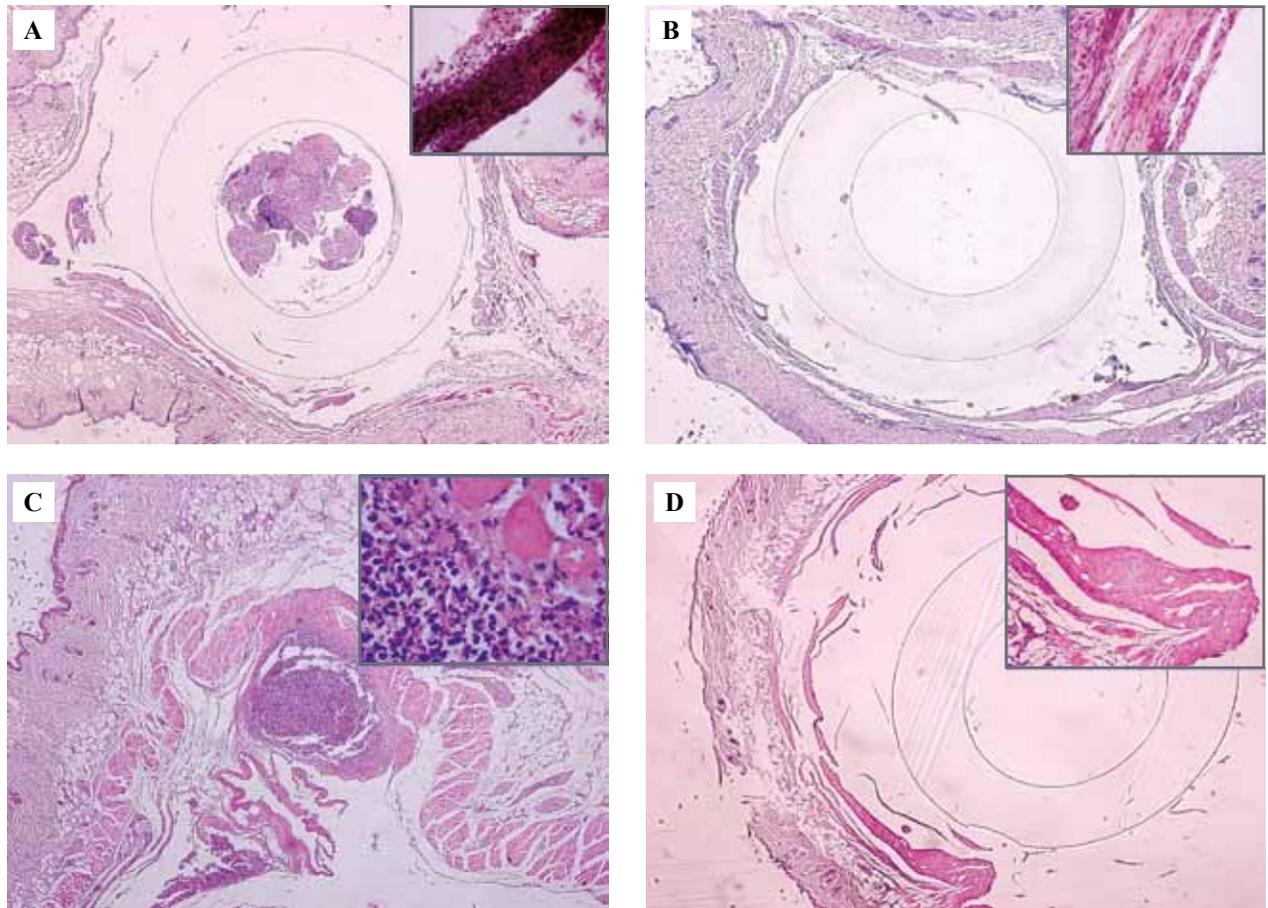


Рис. 4. Влияние варнерина на мягкие ткани вокруг отрезка катетера при моделировании катетер-ассоциированной инфекции. А – скопления микроорганизмов, воспалительный инфильтрат внутри и вокруг отрезка на 2-е сутки при имплантации катетера с биопленками и ежесуточном введении варнерина. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 10$, окрашивание по Броун–Хоппсу, $\times 100$. В – отсутствие скоплений микроорганизмов внутри и вокруг отрезка на 3-и сутки при имплантации катетера с биопленками и ежесуточном введении варнерина. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 10$, окрашивание по Броун–Хоппсу, $\times 100$. С – воспалительный инфильтрат на 2-е сутки при ежесуточном введении взвесей стафилококков в зону имплантации отрезка катетера и последующем ежесуточном введении в эту зону варнерина. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$, $\times 400$. D – отсутствие воспалительного инфильтрата на 3-и сутки при ежесуточном введении взвесей стафилококков в зону имплантации отрезка катетера и последующем ежесуточном введении в ту же зону варнерина. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$, $\times 100$

Fig. 4. Warnerin effect on soft tissues around a catheter segment in a catheter-associated infection model. A – accumulation of microorganisms, inflammatory infiltrate inside and around the segment on day 2 in animals with catheter implantation with biofilms and daily warnerin injection. H&E stain, $\times 10$, Brown-Hoppps stain, $\times 100$. B – no accumulations of microorganisms inside and around the segment on day 3 after the catheter implantation with biofilms and daily warnerin injection. H&E stain, $\times 10$, Brown-Hoppps stain, $\times 100$. C – inflammatory infiltrate on day 2 with the daily staphylococci suspension administration into the implantation zone of the catheter segment and the subsequent daily warnerin injection. H&E stain, $\times 100$, $\times 400$. D – no inflammatory infiltrate on day 3 with the staphylococci suspension administration into the implantation zone of the catheter segment and subsequent daily warnerin injection. H&E stain, $\times 40$, $\times 100$

указанной подгруппы от характеристик аналогичной без применения варнерина (табл. 1). Иммуногистохимически в течение всех экспериментов выявлялись преимущественно Т-лимфоциты и отмечалась положительная реакция на виментин и CD34 (рис. 5). Данные изменения в виде уменьшения объема скоплений микроорганизмов, реакции нейтрофилов, тенденции к уменьшению количества фибробластов и стимуляции Т-клеточного ответа, возможно, тоже обусловле-

ны действием варнерина, даже с учетом достаточно интенсивного бактериального обсеменения. Следует отметить, что аналогичные результаты в виде увеличения количества нейтрофилов и уменьшения количества фибробластов, а также появления дифференцированных форм лимфоцитов в воспалительном инфильтрате вокруг отрезков катетеров были получены и описаны нами ранее при исследовании действия варнерина при имплантации стерильных катетеров [17].

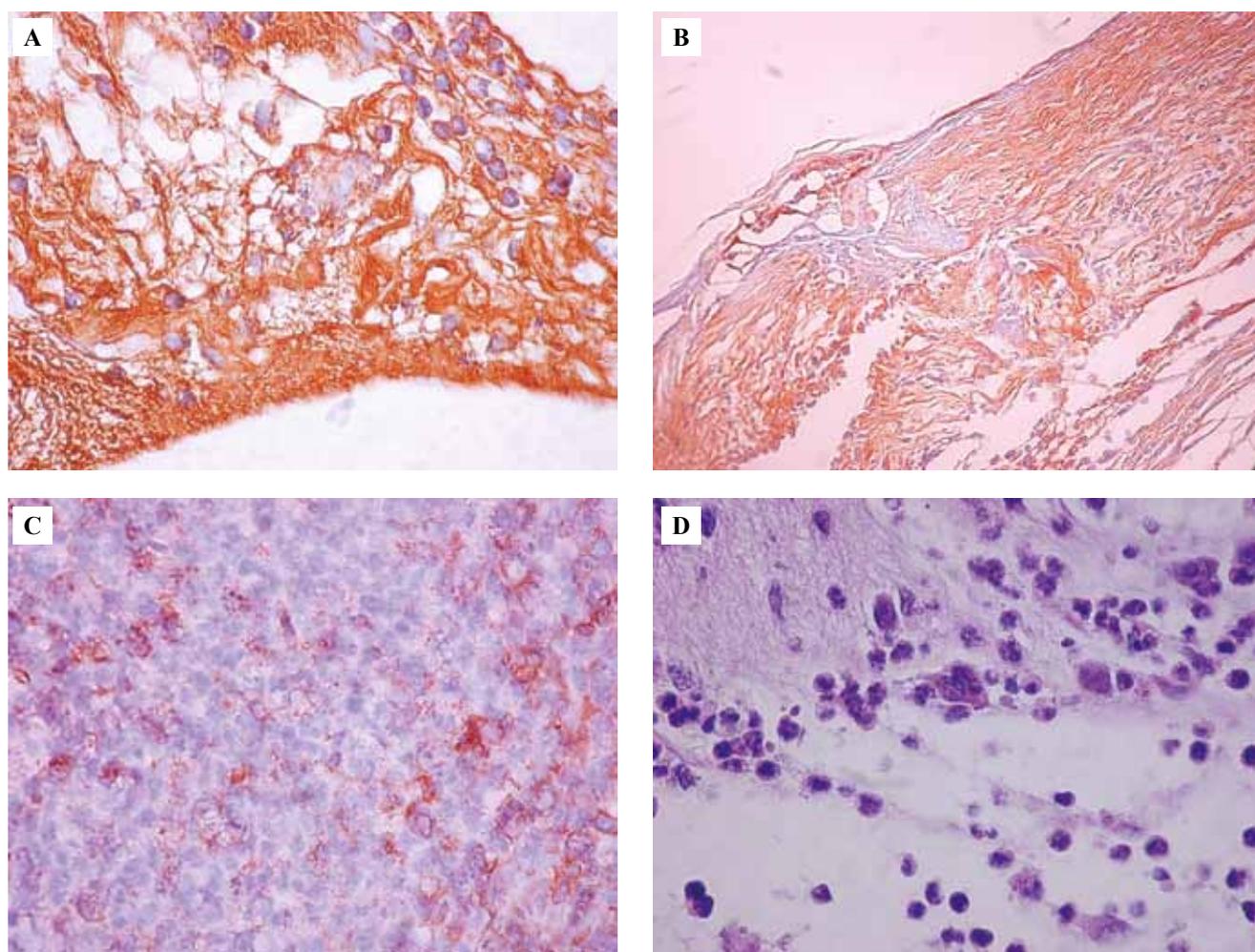


Рис. 5. Воспалительный инфильтрат при ежесуточном введении взвесей стафилококков в зону имплантации отрезка катетера и последующем ежесуточном введении в эту зону варнерина.

А – положительная иммуногистохимическая реакция на CD34 в тканях, окружающих отрезок катетера. CD34 + ($\times 1000$), 2-е сутки. В – положительная иммуногистохимическая реакция на виментин в тканях, окружающих отрезок катетера. Vimentin + ($\times 400$), 2-е сутки. С – положительная иммуногистохимическая реакция на CD3 на мембране лимфоцитов в тканях, окружающих отрезок катетера. CD3 + ($\times 1000$), 2-е сутки. D – воспалительный инфильтрат в мягких тканях вокруг катетера, представленный преимущественно нейтрофилами. Окраска гематоксилином и эозином ($\times 1000$), 3-и сутки

Fig. 5. Inflammatory infiltrate with daily staphylococci suspension administration into the implantation zone of the catheter segment and subsequent daily warnerin injection.

A – positive immunohistochemical reaction for CD34 in the tissues surrounding the catheter segment. CD34 + ($\times 1000$), day 2. B – positive immunohistochemical reaction for Vimentin in the tissues surrounding the catheter segment. Vimentin + ($\times 400$), day 2. C – positive immunohistochemical reaction for CD3 on the lymphocyte membranes in the tissues surrounding the catheter segment. CD3 + ($\times 1000$), 2 days. D – inflammatory infiltrate in the soft tissues surrounding the catheter, represented mainly by neutrophils. H&E stain ($\times 1000$), day 3

Исходя из полученных данных, можно констатировать, что низкомолекулярный катионный пептид варнерин при местном применении обладает выраженной антибактериальной активностью в отношении биопленок коагулазонегативных стафилококков. Введение варнерина ведет к уменьшению скоплений микроорганизмов как при моделировании КАИ путем имплантации отрезков катетеров со сформированными биопленками, так и при ежесуточном введении взвесей

стафилококков в область имплантации отрезков катетеров, хотя и в меньшей степени.

Заключение

При моделировании катетер-ассоциированных инфекций морфологическая картина в мягких тканях лабораторных животных протекает как воспалительная реакция на инородное тело, при этом отмечается ряд особенностей в зависимости от характера инфициро-

вания отрезков катетеров. Бактериальная обсемененность имплантируемых отрезков катетеров, особенно при непосредственном введении взвесей стафилококков, приводит к значительной выраженности воспалительной реакции за счет развития гнойного воспаления. Подобные явления наблюдаются у пациентов с установленными катетерами при иммунодефицитных состояниях. Моделирование катетер-ассоциированных инфекций с применением варнерина – нового низкомолекулярного пептида семейства лантибиотиков ведет к исчезновению или резкому уменьшению скоплений микроорганизмов. При этом под действием самого варнерина как эффективного катионного антибактериального соединения в воспалительном инфильтрате увеличивается количество нейтрофилов и снижается количество фибробластов.

Таким образом, модель катетер-ассоциированной инфекции у мышей может быть использована для экспериментального изучения антибактериальной активности новых лекарственных препаратов, способных подавлять образование и функционирование биопленок коагулазонегативных стафилококков на имплантируемых изделиях из полимерных материалов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.Г. Фрейнд, В.П. Коробов.
Сбор и обработка материала – В.В. Литвинов, Л.М. Лемкина.
Написание текста – В.В. Литвинов.
Редактирование – Г.Г. Фрейнд, В.П. Коробов.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – G.G. Freynd, V.P. Korobov.
Collected the data and performed the analysis – V.V. Litvinov, L.M. Lemkina.
Wrote the paper – V.V. Litvinov.
Edited the manuscript – G.G. Freynd, V.P. Korobov.

Литература/References

1. Pitiriga V, Kanellopoulos P, Bakalis I, Kampos E, Sagris I, Saroglou G et al. Central venous catheter-related bloodstream infection and colonization: The impact of insertion site and distribution of multidrug-resistant pathogens. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):189. DOI: 10.1186/s13756-020-00851-1.
2. Багирова Н.С. Инфекции, связанные с внутрисосудистыми устройствами: терминология, диагностика, профилактика и терапия. *Злокачественные опухоли*. 2014;(3):164–171. DOI: 10.18027/2224-5057-2014-3-164-171.
Bagirova NS. Infections associated with intravascular devices: Terminology, diagnosis, prevention and therapy. *Malignant Tumours*. 2014;(3):164–171 (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2014-3-164-171.
3. Tianyi FL, Tochie JN, Danwang C, Mbonda A, Temgoua MN, Mapoh SY et al. Global epidemiology of septic shock: A protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2019;9:e032289. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-032289.
4. Hebeisen U, Babouee Flury B, Atkinson A, Marshall J, Buetti N. Catheter-related bloodstream infections due to coagulase-negative staphylococci managed with catheter removal: Recurrences are rare. *Am J Infect Control*. 2020;48(7):837–9. DOI: 10.1016/j.ajic.2019.10.013.
5. Квашнина Д.В., Ковалишена О.В., Белянина Н.А. Комплексная клинико-этиологическая и эпидемиологическая характеристика катетер-ассоциированных инфекций кровотока. *Медицинский альманах*. 2017;49(4):41–45. DOI: 10.21145/2499-9954-2017-4-41-45.
Kvashnina D, Kovalishena O, Belyanina N. Comprehensive clinical and etiological, as well as epidemiological characteristics of the catheter-associated blood circulation infections. *Medical Almanac*. 2017;49(4):41–45 (In Russ.). DOI: 10.21145/2499-9954-2017-4-41-45.
6. Safdar N, Fine JP, Maki DG. Meta-analysis: Methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. *Ann Intern Med*. 2005;142(6):451–66. DOI: 10.7326/0003-4819-142-6-200503150-00011.
7. Mermel LA. What is the predominant source of intravascular catheter infections? *Clin Infect Dis*. 2010;52(2):211–2. DOI: 10.1093/cid/ciq108.
8. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563–75. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
9. O'Toole GA. To build a biofilm. *J Bacteriol*. 2003;185(9):2687–9. DOI: 10.1128/jb.185.9.2687-2689.2003.
10. Knezevic V. Complications catheter-related infections in patients on hemodialysis (septic infections of patients on hemodialysis). *Serbian Journal of Anesthesia and Intensive Therapy*. 2017;39(5–6):87–92. DOI: 10.5937/sjait1704087k.
11. Ferreira J, Camargos PAM, Rosado V, Mourão PHO, Romanelli RMC. Risk factors for central venous catheter-related bloodstream infection in neonates. *Am J Infect Control*. 2020;48(9):1102–3. DOI: 10.1016/j.ajic.2019.12.004.
12. Hsu JF, Tsai MH, Huang HR, Lien R, Chu SM, Huang CB. Risk Factors of catheter-related bloodstream infection with percutaneously inserted central venous catheters in very low birth weight infants: A center's experience in Taiwan. *Pediatr Neonatol*. 2010;51(6):336–42. DOI: 10.1016/s1875-9572(10)60065-4.
13. Chung JW, Greenwood-Quaintance KE, Karau MJ, Tilahun A, Khaleghi SR, Chowdhary VR et al. Superantigens produced by catheter-associated *Staphylococcus aureus* elicit systemic inflammatory disease in the absence of bacteremia. *J Leukoc Biol*. 2015;98(2):271–81. DOI: 10.1189/jlb.4a1214-577rr.
14. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun*. 1999;67(5):2627–32. DOI: 10.1128/iai.67.5.2627-2632.1999.
15. Arunachalam K, Ramar M, Ramanathan S, Govindaraju A, Shunmugiah KP, Kandasamy R et al. In vivo protective effect of geraniol on colonization of *Staphylococcus epidermidis* in rat jugular vein catheter model. *Pathog Dis*. 2018;76(5). DOI: 10.1093/femspd/fty055.
16. Basas J, Palau M, Rattia C, Del Pozo JL, Martín-Gómez MT, Gomis X et al. High-dose daptomycin is effective as an antibiotic

- lock therapy in a rabbit model of Staphylococcus epidermidis catheter-related infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(2): e01777-17. DOI: 10.1128/AAC.01777-17.
17. Litvinov VV, Lemkina LM, Freund GG, Korobov VP. Morphological characteristics of the action of cationic peptide warnerin on regeneration of the connective tissue around implanted teflon catheters in mice under conditions of immunosuppression. *Bull Exp Biol Med.* 2020;169(4):521–4. DOI: 10.1007/s10517-020-04922-6.
 18. Mookherjee N, Anderson MA, Haagsman HP, Davidson DJ. Antimicrobial host defence peptides: Functions and clinical potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(5):311–32. DOI: 10.1038/s41573-019-0058-8.
 19. Guani-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes S, Terán L. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol.* 2010;135(1):1–11. DOI: 10.1016/j.clim.2009.12.004.
 20. Lazzaro BP, Zasloff M, Rolff J. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science.* 2020;368(6490):eaau5480. DOI: 10.1126/science.aau5480.
 21. Hancock RE. Cationic peptides: Effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis.* 2001;1(3):156–64. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00092-5.
 22. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial peptides targeting gram-positive bacteria. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016;9(3):59. DOI: 10.3390/ph9030059.
 23. Sandiford S, Upton M. Identification, characterization, and recombinant expression of epidermicin NI01, a novel unmodified bacteriocin produced by Staphylococcus epidermidis that displays potent activity against Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1539–47. DOI: 10.1128/aac.05397-11.
 24. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun.* 2008;76(9):4176–82. DOI: 10.1128/iai.00318-08.
 25. Muttenthaler M, King GF, Adams DJ, Alewood PF. Trends in peptide drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(4):309–25. DOI: 10.1038/s41573-020-00135-8.
 26. Полюдова Т.В., Лемкина Л.М., Лихацкая Г.Н., Коробов В.П. Оптимизация условий получения и моделирование 3D-структуры нового антибактериального пептида семейства лантибиотиков. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017;53(1):47–54. DOI: 10.7868/S0555109917010147. Polyudova TV, Lemkina LM, Likhatskaya GN, Korobov VP. Optimization of production conditions and 3D-structure modeling of novel antibacterial peptide of lantibiotic family. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2017;53(1):47–54 (In Russ.). DOI: 10.7868/S0555109917010147.
 27. de la Fuente-Núñez C, Mertens J, Smit J, Hancock RE. The bacterial surface layer provides protection against antimicrobial peptides. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(15):5452–6. DOI: 10.1128/aem.01493-12.
 28. Homan SM, Martinez R, Benware A, La Flamme SE. Regulation of the association of alpha 6 beta 4 with vimentin intermediate filaments in endothelial cells. *Exp Cell Res.* 2002;281(1):107–14. DOI: 10.1016/s0014-4827(02)95643-0.
 29. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: Structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996;87(1):1–13. DOI: 10.1182/blood.V87.1.1.1.
 30. Miller SI. Antibiotic resistance and regulation of the Gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. *mBio.* 2016;7(5). DOI: 10.1128/mbio.01541-16.

Информация об авторах

Валерий Викторович Литвинов – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии с секционным курсом Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера.

Лариса Марковна Лемкина – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Генриетта Герхардовна Фрейнд – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии с секционным курсом Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера.

Владимир Павлович Коробов – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Author information

Valeriy V. Litvinov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Pathology Department, Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-0300-4424>

Larisa M. Lemkina – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Microorganisms Biochemical Development, Research Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms. <https://orcid.org/0000-0002-2562-5344>

Genrietta G. Freynd – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Pathology Department, Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-2861-4878>

Vladimir P. Korobov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Laboratory of Microorganisms Biochemical Development, Research Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms. <https://orcid.org/0000-0003-3475-8285>

Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований

С.В. Чепур, М.А. Тюнин, В.А. Мясников, И.И. Алексеева, О.О. Владимирова,
Н.С. Ильинский, А.С. Никишин, В.А. Шевченко, А.В. Смирнова

ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Введение. В условиях пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 высоко востребованы экспериментальные модели для скрининга как вновь разрабатываемых вакцин и лекарственных средств, так и уже зарегистрированных фармакологических субстанций для применения по новым показаниям. Эффективный скрининг вакцин и противовирусных лекарственных средств для лечения новой коронавирусной инфекции (COVID-19) возможен при оценке патогенетически значимых для исследуемой патологии изменений биометрических и морфологических показателей. В связи с этим целью настоящего исследования стало описание динамики их изменений на биологической модели SARS-CoV-2-ассоциированного инфекционного процесса у сирийских хомяков *Mesocricetus auratus*. **Материалы и методы.** Исследование выполнено на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus* массой 80–100 граммов. Интраназальное заражение особей проводили культурой вируса SARS-CoV-2, содержащей 4×10^4 ТЦД₅₀/мл, в объеме 26 мкл. Регистрировали массу животных перед инфицированием и в течение последующих 14 суток, удельную массу внутренних органов и степень их влагонасыщения на 3-и, 7-е и 14-е сутки после инфицирования. Дополнительно образцы тканей органов фиксировали 10% нейтральным формалином, подготовку гистологических препаратов выполняли по стандартной методике. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью непараметрических критериев. **Результаты.** После заражения сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* вирусом SARS-CoV-2 начальные проявления инфекционного заболевания наблюдали через 3 суток, а наиболее выраженные патологические изменения в общем состоянии животных и гистоморфологической картине внутренних органов – через 7 суток после инфицирования. В качестве показателей, характеризующих динамику инфекционного заболевания, были определены снижение массы тела и значимые отклонения гравиметрических коэффициентов легких, сердца, селезенки и почек. При гистологическом исследовании в качестве характерных изменений поражения внутренних органов SARS-CoV-2 идентифицированы формирование полиморфноядерных клеточных инфильтратов в межальвеолярных перегородках легких и очаговые дистрофические изменения нейроцитов экранных центров головного мозга с демиелинизацией комиссуральных нервных проводников. Выявленные гистопатологические проявления по срокам соответствовали нарастанию репликативной активности вируса в легких.

Заключение. Экспериментальная модель SARS-CoV-2-ассоциированного инфекционного процесса у сирийских хомяков *Mesocricetus auratus*, характеризуемая выбранными регистрируемыми и расчетными показателями, исследованным профилем патоморфологических изменений, может быть рекомендована для проведения скрининговых экспериментальных (доклинических) исследований эффективности перспективных лекарственных препаратов для патогенетической и этиотропной терапии COVID-19.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, сирийские хомяки, морфометрия, повреждения структуры органов и тканей

Для корреспонденции: Сергей Викторович Чепур. E-mail: gniiivm_2@mil.ru

Для цитирования: Чепур С.В., Тюнин М.А., Мясников В.А., Алексеева И.И., Владимирова О.О., Ильинский Н.С., Никишин А.С., Шевченко В.А., Смирнова А.В. Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):25–34. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 06.07.2021. Получена после рецензирования 12.08.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Organ and tissue damage related to SARS-CoV-2: the biological model for experimental (preclinical) trials on golden hamsters *Mesocricetus auratus*

S.V. Chepur, M.A. Tyunin, V.A. Myasnikov, I.I. Alekseeva, O.V. Vladimirova, N.S. Ilinskiy, A.S. Nikishin, V.A. Shevchenko, A.V. Smirnova

State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

Introduction. Amid the pandemic of the new coronavirus infection COVID-19, experimental models for screening both newly developed vaccines and drugs, and the already registered active pharmaceutical ingredients tested for new indications are in high demand. The registration of changes in biometric and morphological parameters that are significant for the investigative pathology can be an optimal screening tool for antiviral drugs and vaccines to treat COVID-19. In this regard, the purpose of this study was to describe the changes over time of organ and tissue changes using a biological model of a SARS-CoV-2-associated infection in the golden hamsters *Mesocricetus auratus*.

Materials and methods. We performed the study in golden hamsters *Mesocricetus auratus* weighing 80–100 g. The animals were infected through intranasal administration of a culture of SARS-CoV-2 virus containing 4×10^4 TCID₅₀/mL. We recorded the animals' weight before the infection and during the next 14 days and measured the specific gravity of the internal organs and the degree of their moisture saturation on days 3, 7, and 14 after the infection. Additionally, tissue samples were fixed in 10% neutral formalin; the preparation of histological specimens was performed according to the standard procedure. Statistical data processing was carried out using non-parametric tests.

Results. In the model of SARS-CoV-2 infection in *Mesocricetus auratus*, we observed the manifestation of the infectious disease after 3 days. The most pronounced pathological changes in the overall health status of the animals and in the histology of internal organs were seen 7 days after the infection. We determined the weight loss and significant deviations in gravimetric coefficients of lungs, heart, spleen, and kidneys to be the indicators revealing the infectious disease course changes over time. Histologic evaluation showed typical changes in the SARS-CoV-2-associated visceral damage: the formation of polymorphonuclear cell infiltrates in the lung interalveolar septa and patchy dystrophic changes in the neurocytes of the brain screen-type centers with the demyelination of the commissural nerve guides. The detected pathological manifestations corresponded in time to an increase in the virus replicative activity in the lungs.

Conclusion. The experimental model of the SARS-CoV-2-associated infection in golden hamsters *Mesocricetus auratus* can be recommended for screening experimental (preclinical) studies of the promising drugs' efficacy for pathogenetic and etiologic therapy of COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, golden hamsters, morphometry, organ and tissue structural damage

Corresponding author: Sergey V. Chepur. E-mail: gniiivm_2@mil.ru

For citation: Chepur S.V., Tyunin M.A., Myasnikov V.A., Alekseeva I.I., Vladimirova O.V., Ilinskiy N.S., Nikishin A.S., Shevchenko V.A., Smirnova A.V. Organ and tissue damage related to SARS-CoV-2: the biological model for experimental (preclinical) trials on golden hamsters *Mesocricetus auratus*. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):25–34. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.25-34 (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 06.07.2021. **Received in revised form** 12.08.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Актуальность изучения биологических моделей SARS-CoV-2-ассоциированного инфекционного процесса сопряжена с высокой социальной значимостью пандемической ситуации, борьба с которой основана на разработке новых вакцин и лекарственных препаратов, оценке возможности применения зарегистрированных фармакологических субстанций по новым показаниям [1]. Молекулярное сходство ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2) сирийского хомяка *Mesocricetus auratus* и рецепторсвязывающего домена поверхностного шипового белка SARS-CoV-2 стало ключевым фактором для использования животных данного вида в качестве биологической модели инфекции

(COVID-19) [2]. Некоторые авторы считают, что китайский хомяк имеет преимущества по сравнению с сирийским хомяком [3], однако весомые аргументы в пользу этого заключения не приведены.

Применительно к сирийским хомякам инфекция, вызванная SARS-CoV-2, без моделирования дополнительных патологических состояний несмертельна, а данные американских ученых о гибели животных в результате заражения SARS-CoV-2 основаны на выводе из эксперимента особей, потерявших более 20% массы тела и учтенных в публикациях как погибшие [4]. Следует признать, что подобные отклонения массы тела у сирийских хомяков обратимы, а гибель животных от инфекции зарегистрирована лишь в единичных случаях,

составляя, согласно более чем 1000 наблюдений, доли процента. Оснащение предназначенных для работы с биопатогенами лабораторий современным оборудованием физиологического мониторинга не всегда возможно, поэтому для проведения скрининговых экспериментальных (доклинических) исследований наиболее доступным вариантом остается использование простых в измерении критериев, которые вместе с тем могут составить доказательную базу при оценке эффективности перспективных лекарственных препаратов. Именно регистрация гравиметрических и гистологических изменений внутренних органов по сей день остается допустимым подходом при проведении разных по задачам экспериментальных (доклинических) исследований на биологических моделях инфекционных заболеваний.

С учетом указанных выше обстоятельств целью настоящего исследования стало описание динамики гравиметрических и гистологических изменений внутренних органов на биологической модели SARS-CoV-2-ассоциированного инфекционного процесса у сирийских хомяков *Mesocricetus auratus*.

Материалы и методы

Исследования на животных выполнены по программе, одобренной комиссией по этике и биоэтике ГНИИИ военной медицины Министерства обороны Российской Федерации. Животных содержали в надлежащих условиях вивария (разрешение главного государственного ветеринарного инспектора Санкт-Петербурга № 78-1102/19, сертификат ISO 9001:2015 № ST.RU.0001. M0017187, сертификат соответствия стандарту GLP № GLP-0727-1020).

Эксперименты выполнены на самцах и самках сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* в возрасте 4–6 недель (масса тела 80–100 граммов), полученных из питомника НПО «Дом фармации» (Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных условиях вивария при 12-часовом режиме светового дня с постоянным доступом к воде и корму. Штамм вируса был выделен из ПЦР-позитивного материала от больных новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) в лабораториях ГНИИИ военной медицины Министерства обороны Российской Федерации и накоплен на культуре клеток Vero (B) («Биолот», Россия), согласно ранее описанным в литературе методикам [5, 6]. Среднюю тканевую цитопатическую дозу вируса (ТЦД₅₀) определяли на культуре клеток Vero (B) и рассчитывали по методу Рида и Менча [7]. Механическим дозатором проводили интраназальное заражение сирийских хомяков культурой вируса, содержащей 4×10^4 ТЦД₅₀/мл вирусных частиц, в объеме 26 мкл [8]. Массу тела животных регистрировали перед заражением и ежедневно в течение последующих 14 суток. Каждая группа включала 10 особей. После вывода из эксперимента путем передозировки общего анестетика (раствор ксила 20,0 мг/мл и раствор золетил 100 50,0 мг/мл в соотношении 1:1, 1,0 мл на 1,0 кг, внутримышечно) и пересечения нижней полой

вены определяли удельную (относительно массы тела) массу головного мозга, правого легкого, печени, почек, сердца и селезенки [9]. После взвешивания внутренние органы высушивали в термостате при температуре +60°C в течение 3 суток. Степень влагонасыщения органов косвенно характеризовала выраженность отека и степень их повреждения. Образцы тканей органов после взвешивания фиксировали 10% нейтральным формалином по Лилли и жидкостью Карнуа. Дополнительно гистологическому исследованию подвергли различные отделы головного мозга, обонятельные луковицы, тимус, сердце, кишечник, трахею. После стандартной проводки материал помещали в парафин и готовили срезы толщиной 3–5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Регистрацию изменений структуры тканей осуществляли на цифровом фотомикроскопе Leica DM2500 (LEICA Microsystems, Германия) при увеличениях объектива $\times 20$ –100. Результаты описательной статистики приведены в виде медианы и межквартильного размаха. Для парных сравнений показателей несвязанных групп применяли U-критерий Манна–Уитни, для множественных – H-критерий Краскала–Уоллиса при номинальном уровне значимости различий $p < 0,05$. Сравнение проводили с характеристиками животных группы виварного контроля.

Результаты

Инфекционный процесс вызывал потерю массы тела сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* у самцов (рис. 1 А) и самок (рис. 1 В). Уже через 1 сутки после заражения и до окончания наблюдения значения показателя у зараженных животных были значимо ниже, чем у животных в группе виварного контроля. При этом были прослежены половые различия в динамике показателя: наиболее выраженные изменения в динамике массы тела (снижение на 6,4% (4,0; 7,4) относительно исходных значений) определяли у самцов в период 5–7 суток после заражения, в то время как у самок потеря массы тела была менее выраженной (3,2% (1,8; 4,5) от исходных значений) с максимумом отклонений на 3–4-е сутки после заражения. К исходу 14-х суток масса тела самцов оставалась сниженной на 2,3% (0,6; 4,6), масса самок превышала фоновые значения на 1,8% (1,0; 3,4). В связи с этим дальнейшие исследования гравиметрических и гистологических изменений внутренних органов проводили на самцах как более показательной биологической тест-системе.

Восстановление массы тела сирийских хомяков в период с 7-х по 14-е сутки после заражения вирусом SARS-CoV-2, а также элиминация вируса из выбранных тест-тканей к 14-м суткам свидетельствовали о наступлении у животных фазы реконвалесценции, что было подтверждено положительной динамикой результатов гравиметрических исследований.

Косвенно оценить степень выраженности отчетно-пролиферативных изменений в органах и тканях позволило гравиметрическое исследование с определением

относительной массы органов. Гравиметрические индексы печени и головного мозга не изменялись, тогда как применительно к другим органам в экссудативную фазу прослежены достоверные отличия от животных группы виварного контроля (табл. 1).

Уточнение вероятности формирования отечных и дисциркуляторных изменений было проведено после высушивания тканей до конечной массы и определения степени их влагонасыщения. Статистически значимые отклонения коэффициентов прослежены для легкого, влагонасыщение которого на пике заболевания (через 7 суток после заражения) увеличивалось до 80,63 (80,25÷80,69). Напротив, степень влагонасыщения головного мозга у зараженных животных в данный срок снижалась до 76,08 (75,74÷76,99) (табл. 2). В сердце, печени, почках, селезенке признаки значимых экссудативных изменений не зарегистрированы.

Анализ совокупности полученных результатов позволил заключить, что оценку эффективности лекарственных препаратов на исследованной биологической модели SARS-CoV-2-ассоциированного инфекционного процесса у сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* целесообразно проводить на 7-е сутки инфекционного процесса, когда референтные значения характеристик группы негативного контроля статистически значимо отличались от характеристик группы животных виварного контроля: снижение массы тела на 6,4% (4,0;7,4); увеличение массовых коэффициентов легких в 1,7 раза (1,5;1,8), сердца в 1,3 раза (1,2;1,4) и селезенки в 1,4 раза (1,3;1,5) повышение влагонасыщения легких и снижение влагонасыщения головного мозга.

При гистологическом исследовании тканей внутренних органов у животных было выявлено нарастающее к 7-м суткам инфекционного процесса мукоидное набухание соединительной ткани слизистой оболочки носовой перегородки и трахеи с десквамацией клеток эпителия.

К 7-м суткам прослеживали формирование неравномерного полнокровия легких со стазом эритроцитов в капиллярах межальвеолярных перегородок (рис. 2 А), тромбообразованием и пропотеванием жидкости в паравазальную соединительную ткань. Значимого альвеолярного выпота не обнаруживали, вместе с тем межальвеолярные перегородки были существенно расширены за счет инфильтрата (рис. 2 В). В его составе выявляли крупноядерные призматические клетки эпителия с фигурами митозов, по-видимому, мигрирующие из альвеолярных ходов, и макрофаги разной степени зрелости, часто с включениями детрита и железопозитивного материала эритроцитов. Макрофаги различных форм и размеров выявляли и в просвете альвеол со слущенными альвеолоцитами и скудным плазматическим выпотом. В сердце к 7-м суткам прослеживали выраженное полнокровие со стазом форменных элементов и набуханием эндотелиальной выстилки. На фоне умеренного интерстициального отека и паравазальной лимфоцитарной инфильтрации структура большинства сократительных элементов миокарда была сохранена (рис. 2 С). До конца эксперимента наблюдали опустошение периартериальных муфт селезенки (рис. 2 D) и фолликулов тимуса, что свидетельствовало о мобилизации системы клеточного иммунитета. В селезенке также обнаруживали диффузную гиперплазию красной

Таблица 1 | Table 1

Массовые коэффициенты внутренних органов у самцов сирийских хомяков *Mesocricetus auratus*, зараженных SARS-CoV-2 (4×10^4 ТЦД₅₀/мл) в дозе 26 мкл/хомяк, интраназально, Me (Q₁÷Q₃), n=10 |

Mass factors of internal organs of male golden hamsters *Mesocricetus auratus* infected with SARS-CoV-2 (4×10^4 TCID₅₀/mL) at a dose of 26 µl/hamster, intranasal, Me (Q₁÷Q₃), n=10

Орган Organ	Интактные Intact	После заражения SARS-CoV-2 After SARS-CoV-2 infection		
		3 суток 3 days	7 суток 7 days	14 суток 14 days
Головной мозг Brain	10,54 (9,85; 10,690)	9,01 (8,82; 9,99)	9,95 (8,77; 11,59)	10,12 (9,63÷10,51)
Правое легкое Right lung	2,33 (2,20÷2,84)	2,51 (2,41÷2,510)	3,92* (3,88÷4,19)	3,44* (3,32÷3,62)
Сердце Heart	3,05 (2,94÷3,38)	4,01* (3,61÷4,28)	4,07* (3,87÷4,25)	3,89* (3,65÷4,08)
Печень Liver	36,51 (34,72; 37,80)	37,32 (35,27; 38,54)	36,77 (36,01; 38,93)	36,35 (34,91÷38,62)
Селезенка Spleen	0,75 (0,64÷0,81)	1,44* (1,28÷1,57)	1,23* (0,94÷1,53)	0,91 (0,73÷1,08)
Правая почка Right kidney	3,53 (3,45÷3,65)	3,70 (3,51÷3,95)	4,39* (4,07÷4,67)	3,96 (3,51÷4,33)

* – различия с группой интактных животных значимы (p<0,05, критерий Краскела–Уоллиса)

* – the differences with the intact group are significant (p<0.05, Kruskal–Wallis test)

Таблица 2 | Table 2

Влагонасыщение тканей внутренних органов самцов сирийских хомяков *Mesocricetus auratus*, зараженных SARS-CoV-2 (4×10^4 ТЦД₅₀/мл) в дозе 26 мкл/хомяк, интраназально, Ме (Q₁÷Q₃) (n=10) |
Moisture saturation of internal organ tissues of male golden hamsters *Mesocricetus auratus* infected with SARS-CoV-2 (4×10^4 TCID₅₀/mL) at a dose of 26 µl/hamster, intranasal, Me (Q₁÷Q₃), n=10

Орган Organ	Интактные Intact	После заражения SARS-CoV-2 After SARS-CoV-2 infection		
		3 суток 3 days	7 суток 7 days	14 суток 14 days
Головной мозг Brain	77,90 (77,53÷78,07)	77,10 (76,52÷77,40)	76,08* (75,74÷76,99)	77,32 (77,04÷77,78)
Правое легкое Right lung	76,06 (75,32÷76,44)	73,57 (72,03÷73,93)	80,63* (80,25÷80,69)	78,54 (77,34÷79,43)
Сердце Heart	75,88 (75,56÷76,36)	73,73 (72,92;74,75)	75,78 (73,81÷77,50)	76,21 (75,82÷76,75)
Печень Liver	65,41 (64,19; 66,05)	65,37 (63,15÷66,19)	65,77 (64,42÷67,00)	64,84 (64,01÷65,76)
Селезенка Spleen	66,92 (64,82÷69,55)	64,72 (61,14÷67,02)	68,93 (66,20÷73,08)	65,43 (64,53÷66,32)
Правая почка Right kidney	74,28 (72,92÷74,95)	73,26 (72,59÷75,78)	75,70 (74,78÷76,97)	75,25 (74,72÷75,73)

* – различия статистически значимы относительно группы интактных животных (p<0,05, критерий Краскела–Уоллиса)

* – the differences with the intact group are significant (p<0.05, Kruskal–Wallis test)

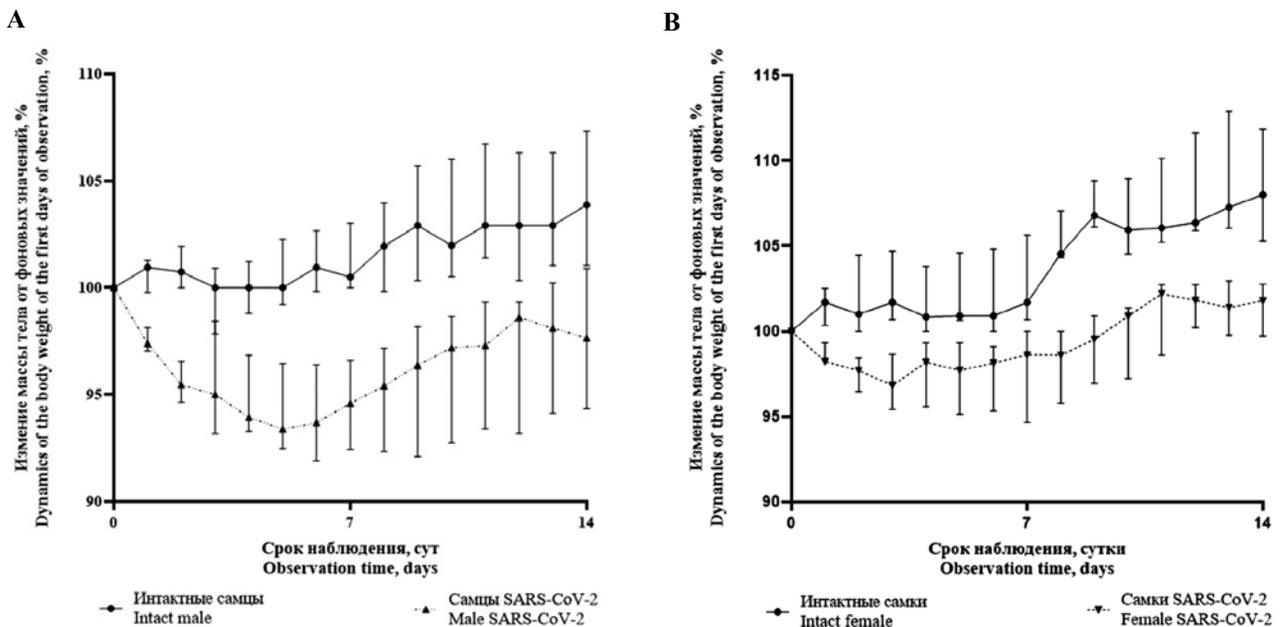


Рис. 1. Динамика массы тела у самцов (А) и самок (В) сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* после заражения коронавирусом SARS-CoV-2 (4×10^4 ТЦД₅₀/мл) в дозе 26 мкл/хомяк, интраназально, Ме (Q₁; Q₃). Различия показателей зараженных животных с группой интактного контроля статистически значимы при p<0,05 (критерий Манна–Уитни) с первых суток наблюдения

* – различия статистически значимы относительно фоновых значений (критерий Фридмана)

Fig 1. Body weight of male (A) and female (B) golden hamsters *Mesocricetus auratus* after SARS-CoV-2 intranasal infection (4×10^4 TCID₅₀/mL) at a dose of 26 µl/hamster, Me (Q₁; Q₃). The differences between characteristics of infected and intact control groups were significant at p<0.05 (Mann–Whitney U test) from the first days of observation

* – differences are significant relative to the first days of observation (Friedman test)

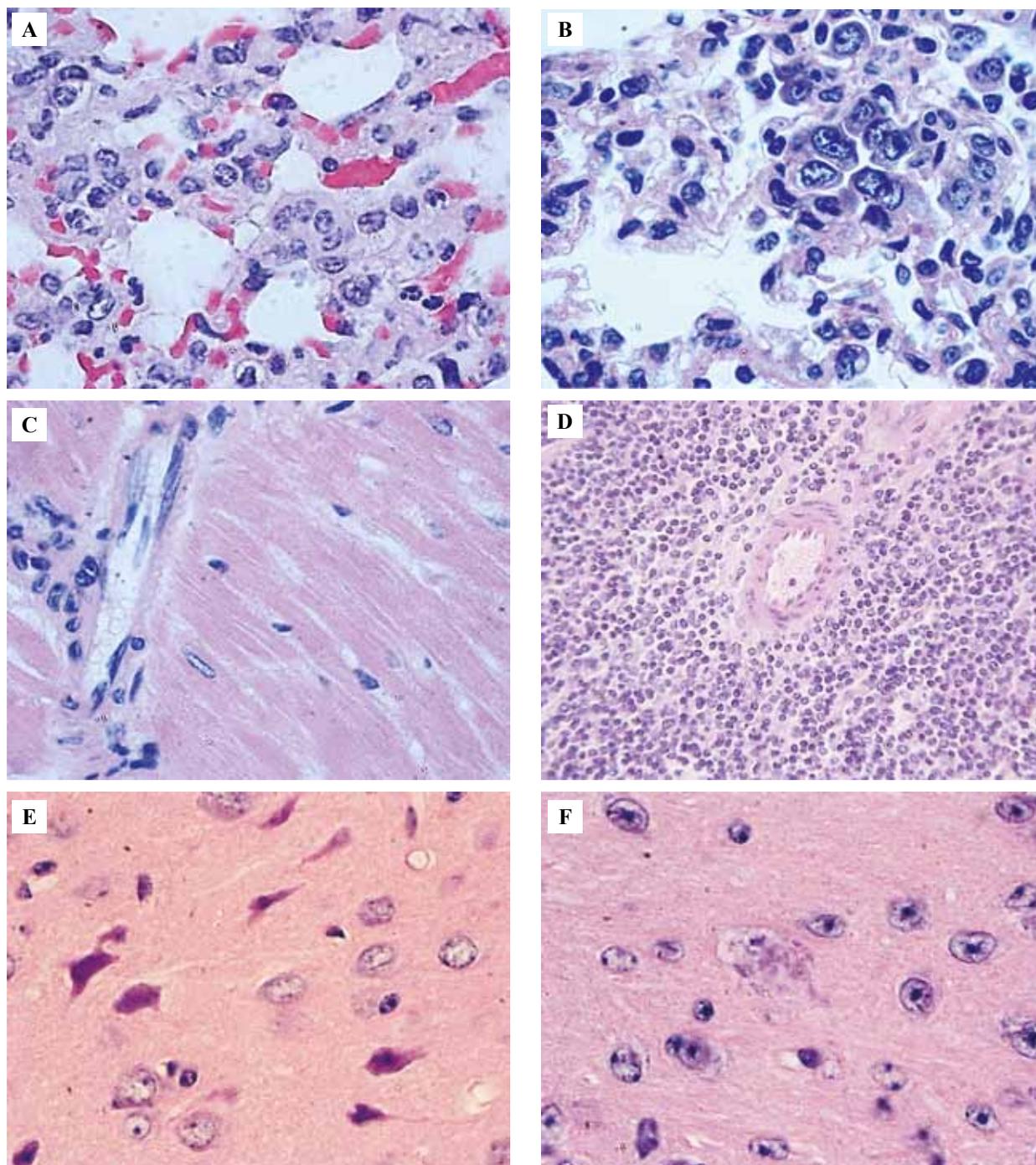


Рис. 2. Гистопатологические изменения во внутренних органах и головном мозге самцов сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* через 7 суток после заражения SARS-CoV-2 (4×10^4 ТЦД₅₀/мл) в дозе 26 мкл/хомяк, интраназально. Окраска гематоксилином и эозином.

А – застой крови и тромбоз микрососудов паренхимы легких, $\times 40$. В – появление эпителиоидных клеток и фагоцитов с цитоплазматическими включениями в межальвеолярных перегородках легких, $\times 100$. С – полиморфноядерная параваскулярная инфильтрация миокарда при сохранности сократительных элементов, $\times 100$. D – снижение плотности клеток периартериальной муфты селезенки, $\times 40$. E – пикноз пирамидных нейроцитов сенсоромоторной коры полушарий головного мозга, $\times 100$. F – тигролиз нейрона в амигдале с признаками нейрофагии, $\times 100$

Fig. 2. Pathological changes in the internal organs and brain of male golden hamsters 7 days after SARS-CoV-2 intranasal administration (4×10^4 TCID₅₀/mL) at a dose 26 μ l/hamster. H&E stain.

A – congestion and thrombosis of microvessels in the lung parenchyma, $\times 100$. B – epithelioid cells and phagocytes with cytoplasmic inclusion bodies in the interalveolar septa, $\times 100$. C – polymorphonuclear perivascular infiltration in the myocardium, with the contractile elements being intact, $\times 100$. D – decreased cell density of the periarteriolar lymphocyte sheath, $\times 40$. E – pyknosis of pyramidal neurons of the sensorimotor cortex, $\times 100$. F – neuron tigrulysis in the amygdala cerebelli with neuronophagy signs, $\times 100$

пульпы, инфильтрацию нейтрофилами, полнокровие сосудов и очаги кровоизлияний. В тонкой кишке выявляли минимальные изменения в виде полнокровия сосудов подслизистой основы, умеренной лимфоцитарной инфильтрации, сокращения количества митозов энтероцитов в криптах и увеличения относительного представления бокаловидных клеток. Патологических изменений в почечных клубочках, извитых канальцах, петлях Генле и собирательных трубочках не выявляли, сосуды гемомикроциркуляторного русла клубочков и соединительной ткани мозгового вещества почек были полнокровными, но без видимых патологических изменений. В портальных трактах печени зараженных животных прослеживали локусы пролиферации холангиоцитов.

Выраженные изменения отмечали при исследовании головного мозга. В наибольшей степени в экранных центрах коры (большие и малые пирамидные клетки мозга (рис. 2 E), полях гиппокампа (но не зубчатой извилины) и в мозжечке (грушевидные клетки Пуркинье) выявляли локусы пикнотичных нейронов, расширение их инициальных дендритов. Прослеживали активацию олигодендроглиоцитов и набухание паравазальных отростков астроцитов в очагах патологических изменений. Капиллярное звено гемомикроциркуляторного русла сохраняло свою структуру, тогда как в мягкой мозговой оболочке и по ходу ветвей пиальных сосудов прослеживали лимфоцитарную инфильтрацию соединительной ткани, свидетельствующую о развитии воспалительного процесса. Очаговый пикноз нейроцитов и тигролиз вещества Ниссля выявляли в черной субстанции и ядрах миндаины (рис. 2 F). В субкортикальных проводящих путях регистрировали признаки очаговой демиелинизации комиссуральных нервных проводников. Необратимые изменения с тигролизом и нейронофагией нейроцитов обонятельных лукович затрагивали менее четверти клеток.

Обсуждение

К настоящему времени накоплено достаточно данных, свидетельствующих о высокой валидности экспериментальной модели новой коронавирусной инфекции (COVID-19) на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus*. Интраназальное, в отличие от внутрибрюшинного, заражение хомяков SARS-CoV-2 соответствует естественному пути передачи вируса и обеспечивает его репликацию в легких, вызывая тяжелые патологические изменения [10]. Минимальная известная инфицирующая доза SARS-CoV-2 для сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* составила от 5 инфекционных частиц, что позволило считать животных данного вида очень восприимчивой к инфекции биологической моделью [11]. Учащение дыхания, потерю массы тела и гистопатологические изменения дыхательных путей, легких и тонкой кишки с экспрессией вирусного нуклеокапсидного белка, лимфоидной атрофией селезенки наблюдали в течение первой недели зара-

жения сирийских хомяков вирусом SARS-CoV-2. При компьютерной томографии у хомяков были описаны общие с человеком изменения, включающие массивное двустороннее периферическое мультисегментарное затемнение по типу «матового стекла» и консолидацию ткани легких [12]. При гистологическом исследовании у хомяков так же, как и у человека, были прослежены возрастные различия. В частности, у молодых хомяков восстановление легких регистрировали к 14-м суткам после заражения, тогда как у взрослых особей при таком же сроке наблюдения в легких выявляли выраженный альвеолярный и периваскулярный отек [13].

Одним из наиболее распространенных симптомов инфекции SARS-CoV-2 во время пандемии COVID-19 стала anosmia. Уже через 2 суток после назальной инстилляцией SARS-CoV-2 у сирийских хомяков выявлено массивное повреждение обонятельного эпителия с потерей ресничек и локальной десквамацией. Эпителий и собственная пластинка слизистой были инфильтрованы иммунными клетками. Эти повреждения были связаны с инфицированием большей части sustentacularных клеток, но не обонятельных нейронов. В обонятельных луковичах хомяков вирус не выявлен. Восстановление эпителия прослеживали к 14-м суткам после заражения [14].

Среди факторов, определяющих повреждение сердца при COVID-19, выделяют прямое поражение кардиомиоцитов вирусом SARS-CoV-2, активацию TGF- β (развитие фиброза в сердечной мышце), системную воспалительную реакцию, интерферониндуцированный иммунный ответ и гипоксию [15]. Описаны случаи вирусного миокардита при COVID-19 у людей, однако авторы не исключали ишемический генез изменений [16]. В опытах на сирийских хомяках выявлены сходные с таковыми у людей морфологические проявления кардиомиопатии: утолщение стенок миокарда, развитие фиброза и единичные некрозы кардиомиоцитов [17].

Методом гибридизации *in situ* показано, что вирус SARS-CoV-2 непосредственно поражает клетки иммунной системы в селезенке [18]. Тем не менее клетки иммунной системы не имеют рецепторов к ACE2, и механизм их поражения не выяснен. В качестве возможного механизма рассматривают вирусассоциированное нарушение дифференцировки фолликулярных Т-хелперов под воздействием TNF- α [19]. Наличие вирусных белков и РНК в селезенке сирийских хомяков выявляли начиная с 3-х суток заболевания [16]. Коррелирующие гравиметрические и гистологические изменения селезенки прослеживали уже на 3-и сутки после заражения.

Применимость биологической модели SARS-CoV-2-ассоциированного инфекционного процесса на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus* для скрининга лекарственных препаратов показана на различных примерах. В частности, введение нейтрализующих антител (nAbs) к двум эпитопам рецепторсвязывающего домена (RBD)

и к отдельным эпитопам, не относящимся к RBD, на белке шипа (S) предупреждало потерю массы и обеспечивало низкие титры вируса в легких при заражении хомяков SARS-CoV-2 в высоких дозах [20]. Комбинации антител hu-mAb были эффективны для профилактики и терапии COVID-19 у сирийских хомяков при раннем введении. Однако степень нейтрализации вируса *in vitro* не всегда коррелировала с защитой *in vivo*, когда некоторые антитела были более эффективными. Анализ Fc-областей антител показал, что связывание с аффинными Fc-рецепторами хомяков способствует оптимальной защите от SARS-CoV-2 [21]. Хомяков, иммунизированных вакциной, коэкспрессирующей белки мембраны и нуклеокапсида, заражали через 5 недель высокой дозой SARS-CoV-2. Вакцинирование предупреждало тяжелую потерю массы тела и патологические изменения в легких, существенно снижало экспрессию вируса в ротоглотке и легких [22]. Вместе с тем при испытании на хомяках гидроксихлорохина для профилактики или лечения COVID-19 препарат ни в стандартной (6,5 мг/кг), ни в высокой (50 мг/кг) дозе не оказывал положительного влияния на клиническое течение заболевания или кинетику SARS-CoV-2 (репликация/выделение) [23], что сопряжено с механизмами действия производных хлорохина и возможностью его применения с учетом токсичности только в первые дни после заражения SARS-CoV-2 для изменения аффинности вируса к гликопротеинам поверхности клеток [1]. Аналог нуклеозидов МК-4482 при пероральном введении либо за 12 часов до заражения, либо через 12 часов после него ингибировал репликацию SARS-CoV-2 у сирийских хомяков [24]. Профилактическое введение устойчивого к окислению лектина гриффитина также обеспечивало защиту сирийских хомяков от летального заражения вирусом Нипах NiV [25].

Заключение

Экспериментальная модель SARS-CoV-2-ассоциированного инфекционного процесса на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus*, характеризующая динамикой выбранных регистрируемых и расчетных показателей, исследованным профилем патоморфологических изменений, может быть использована для скрининга лекарственных средств, предназначенных для этиотропной и патогенетической терапии COVID-19. Для указанной экспериментальной модели свойственны половые различия в формировании патологических изменений с особенно выраженной манифестацией проявлений инфекционного процесса у самцов.

К наиболее информативным признакам, обладающим достаточным уровнем отличий от интактного контроля, следует отнести характерное снижение массы тела сирийских хомяков в течение первых 7 суток, увеличение массовых коэффициентов легких, сердца и селезенки, а также повышение влагонасыщения легких через 7 суток после заражения. При оценке эффективности лекарственных средств необходимо учиты-

вать степень консолидации ткани легких, проявления кардита и предупреждение изменений нейронов коры и подкорковых центров головного мозга.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.В. Чепур, М.А. Тюнин, В.А. Мясников.

Сбор и обработка материала – М.А. Тюнин, Н.С. Ильинский, И.И. Алексеева, О.О. Владимирова, А.С. Никишин, С.В. Чепур, В.А. Шевченко, А.В. Смирнова.

Написание текста – С.В. Чепур, М.А. Тюнин, Н.С. Ильинский, А.С. Никишин, А.В. Смирнова.

Редактирование – С.В. Чепур, М.А. Тюнин, Н.С. Ильинский, В.А. Шевченко, О.О. Владимирова, И.И. Алексеева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.V. Chepur, M.A. Tyunin, V.A. Myasnikov.

Collected the data and performed the analysis – M.A. Tyunin, N.S. Ilinskiy, I.I. Alekseeva, O.O. Vladimirova, A.S. Nikishin, S.V. Chepur, V.A. Shevchenko, A.V. Smirnova.

Wrote the paper – S.V. Chepur, M.A. Tyunin, N.S. Ilinskiy, A.S. Nikishin, A.V. Smirnova.

Edited the manuscript – S.V. Chepur, M.A. Tyunin, N.S. Ilinskiy, V.A. Shevchenko, O.O. Vladimirova, I.I. Alekseeva.

Благодарность

Авторы выражают искреннюю признательность Т.Н. Лавриковой за подготовку уникальных гистологических препаратов, А.А. Усачевой и А.С. Исаевой, принимавшим непосредственное участие при создании биологических моделей.

Acknowledgments

The authors would like to thank T.N. Lavrikova for preparing unique histological specimens, and A.A. Usacheva and A.S. Isaeva for taking part in the creation of the biological models.

Литература/References

1. Чепур С.В., Плужников Н.Н., Чубарь, О.В. Бакулина Л.С., Литвиненко И.В., Макаров В.А. и др. Респираторные РНК-вирусы: как подготовиться к встрече с новыми пандемическими штаммами. Успехи современной биологии. 2020;140(4):359–377. DOI: 10.31857/S0042132420040043. Chepur SV, Pluzhnikov NN, Chubar OV, Bakulina LS, Litvinenko IV, Makarov VA et al. Respiratory RNA viruses: How to prepare for meeting with new pandemic strains. Biology Bulletin Reviews. 2020;140(4):359–377 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0042132420040043.
2. Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: Implications for disease pathogenesis and transmissibility. Clin Infect Dis. 2020;71(9):2428–46. DOI:10.1093/cid/ciaa325.
3. Bertzbach LD, Vladimirova D, Dietert K, Abdelgawad A, Gruber AD, Osterrieder N et al. SARS-CoV-2 infection of Chinese hamsters (*Cricetulus griseus*) reproduces COVID-19 pneumonia in a well-established small animal model. Transbound Emerg Dis. 2021;68(3):1075–9. DOI: 10.1111/tbed.13837.
4. Tostanoski LH, Wegmann F, Martinot AJ, Loos C, McMahan K, Mercado NB et al. Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. Nat Med. 2020;26(11):1694–700. DOI: 10.1038/s41591-020-1070-6.

5. Taştan C, Yurtsever B, Sir Karakuş G, Dillek Kançağı D, Demir S, Abanuz S et al. SARS-CoV-2 isolation and propagation from Turkish COVID-19 patients. *Turk J Biol.* 2020;44(3):192–202. DOI: 10.3906/biy-2004-113.
6. Yao P, Zhang Y, Sun Y, Gu Y, Xu F, Su B et al. Isolation and growth characteristics of SARS-CoV-2 in Vero Cell. *Virol Sin.* 2020;35(3):348–50. DOI: 10.1007/s12250-020-00241-2.
7. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Epidemiol.* 1938;27(3):493–7. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
8. Рыбакова А.В., Макарова М.Н., Кухаренко А.Е., Вичаре А.С., Рюффер Ф. Существующие требования и подходы к дозированию лекарственных средств лабораторным животным. *Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2018;8(4):207–217. DOI: 10.30895/1991-2919-2018-8-4-207-217.
Rybakova AV, Makarova MN, Kukharensko AE, Vichare AS, Rueffer FR. Current requirements for and approaches to dosing in animal studies. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2018;8(4):207–217 (In Russ.). DOI: 10.30895/1991-2919-2018-8-4-207-217.
9. Луговик И.А., Макарова М.Н. Токсикологические исследования. Референтные интервалы массовых коэффициентов внутренних органов на выборке, состоящей из 1000 аутбредных крыс. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2021;1:3–11. DOI: 10.29296/2618723X-2021-01-01.
Lugovic IA, Makarova MN. Toxicological studies. Reference intervals of mass coefficients of internal organs in a sample of 1000 rats. *Laboratory Animals for Science.* 2021;1:3–11 (In Russ.). DOI: 10.29296/2618723X-2021-01-01.
10. Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020;583(7818):834–8. DOI: 10.1038/s41586-020-2342-5.
11. Rosenke K, Meade-White K, Letko M, Clancy C, Hansen F, Liu Y et al. Defining the Syrian hamster as a highly susceptible preclinical model for SARS-CoV-2 infection. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):2673–84. DOI: 10.1080/22221751.2020.1858177.
12. Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(28):16587–95. DOI: 10.1073/pnas.2009799117.
13. Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, Abdelgawad A, Vladimirova D, Kunec D et al. Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters. *Viruses.* 2020;12(7):779. DOI: 10.3390/v12070779.
14. Bryche B, St Albin A, Murri S, Lacôte S, Pulido C, Ar Guilh M et al. Massive transient damage of the olfactory epithelium associated with infection of sustentacular cells by SARS-CoV-2 in golden Syrian hamsters. *Brain Behav Immun.* 2020;89:579–86. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.06.032.
15. Babapoor-Farrokhran S, Gill D, Walker J, Rasekhi RT, Bozorgnia B, Amanullah A. Myocardial injury and COVID-19: Possible mechanisms. *Life Sci.* 2020;253:117723. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117723.
16. Gavriatopoulou M, Korompoki E, Fotiou D, Ntanasis-Stathopoulos I, Psaltopoulou T, Kastritis E et al. Organspecific manifestations of COVID19 infection. *Clin Exp Med.* 2020;20(4):493–506. DOI: 10.1007/s10238-020-00648-x.
17. Song Z, Bao L, Yu P, Qi F, Gong S, Wang J et al. SARS-CoV-2 causes a systemically multiple organs damages and dissemination in hamsters. *Front Microbiol.* 2021;11:618891. DOI: 10.3389/fmicb.2020.618891.
18. Zhan J, Deng R, Tang J, Zhang B, Tang Y, Wang JK et al. The spleen as a target in severe acute respiratory syndrome. *FASEB J.* 2006;20(13):2321–8. DOI: 10.1096/fj.06-6324com.
19. Kaneko N, Kuo HH, Boucau J, Farmer JR, Allard-Chamard H, Mahajan VS et al. Loss of Bcl-6-expressing T follicular helper cells and germinal centers in COVID-19. *Cell.* 2020;183(1):143–157.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.025.
20. Rogers TF, Zhao F, Huang D, Beutler N, Burns A, He WT et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020;369(6506):956–63. DOI: 10.1126/science.abc7520.
21. Schäfer A, Muecksch F, Lorenzi JCC, Leist SR, Cipolla M, Bournazos S et al. Antibody potency, effector function, and combinations in protection and therapy for SARS-CoV-2 infection in vivo. *J Exp Med.* 2021;218(3):e20201993. DOI: 10.1084/jem.20201993.
22. Jia Q, Bielefeldt-Ohmann H, Maison RM, Masleša-Galić S, Cooper SK, Bowen RA et al. Replicating bacterium-vectored vaccine expressing SARS-CoV-2 Membrane and Nucleocapsid proteins protects against severe COVID-19 disease in hamsters. *NPJ Vaccines.* 2021;6(1):47. DOI: 10.1038/s41541-021-00321-8.
23. Rosenke K, Jarvis MA, Feldmann F, Schwarz B, Okumura A, Lovaglio J et al. Hydroxychloroquine prophylaxis and treatment is ineffective in macaque and hamster SARS-CoV-2 disease models. *JCI Insight.* 2020;5(23):143174. DOI: 10.1172/jci.insight.143174.
24. Rosenke K, Hansen F, Schwarz B, Feldmann F, Haddock E, Rosenke R et al. Orally delivered MK-4482 inhibits SARSCoV-2 replication in the Syrian hamster model. *Nat Commun.* 2021;12(1):2295. DOI: 10.1038/s41467-021-22580-8.
25. Lo MK, Spengler JR, Krumpke LRH, Welch SR, Chattopadhyay A, Harmon JR et al. Griffithsin inhibits Nipah virus entry and fusion and can protect Syrian golden hamsters from lethal Nipah virus challenge. *J Infect Dis.* 2020;221(Supplement_4):S480–S492. DOI: 10.1093/infdis/jiz630.

Информация об авторах

Сергей Викторович Челур – доктор медицинских наук, профессор, начальник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Михаил Александрович Тюнин – кандидат медицинских наук, начальник научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Вадим Александрович Мясников – кандидат медицинских наук, заместитель начальника центра Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Ирина Ивановна Алексеева – научный сотрудник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Ольга Олеговна Владимирова – кандидат биологических наук, научный сотрудник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Никита Сергеевич Ильинский – старший научный сотрудник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Александр Сергеевич Никишин – научный сотрудник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Валентин Алексеевич Шевченко – младший научный сотрудник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Анна Владимировна Смирнова – научный сотрудник Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации.

Author information

Sergey V. Chepur – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-5324-512X>

Mikhail A. Tyunin – Cand. Sci. (Med.), Head of the Research Department, State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia.

<https://orcid.org/0000-0002-6974-5583>

Vadim A. Myasnikov – Cand. Sci. (Med.), Deputy Head of the Research Department, State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0001-7232-4678>

Irina I. Alekseeva – Researcher, State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-0924-9158>

Olga O. Vladimirova – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-8703-6799>

Nikita S. Ilinskiy – Senior Researcher, State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0001-7406-753X>

Aleksandr S. Nikishin – Researcher, State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0003-1372-369X>

Valentin A. Shevchenko – Junior Researcher, State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0002-6984-2914>

Anna V. Smirnova – Researcher, State Research Test Institute of Military Medicine of Defense Ministry of the Russian Federation.

<https://orcid.org/0000-0003-0483-5032>

Взаимосвязь структуры микроциркуляторного русла и метастатического потенциала локализованных форм колоректального рака

А.С. Константинов^{1,3}, К.В. Шелехова^{1,2,3}

¹ ГБУЗ Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический), Санкт-Петербург, Россия

² ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

³ ЧОУ ВО Санкт-Петербургский медико-социальный институт, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Неметастатический колоректальный рак может рецидивировать в течение пяти лет в виде отдаленных метастазов примерно у 25% пациентов со II стадией и у 50–60% пациентов с III стадией. Очень важно определить подгруппу пациентов с самым высоким риском рецидива. Цель исследования – определить влияние плотности микрососудов (MVD) и микрососудов с нарушением перичиттарного окружения (PIM) на риск метастазирования колоректальных аденокарцином.

Материалы и методы. Проведен анализ операционного материала локализованных форм колоректального рака. Когорты включали случаи с синхронными отдаленными метастазами (n=53), метастазными метастазами (n=45) и без отдаленных метастазов (n=53). В последней группе катамнез составил от 64 до 92 месяцев. На срезах опухоли было проведено тройное иммуногистохимическое окрашивание: ERG, α -SMA, Podoplanin. В инвазивном фронте определялись области с наибольшей плотностью микрососудов, где подсчитывалось их количество на площади 1,0 мм² при $\times 400$. Подсчитывалось количество кровеносных микрососудов без экспрессии α -SMA и рассчитывался индекс незрелости микрососудов Index-V = PIM / MVD.

Результаты. Нормальные кровеносные сосуды характеризовались экспрессией ERG эндотелиоцитами и α -SMA перичитами, тогда как в составе незрелых микрососудов последние отсутствовали. Разница по MVD в группах была статистически незначимой (p=0,414), в среднем 10/мм² для неметастазирующих и 11/мм² для метастазирующих опухолей. Метастазирующие опухоли показали значительно более высокий PIM (среднее значение 8/мм² против 2/мм²) и Index-V (среднее значение 0,69 против 0,21). Оба показали положительную корреляцию с отдаленными метастазами (p<0,001).

Заключение. Полученные данные демонстрируют, что несовершенная неоваскуляризация в опухоли коррелирует с метастазированием, что приводит к худшему прогнозу. Не только плотность микрососудов, но и особенности их структуры являются важными независимыми прогностическими факторами для пациентов с колоректальным раком. Оценка ангиогенеза в опухоли с точки зрения количества и зрелости новообразованных сосудов способствует выявлению потенциала злокачественности опухоли.

Ключевые слова: ангиогенез, перичиты, плотность микрососудов, колоректальный рак, прогноз

Для корреспонденции: Алексей Сергеевич Константинов. E-mail: konstantinov2007@gmail.com

Для цитирования: Константинов А.С., Шелехова К.В. Взаимосвязь структуры микроциркуляторного русла и метастатического потенциала локализованных форм колоректального рака. Клини. экск. морфология. 2021;10(4):35–44. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.35-44.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 01.07.2021. Получена после рецензирования 20.07.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Correlation of microvasculature structure with metastatic potential of localized forms of colorectal cancer

A.S. Konstantinov^{1,3}, K.V. Shelekhova^{1,2,3}

¹ Saint-Petersburg Clinical Scientific and Practical Center for Specialized Types of Medical Care (Oncological), Saint-Petersburg, Russia

² S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

³ Saint-Petersburg Medico-Social Institute, Saint-Petersburg, Russia

Introduction. Non-metastatic colorectal cancer can recur within five years as distant metastases in about 25% of stage II patients and 50–60% of stage III patients. It is crucial to identify the subgroup of patients with

the highest risk of recurrence. Our study aimed to determine the effect of microvascular density (MVD) and pericyte impaired microvessels (PIM) on the risk of metastasis of colorectal adenocarcinomas.

Materials and methods. We carried out a retrospective study of the surgical material for colorectal cancer without metastases in regional lymph nodes. The cohorts included cases with synchronous distant metastases (n=53), metachronous metastases (n=45), and without distant metastases (n=53). In the last group, the follow-up period was from 64 up to 92 months. We performed triple immunohistochemical staining: ERG, α -SMA, and Podoplanin. At low magnification, we determined the areas of highest microvessel density, calculated them on an area of 1.0 mm² with a magnification of x400. The number of microvessels without α -SMA expression was counted, and eventually the microvessel immaturity index Index-V = PIM / MVD was calculated.

Results. Normal blood vessels were characterized by the expression of ERG in endothelial cells and α -SMA in pericytes, while at immature tumor microvessels, the latter were absent. The difference in MVD in the groups was statistically insignificant (p=0.414), on average 10/mm² for non-metastatic tumors and 11/mm² for metastatic ones. Metastatic tumors showed significantly higher PIM (mean 8/mm² vs. 2/mm²) and Index-V (mean 0.69 vs. 0.21). Both showed a significant correlation with distant metastases (p < 0.001).

Conclusion. The data obtained demonstrate that imperfect tumor neovascularization correlates with metastasis, which leads to a worse prognosis. The density of microvessels and their structural features are important independent prognostic factors for patients with colorectal cancer. Evaluation of angiogenesis in a tumor in terms of the number and maturity of newly formed vessels enable to elucidate malignant potential of the tumor.

Keywords: angiogenesis, pericytes, microvessel density, colorectal cancer, prognosis

Corresponding author: Aleksei S. Konstantinov. E-mail: konstantinov2007@gmail.com

For citation: Konstantinov A.S., Shelekhova K.V. Correlation of microvasculature structure with metastatic potential of localized forms of colorectal cancer. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):35–44. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.35-44 (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 01.07.2021. **Received in revised form** 20.07.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Согласно обобщающей работе D. Hanahan et al., рост злокачественной опухоли зависит от восьми внутренних характеристик опухолевых клеток: 1) независимость от внешних пролиферативных сигналов; 2) нечувствительность к сигналам, подавляющим рост; 3) уклонение от апоптоза; 4) безграничный репликативный потенциал; 5) устойчивый ангиогенез, 6) тканевая инвазия и метастазирование; 7) измененный клеточный метаболизм; 8) ускользание от иммунного надзора [1]. Многие исследования показали, что компоненты стромы опухоли играют важную роль на всех стадиях опухолевого роста [2]. Компоненты стромы включают внеклеточный матрикс и клеточные элементы (фибробласты, макрофаги, лимфоциты и другие воспалительные клетки), а также клетки, формирующие кровеносные и лимфатические сосуды (эндотелиальные клетки, перicyты и гладкомышечные клетки). Злокачественность является результатом сложного взаимодействия между стромой и опухолевыми клетками, при этом как опухолевые клетки, так и компоненты стромы играют активную роль в росте, инвазии и метастазировании. Сосудистая сеть, окружающая опухоль и растущая внутри нее, не только доставляет питательные вещества и кислород, необходимые для устойчивого роста, но также обеспечивает доступ клеток микроокружения, например макрофагов, способствуя ее дальнейшей прогрессии [3]. Ангиогенез

в опухолях приводит к формированию хаотичной, плохо организованной сосудистой сети с извилистыми, неправильной формы сосудами с повышенной проницаемостью, которые часто не могут поддерживать эффективный кровоток. Из-за несбалансированной экспрессии ангиогенных факторов сосуды опухоли, по-видимому, находятся в постоянном состоянии ремоделирования, которое включает одновременное образование и регресс сосудистых каналов [4]. Так же, как эндотелиальные клетки опухоли отличаются от нормального, покоящегося эндотелия, перicyты опухоли отличаются от нормальных перicyтов. Считается, что перicyты в опухолях хуже фиксированы к эндотелию новообразованных сосудов и их цитоплазматические отростки могут распространяться в периваскулярную строму (рис. 1). В ряде работ показана их меньшая распространенность в некоторых опухолях по сравнению с соответствующей нормальной тканью. Так, в карциномах поджелудочной железы отмечается достаточно плотное покрытие перicyтами, а глиобластомы и карциномы молочной железы демонстрируют резкое снижение плотности перicyтов по сравнению с соответствующими нормальными тканями [4].

Таким образом, предполагается, что опухолевые клетки могут легче проникать в незрелые бесперicyтарные микрососуды и созревание сосудов, а также их плотность могут быть полезными маркерами для оценки потенциала злокачественности опухоли. В ли-

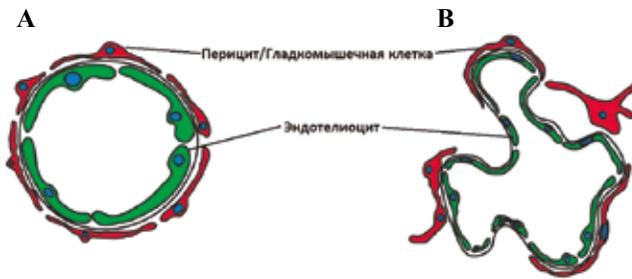


Рис. 1. Схема строения зрелого капилляра (А) и новообразованного сосуда, в процессе ангиогенеза в опухоли (В)

Fig. 1. Schematic structure of a mature capillary (A) and a newly formed vessel during angiogenesis in a tumor (B)

тературе встречается мало клинических исследований взаимосвязи между зрелостью микрососудов опухоли и клинико-патологическими переменными [5–7]. Кроме того, слабо освещена взаимосвязь между отдаленными метастазами и зрелостью микрососудов опухоли, оцениваемой путем идентификации эндотелиальных клеток и перicyтов. В своей работе мы исследовали степень структурной зрелости новообразованных сосудов и их связь с количеством микрососудов, клинико-патологическими параметрами и отдаленным метастазированием при локализованных формах колоректального рака.

Материалы и методы

Когорты пациентов

На архивном материале Санкт-Петербургского клинического научно-практического центра специализированных видов медицинской помощи (онкологический) с 2012 по 2015 год проведен анализ 1350 оперatively удаленных опухолей толстой кишки. Из них было выбрано 98 случаев локализованных форм колоректального рака в соответствии со следующими критериями: 1) опухоль любой глубины инвазии, кроме Tis – интраэпителиальная инвазия или инвазия собственной пластинки слизистой оболочки, 2) отсутствие поражения регионарных лимфатических узлов и клинически выявленных синхронных отдаленных метастазов на момент операции, 3) неоадьювантное химиотерапевтическое и/или лучевое лечение не проводилось, 4) неспецифический гистологический подтип аденокарцином, в том числе опухоли, имеющие очаговую муцинозную дифференцировку (площадь внеклеточного муцина более 10%, но менее 50%), не относящиеся к муцинозным карциномам по критериям ВОЗ, 5) отсутствие первичных опухолей других локализаций.

По данным катанеза, основанного на материалах медицинской документации и информации, полученной у пациента и/или его представителя, исследуемая выборка была разделена на две группы в зависимости от отсутствия (n=53) или наличия отдаленных метастазов (n=45), основываясь на результатах, как минимум, пятилетнего клинического наблюдения

(от 64 до 92 месяцев). В контрольную группу вошли инвазивные опухоли без поражения регионарных лимфоузлов, но с отдаленными синхронными метастазами (n=53), получившими морфологическую верификацию.

Исследуемые характеристики и используемые методики

В зависимости от локализации опухоли случаи были подразделены на три категории: правой половины толстой кишки (включает слепую кишку, восходящую ободочную кишку, печеночный угол и проксимальные две трети поперечной ободочной кишки), левой половины толстой кишки (включает дистальную треть поперечной ободочной кишки, селезеночный угол, нисходящую ободочную кишку и сигмовидную кишку) и прямой кишки.

Определяли степень дифференцировки в соответствии с утвержденными рекомендациями 5-го издания классификации опухолей желудочно-кишечного тракта ВОЗ [8]. В категорию low-grade включены опухоли, ранее относившиеся к высоко- и умереннодифференцированным, в категорию high-grade – низкодифференцированные опухоли. Оценку проводили по наименее дифференцированным участкам.

Стадию опухолевого процесса устанавливали в соответствии с критериями 8-й редакции классификации TNM AJCC/UICC [9]. Оценивали глубину инвазии опухоли кишечной стенки и число исследованных регионарных лимфатических узлов.

После изучения препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, из каждого случая выбирали блок опухоли с наибольшей глубиной инвазии, с которого изготавливали срезы толщиной 4 мкм для дальнейшего иммуногистохимического исследования. Проводили тройное окрашивание в автоматическом стеинере Ventana BanchMark XT (Roche, Швейцария) по соответствующим протоколам, с использованием следующих антител: ERG (EP111, 1:150, Epitomics, США) – нуклеопротеин эндотелиальных клеток кровеносных и лимфатических сосудов; α -SMA (1A4, 1:200, Dako, Дания) – α -гладкомышечный актин, белок микрофиламентов цитоскелета, выявляемый, в частности, в цитоплазме перicyтов и гладкомышечных клеток; Podoplanin (D2-40, 1:50, CellMarque, США) – трансмембранный гликопротеин, выявляющийся в эндотелии лимфатических, но не кровеносных сосудов. На постаналитическом этапе оценивали специфичность проведенного окрашивания, для чего выбирали участки нормальной ткани на удалении от опухоли. При увеличении объектива $\times 40$ оценивали окраску сосудов капиллярного типа и лимфатических сосудов. Кровеносные сосуды определялись по наличию в их просвете эритроцитов, просветы лимфатических сосудов содержали лимфоциты или были пусты. Дифференцированную окраску лимфатических капилляров, посредством Podoplanin, проводили для их исключения из подсчета. При успешном окрашивании кровеносные

капилляры отличались красным контуром по сравнению с коричневым контуром лимфатических сосудов. Далее, перемещаясь вдоль инвазивного фронта опухоли, находили участки с наиболее развитым микроциркуляторным руслом. Проводили подсчет общего числа микрососудов, исключая лимфатические, на площади в 1 мм² – плотность микрососудов (MVD). Новообразованные сосуды, лишённые контура из клеток, экспрессирующих α -SMA, отмечали как микрососуды с нарушением перичитарного окружения (PIM).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программы Statistica для Windows (версия 9).

Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова–Смирнова (при числе исследуемых более 50). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывали с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1–Q3). Категориальные данные описывали с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение трех и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполняли с помощью

критерия Краскела–Уоллиса, апостериорные сравнения – с помощью критерия Данна с поправкой Холма.

Результаты

Средний возраст пациентов во всех группах составил около 65,9±10 лет, соотношение мужчин и женщин – 1:1,5. В группе без метастазов чаще встречались опухоли левой половины толстой кишки – 32 (6,4%). При этом среди всех опухолей правосторонней локализации 47,2% случаев было из группы с синхронными отдаленными метастазами, что можно объяснить их более поздним клиническим проявлением. Во всех группах преобладали опухоли, инвазирующие в стенку на уровне околоободочной/субсерозной/параректальной клетчатки, – pT3. Инвазия в серозную оболочку (pT4a) или в соседние органы (pT4b) достоверно чаще встречалась в группах с метастазами (p<0,001). Во всех группах абсолютное большинство опухолей характеризовалось низкой степенью гистологической злокачественности (low-grade).

Результат тройного иммуногистохимического окрашивания в норме и в опухоли представлен на рисунке 2.

При оценке микроциркуляторного русла выявлены следующие особенности. Средняя плотность микрососудов между группами значительно не отличалась

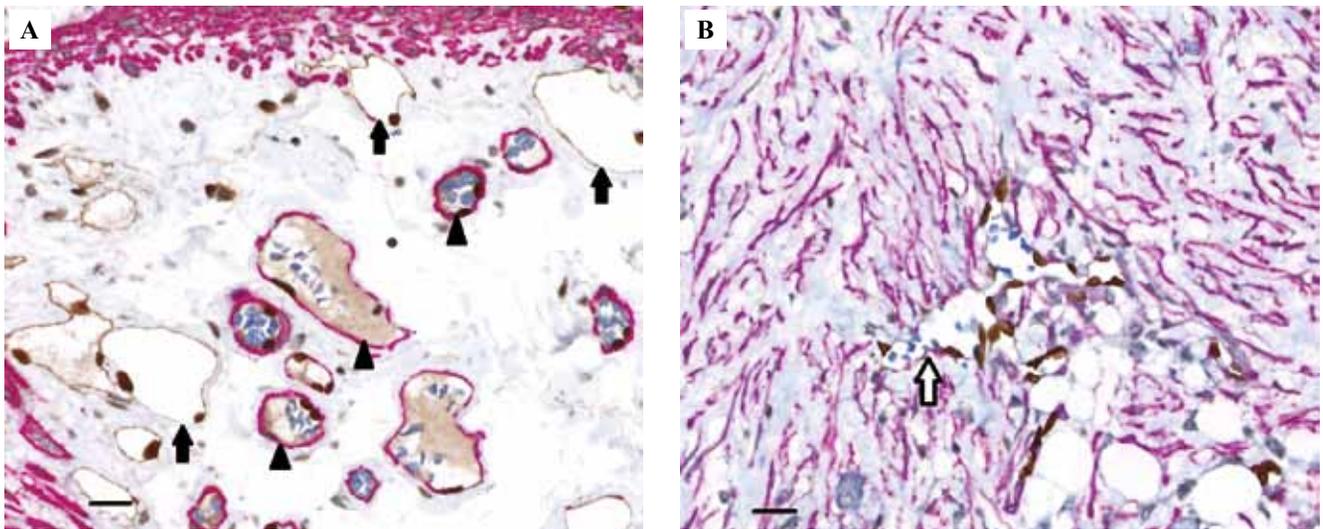


Рис. 2. Тройное иммуногистохимическое окрашивание микрососудов.

А – ядра эндотелиальных клеток кровеносных (верхушка стрелки) и лимфатических (черные стрелки) капилляров окрашены в коричневый цвет (маркер ERG). Красный контур кровеносных сосудов связан с наличием перичитов, (маркер α -SMA). Коричневый контур лимфатических сосудов определяется цитоплазматическим окрашиванием эндотелиальных клеток (маркер Podoplanin). В – новообразованный кровеносный сосуд (белая стрелка) имеет неправильную форму, лишен перичитов и сохраняет только контур из эндотелиальных клеток, определяемый ядрами, окрашенными коричневым (маркер ERG). Обращает внимание выраженная десмопластическая строма, богатая активированными миофибробластами (маркер α -SMA). Масштабная шкала = 200 мкм

Fig. 2. Triple immunohistochemical staining of microvessels.

A – the nuclei of the endothelial cells (arrowheads) and lymphatic (black arrows) capillaries are colored brown (ERG marker). A contour of the blood vessels appears red due to presence of pericytes (α -SMA marker). The brown-colored cytoplasm of the endothelial cells of the lymphatic vessels is defined by the brown Podoplanin outline. B – newly formed misshapen blood vessels (white arrow) in the tumor stroma are devoid of pericyte and retain only the contour of their endothelial cells, detected by nuclei stained in brown (ERG marker). Noteworthy is the pronounced desmoplastic stroma rich with activated myofibroblasts (α -SMA marker). Scale bar = 200 μ m

и составила 10/мм² для группы без метастазов и 11/мм² для метастазирующих опухолей. В опухолях с метастазирующими и синхронными метастазами среди новообразованных сосудов чаще встречались капилляры без перицитарного окружения, в среднем 8/мм² и 9/мм², соответственно, по сравнению с неметастазирующими опухолями – 2/мм² (p<0,001). Обобщенные данные по результатам анализа всех показателей в исследуемых группах пациентов представлены в таблице 1.

Расчетный Index-V относится к количественным показателям, распределение которых не соответствует нормальному, различия между группами с метастазами

и без метастазов представлены на рисунке 3. Методом построения классификационных деревьев было получено пороговое значение Index-V = 0,5, принципиально значимое для оценки риска метастазирования. При Index-V меньше или равно 0,5 отношение рисков (OR) было минимальным, а при Index-V больше 0,5 составило 138,4. Это отношение показывает, во сколько раз повышается риск метастазирования по сравнению с минимальным уровнем показателя.

Как видно из таблицы 2, превышение порогового значения Index-V отмечается в 38 случаях (42,69%) в группе с метастазирующими метастазами, в 49 (55,05%)

Таблица 1 | Table 1

Показатели оцениваемых характеристик в исследуемых группах |
Values of the factors in groups

Показатель Variable	Без метастазов (n=53) Without metastases (n=53)	С метастазами (n=45) With metachronous metastases (n=45)	С синхронными метастазами (n=53) With synchronous metastases (n=53)	p*
Возраст Age Медиана Median Q ₁ -Q ₃	67 60–75	65 58–72	65 59–74	0,898
Пол Sex Мужской Male Женский Female	21 (40) 32 (60)	23 (51) 22 (49)	23 (43) 30 (57)	0,391
Локализация Localization Правая сторона Right-sided Левая сторона Left-sided Прямая кишка Rectum	11 (21) 32 (60) 10 (19)	8 (18) 21 (47) 16 (35)	17 (32) 21 (40) 15 (28)	0,493
Категория T T category 1 2 3 4a 4b	0 0 49 (92) 1 (2) 3 (6)	0 2 (4) 38 (85) 1 (2) 4 (9)	0 5 (9) 29 (55) 9 (17) 10 (19)	<0,001
Степень гистологической злокачественности Grade Low-grade High-grade	47 (89) 6 (11)	42 (93) 3 (7)	44 (83) 9 (17)	0,872
MVD Медиана Median Q ₁ -Q ₃	9 7–11	11 8–13	10 8–12	0,414
PIM Медиана Median Q ₁ -Q ₃	2 1–3	7 5–10	8 6–10	<0,001
Index-V Медиана Median Q ₁ -Q ₃	0,18 0,09–0,33	0,72 0,6–0,86	0,8 0,68–0,91	<0,001

*линейный тест χ^2 для оценки статистической значимости.

MVD – плотность микрососудов, PIM – микрососуды без перицитов, Index-V – соотношение бесперичитарных сосудов к общему числу микрососудов

* χ^2 linear test for trend.

MVD – microvascular density, PIM – pericyte impaired microvessels, Index-V – the ratio of pericyte impaired vessels to the total number of microvessels

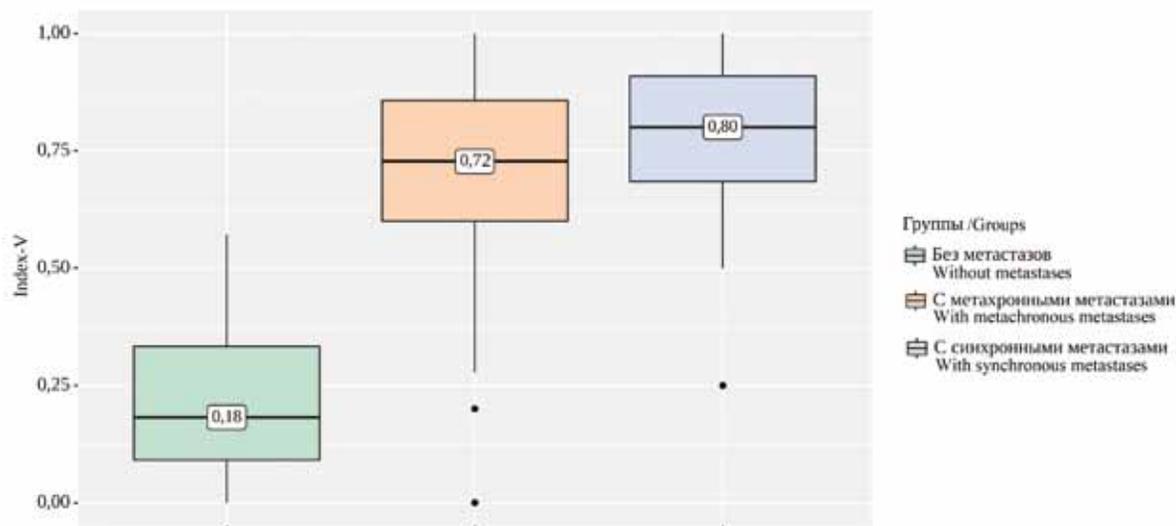


Рис. 3. Значения Index-V в группах без метастазов и с отдаленными синхронными и метастазами
 Fig. 3. Value of Index-V in groups without metastases and with distant synchronous and metachronous metastases

Таблица 2 | Table 2

Распределение случаев в группах без метастазов и с метастазами при различных значениях Index-V |
 Distribution of cases in groups without metastases and with metastases at different values of Index-V

Показатель Variable	Значения показателя Value	Без метастазов Without metastases		С метастазами метастазами With metachronous metastases		С синхронными метастазами With synchronous metastases		Всего Total
		абс. abs.	%	абс. abs.	%	абс. abs.	%	
Index-V (p<0,001)	Index-V≤0,5	51	82,25	7	11,29	4	6,45	62
	Index-V>0,5	2	2,24	38	42,69	49	55,05	89
	Всего Total	53	35,1	45	29,8	53	35,1	151

случаях с синхронными метастазами по сравнению лишь с двумя случаями (2,24%) без метастазов.

С использованием коэффициента корреляции Спирмена (ρ) была установлена положительная взаимосвязь между MVD и PIM (рис. 4). В группе без метастазов ρ=0,294 (p=0,033), в группе с метастазами отдаленными метастазами ρ=0,701 (p<0,05) и в группе с синхронными отдаленными метастазами ρ=0,901 (p<0,001). Следует отметить усиление взаимосвязи между этими показателями в группах с отдаленными метастазами, что отражается приближением показателя коэффициента к 1,0.

Достоверная корреляция между степенью гистологической злокачественности и плотностью микрососудов или числом сосудов без перипититарного окружения не была установлена ни в одной из исследуемых групп. Таким образом, уровень незрелости микрососудов опухоли не коррелировал со степенью дифференцировки опухоли.

Обсуждение

Вопрос лимфогенной и гематогенной диссеминации является предметом давних исследований и, вероятно, сильно зависит от происхождения и локализа-

ции первичной опухоли [10]. Поток интерстициальной жидкости к лимфатическим сосудам и промежутки в эндотелиальной выстилке лимфатических капилляров облегчают доступ и проникновение опухолевыми клетками. Кроме того, лимфатические сосуды лишены гладкомышечных клеток и перипитов, которые в противном случае могли бы препятствовать проникновению в сосуды [11, 12]. В отличие от лимфатических кровеносные сосуды любого размера обычно состоят из нескольких слоев клеток. В сосудах калибра венул, вен, артериол и артерий они называются гладкомышечными клетками, поскольку характеризуются высоким уровнем экспрессии α-SMA и могут образовывать до нескольких слоев сократительных клеток, встроенных во внеклеточный матрикс, богатый эластином и фибриллярным коллагеном. В капиллярном звене клетки аблюминального слоя называются перипитами и характеризуются низким уровнем α-SMA, но сильной экспрессией хондроитинсульфатного протеогликана NG2 [13]. Во время патофизиологических процессов (воспаление, фиброз, опухолевый рост) перипиты активируются комбинацией факторов роста (PDGF-β, VEGFα и TGFβ-1) и демонстрируют измененные профили маркеров, в частности повышение экспрессии

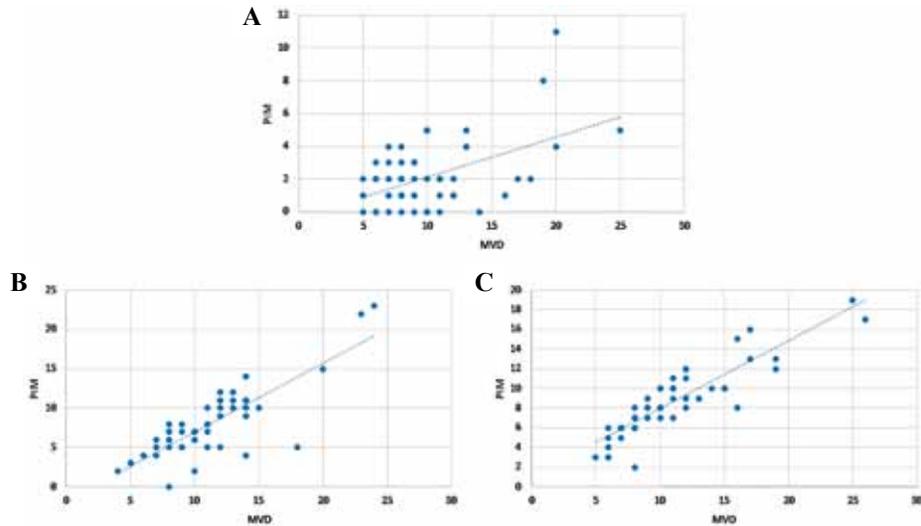


Рис. 4. Корреляция между MVD и PIM.

А – группа без метастазов. В – группа с метастазами. С – группа с синхронными метастазами

Fig. 4. Correlation between MVD and PIM.

A – group without metastases. B – group with metachronous distant metastases. C – group with synchronous distant metastases

α -SMA, что характеризует их трансдифференцировку в миофибробласты. Также отделение перицитов от внеклеточного матрикса приводит к увеличению проницаемости сосудов, что способствует миграции воспалительных клеток, росту и метастазированию опухоли [14]. Тем не менее существуют и другие гипотезы о клеточном происхождении миофибробластов, включая резидентные фибробласты, фиброциты, эпителиальные клетки (вследствие эпителиально-мезенхимального перехода), клетки костного мозга, эндотелиальные клетки. Степень вклада перицитов в модуляцию воспалительных клеток при фиброзе и трансдифференцировку в фибробласты или миофибробласты при канцерогенезе все еще остается в значительной степени неясной.

Периваскулярные стромальные клетки, или перициты, известны давно (впервые описаны Карлом Эбертом в 1871 году), они обнаруживаются в норме на наружной стороне кровеносных (не лимфатических) капилляров, где обеспечивают механическую и физиологическую паракринную поддержку покоящихся эндотелиальных клеток [14]. Перициты представляют собой вид специализированных мезенхимальных клеток (в настоящий момент считаются онтогенетически связанными с сосудистыми гладкомышечными клетками), погруженных в базальную мембрану кровеносных сосудов, с большим числом первичных и вторичных отростков, муфтообразно охватывающих сосудистую трубку (рис. 5).

Пока не существует универсального маркера, который бы мог идентифицировать все перициты, и их обычно выявляют с помощью молекулярных маркеров, таких как α -SMA, десмин или высокомолекулярный меланоассоциированный антиген (HMW-MAA) [15, 16]. Н. Kurz et al. сообщают, что перициты экспрессируют десмин, но

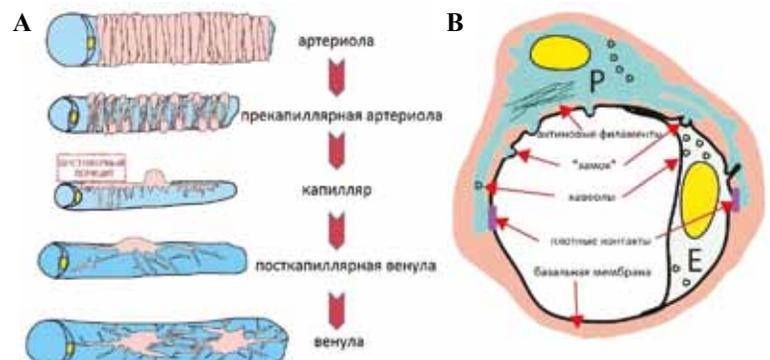


Рис. 5. Схема строения сосудистой стенки.

А – континуум цитоархитектуры перицитов от артериол к венуле. В – ультраструктурные характеристики перицитов и перицитэндотелиальных взаимодействий. Перицит зрелого капилляра (P) имеет общую базальную мембрану с эндотелиальной клеткой (E), и они образуют многочисленные прямые контакты разного типа: схематически изображены плотные контакты и соединения типа «замок» (по А. Armulik, G. Genové и С. Betsholtz, 2011)

Fig. 5. Schematic structure of the vascular wall.

A – a continuum of mural cell cyto-architecture from arterioles to the venule. B – ultrastructural characteristics of pericytes and pericyte-endothelial interactions. The mature capillary pericyte (P) share basal membrane with endothelial cell (E) and make numerous direct contacts of different types: schematically depicted are peg-socket contacts and adhesion plaques (adopted from A. Armulik, G. Genové, C. Betsholtz, 2011)

не α -SMA, на ранних стадиях прорастания капилляров при анализе ангиогенеза опухоли хориоаллантоисной мембраны у птиц [17]. Зависимость экспрессии α -SMA от степени зрелости новообразованных сосудов была также подтверждена нами на примере окрашивания грануляционной ткани. Так, продемонстрировано, что почти все новообразованные капилляры, представленные простыми трубками, сформированными 1–2 эндотелиальными клетками на поперечном срезе, не имели окружения, экспрессировавшего α -SMA, тогда как к периферии разрастаний, по мере их усложнения и ветвления, почти все сосудистые структуры давали положительную экспрессию α -SMA. Эти выводы согласуются с предыдущими работами. Требуются дополнительные исследования для выявления специфических маркеров перicyтов в опухолевом ангиогенезе человека.

Соотношение эндотелиальных клеток к перicyтам варьирует в разных органах от 1:1 в головном мозге до 10:1 в скелетных мышцах, в среднем перicyты покрывают от 70 до 10% аблюминальной поверхности эндотелия [14]. Установлена секреция перicyтами антипролиферативных факторов, к примеру ангиопоэтин-1 (Ang-1) через рецептор Tie2 на эндотелиальных клетках обеспечивает их стабилизацию. Некоторые перicyты могут продуцировать небольшое количество сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) для обеспечения трофической функции в гомеостазе эндотелия [1]. Перicyты наряду с эндотелиальными клетками участвуют в синтезе базальной мембраны сосудов, обеспечивающей сопротивление гидростатическому давлению кровотока.

В опухолевом микроокружении присутствует много растворимых факторов роста и хемокинов, стимулирующих эндотелиальные клетки и ассоциированные с ними перicyты к пролиферации и неоваскуляризации, что является необходимым условием роста опухоли. Без васкуляризации опухоль не может увеличиться более 100–200 мкм в диаметре, несмотря на все генетические аномалии, это зона максимального расстояния диффузии кислорода, необходимого для жизнедеятельности любой животной клетки. Ангиогенез обеспечивает не только постоянный рост опухоли, но также возможность проникать в сосудистое русло, что является основой метастазирования, одного из биологических проявлений злокачественности и наивысшего выражения ее автономности [18]. Опухоли отличаются практически перманентной активацией ангиогенеза, молекулярный базис для его запуска заключается в преобладании воздействия ангиогенных факторов и/или потере ингибиторов ангиогенеза. К таким известным стимуляторам эндотелиального роста относятся метаболический стресс (например, низкий pO_2 , низкий pH или гипогликемия), механический стресс (например, давление от пролиферирующих клеток), иммунный воспалительный ответ или генетические мутации, активирующие продукцию проангиогенных факторов (например, VEGF), ангиопоэтины (Ang) [18].

Новообразованные сосуды опухоли характеризуются структурными и функциональными aberrациями: отличаются неравномерным распределением, избыточным ветвлением и извитостью, имеют неравномерные просветы, что сопровождается нарушением ламинарного тока крови, могут утрачивать периваскулярные клетки и иметь неравномерную эндотелиальную выстилку, прерывающуюся базальную мембрану, что сопровождается повышенной проницаемостью. Последнее приводит к повышению интерстициального давления, сдавлению самих сосудов и, как следствие, снижению оксигенации ткани. В ответ на гипоксию клетки микроокружения, в частности клетки воспалительного инфильтрата (например, макрофаги M2-типа) и клетки опухоли, продуцируют множество проангиогенных цитокинов (VEGF и FGF-2) через активацию HIF-1 α , фактора транскрипции, чувствительного к кислороду. Эти факторы создают так называемый ангиогенный градиент, стимулируя пролиферацию эндотелия и направляя рост новых сосудов к опухоли [19]. В то же время VEGF негативно воздействует на функционирование перicyтов и созревание сосудов [14]. В ряде исследований карцином мочевого пузыря, поджелудочной железы и толстой кишки было показано, что неполное развитие перicyтарного слоя в опухолевых сосудах коррелирует с плохим прогнозом и повышает частоту метастазирования [20, 21]. Недавнее исследование V.G. Cooke et al. частично помогает в понимании этой закономерности. На моделях опухолей мышей с генетическим и фармакологически индуцированным дефицитом перicyтов авторы установили угнетение роста первичных опухолей, но последнее ассоциировалось с гипоксией, что привело к активации эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых клеток за счет активации c-Met рецепторов (рецепторов к гепатоцитарному фактору роста HGF) на мембранах эпителиальных клеток [22]. Результаты клинических наблюдений пациентов с карциномами молочной железы, в которых отмечался низкий процент сосудов, покрытых перicyтами, также показали прямую связь с развитием метастазов и более низкую общую выживаемость [22].

В своем исследовании мы оценивали взаимосвязь степени зрелости микрососудов, а также выраженности ангиогенеза в колоректальных аденокарциномах с их биологическим поведением. Незрелые сосуды определялись как микрососуды с нарушением перicyтарного окружения, лишенные экспрессии α -SMA. Не была установлена взаимосвязь между степенью гистологической злокачественности и метастатическим потенциалом опухоли, плотностью микрососудов и долей бесперicyтарных сосудов в сосудистом ложе. Таким образом, «гистологическая злокачественность» колоректальных аденокарцином не связана с признаком злокачественности опухолей – метастазированием и не может считаться независимым фактором прогноза для данного типа опухолей. При равной плотности

микрососудов в неметастазирующих и метастазирующих опухолях (средняя MVD 10/мм² и 11/мм², соответственно) в последних чаще встречались незрелые сосуды ($p < 0,001$), что позволяет предположить прямую взаимосвязь перичитарного окружения с проницаемостью сосудистой стенки для опухолевых клеток. При оценке взаимосвязи MVD и PIM обнаружено усиление корреляции в метастазирующих опухолях ($p < 0,001$). Это наблюдение указывает на факт, что при большей активности ангиогенеза наблюдалось большее число сосудов с нарушением перичитарного окружения, и эта взаимосвязь была сильнее выражена при высоком метастатическом потенциале опухоли. Вероятно, усиленная стимуляция пролиферации эндотелиальных клеток в опухолевом микроокружении приводит к замедлению их созревания и, как следствие, недостаточной экспрессии цитокинов, необходимых для привлечения перичитарных клеток, обеспечивающих стабилизацию новообразованных сосудов. Данное наблюдение расходится с выводами Y. Yonemura et al., установивших прямо пропорциональную связь повышения плотности микрососудов с увеличением процента зрелых микрососудов в опухоли [21]. Это, возможно, связано с оценкой сосудистого русла по всему объему опухоли, в центральных и периферических отделах, тогда как мы проводили подсчеты только в инвазивном фронте, где, как известно, протекают наиболее активное взаимодействие опухоли и организма «хозяина», в том числе идут процессы неоваскуляризации. В то же время наши результаты согласуются с данными, полученными P. Vermeulen et al., установивших прямую корреляцию между количеством незрелых сосудов и плотностью микрососудов в метастазах колоректальных аденокарцином в печени [23].

Заключение

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что несовершенный ангиогенез коррелирует с появлением отдаленных метастазов у пациентов с локализованным колоректальным раком. Оценка микрососудистого русла опухоли на предмет его созревания, а также количества новообразованных сосудов может быть использована для прогнозирования злокачественного потенциала опухолей данной локализации и планирования ведения пациентов.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.С. Константинов, К.В. Шелехова.

Сбор и обработка материала – А.С. Константинов.

Написание текста – А.С. Константинов.

Редактирование – К.В. Шелехова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment –

A.S. Konstantinov, K.V. Shelekhova.

Collected the data and performed the analysis – A.S. Konstantinov.

Wrote the paper – A.S. Konstantinov.

Edited the manuscript – K.V. Shelekhova.

Литература/References

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2005;7(6):513–20. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.05.024.
3. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*. 2006;124(2):263–6. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.007.
4. Raza A, Franklin MJ, Dudek AZ. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*. 2010;85(8):593–8. DOI: 10.1002/ajh.21745.
5. Eberhard A, Kahlert S, Goede V, Hemmerlein B, Plate KH, Augustin HG. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: Implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res*. 2000;60(5):1388–93. PMID: 10728704.
6. Kinouchi T, Mano M, Matsuoka I, Kodama S, Aoki T, Okamoto M et al. Immature tumor angiogenesis in high-grade and high-stage renal cell carcinoma. *Urology*. 2003;62(4):765–70. DOI: 10.1016/s0090-4295(03)00512-0.
7. Gesundheit B, Klement G, Senger C, Kerbel R, Kieran M, Baruchel S et al. Differences in vasculature between pilocytic and anaplastic astrocytomas of childhood. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41(6):516–26. DOI: 10.1002/mpo.10308.
8. WHO Classification of tumours editorial board. *Digestive system tumours. WHO Classification of tumours*. 5th ed. V. 1. IARC Press: Lyon, 2019. 635 p.
9. JD Brierley, MK Gospodarowicz, C Wittekind (eds.). *TNM Classification of malignant tumours*. 8th ed. Wiley-Blackwell: Oxford, 2017. 272 p.
10. Wong SY, Hynes RO. Lymphatic or hematogenous dissemination: How does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle*. 2006;5(8):812–7. DOI: 10.4161/cc.5.8.2646.
11. Mäkinen T, Norrmén C, Petrova TV. Molecular mechanisms of lymphatic vascular development. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(15):1915–29. DOI: 10.1007/s00018-007-7040-z.
12. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):464–78. DOI: 10.1038/nrm2183.
13. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. 2005;7(4):452–64. DOI: 10.1215/S1152851705000232.
14. Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: Developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011;21(2):193–215. DOI: 10.1016/j.devcel.2011.07.001.
15. Nehals V, Denzer K, Drenckhahn D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res*. 1992;270(3):469–74. DOI: 10.1007/BF00645048.
16. Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ. Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol*. 1990;136(6):1393–405. PMID: 1694058.
17. Kurz H, Lauer D, Papoutsis M, Christ B, Wilting J. Pericytes in experimental MDA-MB231 tumor angiogenesis. *Histochem Cell Biol*. 2002;117(6):527–34. DOI: 10.1007/s00418-002-0388-0.

18. *Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF.* VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:251–75. DOI: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925.
19. *Chang C, Werb Z.* The many faces of metalloproteases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):S37–43. DOI: 10.1016/s0962-8924(01)02122-5.
20. *O’Keeffe MB, Devlin AH, Burns AJ, Gardiner TA, Logan ID, Hirst DG et al.* Investigation of pericytes, hypoxia, and vascularity in bladder tumors: Association with clinical outcomes. *Oncol Res.* 2008;17(3):93–101. DOI: 10.3727/096504008785055530.
21. *Yonenaga Y, Mori A, Onodera H, Yasuda S, Oe H, Fujimoto A et al.* Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology.* 2005;69(2):159–66. DOI: 10.1159/000087840.
22. *Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O’Connell JT, Teng Y et al.* Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer Cell.* 2012;21(1):66–81. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.11.024.
23. *Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, van den Heuvel E et al.* Liver metastasis from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J Pathol.* 2001;195(3):336–42. DOI: 10.1002/path.966.

Информация об авторах

Алексей Сергеевич Константинов – врач-патологоанатом Санкт-Петербургского клинического научно-практического центра специализированных видов медицинской помощи (онкологического), ассистент кафедры патологической анатомии факультета дополнительного профессионального образования Санкт-Петербургского медико-социального института.

Ксения Владимировна Шелехова – доктор медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением Санкт-Петербургского клинического научно-практического центра специализированных видов медицинской помощи (онкологического), старший преподаватель кафедры патологической анатомии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, заведующая кафедрой патологической анатомии факультета дополнительного профессионального образования Санкт-Петербургского медико-социального института.

Author information

Aleksei S. Konstantinov – Pathologist, Pathology Department, Saint-Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncological); Assistant of the Pathology Department, Saint-Petersburg Medico-Social Institute.

<https://orcid.org/0000-0002-1410-4308>

Ksenya V. Shelekhova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, Saint-Petersburg Clinical Scientific and Practical Center of Specialized Types of Medical Care (Oncological); Senior Lecturer, Department of Pathology, S.M. Kirov Military Medical Academy; Head of the Department of Pathology, Saint-Petersburg Medico-Social Institute.

<https://orcid.org/0000-0002-2113-0053>

Иммуногистохимическое исследование эффектов тяжелых металлов на слизистую оболочку тонкой кишки крыс препубертатного возраста

П.А. Елясин, С.В. Залавина, А.Н. Машак, Е.В. Овсянко, С.В. Айдагулова

ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Россия

Введение. Многочисленные исследования патологических эффектов тяжелых металлов проведены на половозрелых экспериментальных животных. Цель работы – изучить маркеры пролиферации и апоптоза в слизистой оболочке тонкой кишки крыс Вистар препубертатного возраста при изолированном и сочетанном воздействии кадмия (Cd) и свинца (Pb) в субтоксичных дозах.

Материалы и методы. Проведено иммуногистохимическое (Ki67 и p53) исследование образцов тонкой кишки 40 самцов крыс Вистар в возрасте 4 недель при изолированном либо сочетанном воздействии *per os* субтоксичных доз кадмия и/или свинца в течение 21 суток.

Результаты. На парафиновых срезах в эпителии тонкой кишки выявлено статистически значимое возрастание экспрессии Ki67 при сочетанном воздействии тяжелых металлов относительно контрольной группы и групп с изолированным воздействием кадмия и свинца. Экспрессия маркера p53 в эпителии крипт и ворсинок тонкой кишки возрастала в опытных группах по сравнению с контрольной с наибольшими показателями при сочетанном воздействии кадмия и свинца. Выявлено статистически значимое уменьшение количества бокаловидных клеток в опытных группах по сравнению с контрольной, наименьшее – при моновоздействии свинца.

Заключение. Токсичные металлы кадмий и свинец индуцировали пролиферативную активность эпителиоцитов слизистой оболочки тонкой кишки, увеличение экспрессии маркера p53 и уменьшение количества бокаловидных клеток.

Ключевые слова: слизистая оболочка тонкой кишки, препубертатные животные, кадмий, свинец, пролиферация, апоптоз, иммуногистохимия

Для корреспонденции: Светлана Владимировна Айдагулова. E-mail: s.aydagulova@gmail.com

Для цитирования: Елясин П.А., Залавина С.В., Машак А.Н., Овсянко Е.В., Айдагулова С.В. Иммуногистохимическое исследование эффектов тяжелых металлов на слизистую оболочку тонкой кишки крыс препубертатного возраста. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):45–52. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.4.45-52.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Новосибирского государственного медицинского университета (НИР № 121061500014-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 12.07.2021. Получена после рецензирования 30.07.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Immunohistochemical study of the effects of heavy metals on the intestinal mucosa in prepubertal rats

P.A. Elyasin, S.V. Zalavina, A.N. Mashak, E.V. Ovsyanko, S.V. Aidagulova

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Introduction. Numerous studies of pathological effects of heavy metals were mostly carried out on adult experimental animals. The aim of this work was to evaluate the markers of proliferation and apoptosis in the mucosa of the small intestine in Wistar prepubertal rats under isolated and combined exposure to cadmium and lead at subtoxic doses.

Materials and methods. We used immunohistochemistry to study Ki67 and p53 expression in the mucosa of the small intestine in 40 male Wistar prepubertal rats aged 4 weeks, the animals having been exposed to isolated or combined *per os* subtoxic cadmium and/or lead doses for 21 days.

Results. In paraffin sections, we observed a significant increase in Ki67 expression in the epithelium of the small intestine in the group of combined exposure to heavy metals compared to Ki67 expression in the control group and other groups with isolated exposure to cadmium or lead. p53 expression in the epithelium of the small intestinal crypts and villi grew in the experimental groups compared to that in the control group, the

highest indices being in the combined exposure group. The number of epithelial goblet cells significantly decreased in all experimental groups compared to that in the control group, the smallest number of goblet cells being observed in isolated exposure to lead compared to that in all other groups.

Conclusion. Heavy toxic metals cadmium and lead induced the proliferative activity of epithelial cells in the small intestinal mucosa combined with an increased p53 expression and reduced number of epithelial goblet cells.

Keywords: small intestinal mucosa, prepubertal rats, cadmium, lead, proliferation, apoptosis, immunohistochemistry

Corresponding author: Svetlana V. Aidagulova. E-mail: s.aidagulova@gmail.com

For citation: Elyasin P.A., Zalavina S.V., Mashak A.N., Ovsyanko E.V., Aidagulova S.V. Immunohistochemical study the effects of heavy metals on the intestinal mucosa in prepubertal rats. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):45–52. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.45-52 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Novosibirsk State Medical University (No. 121061500014-3).

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

Received 12.07.2021. **Received in revised form** 30.07.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Сочетанное воздействие токсичных металлов – кадмия (Cd) и свинца (Pb), накапливающихся в промышленных зонах и крупных городах, приводит к ухудшению здоровья взрослого и детского населения с поражением внутренних органов, в первую очередь печени и почек, а также других органов и систем [1]. Так, у детей повышен риск развития альбуминурии и нарушения скорости клубочковой фильтрации [2]. В эксперименте изолированное воздействие тяжелых металлов в субтоксичных дозах влечет за собой неблагоприятные последствия для всего организма вне зависимости от путей инкорпорации поллютантов [3, 4].

Слизистая оболочка кишечника является входными воротами для многих ксенобиотиков, оказывающих прямое и опосредованное через кишечную микрофлору воздействие на эпителий, специализированный на пищеварении и всасывании [5, 6]. Кадмий при введении *per os* вызывает повреждение слизистой оболочки кишечника из-за воспалительного ответа и дезинтеграции плотных контактов эпителиоцитов, ведущих к усилению проницаемости эпителиального барьера для макромолекул и микроорганизмов [7]. Свинец также может нарушать эпителиальный барьер кишки и способствовать альтерации слизистой оболочки, благодаря чему в энтеропеченочную циркуляцию легко попадают различные лиганды, воспалительные цитокины, а также микробные метаболиты, такие как желчные кислоты и короткоцепочечные жирные кислоты, вызывающие, в свою очередь, системное поражение организма [8, 9]. В современной экологической ситуации избежать вредных выбросов с тяжелыми металлами невозможно, поэтому актуальны вопросы снижения дозовой нагрузки и оздоровления населения (например, использование кишечных сорбентов, пробиотиков и т.п.) [7, 10], что требует более глубокого исследования негативных эффектов так называемых субтоксичных количеств поллютантов.

По данным исследования влияния сульфата кадмия на углеводный обмен 3-, 6- и 18-месячных крыс было установлено повышение концентрации глюкозы и мар-

керов гликолиза в крови животных всех возрастных групп, но наиболее высокие у 3-месячных животных. Сделан вывод, что организм 3-месячных крыс более чувствителен к токсическому воздействию кадмия [11]. Исследование с помощью электронной микроскопии печени препубертатных крыс в условиях 3-недельного воздействия субтоксичных доз кадмия позволило нам выявить у животных опытной группы определенный баланс между альтеративными изменениями гепатоцитов токсического генеза и стереотипными компенсаторными процессами [12].

Многочисленные исследования патологических эффектов тяжелых металлов проведены на половозрелых экспериментальных животных. Наиболее универсальными и широко применяемыми на различных моделях и в клинике являются маркеры пролиферации (Ki67) и апоптоза/повреждения ДНК (p53). Изменение количества слизепродуцирующих клеток может быть косвенным маркером нарушений дифференцировки кишечного эпителия. Целью нашей работы было исследовать иммуногистохимические (ИГХ) маркеры пролиферации и апоптоза в слизистой оболочке тонкой кишки крыс-самцов Вистар препубертатного возраста при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца в субтоксичных дозах.

Материалы и методы

Крысы-самцы Вистар препубертатного возраста (по 10 особей в группе) в возрасте 4 недель в стандартных условиях вивария *per os* в течение 21 суток получали раствор $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 мг/кг (2-я группа), $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 10 мг/кг массы тела (3-я группа) либо сочетание указанных растворов (4-я группа). Контрольная (1-я) группа (10 крыс) получала аналогичный корм и воду *ad libitum* без тяжелых металлов. Работу с животными выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); из эксперимента их выводили путем декапитации под эфирным наркозом. Исследование одобрено комитетом по этике Новосибирского госу-

Динамика изменения массы экспериментальных животных |
Weight changes over time in experimental animals

Возраст животных The age of animals	Масса тела животного, г Animal body mass, g M (SD)			
	Контроль Control	Cd	Pb	Cd + Pb
В начале эксперимента (4 недели) In the beginning of the experiment (4 weeks)	81,31±3,92	84,90±4,33 p=0,052	79,21±6,27 p=0,573	82,12±5,04 p=0,571
В конце эксперимента (7 недель) In the end of the experiment (7 weeks)	152,61±5,06	147,80±5,22 p=0,054	149,10±3,21 p=0,151	150,51±5,28 p=0,241
Прирост массы тела, % Increase in body mass, %	187,70	174,09	188,26	169,10

дарственного медицинского университета (протокол № 135 от 20.05.2021).

Образцы стенки тонкой кишки, иссеченные на расстоянии 1 см от двенадцатиперстной кишки, фиксировали в забуференном формалине, после стандартной гистологической проводки заливали в гистомикс. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для иммуногистохимического исследования применяли первичные антитела к Ki67 и p53, готовые к использованию (ThermoScientific, США) по инструкции производителя. DAB-позитивные ядра клеток эпителия и стромы слизистой оболочки подсчитывали при $\times 630$ (по 50–60 изображений на группу) с помощью микроскопа Axio Scope.A1 (Zeiss, Германия).

Статистический анализ выполняли при помощи программных пакетов Excel MS Office-2016 и SPSS 22.0. Полученные выборки проверяли на нормальность распределения по результатам применения критериев Шапиро–Уилка и Колмогорова–Смирнова [13]. В случае нормального распределения признака данные представлены как среднее (M) и среднеквадратическое отклонение (SD); сравнения проводили с использованием t-критерия Стьюдента для непарных выборок. В случае негауссового распределения параметров использовали U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Описательные данные для количественных признаков представлены в виде медианы (Me), межквартильного интервала (Q1, Q3 – 25-й, 75-й перцентили), минимальный (Min) и максимальные (Max) показатели в выборке. Критический уровень значимости составил 0,05 [14, 15].

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента животные не погибали и при визуальном осмотре не имели признаков патологических изменений, за исключением незначительной влажности и комковатости шерстного покрова. По окончании эксперимента все крысы опытных групп по массе тела не отличались от сверстников контрольной группы (табл.).

При гистологическом исследовании парафиновых срезов тонкой кишки выраженные патологические из-

менения не отмечены, однако обращала на себя внимание гиперплазия лимфоидных клеток в 3-й и 4-й группах: многочисленные мононуклеарные клетки инфильтрировали собственную пластинку слизистой оболочки и формировали крупные лимфоидные узелки без герминативных центров.

Ki67 – ядерный маркер, хорошо экспрессируемый в пролиферирующих опухолевых и неопухолевых клетках, численная оценка которого заменила подсчет митозов при диагностике патологических процессов, а также при стандартизации гистологических исследований [16]. Во время митоза Ki67 необходим для формирования перихромосомного слоя на конденсированных хромосомах для предотвращения их агрегации; в интерфазе Ki67 транслоцируется в маргинальный гетерохроматин – на периферию ядра, а также определяется в структуре ядрышек [17].

В контрольной и опытных группах крыс препубертатного возраста эпителиоциты с мечеными Ki67 ядрами локализовались преимущественно на боковых поверхностях и отчасти на дне крипт (рис. 1).

В эпителии крипт как изолированное, так и сочетанное воздействие кадмия и свинца привело к статистически значимому возрастанию экспрессии маркера пролиферации по сравнению с контрольной группой и при сравнении всех групп между собой. Так, исследование структурных изменений ободочной кишки у мышей-самцов при холодовом стрессе выявило увеличение длины крипт [18], что свидетельствует об усилении пролиферативной активности. В нашем исследовании показатель 3-й группы с моновоздействием свинца был статистически значимо меньше показателя 2-й группы с моновоздействием кадмия (рис. 2).

Для клеток стромы крипт статистически значимые отличия выявлены лишь для 4-й группы, то есть сочетанное воздействие кадмия и свинца способствовало пролиферативной активности клеточных элементов рыхлой соединительной ткани (рис. 3).

В эпителии ворсинок тонкой кишки экспрессия маркера Ki67 была почти в 10 раз меньше, чем в криптах. Показатель DAB-позитивных ядер колебался около нуля в контрольной группе, статистически значимо был

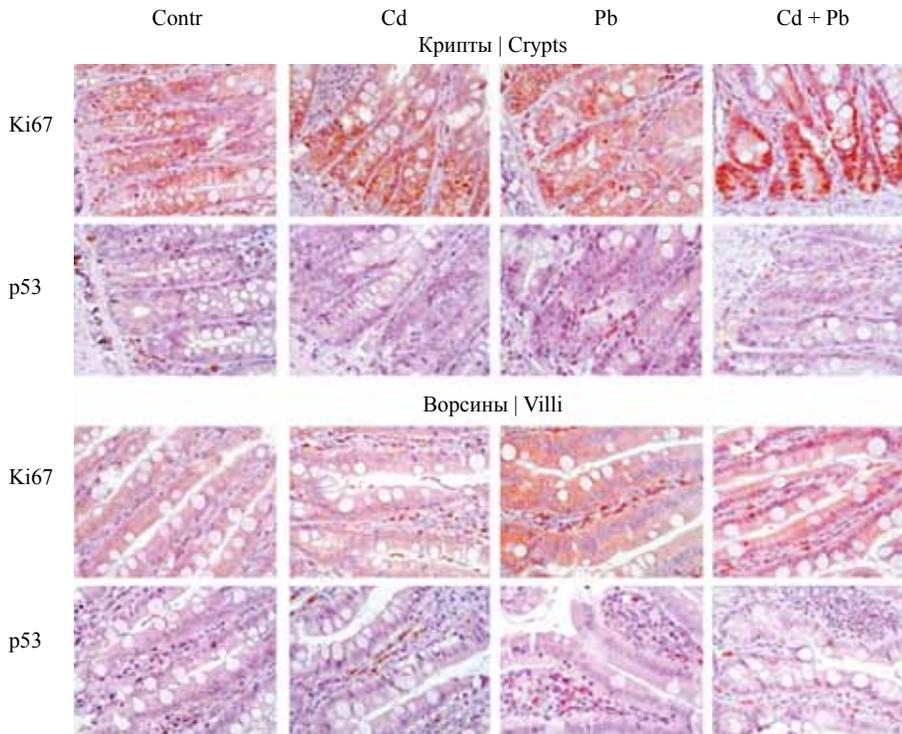


Рис. 1. Сравнительное иммуногистохимическое исследование экспрессии маркеров Ki67 и p53 в слизистой оболочке тонкой кишки препубертатных крыс в условиях изолированного и сочетанного субтоксичного воздействия кадмия (Cd) и свинца (Pb). Докраска ядер гематоксилином Майера, $\times 630$

Fig. 1. Comparative immunohistochemical study of Ki67 and p53 expression in the small intestinal mucosa in prepubertal rats exposed to the isolated and combined subtoxic doses of cadmium (Cd) and lead (Pb). Additional staining of the nuclei with Mayer's hematoxylin, $\times 630$

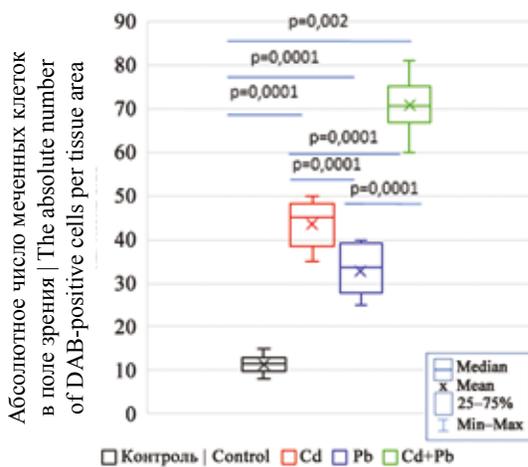


Рис. 2. Экспрессия маркера Ki67 в эпителии крипт тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца

Fig. 2. Ki67 expression in the crypt epithelium in the small intestine in animals under isolated and combined exposure to cadmium and lead

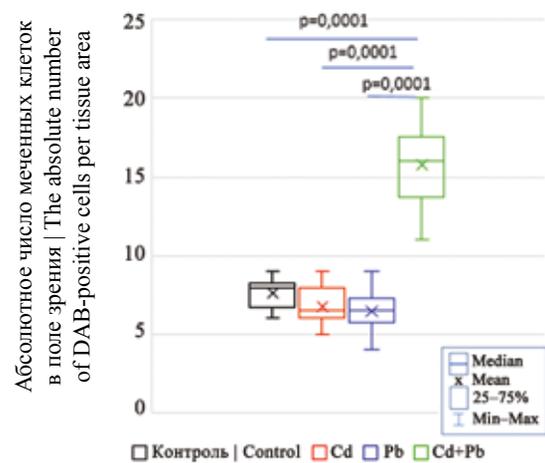


Рис. 3. Экспрессия маркера Ki67 в строме крипт тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца

Fig. 3. Ki67 expression in the crypt stroma in the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead

повышен во 2-й и 3-й группах, и наибольшие значения характеризовали 4-ю группу с сочетанным воздействием тяжелых металлов, с максимальным количеством меченых ядер (рис. 4). Аналогичные изменения выявлены в показателях мечения стромальных клеток ворсинок (рис. 5).

Таким образом, в условиях субтоксичного воздействия тяжелых металлов кадмия и свинца ИГХ исследование экспрессии Ki67 в эпителии и строме тонкой кишки животных в возрасте 7 недель выявило статистически значимое возрастание пролиферативной активности клеточных элементов слизистой оболочки при сочетанном

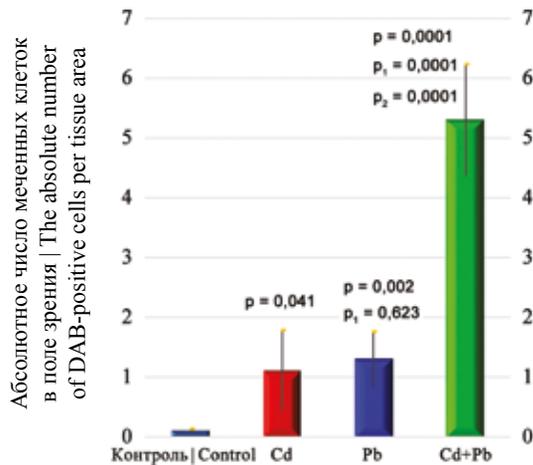


Рис. 4. Экспрессия маркера Ki67 в эпителии ворсинок тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца.

p – отличие от группы контроля; p₁ – отличие от 2-й группы; p₂ – отличие от 3-й группы

Fig. 4. Ki67 expression in the villus epithelium in the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead.

p – difference from the control group; p₁ – difference from group 2; p₂ – difference from group 3

воздействии относительно контрольной группы и групп с изолированным воздействием кадмия, и свинца. При изолированном воздействии каждого из токсинов экспрессия маркера Ki67 в эпителии и строме также возрастала относительно контрольной группы (за исключением показателя стромальных клеток крипт).

Белок p53 функционирует как транскрипционный фактор, вовлеченный в управление клеточным циклом, репарацию ДНК, апоптоз и клеточный стресс. Однако помимо участия в блокировании клеточного роста и в механизме клеточной гибели путем апоптоза активация p53 задействована в модулировании клеточного старения и старения организма как целого. Ген p53 способствует подавлению роста опухолей через регулирование роста и старения клеток, что определяется не только его экспрессией, но и клеточной биологией [19]. Ген белка p53, известный уже более 40 лет, – наиболее часто мутирующий ген во всех типах опухолей, имеющий и проонкогенную, и супрессорную активность, что установлено с помощью антител к его различным изоформам [20].

В нашем эксперименте при исследовании экспрессии белка p53 выявлены однонаправленные изменения лишь для эпителиальных клеток крипт и ворсинок: количество меченых ядер возрастало от 1-й к 4-й группе с разными показателями статистической значимости, при этом в 4-й группе и в криптах, и в ворсинках абсолютное количество DAB-позитивных ядер было наибольшим (рис. 6 и 7).

Экспрессирующие маркер p53 клетки стромы были немногочисленны во всех группах, при этом обращает на себя внимание уменьшение количества меченых кле-

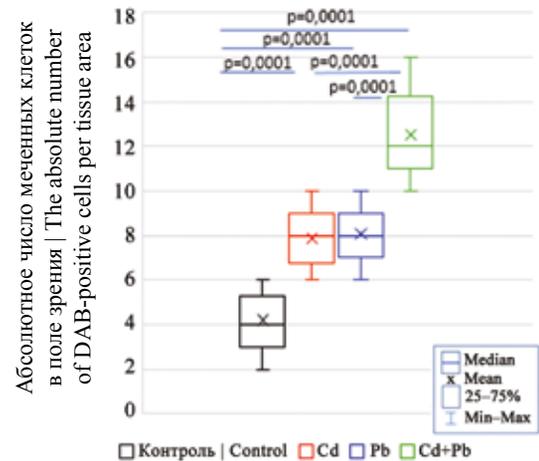


Рис. 5. Экспрессия маркера Ki67 в строме ворсинок тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца

Fig. 5. Ki67 expression in the villus stroma in the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead

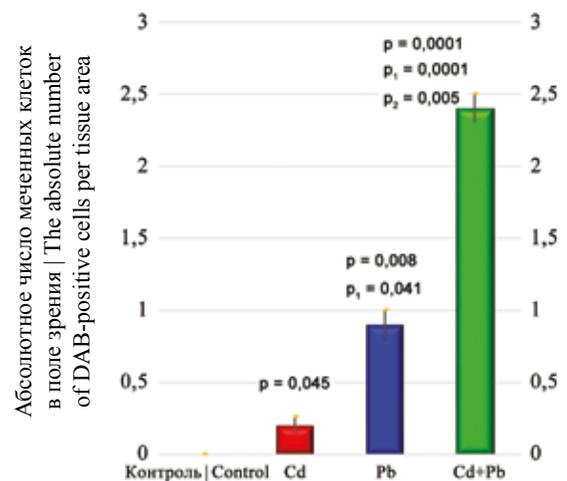


Рис. 6. Экспрессия маркера p53 в эпителии крипт тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца.

p – отличие от группы контроля; p₁ – отличие от 2-й группы; p₂ – отличие от 3-й группы

Fig. 6. p53 expression in the crypt epithelium in the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead.

p – difference from the control group; p₁ – difference from group 2; p₂ – difference from group 3

ток в криптах при моновоздействии кадмия (рис. 8), а также статистически значимое возрастание экспрессии в ворсинках при моновоздействии свинца (рис. 9). Тем не менее, по данным [21], цитрат свинца не оказывал проапоптогического эффекта на культуру фибробластов легких человека.

Таким образом, экспрессия маркера p53 в эпителии крипт и ворсинок тонкой кишки возрастала в опытных группах относительно контрольной с наибольшими показателями при сочетанном воздействии кадмия и свин-

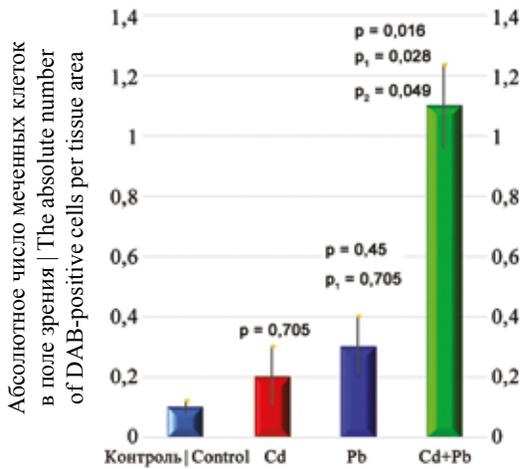


Рис. 7. Экспрессия маркера p53 в эпителии ворсинок тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца.

p – отличие от группы контроля; p₁ – отличие от 2-й группы; p₂ – отличие от 3-й группы

Fig. 7. p53 expression in the villus epithelium in the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead.

p – difference from the control group; p₁ – difference from group 2; p₂ – difference from group 3

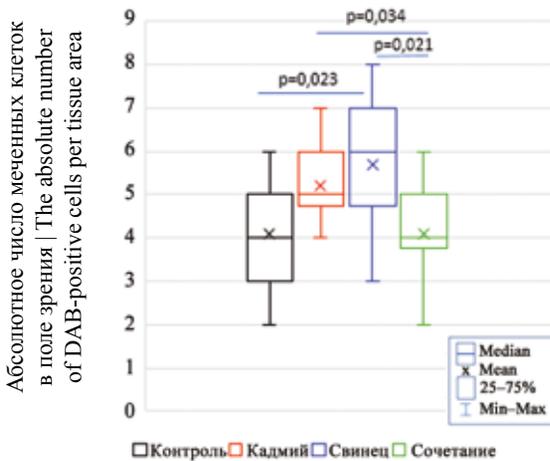


Рис. 9. Экспрессия маркера p53 в строме ворсинок тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца

Fig. 9. p53 expression in the villus stroma in the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead

ца; при этом абсолютные значения оказались почти в 2 раза большими в криптах. Клетки стромы крипт и ворсинок по экспрессии p53 не превышали показатели контрольной группы, за исключением стромальных клеток ворсинок в 3-й группе с моно воздействием свинца.

Исследование защитной реакции слизистой оболочки тонкой кишки на воздействие токсинов оценивали по показателям абсолютной численности слизесодержащих бокаловидных клеток, хорошо визуализируемых на парафиновых срезах (рис. 1). И в криптах, и в вор-

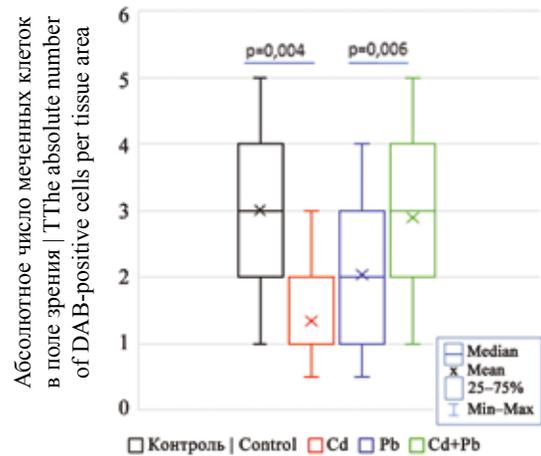


Рис. 8. Экспрессия маркера p53 в строме крипт тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца

Fig. 8. p53 expression in the crypt stroma in the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead

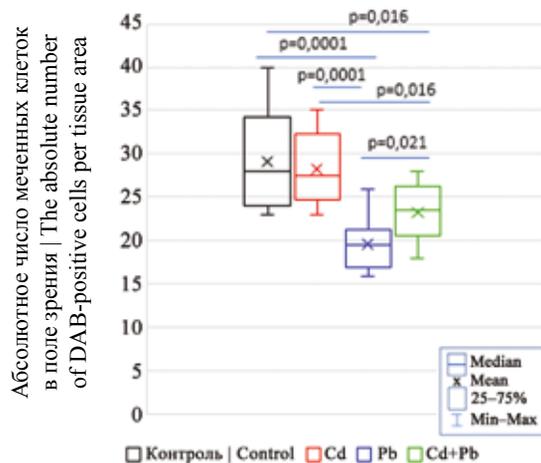


Рис. 10. Количество бокаловидных клеток в криптах тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца

Fig. 10. The number of goblet cells in the crypts of the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead

синках выявлено уменьшение количества бокаловидных клеток по сравнению с контрольной группой, причем изменения были статистически значимыми и аналогичными в обоих компартментах, и наименьшее количество бокаловидных клеток отмечено при моно воздействием свинца относительно остальных групп (рис. 10 и 11).

В целом, исследованные нами ИГХ маркеры пролиферации и апоптоза в слизистой оболочке тонкой кишки крыс-самцов Вистар препубертатного возраста при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца в субтоксичных дозах отражают индукцию пролиферативной активности эпителиоцитов, увеличение экспрессии маркера апоптоза/повреждения ДНК и уменьшение количества бокаловидных клеток, расце-

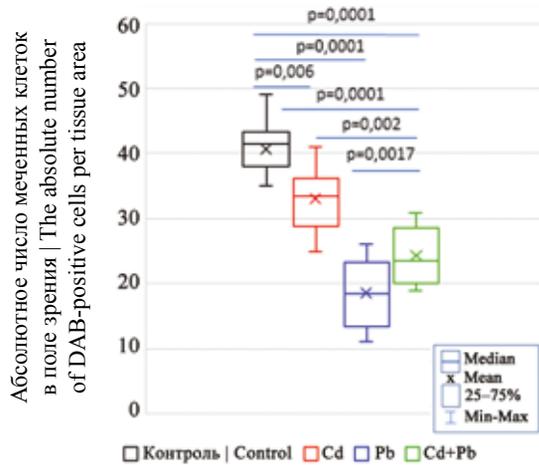


Рис. 11. Количество бокаловидных клеток в ворсинках тонкой кишки при изолированном и сочетанном воздействии кадмия и свинца

Fig. 11. The number of goblet cells in the villi of the small intestine under isolated and combined exposure to cadmium and lead

ниваемое как некоторое нарушение клеточной дифференцировки. Тем не менее это не повлияло на развитие и рост экспериментальных животных (табл.), что может свидетельствовать о достаточно высоких компенсаторных возможностях крыс препубертатного возраста, несмотря на воздействие токсичных металлов с хорошо изученными механизмами алтерации [22–24]. Важно отметить, что тонкая кишка – орган с интенсивным метаболизмом из-за постоянного обновления эпителия, например у жвачных животных, потребляющий от 17 до 25% кислорода [25].

Заключение

У крыс Вистар препубертатного возраста субтоксичное *per os* воздействие свинца и кадмия в течение 21 суток индуцировало пролиферативную активность клеток эпителия слизистой оболочки тонкой кишки, оцениваемую по экспрессии маркера пролиферации Ki67. В эпителии и строме выявлено статистически значимое возрастание экспрессии Ki67 при сочетанном воздействии относительно контрольной группы и групп с изолированным воздействием кадмия и свинца. При изолированном воздействии обоих токсинов экспрессия Ki67 в эпителии и строме также возрастала относительно контрольной группы (за исключением показателя стромальных клеток крипт).

Экспрессия маркера p53 в эпителии крипт и ворсинок тонкой кишки возрастала в опытных группах относительно контрольной с наибольшими показателями при сочетанном воздействии кадмия и свинца; при этом абсолютные значения оказались почти в 2 раза большими в крипах. Стромальные клетки ворсинок в 3-й группе с моновоздействием свинца превышали показатели контрольной группы.

Выявлено статистически значимое уменьшение количества бокаловидных клеток в опытных группах

по сравнению с контрольной, наименьшее количество данных слизепroduцирующих клеток отмечено при моновоздействии свинца относительно всех остальных групп.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.В. Залавина, А.Н. Машак. Сбор и обработка материала – П.А. Елясин, Е.В. Овсянко. Написание текста – П.А. Елясин, С.В. Айдагулова. Редактирование – С.В. Айдагулова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.V. Zalavina, A.N. Mashak. Collected the data and performed the analysis – P.A. Elyasin, E.V. Ovsyanko. Wrote the paper – P.A. Elyasin, S.V. Aidagulova. Edited the manuscript – S.V. Aidagulova.

Литература/References

1. Fujiwara Y, Lee JY, Banno H, Imai S, Tokumoto M, Hasegawa T et al. Cadmium induces iron deficiency anemia through the suppression of iron transport in the duodenum. *Toxicol Lett.* 2020;332:130–9. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.07.005.
2. Weidemann DK, Weaver VM, Fadrowski JJ. Toxic environmental exposures and kidney health in children. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(11):2043–54. DOI: 10.1007/s00467-015-3222-3.
3. Залавина С.В., Склянов Ю.И., Бгатовна Н.П. Структурные изменения миокарда крыс в системе мать–плод в условиях введения кадмия. *Морфология.* 2007;132(6):42–45. Zalavina SV, Sklyanov YuI, Bgatova NP. Structural changes of rat myocardium in the motherfetus system exposed to cadmium. *Morphology.* 2007;132(6):42–45 (In Russ.).
4. Breton J, Le Clère K, Daniel C, Sauty M, Nakab L, Chassat T et al. Chronic ingestion of cadmium and lead alters the bioavailability of essential and heavy metals, gene expression pathways and genotoxicity in mouse intestine. *Arch Toxicol.* 2013;87(10):1787–95. DOI: 10.1007/s00204-013-1032-6.
5. Negroni A, Cucchiara S, Stronati L. Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:250762. DOI: 10.1155/2015/250762.
6. Volk N, Lacy B. Anatomy and physiology of the small bowel. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2017;27(1):1–13. DOI: 10.1016/j.giec.2016.08.001.
7. Tinkov AA, Gritsenko VA, Skalnaya MG, Cherkasov SV, Aaseth J, Skalny AV. Gut as a target for cadmium toxicity. *Environ Pollut.* 2018;235:429–34. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.114.
8. Okumura R, Takeda K. Maintenance of intestinal homeostasis by mucosal barriers. *Inflamm Regen.* 2018;38:5. DOI: 10.1186/s41232-018-0063-z.
9. Liu W, Feng H, Zheng S, Xu S, Massey IY, Zhang C et al. Pb toxicity on gut physiology and microbiota. *Front Physiol.* 2021;12:574913. DOI: 10.3389/fphys.2021.574913.
10. Tomaszewska E, Winiarska-Mieczan A, Dobrowolski P. Hematological and serum biochemical parameters of blood in adolescent rats and histomorphological changes in the jejunal epithelium and liver after chronic exposure to cadmium and lead in the case of supplementation with green tea vs black, red or white tea. *Exp Toxicol Pathol.* 2015;67(5–6):331–9. DOI: 10.1016/j.etp.2015.02.005.

11. *Shepel'ova IA, Derkach IaA, Mel'nykova NM.* Effect of cadmium sulphate on the metabolism of carbohydrates in organism of rats of different ages. *Ukr Biokhim Zh* (1999). 2007;79(2):92–6. PMID: 18030756.
12. *Елясин П.А., Залавина С.В., Машак А.Н., Равилова Ю.Р., Первойкин Д.М., Надеев А.П. и др.* Классическая долячка печени как модель исследования воздействия субтоксичных доз кадмия. *Экология человека.* 2018;1:47–52. DOI: 10.33396/1728-0869-2018-1-47-52.
Elyasin PA, Zalavina SV, Mashak AN, Ravilova YuR, Pervoykin DM, Nadeev AP et al. Classic liver lobule as a model for studying the influence of cadmium subtoxic doses. *Human ecology.* 2018;1:47–52 (In Russ.). DOI: 10.33396/1728-0869-2018-1-47-52.
13. *Наркевич А.Н., Виноградов К.А., Гржибовский А.М.* Множественные сравнения в биомедицинских исследованиях: проблема и способы решения. *Экология человека.* 2020;10:55–64. DOI: 10.33396/1728-0869-2020-10-55-64.
Narkevich AN, Vinogradov KA, Grjibovski AM. Multiple comparisons in biomedical research: The problem and solutions. *Human Ecology.* 2020;10: 55–64 (In Russ.). DOI: 10.33396/1728-0869-2020-10-55-64.
14. *Зайцев В.М., Савельев С.И.* Практическая медицинская статистика. Учебное пособие. Тамбов: Цифра, 2013. 579 с.
Zaitsev VM, Saveliyev SI. Practical medical statistics. Study guide. Tambov: Tsifra, 2013. 579 p. (In Russ.).
15. *Петри А., Сэбин К.* Наглядная медицинская статистика. Учебное пособие для вузов. 3-е изд. Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2019. 216 с.
Petri A, Sabin K. Visual medical statistics. Manual for graduate students. 3rd ed. Moscow: GEOTAR-Media, 2019. 216 p. (In Russ.).
16. *Klöpffel G, La Rosa S.* Ki67 labeling index: Assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch.* 2018;472(3):341–9. DOI: 10.1007/s00428-017-2258-0.
17. *Sun X, Kaufman PD.* Ki-67: More than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127(2):175–86. DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8.
18. *Золотова Н.А., Цветков И.С., Хочанский Д.Н., Джалилова Д.Ш., Косырева А.М., Михайлова А.Л. и др.* Морфофункциональные изменения ободочной кишки и иммунные реакции при холодном стрессе у самцов и самок мышей C57BL/6. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2020;9(4):50–64. DOI: 10.31088/CEM2020.9.4.50-64.
Zolotova NA, Tsvetkov IS, Khochanskiy DN, Dzhaliylova DS, Kosyreva AM, Mikhailova AL et al. Morphofunctional changes in the colon and immune responses during cold stress in male and female C57BL/6 mice. *Clinical and experimental morphology.* 2020;9(4):50–64 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.4.50-64.
19. *Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G.* Senescence and aging: The critical roles of p53. *Oncogene.* 2013;32(43):5129–43. DOI: 10.1038/onc.2012.640.
20. *Sabapathy K, Lane DP.* Understanding p53 functions through p53 antibodies. *J Mol Cell Biol.* 2019;11(4):317–29. DOI: 10.1093/jmcb/mjz010.
21. *Kim JY, An MJ, Shin GS, Lee HM, Kim MJ, Kim CH et al.* Mercury chloride but not lead acetate causes apoptotic cell death in human lung fibroblast MRC5 cells via regulation of cell cycle progression. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2494. DOI: 10.3390/ijms22052494.
22. *Barbosa F Jr, Farina M, Viegas S, Kempinas Wde G.* Toxicology of metals and metalloids. *Biomed Res Int.* 2014;2014:253738. DOI: 10.1155/2014/253738.
23. *Metryka E, Chibowska K, Gutowska I, Falkowska A, Kupnicka P, Barczak K et al.* Lead (Pb) exposure enhances expression of factors associated with inflammation. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6):1813. DOI: 10.3390/ijms19061813.
24. *Balali-Mood M, Naseri K, Tahergerabi Z, Khazdair MR, Sadeghi M.* Toxic mechanisms of five heavy metals: Mercury, lead, chromium, cadmium, and arsenic. *Front Pharmacol.* 2021;12:643972. DOI: 10.3389/fphar.2021.643972.
25. *Montanholi Y, Fontoura A, Swanson K, Coomber B, Yamashiro S, Miller S.* Small intestine histomorphometry of beef cattle with divergent feed efficiency. *Acta Vet Scand.* 2013;55(1):9. DOI: 10.1186/1751-0147-55-9.

Информация об авторах

Павел Александрович Елясин – кандидат медицинских наук, доцент кафедры анатомии человека Новосибирского государственного медицинского университета.

Светлана Васильевна Залавина – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии Новосибирского государственного медицинского университета.

Александр Николаевич Машак – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой анатомии человека Новосибирского государственного медицинского университета.

Елена Владимировна Овсянко – доктор медицинских наук, профессор кафедры анатомии человека Новосибирского государственного медицинского университета.

Светлана Владимировна Айдагулова – доктор биологических наук, заведующая лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции Центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского государственного медицинского университета.

Author information

Pavel A. Elyasin – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Human Anatomy Department, Novosibirsk State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0003-2570-367X>

Svetlana V. Zalavina – Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Histology, Embryology and Cytology, Novosibirsk State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0003-3405-5993>

Alexander N. Mashak – Dr. Sci. (Med.), Head of the Human Anatomy Department, Novosibirsk State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0003-4450-8300>

Elena V. Ovsyanko – Dr. Sci. (Med.), Professor, Human Anatomy Department, Novosibirsk State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-9282-7616>

Svetlana V. Aidagulova – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Cellular Biology and Fundamental Basis of Reproduction, Central Scientific Laboratory, Novosibirsk State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-7124-1969>

© Gasparyan H.V., Buloyan S.A., Pogosyan A.E., Arshakyan L.M., Harutyunyan L.S., Paronikyan R.G., Nazaryan I.M., Dashyan Sh.Sh., Paronikyan E.G., 2021

DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.53-62

Pathological investigation of neuroprotective activity of new derivatives of fused pyrazolyl-thienopyridines in Corazol-induced seizures

H.V. Gasparyan, S.A. Buloyan, A.E. Pogosyan, L.M. Arshakyan, L.S. Harutyunyan, R.G. Paronikyan, I.M. Nazaryan, Sh.Sh. Dashyan, E.G. Paronikyan

Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia

Introduction. Seizures provoke several morphological alterations in the brain structures. These alterations are primarily located in the hippocampal CA1 region and the entorhinal cortex. Recurrent seizures are common in patients with epilepsy. Therapeutic options for this disease are very limited and most of them are aimed at relieving symptoms. In most cases, to treat epilepsy, anti-seizure drugs are used. Nevertheless, one-third of affected individuals have resistance to them. Thus, the study of new effective agents that can prevent epileptogenesis is still an ongoing challenge. In this work, we aimed to study the neuroprotective activity of several new derivatives of tricyclic pyrazolyl substituted thieno[2,3-c]isoquinolins (SHD-89 and SHD-91) and pyrano[4,3-d]thieno[2,3-b]pyridines (SHD-78 and SHD-85) as potential anti-seizure drugs.

Materials and methods. The study was performed on mice (n=60). The action of compounds SHD-78, SHD-85, SHD-89, and SHD-91 was tested in seizures with and without Corazol administration. Histopathological examinations were performed in the hippocampus and the entorhinal cortex in different experimental groups.

Results. The study showed that under the action of SHD-89 and SHD-78, there was a reduction in the number of neurons and activation of glial cells in examined regions of the brain. SHD-91 caused severe neurodegenerative effects with changes in the brain structure. In contrast, under the action of SHD-85, the number of neurons was higher and with lower activation of glial cells.

Conclusion. Studies showed that among the tested compounds SHD-85 possessed moderate neuroprotective activity and reduced gliosis and neuronal loss induced by Corazol.

Keywords: anti-seizure drugs, pyrazolylthienopyridines, hippocampus, entorhinal cortex, histopathological examination

Corresponding author: Hrachik V. Gasparyan. E-mail: hrachikgasparyan@mail.ru

For citation: Gasparyan H.V., Buloyan S.A., Pogosyan A.E., Arshakyan L.M., Harutyunyan L.S., Paronikyan R.G., Nazaryan I.M., Dashyan Sh.Sh., Paronikyan E.G. Pathomorphological investigation of neuroprotective activity of new derivatives of fused pyrazolyl-thienopyridines in Corazol-induced seizures. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):53–62. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.53-62.

Funding. The study was supported by the RA MES State Committee of Science, Project No. 18T-1D066.

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

Received 30.08.2021. **Received in revised form** 15.09.2021. **Accepted** 22.09.2021.

УДК 615.213, 611.018.8, 616-018

Патоморфологическое исследование нейропротекторной активности новых производных конденсированных пиразолил-тиенопиридинов при судорогах, индуцированных коразолом

Г.В. Гаспарян, С.А. Булоян, А.Е. Погосян, Л.М. Аршакаян, Л.С. Арутюнян, Р.Г. Пароникян, И.М. Назарян, Ш.Ш. Дашиян, Е.Г. Пароникян

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

Введение. Судороги вызывают несколько морфологических изменений в структуре мозга. Эти изменения в основном локализируются в области CA1 гиппокампа и в энторинальной коре. Рецидивирующие судороги часто встречаются у пациентов с эпилепсией. Варианты лечения этого заболевания очень

ограничены, и большинство из них нацелено на облегчение его симптомов. Во многих случаях для терапии эпилепсии используют противосудорожные препараты. Тем не менее одна треть пациентов с этим состоянием резистентна к противосудорожным препаратам. Таким образом, изучение новых эффективных агентов, которые могут предотвратить эпилептогенез или предотвратить судороги, по-прежнему остается сложной задачей в медицине. В данной работе мы изучили нейропротекторную и противосудорожную активность нескольких новых производных трициклических пиразолилзамещенных тиено[2,3-с]изохинолинов (SHD-89 и SHD-91) и пирано[4,3-d]тиено[2,3-b]пиридинов (SHD-78 и SHD-85) в качестве потенциальных противосудорожных препаратов.

Материалы и методы. Исследования проводились на белых беспородных мышах. Действие этих соединений (SHD-89, SHD-91, SHD-78, SHD-85) было протестировано при судорогах, вызванных коразолом, а также без действия хемоконвульсанта. Гистопатологические исследования проведены в гиппокампе и энторинальной коре головного мозга, в разных экспериментальных группах.

Результаты. Исследования показали, что под действием SHD-89 и SHD-78 происходят уменьшение количества нейронов и активация глиальных клеток в исследуемых областях мозга, тогда как соединение SHD-91 оказывает тяжелые нейродегенеративные эффекты на мозговую ткань, с изменением структуры мозга. Напротив, под действием SHD-85 количество нейронов было выше по сравнению с этим показателем в других экспериментальных группах, с меньшей активацией глиальных клеток.

Заключение. Исследования показали, что среди всех изученных соединений (SHD-89, SHD-91, SHD-78, SHD-85) SHD-85 обладает умеренной нейропротекторной активностью и предотвращает глиоз и потерю нейронов, вызванную коразолом.

Ключевые слова: противосудорожные препараты, пиразолилтиенопиридины, гиппокамп, энторинальная кора, гистопатологическое исследование

Для корреспонденции: Грачик Ваграмович Гаспарян. E-mail: hrachikgasparyan@mail.ru

Для цитирования: Гаспарян Г.В., Булоян С.А., Погосян А.Е., Аршакян Л.М., Арутюнян Л.С., Пароникян Р.Г., Назарян И.М., Дашян Ш.Ш., Пароникян Е.Г. Патоморфологическое исследование нейропротекторной активности новых производных конденсированных пиразолил-тиенопиридинов при судорогах, индуцированных коразолом. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):53–62 (англ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.53-62.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного комитета науки МОН РА в рамках исследовательского проекта № 18Т-1D066.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 30.08.2021. Получена после рецензирования 15.09.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Introduction

Seizure is a paroxysmal alteration of brain function caused by hypersynchronous discharges of CNS neurons. Seizures are divided into three categories: generalized, focal, and status epilepticus (SE) [1]. Epilepsy is one of the most common neurological disorders that includes a number of different syndromes and is characterized by recurrent unprovoked seizures [2].

Studies on different animal models of epilepsy and the human brain with temporal lobe epilepsy (TLE) showed that epileptic seizures induced neuronal loss of pyramidal cells of the hippocampal CA1 region and reorganization of the granular cells of the dentate gyrus that was accompanied by astrocytic hypertrophy and proliferation [3, 4]. Moreover, patients with mesial TLE show histopathological alterations in the entorhinal cortex and amygdala, which accompany extensive gliosis [5, 6].

Therapeutic options for seizure syndrome are very limited and most of them are aimed at relieving its symptoms rather than preventing epileptogenesis [7]. The main treatment for epilepsy is still considered to be anti-seizure drugs (ASDs), yet at least one-third of affected individuals continue to experience spontaneous recurrent seizures.

These patients not only have continuous seizure activity but are also at risk of developing cognitive impairment and comorbid mental health problems [8]. Thus, a new effective agent that can prevent epileptogenesis or cure convulsions during any type of seizures with mild side effects is still an ongoing challenge. For the same reason, it is very important to search for original drugs in new series of chemical compounds, in particular, among the derivatives of new heterocyclic systems.

A number of heterocyclic derivatives containing nitrogen atoms serve as universal structural units for the synthesis of complex heterocyclic systems. Pyridine is the parent ring system of a large number of naturally occurring products and important pharmaceuticals. The derivatives of condensed pyridines are of interest as biologically active substances. Thus, alkaloids of the pyrano[3,4-c]pyridine series extracted from plants exert various effects: hypotensive, anticonvulsant, antipsychotic, anti-inflammatory, and hypothermic [9]. Furthermore, pyrano[3,4-c]pyridine derivatives are the starting compounds for the synthesis of indole alkaloids, in particular, camptothecin exhibiting antitumor activity [10, 11]. The pyrazole nucleus attracted great attention due to the use of this ring system as an

important core structure in many drug substances. A large number of substituted pyrazolopyridine derivatives were found to possess diverse biological properties, such as antimicrobial [12, 13], antiviral [14], antileishmanial [15], and anti-inflammatory [16] non-anionic antiplatelet agents [17], as well as psychotropic effects [18].

This study continues our research on the synthesis and evaluation of the neurotropic activity of fused heterocyclic systems containing nitrogen atoms [19, 20]. New derivatives of tricyclic pyrazolyl substituted thieno[2,3-*c*]isoquinolins (SHD-89 and SHD-91) and pyrano[4,3-*d*]thieno[2,3-*b*]pyridines (SHD-78 and SHD-85) were synthesized in the Laboratory of the synthesis of psychotropic compounds. In this work, we aimed to study their neuroprotective activity in Corazol-induced seizure models as potential ASDs.

Materials and methods

Chemical compounds. We studied anticonvulsant and neuroprotective properties of the following compounds:

- SHD-89: thieno[2,3-*c*]isoquinolin-1-amine-*N*-phenyl
- SHD-78: pyrano[4,3-*d*]thieno[2,3-*b*]pyridin-1-amine-*N*-phenethyl
- SHD-91: thieno[2,3-*c*]isoquinolin-1-amine- *N*-(2,4-dimethoxyphenyl)
- SHD-85: pyrano[4,3-*d*]thieno[2,3-*b*]pyridin-1-amine-*N*-(3,4-dichlorophenyl)

Design of a Corazol-induced animal model. For histopathological evaluation of the brain tissue, we conducted experiments on 60 male and female mice weighing 18–24 g. All novel compounds were administered via intraperitoneal injection at a 50-mg/kg dose for 3 successive days. To model the seizures, 1 hour after the injections, all animals from the control group and experimental groups 1, 3, 5, and 7 received the same dose of Corazol via subcutaneous injection.

The animals were divided into 10 groups ($n=6$ in each group):

- A. Intact group: normal animals
- B. Control group: Corazol-treated group
- C. Experimental group 1: treated with Corazol and compound SHD-89
- D. Experimental group 2: treated with compound SHD-89
- E. Experimental group 3: treated with Corazol and compound SHD-78
- F. Experimental group 4: treated with compound SHD-78
- G. Experimental group 5: treated with Corazol and compound SHD-91
- H. Experimental group 6: treated with compound SHD-91
- I. Experimental group 7: treated with Corazol and compound SHD-85
- J. Experimental group 8: treated with compound SHD-85

All experiments were performed according to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament. The animals were kept in a room at $21\pm 2^\circ\text{C}$ and a 12-hour light/dark cycle and given *ad libitum* access to food and water.

Histopathological examination. After day 3 of the experiment, the mice were sacrificed under anesthesia

(40 mg/kg Nembutal Sodium via intraperitoneal injection). Brain tissue was collected and stored in a 10% neutral buffered formalin. The samples were dehydrated and embedded in paraffin; 3–5- μm microtome sections were prepared. Brain tissues were cut in coronal sections and stained with Nissl stain.

For morphometric analysis, ten samples of the hippocampal CA1 region and entorhinal cortex were photographed at 400 \times magnification using AmScope MU500 5MP USB2.0 Microscope Digital Camera & Software (USA). In the CA1 region, we counted normal neurons with a light nucleus. In the entorhinal cortex, we counted neurons of layers II and III, microglial cells, and astrocytes. All cells were counted with ImageJ 1.x software using Cell Counter Plugin. All data were expressed as means \pm SD. Statistical data analysis was performed using IBM SPSS Statistics 22.0.0 software with one-way ANOVA, followed by Bonferroni post hoc test.

Results and discussion

Although the source of convulsions is located in other brain areas, the literature review showed that in various animal models of epilepsy, such as TLE and Pilocarpine and Kainate treated models, the main pathological changes (e.g., neurolysis and gliosis) were observed in the hippocampus, entorhinal cortex, amygdala, and thalamus [5, 7, 21–24]. Our observations showed that the main regions which had undergone pathological alterations after Corazol treatment were the hippocampus and entorhinal cortex. Consequently, we made a pathological evaluation of these regions after Corazol-induced seizures and treated them with different newly synthesized compounds to investigate their neuroprotective effects. Corazol had convulsant effects in animal models due to the inhibition of chlorine channels in the GABAA-receptor complex and the impairment of the GABAergic inhibitory mechanisms [25].

Histological and pathological observations showed that the hippocampi of the intact animals had a normal morphological appearance, i.e., they showed no signs of sclerosis, chromatolysis, or shrinkage of neurons. Pyramidal cells in the CA1 region were neatly arranged with clear nuclei and visible nucleoli, and the cytoplasm had a normal distribution of Nissl bodies (Fig. 1A). The average neuron count in the CA1 region was 101.3 ± 8.96 cells in the microscopic field (Fig. 2).

Patients with TLE are known to have cornu ammonis (CA) sclerosis as the most common pathological lesion. The lesion is characterized by severe loss of pyramidal neurons and gliosis in the CA1 region, prosubiculum, and CA3 region [26], with both being less severe in the CA3 region. Compared to the hippocampi of the animals in the intact group, the hippocampi of the animals treated with Corazol had prominent chromatolysis of neurons. Neurons were absent in all regions of the hippocampi, and the CA1 region showed sclerosis (Fig. 1B). The count of pyramidal cells drastically decreased compared to that in the intact animals and was 44.7 ± 2.87 cells in the microscopic field

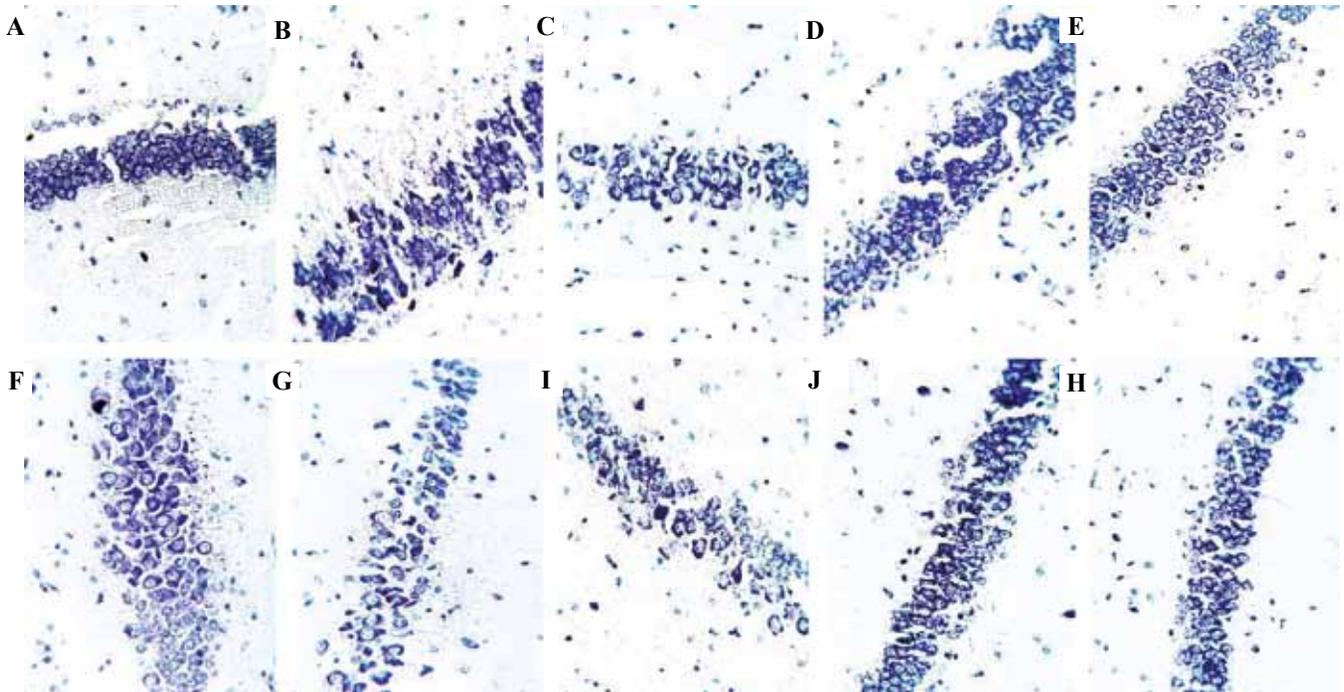


Fig. 1. Photomicrographs of the hippocampus with Nissl stain $\times 400$.

A – intact; B – control animals treated with Corazol; C – animals treated with Corazol and SHD-89; D – animals treated with SHD-89; E – animals treated with Corazol and SHD-78; F – animals treated with SHD-78; G – animals treated with Corazol and SHD-91; H – animals treated with SHD-91; I – animals treated with Corazol and SHD-85; J – animals treated with SHD-85

Рис. 1. Микрофотографии гиппокампа, окрашивание по Нисслю $\times 400$.

A – интактная группа, B – контрольные животные, получавшие коразол, C – животные, получавшие коразол и SHD-89, D – животные, получавшие SHD-89, E – животные, получавшие коразол и SHD-78, F – животные, получавшие SHD-78, G – животные, получавшие коразол и SHD-91, H – животные, получавшие SHD-91, I – животные, получавшие коразол и SHD-85, J – животные, получавшие SHD-85

(Fig. 2). There was also a prominent activation of astrocytes and microglial cells. In the CA3 region, there was gliosis along with many dark neurons with indistinct nuclei. The vessels near the CA3 region and in the dorsal part of the third ventricle were congested, and the ventricles were collapsed.

In comparison with the hippocampi of the animals in the intact group, those in experimental group 1 showed increased neurodegenerative signs. The number of neurons decreased significantly, especially in the CA1 region (Fig. 1C). Neuron count was 46.6 ± 4.81 cells in the microscopic field, which was not statistically different from that of the control group (Fig. 2).

In the hippocampus, there was noticeable activation of microglia. Due to hemodynamic disbalance, delicate vessels of the choroid plexus were disrupted, resulting in the formation of hematoma in the dorsal part of the third ventricle. In addition, there was congestion of the vessels near the CA3 region. High doses of antiepileptic drugs were shown to cause a high risk of stroke [27]. In experimental models of epilepsy, there were various lesions and changes in the permeability of the blood-brain barrier that is characterized by the leakage of various blood components into the brain [28]. Consequently, in our experiments, intracranial hemorrhages can be due to the high dosage of SHD-89 in

a combination with Corazol that leads to changes in the permeability of blood vessels.

In experimental group 2, no noticeable morphological alterations in the hippocampal region were detected. There was a slight activation of astrocytes and hyperchromasia

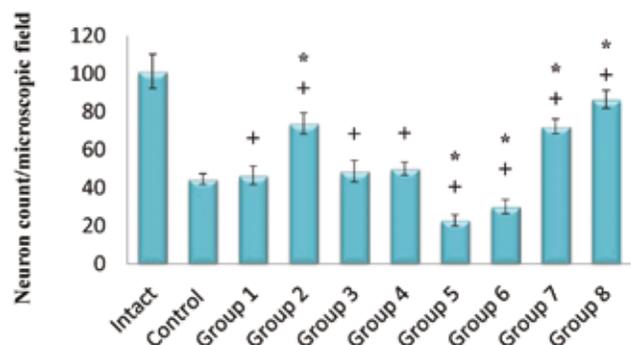


Fig. 2. The count of neuronal cells in the CA1 region. Data are expressed as Mean \pm SD; * $p < 0.05$ compared to the control group; + $p < 0.05$ compared to the intact group

Рис. 2. Подсчет нейрональных клеток в области CA1. Данные выражены как среднее \pm стандартное отклонение; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; + $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой

of the neurons of the CA3 and CA1 regions. In a higher magnification, the neurons showed darker staining compared to those of the intact animals, but their nuclei were clear with visible nucleoli (Fig. 1D). The pyramidal cell count was 73.9 ± 5.55 , which is statistically higher compared to that in the control animals [$p < 0.05$] (Fig. 2). These data indicate that compound SHD-89 has a synergic effect on the chemoculvulsant agent.

We observed very similar changes in the hippocampi of animals from experimental group 3. There were hyperchromatic dark neurons and activation of astrocytes. In the CA1 region, the neurons were hyperchromatic and there was chromatolysis of Nissl bodies and microgliosis (Fig. 1E). The neuronal cell count also decreased (48.8 ± 5.63) and was not statistically different from that in the control animals (Fig. 2).

The blood vessels close to the dentate gyrus were congested. There was noticeable congestion of vessels in the choroid plexus and hemorrhage to the dorsal part of the third ventricle. Along with the above-mentioned morphological changes, there was also atrophy of the medial habenula. Multiple studies have shown that chronic stress induces bilateral atrophy of the medial habenula and the lateral habenula [29]. Thus, the combination of the chemoconvulsant agent and compound SHD-78 result in severe stress response in mice, which leads to the atrophy of this region.

Experimental group 4 showed similar morphological changes: astrogliosis, microgliosis, hyperchromasia of the neurons, and congested blood vessels. In the CA1 region, the number of neurons was reduced and the preserved neurons were mostly chromatolytic. Besides, we observed there few dark pyknotic neurons (Fig. 1F). The neuron count was 50.1 ± 3.35 cells in the microscopic field, which was not statistically different from that in the control group (Fig. 2). The congestions in different regions of the brain indicate that compound SHD-78 results in a change in permeability of the blood-brain barrier.

In the brain tissue of animals from experimental group 5, there was a prominent activation and proliferation of astroglia, which resulted in the structural change of the hippocampus, especially in the CA3 region. The number of pyramidal cells of the CA1 region significantly reduced (Fig. 1G). The neuron count was 23 ± 3.06 cells, which was statistically lower compared to that in the control animals (Fig. 2). As a result of structural changes in the hippocampus, the dorsal part of the third ventricle had shrinkage, and delicate vessels of the choroid plexus were disrupted.

Morphological changes in experimental group 6 were almost the same as those in experimental group 5. There was prominent astrogliosis and hyperchromatic dark neurons in the dentate gyrus and CA3 regions. In the CA1 region, there was a reduction in the number of cells and pyknosis (Fig. 1H). The count of pyramidal cells was 30.2 ± 3.68 , which was also significantly lower compared to that in the control animals (Fig. 2).

The hippocampi of animals from experimental group 6 resembled those of the intact animals. There was mild gliosis, and only a few cells underwent pyknosis and chromatolysis. The number of pyramidal cells of the CA1 region was not visibly reduced, although there was evidence of chromatolysis of Nissl bodies in some nerve cells (Fig. 1I). The count of neurons was 72.3 ± 3.89 cells, which was statistically higher compared to that in the control animals but lower than that in the intact animals (Fig. 2).

The animals from experimental group 8 had minor changes in the hippocampal region of the brain as well. The neurons of the CA1 region were mostly neatly arranged with clear nuclei and visible nucleoli, and only few of them had chromatolysis of Nissl bodies (Fig. 1J). There was mild gliosis and a slight reduction in the number of neurons (86.7 ± 4.74) that was significantly higher than that in the control group but slightly lower than that in the intact group (Fig. 2).

Overall, the animals from experimental group 8 did not show significant pathological changes in the hippocampal region with and without the chemoconvulsant agent.

Another brain region of particular interest involved in epileptic seizures is the entorhinal cortex because it is a part of the hippocampal memory system and constitutes the major gateway between hippocampal formation and the neocortex [30, 31]. Numerous studies have demonstrated that in patients with TLE, there is atrophy not only of the hippocampus but also of the entorhinal cortex. Additionally, in these patients, quantified significant interactions between the hippocampus and entorhinal cortex were proven to prevent seizure onset [32].

The entorhinal cortex of the normal brain consists of six layers with different types of neurons. Histological observation of the intact brain showed that in layer I of the entorhinal cortex there were few cells, while layer II consisted of islets of round neurons, which were hyperchromatic and had prominent nucleoli (Fig. 3A). The morphometric analysis showed the number of neurons in this layer to be 72.5 ± 6.22 cells in the microscopic field (Fig. 4). The cells of this layer project primarily to the dentate gyrus [33].

In layer III, there were medium size pyramidal cells with clear oval nuclei (Fig. 3A). The cells of this layer project predominantly to CA1 and CA3 regions [34]. The number of these cells was 32.6 ± 4.03 (Fig. 4). Other three layers consist of large pyramidal cells and neurons of different sizes and shapes. In all layers, there was a normal number of glial cells. The morphometric analysis showed the number of microglial cells of the entorhinal cortex to be 9.6 ± 1.58 in the microscopic field and that of astrocytes to be 9.6 ± 1.27 (Fig. 5).

Astrocytes regulate brain function and are characterized by tight interaction with neurons. In physiological conditions, they play an important role in neuronal metabolism and the synthesis of neurotransmitters. On the other hand, activated reactive astrocytes are characteristic of neurodegenerative diseases. In pathological conditions, astrocytes release several pro-inflammatory mediators,

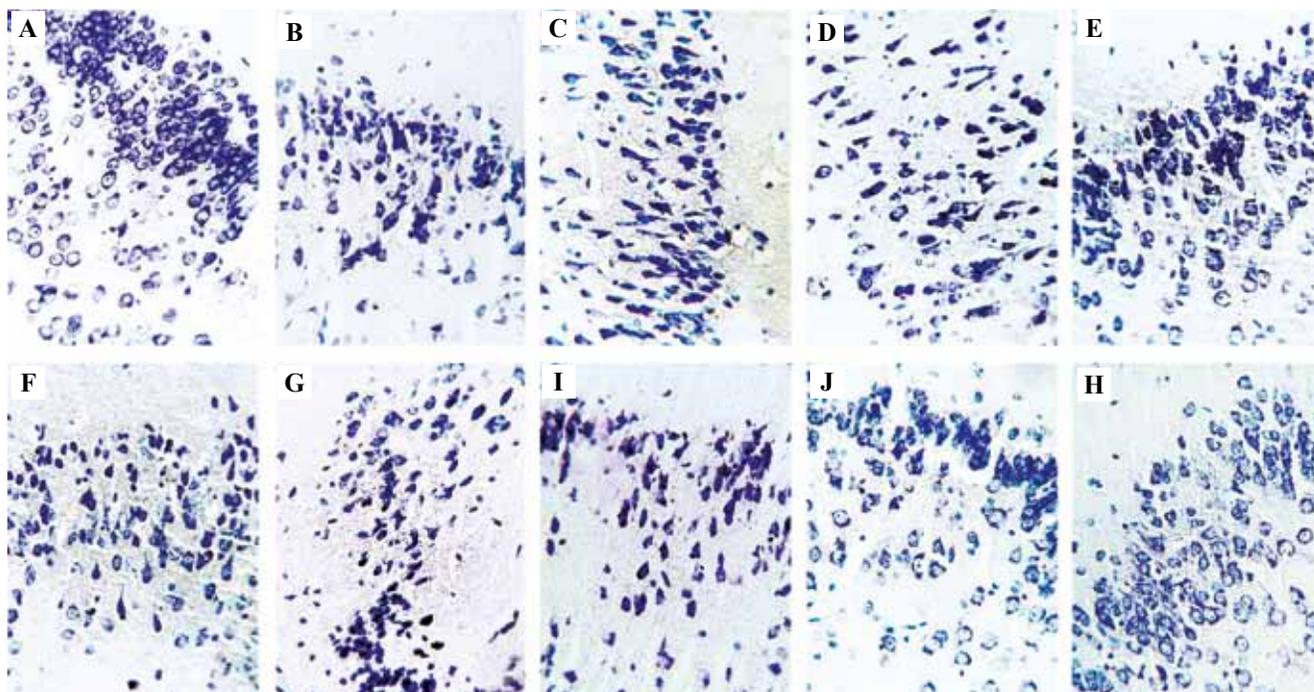


Fig. 3. Photomicrographs of the entorhinal cortex with Nissl stain $\times 400$.

A – intact; B – control animals treated with Corazol; C – animals treated with Corazol and SHD-89; D – animals treated with SHD-89; E – animals treated with Corazol and SHD-78; F – animals treated with SHD-78; G – animals treated with Corazol and SHD-91; H – animals treated with SHD-91; I – animals treated with Corazol and SHD-85; J – animals treated with SHD-85

Рис. 3. Микрофотографии энторинальной коры, окрашивание по Ниссли $\times 400$.

A – интактная группа, B – контрольные животные, получавшие коразол, C – животные, получавшие коразол и SHD-89, D – животные, получавшие SHD-89, E – животные, получавшие коразол и SHD-78, F – животные, получавшие SHD-78, G – животные, получавшие коразол и SHD-91, H – животные, получавшие SHD-91, I – животные, получавшие коразол и SHD-85, J – животные, получавшие SHD-85

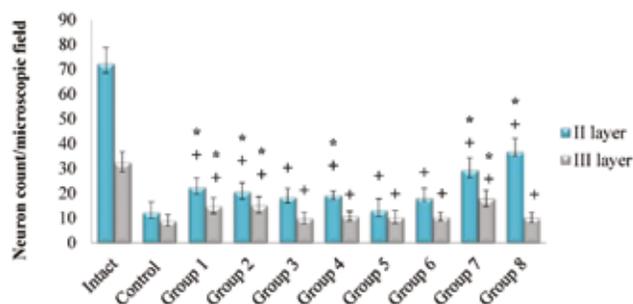


Fig. 4. The count of neuronal cells in the entorhinal cortex. Data are expressed as Mean \pm SD; * $p < 0.05$ compared to the control group; + $p < 0.05$ compared to the intact group

Рис. 4. Подсчет нейрональных клеток в энторинальной коре. Данные выражены как среднее \pm стандартное отклонение; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; + $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой

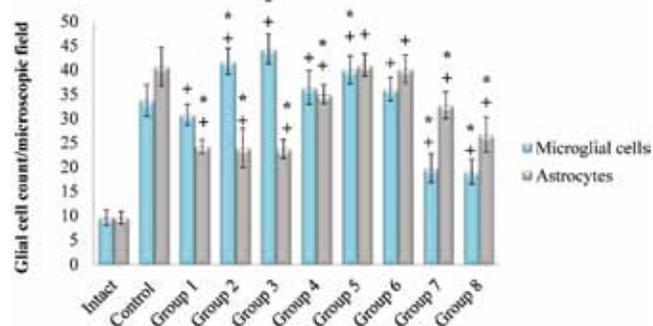


Fig. 5. The count of glial cells in the entorhinal cortex. Data are expressed as Mean \pm SD; * $p < 0.05$ compared to the control group; + $p < 0.05$ compared to the intact group

Рис. 5. Подсчет глиальных клеток энторинальной коры. Данные выражены как среднее \pm стандартное отклонение; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; + $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой

reactive oxygen species, and neurotrophic factors that subsequently lead to neuronal damage and death [35, 36]. Microglial cells, as well as astrocyte activation, are known to play an important role in epileptogenesis: experimental studies showed that after acute seizures or SE induced

by convulsive drugs or electrostimulation, microglia were rapidly activated in various brain regions [37]. Activated microglia and astrocytes in seizures cause inflammation in brain tissue by releasing a number of proinflammatory mediators. Proinflammatory molecules can change neuronal

excitability and affect the physiological functions of glia by paracrine or autocrine actions, thus perturbing the communication between glial cells and neurons [22, 38].

In the entorhinal cortex of control animals, there were prominent gliosis and neurolysis. In all layers, there were dark pyknotic neurons, as well as vacuolation and chromatolysis (Fig. 3B). In layer III, the number of pyramidal neurons drastically decreased and reached 9 ± 2.36 cells in the microscopic field. In layer II, the reduction was more prominent and the neuron count was 12.4 ± 3.978 cells (Fig. 4). Experimental studies on epilepsy, as well as those of the patients with TLE, demonstrated that there was a selective loss of neurons within layer III of the entorhinal cortex [39, 40], and this correlates with our findings. There was also hyperplasia of both microglial cells and astrocytes, the number of which was 33.7 ± 3.23 and 40.7 ± 4 , respectively (Fig. 5).

In experimental group 1, there were prominent neurodegenerative processes in the entorhinal cortex. The number of neurons in layers II and III reduced and the count of neurons was 22.7 ± 3.4 and 15 ± 3.09 , respectively. Although this number was significantly higher compared to that in the control animals ($p < 0.05$), it was significantly lower compared to that in the intact animals (Fig. 4). There were many dark pyknotic neurons along with chromatolytic neurons and active gliosis (Fig. 3C). The number of microglial cells was not significantly different from that of the control group (30.8 ± 2.15 cells), while the number of astrocytes was significantly lower compared to that of the control group [24.2 ± 1.398] (Fig. 5).

In experimental group 2, the results were similar. The number of neurons declined particularly in layer II. In layers II and III, the neurons were dark pyknotic (Fig. 3D), and their count was 20.9 ± 3.24 and 15.3 ± 3.3 cells, respectively (Fig. 4). In this group, there was also prominent microgliosis: the number of microglial cells was significantly higher compared to that of the control group (41.7 ± 2.71 cells in the microscopic field). On the other hand, there were significantly fewer astrocytes than in the control animals [24 ± 4.06 cells in the microscopic field] (Fig. 5).

Interestingly, under the effect of SHD-89 layer II of the cortex was more affected and showed pronounced microgliosis. We observed prominent epidural hematomas in the brains of animals treated with SHD-89 and Corazol. Simultaneously, in the brains of animals treated only with SHD-89, there was congestion of the vessels near the amygdala and pronounced gliosis of amygdala. This suggests that due to hemodynamic disbalance, neurons of layer II undergo hypoxic stress and ischemic necrosis as the dark cells; in this case, there was a pathological feature in these groups (Fig. 3C, D). Various experimental studies on traumatic brain injury demonstrated vascular disruption in acute stages of trauma to lead to the exhibition of abnormal dark neurons in the cortex and hippocampus [41].

In experimental group 3, layer II was characterized by a substantial decrease in the number of neurons that reached 18.5 ± 3.47 cells; the neurons were dark pyknotic (Fig. 3E). In layer III, the reduction in the number of neurons was

substantial as well [10 ± 2.36 cells] (Fig. 4). Moreover, there was a prominent activation of the microglia. Compared to the number of microglial cells and astrocytes in the control group, here, that of the former was significantly higher (44.3 ± 3.06 cells) and that of the latter was significantly lower [23.7 ± 1.95 cells] (Fig. 5).

In the cortexes of animals from experimental group 4, we observed very similar morphological changes. There was a reduction in the number of neurons in layer III; layer II seemed to have pyknosis and pronounced gliosis (Fig. 3F). The number of neurons in layers II and III was 19.4 ± 1.51 and 10.8 ± 1.93 , respectively (Fig. 4). Gliosis was also pronounced: the number of microglial cells was 36.4 ± 3.44 and that of astrocytes (35 ± 2 cells) was higher in this group compared to experimental groups 1, 2, and 3 (Fig. 5). The presence of dark pyknotic neurons in experimental groups 3 and 4 treated with compound SHD-78 can also be a result of hemodynamic changes and congestion.

In experimental group 5, there were severe pathological changes in the entorhinal cortex: pronounced chromatolysis and pyknosis of neurons, as well as multiple foci of microgliosis (Fig. 3G). In layer II, the reduction in the number of neurons was significant and amounted to 13.3 ± 4.47 cells in the microscopic field, whereas in layer III, the number of pyramidal cells was 10.5 ± 2.593 (Fig. 4). Because of gliosis and brain swelling the neurons of layer II traveled to layer I. The numbers of microglial cells and astrocytes were elevated compared to that in other groups [40 ± 2.83 and 41 ± 2.26 , respectively] (Fig. 5).

Without Corazol, SHD-91 produces mild pathological changes in the entorhinal cortex of mice. There was a reduction in the number of neurons in layers II and III [18.2 ± 3.99 and 10.6 ± 1.713 cells, respectively] (Fig. 4). We observed substantial neuronal necrosis and pyknosis, as well as microgliosis in all layers (Fig. 3H). Glial cell count showed that in this group, the numbers of microglial cells and astrocytes increased to 36.1 ± 2.38 and 40.2 ± 2.86 , respectively. The number of glial cells was not significantly different from that in the control group (Fig. 5).

In experimental groups 5 and 6, the neurodegenerative processes in the brain tissue were more pronounced than in other groups. Pathological changes of the brain tissue were particularly noticeable in group 5: there were structural changes in the hippocampus and entorhinal cortex. This suggests that SHD-91 has a synergic effect on Corazol that, in turn, leads to the activation of astrocytes and changes the structure of the brain in mice. Numerous experimental studies on epilepsy demonstrate that prior to seizures there are morphological changes in both astrocytes and neurons in the brain. Palisading astrocytes immediately surround the injury site, and their processes form a halo around the lesion with striking radial orientation [42]. This phenomenon was observed in experimental groups 5 and 6 where there was pronounced astrogliosis in the hippocampal region and entorhinal cortex.

In experimental group 7, the morphological picture of the cortex was almost the same as in the intact animals

(Fig. 3I). Although in layer II, the number of neuronal cells reduced (29.6 ± 4.65 cells), it was significantly higher compared to that in the control and experimental groups 1–6. In layer III, the number of pyramidal cells was the highest of all experimental groups [17.9 ± 3.381 cells in the microscopic field] (Fig. 4). There was a lower activation of microglia than in other groups. The count of microglial cells was 19.8 ± 2.94 , which is significantly lower compared to that in the control animals. Although the number of astrocytes was slightly higher (32.8 ± 2.78 cells), it was significantly lower than in the control group (Fig. 5). Overall, pathological processes were moderate in comparison with other experimental groups.

In experimental group 8, however, we observed a reduction in the number of nerve cells in the entorhinal cortex to be more considerable, especially in layer III (10.3 ± 2.06 cells). In layer II, on the other hand, the neurons were more preserved (Fig. 3J), and their number was the highest in this group compared to that in other experimental groups [37 ± 5.099 cells] (Fig. 4). Gliosis was moderate as well: the number of microglial cells was much lower compared to that in the control and other experimental groups (19.1 ± 2.51 cells). Astrocytes count was significantly lower compared to that in the control animals [26.7 ± 3.56 cells] (Fig. 5).

The reduction in the number of neurons in layer III suggests that although SHD-85 has almost no pathological effect on the hippocampus, it affects the entorhinal cortex leading to neuronal loss in this region. This phenomenon should be studied further with different doses of SHD-85.

Conclusion

Histological and pathological studies of brain tissue under the effects of new derivatives of pyrazolyl-thienopyridines with and without chemoconvulsant agent Corazol show that among all the studied compounds SHD-78 and SHD-89 cause moderate morphological changes to the hippocampus and entorhinal cortex, whereas compound SHD-91 produces severe neurodegenerative effects on brain tissue. Moreover, SHD-85 shows neuroprotective activity with reducing gliosis and neuronal loss induced by Corazol.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – H.V. Gasparyan, R.G. Paronikyan, I.M. Nazaryan.
Synthesis of chemical compounds – Sh.Sh. Dashyan, E.G. Paronikyan.
Collected the data and performed the analysis – H.V. Gasparyan, S.A. Buloyan, A.E. Pogosyan, L.M. Arshakyan, L.S. Harutyunyan.
Wrote the paper – S.A. Buloyan.
Edited the manuscript – H.V. Gasparyan, S.A. Buloyan.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Г.В. Гаспарян, Р.Г. Пароникян, И.М. Назарян.
Синтез химических соединений – Ш.Ш. Дашян, Е.Г. Пароникян.
Сбор и обработка материала – Г.В. Гаспарян, С.А. Булоян, А.Е. Погосян, Л.М. Аршакян, Л.С. Арутюнян.
Написание текста – С.А. Булоян.
Редактирование – Г.В. Гаспарян, С.А. Булоян.

References/Литература

1. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and epilepsy: An overview for neuroscientists. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(6):a022426. DOI: 10.1101/cshperspect.a022426.
2. Chang BS, Lowenstein DH. Epilepsy. *N Engl J Med*. 2003; 349(13):1257–66. DOI: 10.1056/NEJMra022308.
3. de Lanerolle NC, Lee TS, Spencer DD. Histopathology of human epilepsy. In: JL Noebels, M Avoli, MA Rogawski, RW Olsen, AV Delgado-Escueta (eds.). *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2012. P. 567–595. PMID: 22787669.
4. Steward O, Torre ER, Tomasulo R, Lothman E. Seizures and the regulation of astroglial gene expression. *Epilepsy Res Suppl*. 1992;7:197–209. PMID: 1334663.
5. Yilmazer-Hanke DM, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD, Blümcke I. Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(10):907–20. DOI: 10.1093/jnen/59.10.907.
6. Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M et al. Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 1993;43(6):1083–7. DOI: 10.1212/wnl.43.6.1083.
7. Zhang Z, Sun T, Niu JG, He ZQ, Liu Y, Wang F. Amentoflavone protects hippocampal neurons: Anti-inflammatory, antioxidative, and antiapoptotic effects. *Neural Regen Res*. 2015;10(7):1125–33. DOI: 10.4103/1673-5374.160109.
8. Rho JM, White HS. Brief history of anti-seizure drug development. *Epilepsia Open*. 2018;3(SupplSuppl 2):114–9. DOI: 10.1002/epi4.12268.
9. Bhattacharya SK, Ghosal S, Chaudhuri RK, Singh AK, Sharma PV. Letter: Chemical constituents of gentianaceae. XI. Antipsychotic activity of gentianine. *J Pharm Sci*. 1974;63(8):1341–2. DOI: 10.1002/jps.2600630850.
10. Yu S, Huang QQ, Luo Y, Lu W. Total synthesis of camptothecin and SN-38. *J Org Chem*. 2012;77(1):713–7. DOI: 10.1021/jo201974f.
11. Wei SH, Jiang ZH, Tian SH, Zhang D. Highly facile approach to the formal total synthesis of camptothecin. *Tetrahedron Lett*. 2013;54(34):4515–7. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.06.057.
12. El-Sayed Ali T. Synthesis of some novel pyrazolo[3,4-b]pyridine and pyrazolo[3,4-d]pyrimidine derivatives bearing 5,6-diphenyl-1,2,4-triazine moiety as potential antimicrobial agents. *Eur J Med Chem*. 2009;44(11):4385–92. DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.05.031.
13. Salem MS, Ali MA. Novel pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives: Synthesis, characterization, antimicrobial and antiproliferative profile. *Biol Pharm Bull*. 2016;39(4):473–83. DOI: 10.1248/bpb. b15-00586.
14. Bernardino AMR, de Azevedo ARG, Pinheiro LCDS, Borges JC, de Carvalho VL, Miranda MD et al. Synthesis and antiviral activity of new 4-(phenylamino)/4-[(methylpidin-2-yl) amino]-1-phenyl-1H-pyrazolo-[3,4-b]-pyridine-4-carboxylic acid derivatives. *Med Chem Res*. 2007;16(7):352–69. DOI: 10.1007/s00044-007-9035-6.
15. de Mello H, Echevarria A, Bernardino AM, Canto-Cavalheiro M, Leon LL. Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: Synthe-

- sis and structure-activity relationship analysis. *J Med Chem.* 2004;47(22):5427–32. DOI: 10.1021/jm0401006.
16. *Hamdy NA, Gamal-Eldeen AM.* New pyridone, thioxopyridine, pyrazolopyridine and pyridine derivatives that modulate inflammatory mediators in stimulated RAW 264.7 murine macrophage. *Eur J Med Chem.* 2009;44(11):4547–56. DOI: 10.1016/j.ejmech.2009.06.023.
 17. *Jordão AK, Ferreira VF, Lima ES, de Souza MC, Carlos EC, Castro HC et al.* Synthesis, antiplatelet and in silico evaluations of novel N-substituted-phenylamino-5-methyl-1H-1,2,3-triazole-4-carbohydrazides. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(10):3713–9. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.03.053.
 18. *Kasabov KA, Kudryashov NV, Volkova AV, Shimshirt AA, Kalinina TS, Zhmurenko LA et al.* Psychotropic effects of a new pyrazolo[C]pyridine derivative GIZh-72 are related to functional activity of atp-sensitive potassium channels. *Bull Exp Biol Med.* 2020;168(4):449–52. DOI: 10.1007/s10517-020-04729-5.
 19. *Paronikyan EG, Petrou A, Fesatidou M, Geronikaki A, Dashyan SS, Mamyan SS et al.* Derivatives of a new heterocyclic system-pyrano[3,4-c][1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridines: Synthesis, docking analysis and neurotropic activity. *Medchemcomm.* 2019;10(8):1399–411. DOI: 10.1039/c9md00187e.
 20. *Dabaeva VV, Bagdasaryan MR, Dashyan SS, Dzhagatspanyan IA, Nazaryan IM, Akopyan AG et al.* Synthesis and neurotropic activity of new condensed pyrano[4,3-b]-pyridines derivatives. *Pharm Chem J.* 2019;52(3):844–9. DOI: 10.1007/s11094-019-1912-z.
 21. *do Nascimento AL, Dos Santos NF, Campos Pelágio F, Aparecida Teixeira S, de Moraes Ferrari EA, Langone F.* Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 2012;1470:98–110. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.06.008.
 22. *Zheng Y, Moussally J, Cash SS, Karnam HB, Cole AJ.* Intravenous levetiracetam in the rat pilocarpine-induced status epilepticus model: Behavioral, physiological and histological studies. *Neuropharmacology.* 2010;58(4-5):793–8. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.12.007.
 23. *Dalby NO, Mody I.* The process of epileptogenesis: A pathophysiological approach. *Curr Opin Neurol.* 2001;14(2):187–92. DOI: 10.1097/00019052-200104000-00009.
 24. *Gualtieri F, Curia G, Marinelli C, Biagini G.* Increased perivascular laminin predicts damage to astrocytes in CA3 and piriform cortex following chemoconvulsive treatments. *Neuroscience.* 2012;218:278–94. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.018.
 25. *Karpova MN, Vetrile LA, Klishina NY, Trekova NA, Kuznetsova LV, Evseev VA.* Elevation of corazol-induced seizure threshold after active immunization of mice of various genetic strains with glutamate-bovine serum albumin conjugate. *Bull Exp Biol Med.* 2003;136(3):250–2. DOI: 10.1023/b:bebm.0000008975.89978.0f.
 26. *Mathern GW, Babb TL, Armstrong DL.* Hippocampal sclerosis. In: *J Engel, TA Pedley (eds.). Epilepsy: A Comprehensive Textbook.* Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997. P. 133–155.
 27. *Chang CS, Liao CH, Lin CC, Lane HY, Sung FC, Kao CH.* Patients with epilepsy are at an increased risk of subsequent stroke: A population-based cohort study. *Seizure.* 2014;23(5):377–81. DOI: 10.1016/j.seizure.2014.02.007.
 28. *Curia G, Lucchi C, Vinet J, Gualtieri F, Marinelli C, Torsello A et al.* Pathophysiological changes of mesial temporal lobe epilepsy: Is prevention of damage antiepileptogenic? *Curr Med Chem.* 2014;21(6):663–88. DOI: 10.2174/0929867320666131119152201.
 29. *Jacinto LR, Mata R, Novais A, Marques F, Sousa N.* The habenula as a critical node in chronic stress-related anxiety. *Exp Neurol.* 2017;289:46–54. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.12.003.
 30. *Zhang SJ, Ye J, Couey JJ, Witter M, Moser EI, Moser MB.* Functional connectivity of the entorhinal-hippocampal space circuit. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;369(1635):20120516. DOI: 10.1098/rstb.2012.0516.
 31. *Ibrahim KR, Hala ZEM.* Histological changes of the adult albino rats entorhinal cortex under the effect of tramadol administration: Histological and morphometric study. *Alexandria Journal of Medicine.* 2016;53(2):123–33. DOI: 10.1016/j.ajme.2016.05.001.
 32. *Bartolomei F, Khalil M, Wendling F, Sontheimer A, Régis J, Ranjeva JP et al.* Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia.* 2005;46(5):677–87. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2005.43804.x.
 33. *Dolorfo CL, Amaral DG.* Entorhinal cortex of the rat: Topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1998;398(1):25–48. PMID: 9703026.
 34. *van Groen T, Miettinen P, Kadish I.* The entorhinal cortex of the mouse: Organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus.* 2003;13(1):133–49. DOI: 10.1002/hipo.10037.
 35. *Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS.* The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem.* 2006;98(3):641–53. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x
 36. *Goswami P, Gupta S, Joshi N, Sharma S, Singh S.* Astrocyte activation and neurotoxicity: A study in different rat brain regions and in rat C6 astroglial cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;40(1):122–39. DOI: 10.1016/j.etap.2015.06.001.
 37. *Hiragi T, Ikegaya Y, Koyama R.* Microglia after seizures and in epilepsy. *Cells.* 2018;7(4):26. DOI: 10.3390/cells7040026.
 38. *Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ.* Epilepsy and brain inflammation. *Exp Neurol.* 2013;244:11–21. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.09.033.
 39. *Drexel M, Preidt AP, Sperk G.* Sequel of spontaneous seizures after kainic acid-induced status epilepticus and associated neuropathological changes in the subiculum and entorhinal cortex. *Neuropharmacology.* 2012;63(5):806–17. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.009.
 40. *Vismar MS, Forcelli PA, Skopin MD, Gale K, Koubeissi MZ.* The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. *Front Neural Circuits.* 2015;9:27. DOI: 10.3389/fncir.2015.00027.
 41. *Cortez SC, McIntosh TK, Noble LJ.* Experimental fluid percussion brain injury: Vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res.* 1989;482(2):271–82. DOI: 10.1016/0006-8993(89)91190-6.
 42. *Oberheim NA, Tian GF, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, Nedergaard M.* Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J Neurosci.* 2008;28(13):3264–76. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4980-07.2008.

Author information

Hrachik V. Gasparyan – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Pharmacology and Histopathology, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia
<https://orcid.org/0000-0002-8555-3733>

Sona A. Buloyan – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Pharmacology and Histopathology, Group of Histopathology, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia.
<https://orcid.org/0000-0002-6739-509X>

Anahit E. Pogosyan – Researcher, Laboratory of Pharmacology and Histopathology, Group of Histopathology, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia.
<https://orcid.org/0000-0001-8776-1483>

Lilit M. Arshakyan – Junior Researcher, Laboratory of Pharmacology and Histopathology, Group of Cytology and Biochemistry, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia.
<https://orcid.org/0000-0002-1486-5457>

Lusine S. Harutyunyan – Laboratory Assistant, Laboratory of Pharmacology and Histopathology, Group of Cytology and Biochemistry, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia.
<https://orcid.org/0000-0001-8360-9070>

Ruzanna G. Paronikyan – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Pharmacology and Histopathology, Group of Studies of Anticonvulsant and Psychotropic Compounds, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia.
<https://orcid.org/0000-0002-3845-6324>

Ivetta M. Nazaryan – Researcher, Laboratory of Pharmacology and Histopathology, Group of Studies of Anticonvulsant and Psychotropic Compounds, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia.
<https://orcid.org/0000-0003-2531-8093>

Shushan Sh. Dashyan – Cand. Sci. (Chem.), Researcher, Laboratory of the Synthesis of Psychotropic Compounds, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia.
<https://orcid.org/0000-0002-6365-3725>

Ervand G. Paronikyan – Dr. Sci. (Chem.), Head of Laboratory of the Synthesis of Psychotropic Compounds, Scientific Technological Center of Organic and Pharmaceutical Chemistry National Academy of Sciences of the Republic of Armenia.
<https://orcid.org/0000-0002-6048-3599>

Информация об авторах

Грачик Ваграмович Гаспарян – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией фармакологии и гистопатологии Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Сона Азатовна Булоян – кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатория фармакологии и гистопатологии, группа гистопатологии Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Анаит Ервандовна Погосян – научный сотрудник, лаборатория фармакологии и гистопатологии, группа гистопатологии Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Лилит Мартиновна Аршакян – младший научный сотрудник, лаборатория фармакологии и гистопатологии, группа цитологических и биохимических исследований Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Лусине Саргисовна Арутюнян – лаборант лаборатории фармакологии и гистопатологии, группа цитологических и биохимических исследований Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Рузанна Гарниковна Пароникян – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория фармакологии и гистопатологии, группа исследований противосудорожных и психотропных веществ Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Иветта Маратовна Назарян – научный сотрудник, лаборатория фармакологии и гистопатологии, группа исследований противосудорожных и психотропных веществ Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Шушан Шамировна Дашян – кандидат химических наук, научный сотрудник, лаборатория синтеза психотропных соединений Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Ерванд Гарникович Пароникян – доктор химических наук, заведующий лабораторией синтеза психотропных соединений Научно-технологического Центра органической и фармацевтической химии Национальной академии наук Республики Армения.

Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток CD44, CD133 и ALDH в первичной опухоли на фоне платиносодержащей химиотерапии при раке яичников

С.О. Генинг¹, И.И. Антонеева^{1,2}, Т.В. Абакумова¹, Т.П. Генинг¹, Е.В. Слесарева¹

¹ ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет, Институт медицины, экологии и физической культуры, Ульяновск, Россия

² ГУЗ Областной клинический онкологический диспансер, Ульяновск, Россия

Введение. Рак яичников характеризуется неблагоприятным клиническим течением. Сложности в его лечении могут быть обусловлены внутриопухолевой гетерогенностью, включающей наличие пула стволовых клеток. Целью данного исследования была оценка экспрессии маркеров стволовых опухолевых клеток в ткани первичного рака яичников до и в процессе химиотерапии (ХТ) в связи с клиническими характеристиками заболевания.

Материалы и методы. В ретроспективном исследовании оценивали образцы ткани первичной опухоли пациенток (n=28) с первичным эпителиальным раком яичников I–IV стадии, полученные до трех курсов ХТ либо после них. Оценку экспрессии ALDH, CD44, CD133 проводили методом иммуногистохимии.

Результаты. В образцах низкодифференцированной серозной аденокарциномы процент клеток, экспрессирующих ALDH (p=0,008), CD44 (p=0,026), CD133 (p=0,059), был ниже, чем в опухолях других подтипов. В образцах ткани, полученных до лечения, процент клеток, экспрессирующих CD44, был больше (p=0,053), чем в образцах, полученных после неoadъювантной ХТ. Прослеживалась тенденция к более высокой экспрессии CD44 (p=0,056) и ALDH (p=0,074) в опухолях I–II стадии в сравнении с III–IV стадией. У пациенток с клинически платиночувствительными опухолями в группе после ХТ, но не до ХТ, процент CD44⁺ клеток в опухоли был больше, чем у нечувствительных к платине (p=0,038). Количество опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH, возрастало прямо пропорционально количеству опухолевых клеток, экспрессирующих CD44 (R²=0,280, p=0,005). Между количеством CD44⁺ и CD133⁺ клеток в паренхиме опухоли присутствовала положительная корреляция (r=0,408, p=0,031).

Заключение. Маркеры стволовых опухолевых клеток коэкспрессируются в тканях первичного очага рака яичников. Экспрессия маркеров различается в зависимости от гистологического подтипа и наличия предшествующего химиотерапевтического воздействия.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки, рак яичников, химиотерапия, CD44, CD133, ALDH, иммуногистохимия

Для корреспонденции: Снежанна Олеговна Генинг. E-mail: sgening@bk.ru

Для цитирования: Генинг С.О., Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Слесарева Е.В. Экспрессия маркеров стволовых опухолевых клеток CD44, CD133 и ALDH в первичной опухоли на фоне платиносодержащей химиотерапии при раке яичников. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):63–71. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.63-71.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90011.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 28.07.2021. Получена после рецензирования 16.08.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Expression of cancer stem cell markers CD44, CD133, and ALDH in a primary tumor before and after platinum-containing chemotherapy in ovarian cancer

S.O. Gening¹, I.I. Antonееva^{1,2}, T.V. Abakumova¹, T.P. Gening¹, E.V. Slesareva¹

¹ Ulyanovsk State University, Institution of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk, Russia

² Regional Clinical Oncological Dispensary, Ulyanovsk, Russia

Introduction. Ovarian cancer (OC) is characterized by an unfavorable clinical course. Difficulties in the treatment of OC can be due to intratumoral heterogeneity, which includes the presence of stem cells. The aim of this study was to assess the expression of stem markers in the tissue of primary OC before and during chemotherapy of OC in association with the clinical features of the disease.

Materials and methods. A retrospective study evaluated tissue samples of the primary tumors of patients (n=28) with stages I–IV epithelial OC obtained before or after 3 courses of chemotherapy. The expression of ALDH, CD44, and CD133 was assessed by immunohistochemistry.

Results. In samples of high-grade serous adenocarcinoma, the percentages of cells expressing ALDH (p=0.008), CD44 (p=0.026), and CD133 (p=0.059) were lower than in other subtypes. Tissue samples obtained before treatment showed a higher percentage of cells expressing CD44 (p=0.053) than the ones obtained after neoadjuvant chemotherapy. There was a tendency towards higher expression of CD44 (p=0.056) and ALDH (p=0.074) in stages I–II tumors when compared to that in stages III–IV. In the neoadjuvant chemotherapy group, patients with clinically platinum-sensitive tumors had a higher percentage of CD44⁺ cells than those with non-platinum-sensitive ones (p=0.038). The number of tumor cells expressing ALDH rose with the increase in CD44⁺ cells number (R²=0.280, p=0.005). We found a positive correlation between the numbers of CD44⁺ and CD133⁺ cells in the tumor parenchyma (r=0.408, p=0.031).

Conclusion. Cancer stem cell markers are co-expressed in primary tumor tissue in OC. The expression of stem markers differs depending on the histological subtype and the presence of prior exposure to chemotherapy.

Keywords: tumor stem cells, ovarian cancer, chemotherapy, CD44, CD133, ALDH, immunohistochemistry

Corresponding author: Snezhanna O. Gening. E-mail: sgening@bk.ru

For citation: Gening S.O., Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Gening T.P., Slesareva E.V. Expression of cancer stem cell markers CD44, CD133, and ALDH in a primary tumor before and after platinum-containing chemotherapy in ovarian cancer. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):63–71. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.63–71 (In Russ.).

Funding. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project No. 19-315-90011.

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

Received 28.07.2021. **Received in revised form** 16.08.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Рак яичников (РЯ) характеризуется рядом неблагоприятных особенностей клинического течения. К ним относятся отсутствие симптомов до момента развития интраперитонеальной диссеминации, низкая 5-летняя общая выживаемость, несмотря на высокую частоту ответа на химиотерапию первой линии, укорочение интервала без прогрессирования с каждым последующим рецидивом, критическое значение наличия чувствительности к платиновым препаратам для прогноза болезни [1, 2]. Исследования новых лекарственных средств для терапии РЯ в последние годы демонстрируют многообещающие результаты, однако патогенез данного заболевания до сих пор во многом неясен.

Все больше авторов связывают сложности в лечении РЯ с высоким уровнем внутриопухолевой гетерогенности [3]. Общепринятая в настоящее время концепция стволовых клеток (СК) опухолей как источника гетерогенности [4] актуальна и для РЯ. Два основных свойства стволовых клеток – самообновление пула и мультилинейная дифференцировка – позволяют им воспроизводить широкий спектр фенотипов клеток опухолевой паренхимы и даже стромы [3]. Способность СК к формированию сфероидных колоний, растущих в жидкой среде без подложки, может успешно реализоваться внутри асцита, появление которого часто становится первым симптомом прогрессирующего РЯ [4].

В 2010 году L. Hu et al. описали наличие в РЯ клеток «сторонней популяции» (side population). После введения красителя эти клетки гораздо эффективнее осуществляли его удаление (эффлюкс) из цитоплазмы,

чем другие клетки паренхимы [5]. Данное явление наблюдается в стволовых опухолевых клетках и вызвано высокой экспрессией в составе их мембраны белков-транспортеров, которые также помогают выведению молекул цитостатиков, потенциально нивелируя эффект лечения [6]. В последующих исследованиях были описаны маркеры детекции СК РЯ, которые могут использоваться в иммуногистохимических исследованиях, в том числе CD44, CD133 альдегиддегидрогеназа (Aldehyde dehydrogenase, ALDH) [7]. Описана роль гликопротеина CD44 в опухолевой прогрессии и модуляции опухолевого микроокружения, экспрессия CD133 обнаружена на СК различных опухолей, однако функция и клиническое значение этого маркера до сих пор неясны [8]. Также до настоящего момента не определена оптимальная комбинация маркеров для выявления СК РЯ; кроме того, высокая пластичность фенотипа стволовых опухолевых клеток может приводить к различиям в паттернах экспрессии в зависимости от клинической ситуации [9].

Целью данного исследования была оценка экспрессии маркеров стволовых клеток опухоли CD44, CD133 и ALDH в ткани первичного РЯ до и в процессе химиотерапии в связи с клиническими характеристиками заболевания.

Материалы и методы

В ретроспективное исследование были включены пациентки (n=28) с первичным гистологически верифицированным эпителиальным РЯ I–IV стадии по FIGO, проходившие лечение в гинекологическом отделении Ульяновского областного клинического онкологическо-

го диспансера в 2016–2019 годах. Критерии включения в исследование: планово выполненная хирургическая операция, наличие биоматериала достаточного объема и качества для иммуногистохимического (ИГХ) исследования, отсутствие иных злокачественных опухолей (в анамнезе и синхронно развивающихся).

Добровольное информированное согласие в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (2013) подписано всеми участницами исследования. Исследование одобрено этическим комитетом ИМЭиФК Ульяновского государственного университета (протокол № 3 от 15.03.2017). Образцы ткани опухоли получены интраоперационно: у пациенток, получавших адъювантную химиотерапию (АХТ), – до начала химиотерапии, а у пациенток, получавших неoadъювантную химиотерапию (НАХТ), – после трех курсов химиотерапии по схеме TP (карбоплатин AUC6 + паклитаксел 175 мг/м³ внутривенно капельно 1 раз в 3 недели) согласно международным и национальным рекомендациям [10]. Хирургическое лечение выполнялось в объеме гистерэктомии с двусторонней сальпингоофорэктомией и оментэктомией. Согласно рекомендациям GCI4th, пациенток считали клинически платиночувствительными, если рецидив/прогрессирование возникали через более чем 6 месяцев от последнего введения химиопрепаратов первой линии; нечувствительными – если интервал от последнего введения до рецидива/прогрессирования составлял менее 6 месяцев [11].

Морфологическое исследование включало гистологический и иммуногистохимический методы. Ткани фиксировали в 10% растворе формалина, заливали в парафин по обычной методике. Серийные срезы толщиной 3–5 мкм депарафинировали по стандартной схеме и окрашивали гематоксилином и эозином. Для ИГХ исследования серийные срезы толщиной 3–5 мкм наносили на предметные стекла с адгезивным покрытием. ИГХ реакцию проводили ручным методом. На одно стекло антитело разводили в соотношении 1:100. Предварительная обработка стекла проводилась в буфере для высокотемпературной демаскировки эпитопов антигена в течение 30 минут. После этого стекла помещали в автостейнер, где окрашивали согласно стандартному протоколу с помощью системы детекции UltraVision (Thermo Scientific, США).

Для определения СК в опухолевой популяции и в строме применяли антитела к CD44 (Anti-CD44 antibody (EPR1013Y) ab 51037 Abcam, Великобритания), ALDH (BD Transduction Laboratories, Purified Mouse Anti-ALDH 611195 Clone: 44/ALDH aa 7-128 Becton Dickinson, США), CD133/1 (AC133) antibodies, human, Clone: AC133, Miltenyi Biotec, США). Экспрессию каждого показателя клетками паренхимы опухоли определяли по системе Klein et al [12]. Финальный балл экспрессии (от 0 до 9) определяли как произведение количества окрашенных клеток (0 баллов – нет окрашенных клеток, 1 балл – окрашивается менее 30% клеток, 2 балла – 30–60% клеток, 3 балла – более 60%

клеток) на интенсивность окрашивания (0 баллов – нет реакции, 1 балл – слабое окрашивание, 2 балла – умеренное окрашивание, 3 балла – сильное окрашивание). Экспрессию маркеров в строме опухоли оценивали по шкале от 0 до 3 баллов. Образцы независимо оценивали два специалиста-патоморфолога.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью программного обеспечения Jamovi 2.0.0 for MacOS. Поскольку распределение количественных данных отличалось от нормального, для сравнения независимых подгрупп использовали критерий Манна–Уитни. С учетом числа образцов корреляции оценивали с помощью коэффициента Спирмена. При оценке двухлетней выживаемости рассчитывали отношение шансов; для оценки прогностической значимости использовали обобщенную линейную модель. Результаты расценивались как статистически значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты

Клинические характеристики участниц исследования представлены в таблице 1.

При анализе данных, полученных в результате изучения экспрессии ALDH в опухолевых клетках первичной опухоли, по 14,3% случаев как до ХТ, так и после нее не имело в своем пуле клеток, экспрессирующих ALDH. Высокая (9 баллов) экспрессия ALDH наблюдалась лишь в одном случае после ХТ. Интенсивность экспрессии ALDH в клетках стромы варьировала от слабой очаговой до очаговой умеренно сильной как до ХТ, так и после нее. Во всех изученных образцах ткани до начала лечения наблюдалась экспрессия CD44 клетками паренхимы. После ХТ в двух случаях (14,3%) не имелось клеток, экспрессирующих CD44. Интенсивность экспрессии CD44⁺ в клетках стромы до ХТ варьировала от ярко очаговой до диффузно яркой. Экспрессия в 9 баллов также присутствовала только в одном образце после ХТ. В паренхиме первичной опухоли РЯ в 50% случаев до начала лечения и в 64,3% случаев после ХТ не выявлена экспрессия CD133. Высший балл экспрессии присутствовал в одном образце до лечения (табл. 2). В строме всех изученных образцов не экспрессировался маркер CD133.

В образцах низкодифференцированной серозной аденокарциномы процент клеток, экспрессирующих ALDH ($p=0,008$), CD44 ($p=0,026$), CD133 ($p=0,059$), был ниже, чем в опухолях других подтипов.

В образцах ткани, полученных до лечения, был несколько выше процент клеток, экспрессирующих ALDH ($p=0,063$) и CD44 ($p=0,053$), но не CD133, чем в образцах, полученных после неoadъювантной химиотерапии (рис. 1, 2). В образцах до лечения чаще наблюдалась экспрессия ALDH более чем в 1% клеток паренхимы, а в образцах после лечения экспрессия чаще отсутствовала (хи-квадрат 5,04, $p=0,025$).

Содержание клеток CD133⁺ в опухоли у пациенток с асцитом было несколько ниже, чем у пациенток без него ($p=0,050$), тогда как показатели CD44⁺ и ALDH⁺

не отличались. При этом в нашей когорте пациенток асцит чаще присутствовал у неплатиночувствительных пациенток (хи-квадрат 8,13, $p=0,004$).

Экспрессия изученных маркеров не зависела от стадии заболевания. Это наблюдение согласуется с данными GEPIC – базы, включающей информацию секвенирования генома образцов опухолевой ткани из проекта The Cancer Genome Atlas [13]. Тем не менее прослеживалась тенденция к более высокой экспрессии CD44 ($p=0,056$) и ALDH ($p=0,074$) в опухолях I–II стадии в сравнении с III–IV стадией.

У пациенток с клинически платиночувствительными опухолями в когорте в целом процент CD44⁺ клеток

в опухоли был выше, чем у нечувствительных к платине ($p=0,038$). При подгрупповом анализе оказалось, что данное наблюдение обусловлено подгруппой образцов, полученных после химиотерапии ($p=0,011$), но не до лечения ($p=0,814$). Однако в уравнении биномиальной регрессии изученные показатели экспрессии стволовых маркеров не продемонстрировали предиктивной значимости в отношении чувствительности либо нечувствительности рецидива к платине.

Количество опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH, возрастало прямо пропорционально количеству опухолевых клеток, экспрессирующих CD44 ($R^2=0,280$, $p=0,005$).

Таблица 1 | Table 1

**Клинические характеристики пациенток, включенных в исследование |
Clinical characteristics of patients included in the study**

Клиническая характеристика Clinical characteristics	Число пациенток Number of patients (%)
1. Возраст – медиана (IQR Q1–Q3), лет – 61,5 (55,5–67) Age – median (IQR Q1–Q3), years – 61.5 (55.5–67)	
2. Уровень СА-125 до лечения – медиана (IQR), Ед/мл – 341 (133–478) CA-125 level before treatment – median (IQR), U/mL – 341 (133–478)	
3. Стадия FIGO FIGO stage	
I	3 (11%)
II	1 (4%)
III	18 (64%)
IV	6 (21%)
4. Наличие асцита на момент первичной диагностики Presence of ascites at the time of initial diagnosis	
Да Yes	11 (39%)
Нет No	17 (61%)
5. Гистологический подтип Histological subtype	
• серозная high-grade аденокарцинома serous high-grade adenocarcinoma	19 (68%)
• серозная low-grade аденокарцинома serous low-grade adenocarcinoma	1 (4%)
• светлоклеточная карцинома clear cell carcinoma	3 (11%)
• муцинозная карцинома mucinous carcinoma	1 (4%)
• недифференцированный эпителиальный рак яичников undifferentiated epithelial OC	4 (14%)
6. Режим химиотерапии Chemotherapy regimen	
• неoadъювантная (НАХТ) neoadjuvant chemotherapy	14 (50%)
• адъювантная (АХТ) adjuvant chemotherapy	14 (50%)
7. Патоморфологический ответ CRS (в подгруппе НАХТ) Pathological response CRS (in the neoadjuvant chemotherapy subgroup)	
• CRS 0–1	7 (50%)
• CRS 2	6 (43%)
• CRS 3	1 (7%)
8. Клиническая платиночувствительность первого рецидива/прогрессирования Clinical platinum sensitivity at first relapse/progression	
• платиночувствительный platinum sensitive	15 (54%)
• неплатиночувствительный non-platinum-sensitive	13 (46%)

IQR – интерквартильный размах | IQR – Interquartile Range

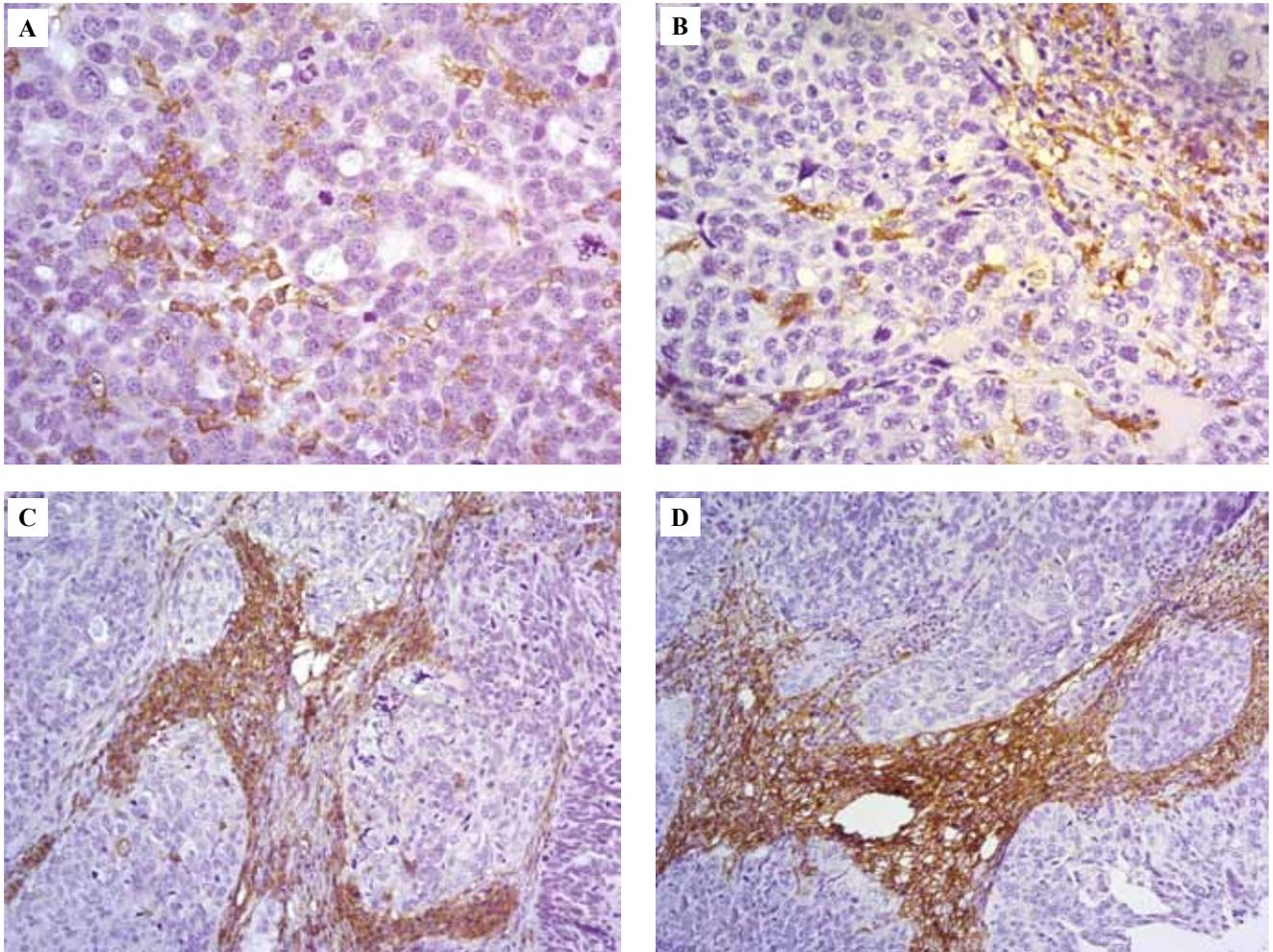


Рис. 1. Экспрессия стволовых маркеров в образцах ткани РЯ пациенток до лечения.

А, В – пациентка 66 лет, II стадия, T2N0M0. В паренхиме большое количество атипичных гигантских митозов.

А – экспрессия CD44 определяется в стромальных элементах опухоли, преимущественно на границе с паренхимой, частично в виде диффузного окрашивания, частично в виде очагового окрашивания (окраска антителами к CD44, $\times 400$). В – экспрессия ALDH в клетках стромы выраженная, окрашивание диффузное. ALDH в клетках паренхимы не определяется (окрашивание антителами к ALDH, $\times 400$), при окрашивании на CD133 большая часть паренхимы опухоли обнаруживает негативную реакцию, выявлен один участок с позитивными клетками (до 10), рассеянными диффузно. В опухоли отмечалась очаговая экспрессия CytokeratinPan (AE1/AE3), WT1, отсутствовала экспрессия ER, Synaptophysin, Chromogranin, Inhibin, Calretinin. Недифференцированная карцинома яичника.

С, D – пациентка 65 лет, III стадия, T3N0M0. Опухоль преимущественно паренхиматозного типа с узкими прослойками стромы. С – строма активно экспрессирует CD44. Фиксация маркера отмечается на границе стромы и эпителиального пласта. Экспрессия CD44 в паренхиматозных элементах незначительная, позитивны единичные клетки (окрашивание антителами к CD44, $\times 200$). D – экспрессия ALDH в строме менее выражена, ALDH в паренхиме не выявляется (окрашивание антителами к ALDH, $\times 200$). Опухоль CD133-негативна. Низкодифференцированная (high-grade) серозная карцинома яичника

Fig. 1. Expression of stem markers in OC tissue samples before treatment.

A, B – patient 66 years old, stage II, T2N0M0. The parenchyma contains a large number of atypical giant mitoses.

A – CD44 expression is determined in the stromal elements of the tumor, mainly at the border with the parenchyma, partly in the form of diffuse staining and partly in the form of focal staining (staining with antibodies to CD44, $\times 400$). B – ALDH expression in stromal cells is pronounced; staining is diffuse. ALDH staining is negative in parenchyma cells (staining with antibodies to ALDH, $\times 400$). When staining for CD133, most of the tumor parenchyma had a negative reaction, 1 area with diffusely positive cells (up to 10 cells) being detected. The tumor showed focal expression of Cytokeratin Pan (AE1/AE3), WT1. There was no expression of ER, Synaptophysin, Chromogranin, Inhibin, or Calretinin. Undifferentiated ovarian carcinoma.

C, D – patient 65 years old, stage III, T3N0M0. The tumor is predominantly of parenchymal type with narrow stromal layers. C – the stroma actively expresses CD44. The fixation of the marker is noted at the border of the stroma and the epithelial layer. The expression of CD44 in the parenchymal elements is insignificant, single cells are positive (staining with antibodies to CD44, $\times 200$). D – the expression of ALDH in the stroma is less pronounced, ALDH is not detected in the parenchyma (staining with antibodies to ALDH, $\times 200$). The tumor is CD133 negative. High-grade serous ovarian carcinoma

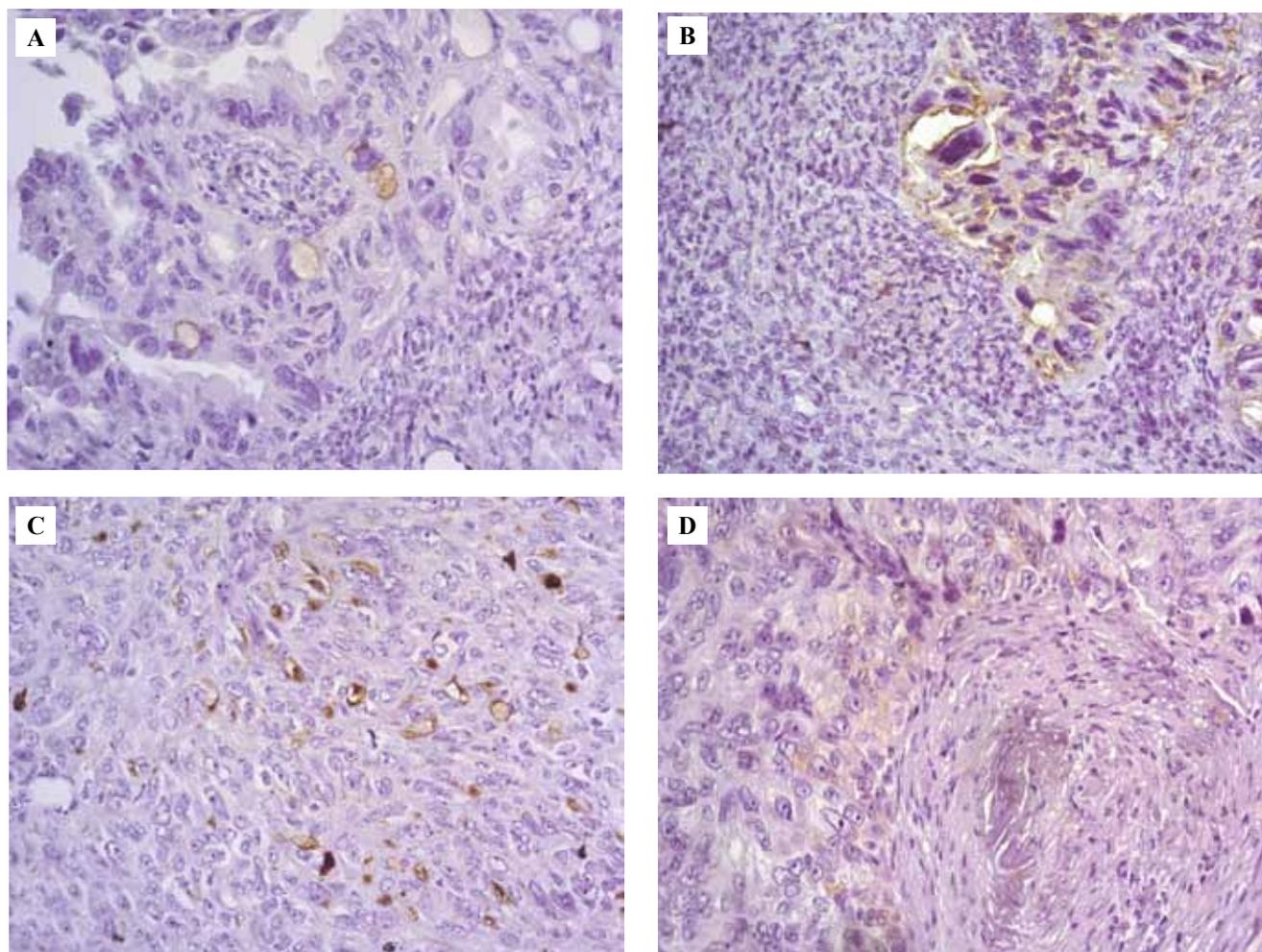


Рис. 2. Экспрессия стволовых маркеров в образцах ткани РЯ пациенток после неoadъювантной химиотерапии.

А, В – пациентка 60 лет, IV стадия, T3N1M1, асцит. Эпителиальная опухоль солидно-папиллярного строения, построенная из клеток с полиморфными атипичными ядрами, среди которых преобладают крупные светлые пузырьковидные ядра с отчетливыми ядрышками, встречаются также гигантские уродливые ядра. В 1 мм² опухоли менее 1 митоза. Низкодифференцированная (high-grade) серозная карцинома яичника. А – окрашивание антителами к CD133, ×400, В – окрашивание антителами к CD44, ×400.

С, D – пациентка 69 лет, III стадия, T3N1M0. Опухоль представлена солидными разрастаниями светлых клеток округлой и вытянутой формы. Ядра их крупные, светлые, пузырьковидные, с отчетливыми ядрышками. В 1 мм² опухоли до 5 митозов. В опухоли отмечалась диффузная экспрессия CytokeratinPan (AE1/AE3), экспрессия WT1 единичными клетками, отсутствовала экспрессия ER, Synaptophysin, Chromogranin, Inhibin, Calretinin. Недифференцированная карцинома яичника. С – окрашивание антителами к CD133, ×400, D – окрашивание антителами к ALDH, ×400

Fig. 2. Expression of stem markers in OC tissue samples after neoadjuvant chemotherapy.

A, B – patient 60 years old, stage IV, T3N1M1, ascites. An epithelial tumor of a solid-papillary structure, built from cells with polymorphic atypical nuclei, among which there are giant ugly nuclei and prevalence of large light vesicular nuclei with distinct nucleoli. There is less than 1 mitosis in 1 mm² of the tumor. High-grade serous ovarian carcinoma. A – staining with antibodies to CD133, ×400, B – staining with antibodies to CD44, ×400.

C, D – patient 69 years old, stage III, T3N1M0. The tumor is represented by solid areas of round and elongated light cells. Their nuclei are large, light, vesicular, and with distinct nucleoli. There are up to 5 mitoses in 1 mm² of a tumor. The tumor showed diffuse expression of Cytokeratin Pan (AE1/AE3) and WT1 by single cells. There was no expression of ER, Synaptophysin, Chromogranin, Inhibin, or Calretinin. Undifferentiated ovarian carcinoma. C – staining with antibodies to CD133, ×400, D – staining with antibodies to ALDH, ×400

Таблица 2 | Table 2

Распределение случаев РЯ по уровню экспрессии стволовых маркеров в паренхиме первичной опухоли до и после платиносодержащей ХТ | Distribution of OC cases by the level of expression of stem markers in the parenchyma of the primary tumor before and after platinum-containing chemotherapy

Число случаев Number of cases	Распределение случаев по уровню экспрессии ALDH (финальный балл) Distribution of cases by level of ALDH expression (final score)			
	0 баллов 0 points	1–3 балла 1–3 points	4–6 баллов 4–6 points	7–9 баллов 7–9 points
До ХТ Before chemotherapy	2 (14,3%)	6 (42,8%)	6 (42,8%)	0 (0%)
После ХТ After chemotherapy	2 (14,3%)	10 (71,4%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)
Распределение случаев по уровню экспрессии CD44 Distribution of cases by level of CD44 expression				
До ХТ Before chemotherapy	0 (0%)	10 (71,4%)	4 (28,6%)	0 (0%)
После ХТ After chemotherapy	2 (14,3%)	8 (57,1%)	3 (21,4%)	1 (7,1%)
Распределение случаев по уровню экспрессии CD133 Distribution of cases by the level of CD133 expression				
До ХТ Before chemotherapy	7 (50%)	6 (42,8%)	0 (0%)	1 (7,2%)
После ХТ After chemotherapy	9 (64,3%)	5 (35,7%)	0 (0%)	0 (0%)

Между количеством CD44⁺ и CD133⁺ клеток в паренхиме опухоли присутствовала положительная корреляция ($r=0,408$, $p=0,031$). Показатели экспрессии ALDH и CD133 в паренхиме не были положительно связаны между собой. Уровень экспрессии ALDH в строме опухоли отрицательно коррелировал с числом клеток, экспрессирующих ALDH в паренхиме ($r=-0,413$, $p=0,032$).

Двухлетняя общая выживаемость была ниже в подгруппе НАХТ (отношение шансов (ОШ) 11,90, 95% доверительный интервал (ДИ) 1,87–128,28, $p=0,017$) и среди пациенток с высокой экспрессией ALDH в строме опухоли (ОШ 2,58, 95% ДИ 1,07–7,92, $p=0,055$). При построении предиктивной модели для выживаемости, однако, показатель экспрессии ALDH в строме, а также другие изученные маркеры не продемонстрировали прогностической значимости.

Обсуждение

Большинство исследованных образцов опухолевой ткани экспрессировало CD44 и ALDH, тогда как экспрессия CD133 в паренхиме наблюдалась только у 12 пациенток (42,8%), а экспрессия CD133 в строме отсутствовала у всех. В ткани низкодифференцированной серозной аденокарциномы процент клеток, экспрессирующих ALDH, CD44, CD133, был ниже, чем в опухолях других подтипов. Это может быть связано с тем, что среди остальных подтипов в когорте было несколько образцов недифференцированной карциномы. По данным K. Kar et al. [14], в менее дифференцированных опухолях яичников уровень экспрессии CD44 выше, чем в опухолях low-grade. Однако авторы не наблюдали экспрессии CD44 светлоклеточными опухолями ($n=3$), тогда как в нашей когорте все три образца светлоклеточной карциномы экспрессировали данный маркер. У пациенток рецидив заболевания развился в течение первого года, что характерно для

малочувствительного к химиотерапии светлоклеточного РЯ [11].

Мы не наблюдали значимой связи между экспрессией изученных маркеров и стадией заболевания, что согласуется с данными The Cancer Genome Atlas; в то же время присутствовала тенденция к более высокому содержанию CD44⁺ и ALDH⁺ клеток при I–II стадии, чем при III–IV. Подобное наблюдение описано для CD133 в метаанализе [15]. Авторы метаанализа также продемонстрировали негативное прогностическое значение экспрессии CD133 в отношении двухлетней выживаемости, подчеркивая, однако, существование противоречивых результатов и предпочтительную оценку коэкспрессии CD133 с другими стволовыми маркерами.

В изученных нами образцах количество CD133⁺ клеток положительно коррелировало с количеством CD44⁺. Процент ALDH⁺ клеток также был положительно связан с процентом CD44⁺. Корреляция между экспрессией ALDH1 и CD44 в злокачественных опухолях яичников ($r=0,16$, $p=0,0012$) также наблюдается по данным GEPIA [13]; при этом экспрессия CD133 и ALDH в наших образцах не была связана между собой. Известно, что CD133⁺ALDH⁺ клетки РЯ очень агрессивны [16]; возможно, CD133-позитивные клетки представляют собой лишь малочисленную высокомутированную часть пула ALDH⁺. Экспрессия ALDH1 >50% в комбинации с CD44 ассоциирована с ярко выраженными стволовыми свойствами клеток РЯ [17].

В образцах ткани, полученных до лечения, больше клеток экспрессировало ALDH и CD44, чем в образцах, полученных после неoadъювантной химиотерапии; кроме того, в подгруппе НАХТ большее число CD44⁺ парадоксально ассоциировалось с платиночувствительностью, в отличие от опухолей до лечения. Мы не наблюдали предиктивной значимости

показателей экспрессии CD44, но, возможно, статистические различия отражают разницу в биологической роли опухолевых СК до лечения и в процессе лечения. Ранее в ретроспективном исследовании [18] было продемонстрировано отрицательное прогностическое значение экспрессии CD44 в тканях РЯ после химиотерапии в отношении общей, но не безрецидивной выживаемости, что может объясняться способностью стволовых клеток останавливать клеточный цикл и инициировать отдаленные рецидивы.

В нашей когорте процентное содержание клеток CD133⁺ в опухоли у пациенток с асцитом было несколько ниже, чем у пациенток без него, что не согласуется с данными N. Li et al. [19], по которым число CD133-положительных опухолей среди пациенток с асцитом было выше, чем без него. Возможная причина расхождения заключается в оцениваемых гистологических подтипах, так как в нашей когорте к CD133-положительным опухолям без асцита относились светлоклеточные и недифференцированные карциномы, не включенные в исследование N. Li et al.

Двухлетняя общая выживаемость была ниже среди пациенток с высокой экспрессией ALDH в строме опухоли. Это может быть вызвано процессами васкулогенной мимикрии, в которых активно участвуют ALDH-положительные клетки РЯ [20]; в данном исследовании мы не оценивали наличие признаков васкулогенной мимикрии в образцах. Уровень экспрессии ALDH в строме не имел прогностического значения в мультивариантном анализе. Это может быть связано с неоднородностью выборки, которая включала подгруппы АХТ и НАХТ, поскольку мы наблюдали различия в экспрессии стволовых маркеров между этими подгруппами, а также существенные различия в длительности бесплатинового интервала и двухлетней выживаемости. I. Ruscito et al. [21] продемонстрировали отрицательное прогностическое значение коэкспрессии CD133 и ALDH для безрецидивной и общей выживаемости при первичной низкодифференцированной серозной карциноме яичника, при этом экспрессия каждого маркера в отдельности не имела прогностического значения в мультивариантном анализе. Коэкспрессия в данном исследовании встречалась в 23,2% случаев; в нашей когорте коэкспрессия CD133 и ALDH по тем же критериям (балл экспрессии ALDH 2–9, CD133 >10%) наблюдалась лишь у трех пациенток (10,7%), две из которых имели I стадию заболевания. Таким образом, оценка экспрессии маркеров СК в ткани РЯ требует комплексного подхода с учетом гистологических, а также клинических характеристик.

Заключение

Маркеры стволовых опухолевых клеток коэкспрессируются в тканях первичного очага рака яичников. Экспрессия маркеров различается в зависимости от гистологического подтипа опухоли и наличия предшествующего химиотерапевтического воздействия.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – С.О. Генинг, Т.П. Генинг.
Сбор и обработка материала – Е.В. Слесарева, И.И. Антонева,
Т.В. Абакумова.

Написание текста – С.О. Генинг.

Редактирование – Т.П. Генинг, И.И. Антонева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – S.O. Gening, T.P. Gening.

Collected the data and performed the analysis – E.V. Slesareva, I.I. Antoneeva, T.V. Abakumova.

Wrote the paper – S.O. Gening.

Edited the manuscript – T.P. Gening, I.I. Antoneeva.

Литература/References

1. Arnold M, Rutherford MJ, Bardot A, Ferlay J, Andersson TM, Myklebust TA et al. Progress in cancer survival, mortality, and incidence in seven high-income countries 1995–2014 (ICBP SURVMARK-2): A population-based study. *Lancet Oncol.* 2019;20(11):1493–505. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30456-5.
2. Giornelli GH. Management of relapsed ovarian cancer: A review. *Springerplus.* 2016;5(1):1197. DOI: 10.1186/s40064-016-2660-0.
3. Sabini C, Sorbi F, Cunnea P, Fotopoulou C. Ovarian cancer stem cells: Ready for prime time? *Arch Gynecol Obstet.* 2020;301(4):895–9. DOI: 10.1007/s00404-020-05510-9.
4. Ahmed N, Escalona R, Leung D, Chan E, Kannourakis G. Tumour microenvironment and metabolic plasticity in cancer and cancer stem cells: Perspectives on metabolic and immune regulatory signatures in chemoresistant ovarian cancer stem cells. *Semin Cancer Biol.* 2018;53:265–81. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.10.002.
5. Hu L, McArthur C, Jaffe RB. Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant. *Br J Cancer.* 2010;102(8):1276–83. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605626.
6. Yamanoi K, Baba T, Abiko K, Hamanishi J, Yamaguchi K, Murakami R et al. Acquisition of a side population fraction augments malignant phenotype in ovarian cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):14215. DOI: 10.1038/s41598-019-50794-w.
7. Jain S, Annett SL, Morgan MP, Robson T. The cancer stem cell niche in ovarian cancer and its impact on immune surveillance. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8):4091. DOI: 10.3390/ijms22084091.
8. Puchinskaya MV. Cancer stem cell markers and their prognostic value. *Arkh Patol.* 2016;78(2):47–54. DOI: 10.17116/patol201678247-54.
9. Craveiro V, Yang-Hartwich Y, Holmberg JC, Joo WD, Sumi NJ, Pizzonia J et al. Phenotypic modifications in ovarian cancer stem cells following Paclitaxel treatment. *Cancer Med.* 2013;2(6):751–62. DOI: 10.1002/cam4.115.
10. Тюляндин С.А., Коломиец Л.А., Морхов К.Ю., Нечушкина В.М., Pokataev I.A., Rummyantsev A.A. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников, первичного рака брюшины и рака маточных труб. Злокачественные опухоли. 2020;10(3s2–1):183–95. DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-10.
Tjulandin SA, Kolomiets LA, Morkhov KYu, Nechushkina VM, Pokataev IA, Rummyantsev AA et al. Practical guidelines for the drug treatment of ovarian cancer, primary peritoneal cancer and

- tubal cancer. *Malignant Tumours*. 2020;10(3s2–1):183–95 (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2020-10-3s2-10.
11. Friedlander M, Trimble E, Tinker A, Alberts D, Avall-Lundqvist E, Brady M et al. Clinical trials in recurrent ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21(4):771–5. DOI: 10.1097/IGC.0b013e31821bb8aa.
 12. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plénat F et al. Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):656–8. DOI: 10.1210/jcem.86.2.7226.
 13. Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W98–102. DOI: 10.1093/nar/gkx247.
 14. Kar K, Ghosh S, Roy AK. A study of CD44 positive cancer cells in epithelial ovarian cancer and their correlation with p53 and Ki67. *J Lab Physicians*. 2021;13(1):50–7. DOI: 10.1055/s-0041-1724235.
 15. Zhou Q, Chen A, Song H, Tao J, Yang H, Zuo M. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancer: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):3080–8. PMID: 26064196.
 16. Kryczek I, Liu S, Roh M, Vatan L, Szeliga W, Wei S et al. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells. *Int J Cancer*. 2012;130(1):29–39. DOI: 10.1002/ijc.25967.
 17. Wang YC, Yo YT, Lee HY, Liao YP, Chao TK, Su PH et al. ALDH1-bright epithelial ovarian cancer cells are associated with CD44 expression, drug resistance, and poor clinical outcome. *Am J Pathol*. 2012;180(3):1159–69. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.015.
 18. Papadaki C, Manolakou S, Lagoudaki E, Pontikakis S, Iero-diakonou D, Vogiatzoglou K et al. Correlation of PKM2 and CD44 protein expression with poor prognosis in platinum-treated epithelial ovarian cancer: A retrospective study. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):1013. DOI: 10.3390/cancers12041013.
 19. Li N, Dai C, Yang Y, Wu X, Wang L, Wang P. The expression levels and clinical significance of MFG-E8 and CD133 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Endocrinol*. 2020;36(9):803–7. DOI: 10.1080/09513590.2019.1708892.
 20. Yu L, Zhu B, Wu S, Zhou L, Song W, Gong X et al. Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KiSS-1, and MACC1 in the prediction of metastasis and prognosis in ovarian carcinoma. *Diagn Pathol*. 2017;12(1):23. DOI: 10.1186/s13000-017-0612-9.
 21. Ruscito I, Cacsire Castillo-Tong D, Vergote I, Ignat I, Stanske M, Vanderstichele A et al. Exploring the clonal evolution of CD133/aldehyde-dehydrogenase-1 (ALDH1)-positive cancer stem-like cells from primary to recurrent high-grade serous ovarian cancer (HGSOC). A study of the Ovarian Cancer Therapy – Innovative Models Prolong Survival (OCTIPS) Consortium. *Eur J Cancer*. 2017;79:214–25. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.04.016.

Информация об авторах

Снежанна Олеговна Генинг – врач-онколог, ассистент кафедры физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Инна Ивановна Антонеева – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры онкологии и лучевой диагностики Ульяновского государственного университета, заведующая гинекологическим отделением Ульяновского областного клинического онкологического диспансера, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Татьяна Владимировна Абакумова – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Татьяна Петровна Генинг – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии и патофизиологии Ульяновского государственного университета, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Елена Васильевна Слесарева – доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой морфологии Ульяновского государственного университета, Институт медицины, экологии и физической культуры.

Author information

Snezhanna O. Gening – Oncologist, Assistant, Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University.
<https://orcid.org/0000-0001-6970-6659>

Inna I. Antoneeva – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Professor, Department of Oncology and Radiation Diagnostics, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University; Head of the Gynecology Department, Ulyanovsk Regional Clinical Oncological Dispensary.
<https://orcid.org/0000-0002-1525-2070>

Tatyana V. Abakumova – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University.
<https://orcid.org/0000-0001-7559-5246>

Tatyana P. Gening – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University.
<https://orcid.org/0000-0002-5117-1382>

Elena V. Slesareva – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Morphology, Institute of Medicine, Ecology and Physical Culture, Ulyanovsk State University.
<https://orcid.org/0000-0003-3326-7863>

Участие жировой ткани в заживлении сквозной операционной раны стенки матки крысы

Н.Б. Тихонова, А.П. Милованов, В.В. Алексанкина, Т.В. Фокина, М.Н. Болтовская, А.П. Алексанкин

ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Москва, Россия

Введение. В настоящее время неизвестна роль компонентов жировой ткани в восстановлении поврежденной маточной стенки, хотя некоторые авторы заявляют о положительном влиянии клеточных препаратов из жировой ткани на репарацию поврежденной стенки матки лабораторных грызунов. Между тем стволовые клетки, полученные из жировой ткани, рассматриваются как наиболее перспективные для использования в регенеративной медицине. Цель исследования – провести оценку адипоцитарных компонентов в маточной стенке крыс при заживлении после сквозного хирургического разреза.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 40 самках крыс Спрейг-Дуоли. Животным наносили сквозной продольный разрез на стенку правого рога матки, левый рог служил интактным контролем. Морфологическое исследование маточной стенки проводили ежедневно у пяти животных с 1-х по 7-е и на 15-е сутки. Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином, а также трихромным красителем по Пикро Маллори. Адипоциты FABP4⁺ и макрофаги CD68⁺ выявляли методами иммуногистохимического анализа. Морфометрическое исследование проводили с помощью системы Leica (Leica, Германия). Обработку результатов выполняли в программе Statistica 12 (StatSoft).

Результаты. Период наиболее активного взаимодействия жировой ткани с поврежденным рогом длился с 3-х по 15-е сутки и совпадал с активизацией макрофагов в зоне заживления. Интактный левый рог матки в процессах взаимодействия с жировой тканью брыжейки не участвовал. Начиная с 3-х суток FABP4⁺ клетки располагались в маточной стенке оперированного рога группами, формируя округлые гнездообразные структуры. Скопления FABP4⁺ клеток локализовались в зоне заживления, около шовного материала и в периметрии вблизи участков прикрепления брыжейки. Динамика показателей площади гнезд различной локализации зависела от локализации и продолжительности заживления. В левом неповрежденном роге FABP4⁺ клетки отсутствовали.

Заключение. Охарактеризованы морфологические аспекты взаимодействия компонентов жировой ткани с поврежденной маточной стенкой в течение первых двух недель после сквозного хирургического разреза рога матки крысы. Результаты исследования свидетельствуют об активном участии клеток адипоцитарного происхождения в процессе заживления сквозного повреждения маточной стенки крыс на самых ранних сроках.

Ключевые слова: матка крысы, гистеротомия, заживление, адипоциты, макрофаги

Для корреспонденции: Наталия Борисовна Тихонова. E-mail: nb-ti@hotmail.com

Для цитирования: Тихонова Н.Б., Милованов А.П., Алексанкина В.В., Фокина Т.В., Болтовская М.Н., Алексанкин А.П. Участие жировой ткани в заживлении сквозной операционной раны стенки матки крысы. Клини. эксп. морфология. 2021;10(4):72–80. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.72-80.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына (№ АААА-А17-117013050049-3).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.08.2021. Получена после рецензирования 15.09.2021. Принята в печать 22.09.2021.

The role of adipose tissue in the healing of rat uterine wall after a full-thickness surgical incision

N.B. Tikhonova, A.P. Milovanov, V.V. Aleksankina, T.V. Fokina, M.N. Boltovskaya, A.P. Aleksankin

A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. Data about the role of components of adipose tissue in the repair of damaged uterine walls are limited, although a number of authors claim that cell-based drugs from adipose tissue have a positive effect on the repair of damaged uterine walls in laboratory rodents. Meanwhile, stem cells derived from adipose tissue are considered to be the most promising type of cells in regenerative medicine. The aim of the study was to evaluate the adipocyte components in the uterine wall of rats in healing after a full-thickness surgical incision.

Materials and methods. We conducted the study on 40 female Sprague Dawley rats. The animals were subjected to a full-thickness longitudinal incision in the wall of the right uterine horn, with the left one serving as an intact control. We carried out morphological examinations of the uterine walls daily in 5 animals from day 1 to 7 and on day 15. The sections from paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin and Mallory's trichrome staining. Immunohistochemistry detected FABP4⁺ adipocytes and CD68⁺ macrophages. The morphometric study was carried out using the Leica system (Leica, Germany). The results underwent processing in the Statistica 12 software (StatSoft).

Results. We noticed the period of the most active interaction of adipose tissue with the damaged horn to last from day 3 to 15 and coincide with the macrophage activation in the healing zone. The intact left uterine horn was not involved in the interaction processes with the mesenteric adipose tissue. Starting from day 3 FABP4⁺ cells in the uterine wall of the operated horn formed groups, creating rounded nest-like structures. Clusters of FABP4⁺ cells were localized in the healing zone, near the suture material, and in the perimetrium near the mesentery attachment sites. The changes over time of the indicators of the area of cell nests depended on the localization and duration of healing. There were no FABP4⁺ cells in the left intact horn.

Conclusion. We characterized the morphological interaction of adipose tissue with the damaged uterine wall during the first two weeks after a full-thickness surgical incision of the rat uterine horn. The results of the study indicate that adipocytes take an active part in the healing after a surgical incision of the rat uterine wall at the earliest stages.

Keywords: rat uterus, hysterotomy, healing, adipocytes, macrophages

Corresponding author: Natalia B. Tikhonova. E-mail: nb-ti@hotmail.com

For citation: Tikhonova N.B., Milovanov A.P., Aleksankina V.V., Fokina T.V., Boltovskaya M.N., Aleksankin A.P. The role of adipose tissue in the healing of rat uterine wall after a full-thickness surgical incision. Clin. exp. morphology. 2021;10(4):72–80. DOI: 10.31088/CEM2021.10.4.72-80. (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of state assignment to A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology (No. AAAA-A17-117013050049-3).

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

Received 20.08.2021. **Received in revised from** 15.09.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Восстановление поврежденной ткани требует взаимодействия множества типов клеток. Ткани многих органов, таких как кожа [1], костный мозг [2] и молочные железы [3], содержат локальные адипоциты. Жировые клетки секретируют цитокины, регулирующие восстановление гомеопэтических стволовых клеточных элементов [1] после повреждения, и бактерицидный пептид – кателицидин [4]. Наиболее изученными функциями клеток жировой ткани являются хранение и расщепление триглицеридов для быстрой продукции жирных кислот в целях обеспечения метаболизма окружающих клеток и тканей. Липолиз в адипоцитах (гидролиз триглицеридов) начинается с активации ограниченной по скорости липазы жирных триглицеридов и высвобождения неэстерифицированных жирных кислот, а также диацилглицеринов [5]. В последующем липазы катализируют гидролиз оставшихся жирных кислот. Введение липидов адипоцитарного происхождения стимулирует иммунные процессы в сальнике [6], а производные липидов эйкозаноиды, такие как простагландины, участвуют в восстановлении поврежденных тканей [7]. Липолиз адипоцитов, их дедифференцировка и миграция в зону кожного повреждения регулируют процесс заживления раны, инициируют воспалительную реакцию, активируют и привлекают макрофаги и обеспечивают последующее восстановление поврежденной зоны [8]. Сведения

о роли компонентов жировой ткани в восстановлении поврежденной маточной стенки в настоящее время отсутствуют, хотя некоторые авторы заявляют о положительном влиянии клеточных препаратов из жировой ткани на репарацию поврежденной маточной стенки лабораторных грызунов [9, 10]. Между тем стволовые клетки, полученные из жировой ткани (ADSC), считаются наиболее перспективным типом клеток в регенеративной медицине [11].

Цель исследования – оценка адипоцитарных компонентов в поврежденной маточной стенке крыс в динамике заживления после сквозного хирургического разреза.

Материалы и методы

Животные. В исследовании использованы 40 самок крыс Спрейг-Доули (возраст 14–16 недель, масса 220–280 граммов). При работе с животными соблюдали принципы гуманного обращения в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, и руководствовались ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с грызунами и кроликами», на проведение исследования получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека (протокол № 19 от 03.10.2017). Для точной идентификации фаз эстрального цикла [12] исследовали вагинальные мазки, окрашенные компонента-

ми набора «Диахим-Диф-Квик» («Абрис+», Россия). Уровень эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови определяли иммуноферментным анализом [13] с помощью наборов реагентов «ИммуноФА-Эстрадиол» и «ИммуноФА-ПГ» («НВО Иммунотех», Россия).

Проведение операции. Выполняли сквозной разрез стенки правого рога матки в фазе эструса. Левый рог матки оставляли интактным для сравнительного контроля. Оперировали под общим наркозом, вводили анестетик золетил (Vibras, Франция) – 10 мг/кг и седативный препарат ксиланит («Нита-Фарм», Россия) – 0,1 мг/кг. Рассекали кожу и слои передней брюшной стенки длиной 20 мм по белой линии, выводили правый рог матки, наносили продольный сквозной разрез длиной 10 мм на антимезометриальной стороне, матку и брюшную стенку ушивали непрерывным обвивным швом нитью «Ультрасорб USP 6/0», кожу – П-образным узловым швом нитью «Моносорб USP 4/0». Шов обрабатывали 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата («ЮжФарм», Россия) и спреем тетраамицин аэрозоль (IGS Aerosol GmbH, Германия).

Морфологическое исследование. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза. Макроскопическое изучение и забор образцов тканей проводили ежедневно у пяти животных с 1-х по 7-е и на 15-е сутки. Визуально оценивали поврежденный и прилегающие участки оперированного рога и состояние неоперированного. Вырезали содержащий разрез маточный сегмент и с помощью линейки определяли долю длины разреза со стороны серозной оболочки, сросшуюся с жировой тканью. Степень сращения маточной стенки и жировой ткани брыжейки обозначали термином «прикрепление» и выражали в процентах. Термином «окутывание» обозначили степень покрытия жировой тканью участка поврежденного рога по всему периметру. Долю серозной поверхности поврежденного сегмента маточной трубки, покрытую жировой тканью, вычисляли после линейных измерений длины и диаметра покрытой и непокрытой жиром частей и выражали также в процентах. При полном окутывании жировой тканью брыжейки оперированного участка рога степень сращения и степень окутывания принимали за 100%. Для гистологического исследования образцы ткани фиксировали 10% забуференным формалином («БиоВитрум», Россия). После 48-часовой фиксации материал промывали, дегидратировали и заливали в парафин «Гистомикс экстра» («БиоВитрум», Россия). Срезы с парафиновых блоков толщиной 4 мкм получали на ротационном микротоме Sakura Accu-Cut SRM200 (Sakura, Япония), окрашивали гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия), трихромным красителем по Пикро Маллори («БиоВитрум», Россия).

Иммуногистохимическое исследование. Адипоциты (FABP4⁺) выявляли кроличьими моноклональными антителами (мкАт) к FABP4 – транспортному белку липидов в адипоцитах (#ab219595, Abcam, Великобритания, рабочее разведение 1:100), макрофаги

(CD68⁺) – мышинными мкАт к CD68 (#ab31630, Abcam, Великобритания, рабочее разведение 1:100). Для проявления связавшихся первичных антител использовали набор реагентов Novolink™ Polymer Detection System (#RE7150, Leica, Великобритания). Срезы докрашивали гематоксилином Майера.

Микроскопию препаратов проводили с помощью системы Leica, состоящей из микроскопа Leica DM2500, видеокамеры Leica DFC290 и программного обеспечения для микроскопии Image Scope M (Leica, Германия). Исключали тангенциальные срезы. Морфометрический анализ выполняли на пяти поперечных срезах маточного сегмента, взятого от каждого животного в области повреждения, и в интактном роге. Общее количество скоплений FABP⁺ клеток подсчитывали по всему срезу при $\times 100$. Площадь каждого скопления определяли, выделяя область интереса в программе Image Scope M при $\times 200$. Количество клеток в скоплении считали при $\times 400$ во всех полях зрения. Количество CD68⁺ клеток подсчитывали при $\times 400$ в трех полях зрения в зонах интереса и выражали в единицах на 1000 мкм².

Статистический анализ. Обработку результатов выполняли в программе Statistica 12 (StatSoft). Результаты представляли в виде медианы с процентиллями 25% и 75% – Ме (Q1; Q3). Сравнение групп проводили с помощью U-критерия Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На 1-е сутки после хирургической операции наблюдали явный сквозной дефект стенки матки (рис. 1 А3), место ушивания, прилегающие и отдаленные участки со стороны брюшной полости не содержали никаких дополнительных структур или сращений с другими тканями (рис. 1 А1–2). На 2-е сутки в отдельных участках раневого канала проявлялись признаки стягивания краев раны и частичное закрытие дефекта, а также фрагментарное прикрепление жировой ткани брыжейки к раневой поверхности (рис. 1 В1–3). Тем не менее плотность сращения тканей брыжейки с поврежденной стенкой матки была незначительной, и они легко отделялись при натяжении. На 3-и сутки у всех животных на внешней поверхности разреза обнаружили фиксацию жировой ткани, местами прикрывающей дефект (рис. 1 С1–2). Края раны были преимущественно сомкнуты (рис. 1 С3). На 4-е сутки наблюдали полное исчезновение раневого канала. Со стороны маточной полости зона повреждения была заполнена эндометрием с незначительным количеством прорастающих маточных желез (рис. 1 С3, D3), а со стороны брюшной полости выявили прикрепление жировой ткани брыжейки к месту бывшего разреза и ее разрастание вокруг внешней поверхности рога (рис. 1 D1–2). На 5-е сутки эндометрий с растущими маточными железами заполнил всю поврежденную зону, незначительно выступив за пределы периметрия, вплоть до сращения с жировой тканью брыжейки, покрывающей раневую

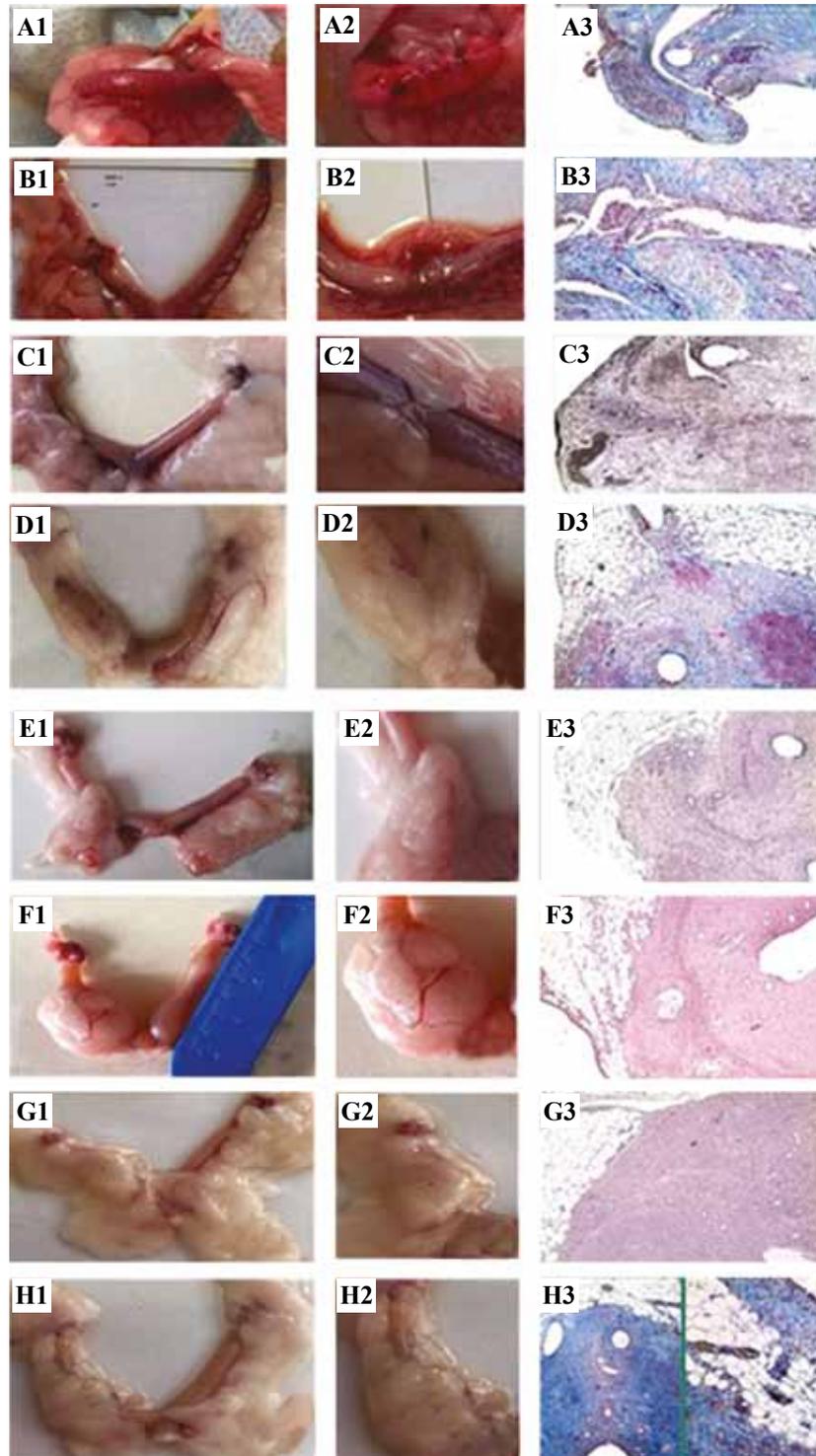


Рис. 1. Матка крысы после сквозного разреза стенки.

A – 1-е сутки после операции, B – 2-е сутки, C – 3-и сутки, D – 4-е сутки, E – 5-е сутки, F – 6-е сутки, G – 7-е сутки, H – 15-е сутки. A1–H1 – оперированный (правый) и неоперированный (левый) рога с мезометрием, A2–H2 – участок разреза стенки рога (правый), A3–H3 – зона заживления, $\times 50$, H3 – вставка $\times 100$; A3, B3, D3, H3 – окраска Пикро Маллори; C3, E3, F3, G3 – окраска гематоксилином и эозином

Fig. 1. The rat uterus after a full-thickness surgical incision of the uterine wall.

A – day 1 after the incision, B – day 2, C – day 3, D – day 4, E – day 5, F – day 6, G – day 7, H – day 15.

A1–H1 – damaged horn (right) and intact horn (left), A2–H2 – wounded uterine horn (right),

A3–H3 – sections of the healing zone, $\times 50$, H3 – insert $\times 100$; A3, B3, D3, H3 – stained by Picro Mallory; C3, E3, F3, G3 – H&E stain

область со стороны брюшной полости (рис. 1 ЕЗ). На 6–7-е сутки окутывание жировой тканью оперированного участка матки достигло в среднем 80% внешней поверхности (рис. 1 F–G). К 15-м суткам муфта из жировой ткани полностью или частично окутывала рог с оперированным участком (рис. 1 Н1–2), эндометрий заполнил область заживления до сращения с жировой тканью, причем участки жировой ткани проникали между слоями маточной стенки (рис. 1 Н3).

В таблице 1 представлены результаты оценки прикрепления жировой ткани к линии разреза и окутывания брыжейкой участка, содержащего повреждение. Установлено, что первые признаки прикрепления появлялись на 2-е сутки после операции, а неполное окутывание рога только на 3-и. К 4-м суткам ткань брыжейки покрывала разрез на протяжении всей его длины, а разрастающаяся с мезометриальной стороны жировая ткань окутывала до половины внешней стенки оперированного сегмента (рис. 1 D1–3). Полное сращение линии разреза с жировой тканью сохранялось вплоть до последнего дня наблюдений (15 суток). Окутывание оперированного сегмента ежедневно усиливалось и к 15-м суткам достигало 100%. На протяжении всего периода наблюдений интактный левый рог матки в процессах взаимодействия с жировой тканью брыжейки не участвовал, его маточная стенка подвергалась только физиологическим изменениям в соответствии с эстральным циклом (рис. 1).

Иммуногистохимический анализ распределения клеточных элементов жировой ткани в маточной стенке выявил отсутствие адипоцитов в интактном роге и изменение содержания FABP4⁺ клеток в процессе заживления оперированного рога (табл. 2). FABP4⁺ клетки располагались в поврежденной маточной стенке груп-

Таблица 1 | Table 1
Доля разреза с приросшей жировой тканью (прикрепление) и сегмента оперированного рога, окутанного жировой тканью (окутывание) | The percentage of the incision with the attached adipose tissue (attachment) and the operated horn segment, which was surrounded by adipose tissue (envelopment)

Сутки Day	Прикрепление Attachment (%), Me (Q1; Q3)	Окутывание Envelopment (%), Me (Q1; Q3)
1	–	–
2	40 (30; 50)	Незначительно / insignificantly
3	100 (80; 100)	30 (20; 30)
4	100 (100; 100)	50 (50; 60)
5	100 (100; 100)	70 (70; 80)
6	100 (100; 100)	90 (80; 100)
7	100 (100; 100)	90 (80; 100)
15	100 (100; 100)	100 (100; 100)

пами, формируя округлые гнездообразные скопления (рис. 2 A1, B1, C1, D1). Впервые скопления клеток данного фенотипа обнаружили на 3-и сутки заживления и только в зоне повреждения. На 4-е сутки FABP4⁺ клетки появились в отдаленных от повреждения участках периметрия, а на 5-е – также в зоне, прилегающей к шовному материалу (табл. 2). Динамика показателей площади гнезд зависела от локализации и продолжительности заживления. Изменение плотности клеток в скоплениях было незначительным и слабо отличалось в разных зонах (табл. 2). Позднее всего FABP4⁺ клетки

Таблица 2 | Table 2
Распределение клеток FABP4⁺ в маточной стенке оперированного рога | FABP4⁺ cells in the operated uterine wall

Сутки Day	Общее количество скоплений Total number of FABP4 ⁺ clusters, Me (Q1; Q3)	Площадь скоплений FABP4 ⁺ разной локализации, мкм ² Total area of FABP4 ⁺ clusters, μm ²			Количество FABP4 ⁺ клеток в скоплениях разной локализации в 1000 мкм ² The number of FABP4 ⁺ cells in the clusters per 1000 μm ²		
		зона повреждения the injury zone	зона шовного материала the zone near the suture fiber	отдаленный периметрий the distant uterine perimetrium	зона повреждения the injury zone	зона шовного материала the zone near the suture fiber	отдаленный периметрий the distant uterine perimetrium
1	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	–	–	–	–
3	0 (0; 1)	0 (0; 450)	–	–	0 (0; 8,3)	–	–
4	2 (2; 3)	4650 (3740; 5890)	–	3480 (3120; 4840)	6,1 (5,4; 6,4)	–	7,0 (6,7 ;8,0)
5	2 (2; 3)	2250 (1800; 3170)	1760 (0; 2200)	2870 (1460; 3420)	5,4 (4,4; 6,9)	4,5 (0; 6,8)	5,2 (4,4;5,3)
6	5 (4; 5)	4270 (3870; 4510)	1280 (0; 1920)	1740 (1200; 2700)	7,1 (6,9; 7,2)	5,2 (0; 5,8)	6,7 (6,3 ;7,6)
7	5 (5; 6)	3930 (3150; 4090)	2860 (1980; 4340)	3820 (3640; 4220)	6,4 (6,1; 7,9)	7,0 (6,7; 7,8)	6,0 (6,0 ;6,6)
15	3 (1; 4)	320 (0; 980)	–	1120 (720; 1370)	9,4 (0; 10,2)	–	7,3 (6,8 ;8,3)

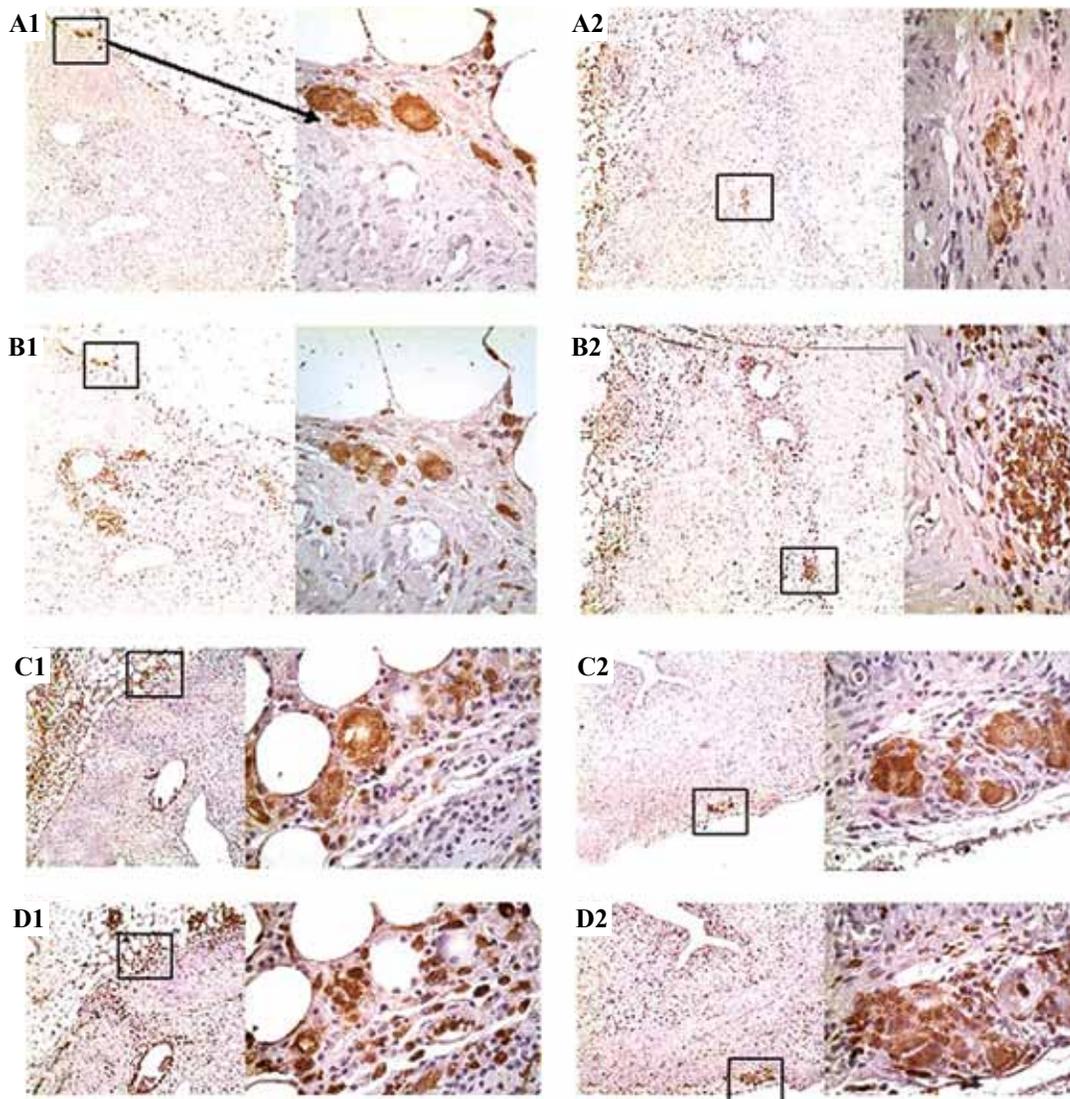


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование оперированного рога матки крысы.

A–B – 5-е сутки после операции, C–D – 15-е сутки. A1–D1 – FABP4⁺, A2–D2 – CD68⁺, ×50, вставки ×200

Fig. 2. Immunohistochemical assay of the damaged uterine horn.

A–B – day 5 after the incision, C–D – day 15. A1–D1 – FABP4⁺, A2–D2 – CD68⁺, ×50, inserts ×200

появлялись в зоне, прилегающей к шовному материалу, достигая максимума к 7-м суткам, а на 15-е они там уже не обнаруживались. В зоне повреждения и в отдаленном периметрии эти клетки выявлялись в наибольшем количестве на 4-е сутки, к 15-м их численность значительно сокращалась, причем в месте заживления в отдельных случаях FABP4⁺ клетки не обнаруживались. В периметрии гнезда присутствовали во всех наблюдениях, но их общая площадь сократилась в 3–5 раз. В разных зонах за весь период наблюдения плотность клеток в скоплениях отличалась незначительно.

Отмечено, что локализация FABP4⁺ клеток всегда совпадала с частичной локализацией макрофагов CD68⁺, но не наоборот. Кроме того, выявлен приток клеток фенотипа CD68⁺ в область, прилегающую к шовному материалу (рис. 2 A2, B2, C2). При этом ИГХ исследовании показало, что количество CD68⁺ клеток в зонах

интереса значительно меньше, чем клеток FABP4⁺, исключение составила лишь зона вблизи шовного материала (табл. 3). На 5-е сутки вблизи шовного материала CD68⁺ клеток было значительно больше, чем FABP4⁺ ($p < 0,05$), а с 6-х по 7-е сутки отличия были незначительные. На 15-е сутки плотность CD68⁺ клеток в данной локализации не отличалась от показателя 6-х суток, а FABP4⁺ клетки отсутствовали. В зоне заживления, как и вблизи шовного материала, макрофаги появлялись на 3-и сутки, что совпадало с началом закрытия раневого канала. Количество CD68⁺ клеток в месте заживления значимо отличалось от их содержания в эндометрии вне зоны повреждения ($p < 0,05$) в период с 3-х по 7-е сутки. На 15-е сутки отличия были незначительные. Достоверных отличий в количестве CD68⁺ в зонах скопления FABP⁺ и в отдаленном эндометрии на протяжении всего периода наблюдений не отмечено ($p > 0,05$).

Распределение CD68⁺ клеток в маточной стенке после повреждения |
CD68⁺ cells in the uterine wall after injury

Сутки Day	Количество CD68 ⁺ клеток в 1000 мкм ² CD68 ⁺ cells per 1000 μm ² , Me (Q1; Q3)			
	зона повреждения the injury zone	зона шовного материала the zone near the suture fiber	зона скопления FABP ⁺ the FABP ⁺ cluster	эндометрий вне зоны повреждения endometrium outside the zone of damage
3	0,9 (0,9; 1,0)	0,2 (0,0; 0,2)	–	1,4 (1,4; 1,8)
4	3,2 (3,1; 3,3)	2,2 (2,2; 2,3)	2,6 (2,5; 2,7)	1,5 (1,5; 1,5)
5	2,9 (2,6; 3,1)	8,2 (6,8; 8,3)	1,2 (1,2; 1,7)	1,2 (1,2; 1,2)
6	2,3 (2,3; 2,4)	4,7 (4,6; 4,8)	1,1 (0,6; 1,1)	2,0 (1,9; 2,0)
7	2,9 (2,4; 2,9)	4,9 (4,8; 5,0)	1,4 (0,8; 1,5)	1,7 (1,3; 1,7)
15	1,2 (1,1; 1,3)	4,6 (3,8; 4,9)	0,9 (0,8; 1,2)	1,0 (1,0; 1,1)

Обсуждение

В процессе заживления хирургического сквозного разреза маточной стенки крыс обнаружено прикрепление мезометрия к раневой поверхности, которое впервые отмечено на 2-е сутки в отдельных случаях, в местах частичного стягивания раны. На 4-е сутки во всех наблюдениях место разреза по всей длине срасталось с жировой тканью брыжейки. Затем жировая ткань продолжала распространяться по серозной оболочке вокруг рога матки. К 15-м суткам сегмент рога с поврежденным участком был окутан жировой тканью со всех сторон, как муфтой, с проникновением участков жира между слоями маточной стенки. Объем жировой муфты отличался от случая к случаю, что было обусловлено, видимо, индивидуальными особенностями животных. Сведения о роли жировой ткани в заживлении маточной стенки в научной литературе отсутствуют, при этом в единичных работах на грызунах авторы указывают на сращение тканей брыжейки с поврежденным участком маточной стенки в первые дни после операции, но не дают никаких комментариев по данному поводу [14, 15]. В исследовании К. Schlenger et al. показали, что прикрепление мезометриального жира к ране начиналось через сутки после гистеротомии, а уже к 14-му дню жировой слой отсутствовал над поврежденной зоной в большинстве образцов [15]. Тем не менее в нашем исследовании через сутки поврежденный участок был совершенно свободным от каких-либо спаек. Первые признаки прикрепления ткани брыжейки мы обнаружили лишь на 2-е сутки, и далее жировая масса вокруг рога только нарастала вплоть до окончания периода наблюдений (рис. 1). Возможно, различия в проведении операции и индивидуальные особенности животных оказали влияние на временные показатели прикрепления жировой ткани к ране. Так, С.С. Buhimschi et al. отмечали межлинейные различия в регенеративной способности маточной стенки после гистеротомии у мышей [14]. Наши наблюдения согласуются с данными других исследователей [15] в том, что в первые дни жировая ткань брыжейки прикрепляется к серозной оболочке поврежденной маточной стенки и распространяется далее по неповрежденной

поверхности, окутывая, в большей или меньшей степени, сегмент рога с повреждением со всех сторон в виде муфты. Таким образом, на самом раннем этапе заживления раневое пространство отделяется от брюшной полости тканевыми элементами еще до полного сращения краев.

Основным объектом исследования в данной работе служили клетки адипоцитарного происхождения с фенотипом FABP⁺ (синонимы: ALBP, aP2) – белком, связывающим жирные кислоты и участвующим в их внутриклеточной транспортировке [16]. Данный белок обнаружен также в макрофагах/пенистых клетках [17], поэтому перед нами стояла задача выяснить, могут ли выявляемые нами FABP⁺ клетки являться макрофагами. В результате сравнения на серийных срезах плотности клеток FABP⁺ и CD68⁺ в местах скопления нами показано значительное превышение показателей для FABP⁺, что указывает на присутствие именно адипоцитарных клеточных элементов в исследованных локализациях. Интересно, что после заполнения раневого пространства к 15-м суткам FABP⁺ клетки исчезали в околословном пространстве во всех наблюдениях и в зоне заживления в части наблюдений, однако их скопления продолжали обнаруживаться в отдаленных участках периметрии в местах прикрепления жировой ткани к брюшной поверхности рога.

В настоящей работе мы не акцентируем внимание на нейтрофилах – основных компонентах воспалительной фазы заживления, но следует отметить, что в зоне вблизи шовного материала их присутствие значительно снижалось на 3-и сутки, когда там начинали выявляться макрофаги. По данным литературы, пиковое значение содержания нейтрофилов в каждой ране также отмечается на 2-е сутки [18]. Количество макрофагов, мигрировавших в раневую зону кожи, тоже увеличивается на 2-е сутки и остается стабильным до 5-х суток, а затем начинает постепенно снижаться до фонового уровня к 14-м суткам [19]. Нами установлено, что к 5-м суткам в зоне заживления маточной стенки FABP⁺ клетки появляются только при отсутствии инфильтрации нейтрофилами. В участках около шовного материала с продолжающейся инфильтрацией нейтрофилами в отдельных

случаях FABP4⁺ клетки не обнаруживались. В левом неповрежденном роге FABP4⁺ клетки отсутствовали.

Маточная стенка – достаточно лабильная структура, отвечающая на действие половых гормонов в эстральном цикле изменением своих морфометрических показателей [20–22]. В зависимости от фазы эстрального цикла изменяется распределение макрофагов в маточной стенке [23, 24]. Продолжительность эстрального цикла крыс – всего 4–5 суток [13], поэтому при исследовании роли макрофагов в заживлении маточной стенки важно учитывать влияние гормонального фона на изменение их показателей. В качестве показателя, относящегося к физиологическим изменениям в эстральном цикле, мы определяли содержание макрофагов в участке эндометрия, отдаленном от зоны повреждения. К 15-м суткам достоверных различий в содержании CD68⁺ клеток в участке заживления и в отдаленных участках эндометрия не обнаружено, что свидетельствует о завершении активной роли макрофагов в процессе регенерации этой зоны и приближении ее к восстановлению физиологических функций. Подобные результаты получены при исследовании заживления ран кожи [19]. Изменения в количестве и фенотипе макрофагов могут определять состояние рубцовой ткани [25].

Заключение

В представленной работе охарактеризованы морфологические аспекты взаимодействия компонентов жировой ткани с поврежденной маточной стенкой в течение первых двух недель после сквозного хирургического разреза рога матки крысы. Показано, что клетки адипоцитарного происхождения принимают активное участие в процессе заживления сквозного повреждения маточной стенки крыс на самых ранних сроках. Жировая ткань брыжейки, прикрепляясь к раневому дефекту, создает изолирующую прослойку, отделяющую поврежденную зону от брюшной полости, и, возможно, является основным или дополнительным источником для поступления в область регенерации мезенхимальных стромальных стволовых клеток, обеспечивая успешное восстановление поврежденных тканей. Период наиболее активного взаимодействия жировой ткани с поврежденным рогом длится с 3-х по 15-е сутки и совпадает с активизацией макрофагов в зоне заживления. Тем не менее в зонах активной воспалительной реакции, инфильтрованных полиморфноядерными клетками, адипоциты отсутствуют. Для более детальной характеристики роли жировой ткани как возможного источника факторов, стимулирующих регенеративные процессы поврежденной маточной стенки, необходимы дальнейшие исследования.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.Б. Тихонова, А.П. Милованов. Сбор и обработка материала – В.В. Алексанкина, Н.Б. Тихонова, Т.В. Фокина, А.П. Алексанкин. Написание текста – Н.Б. Тихонова. Редактирование – А.П. Милованов, М.Н. Болтовская.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.B. Tikhonova, A.P. Milovanov. Collected the data and performed the analysis – V.V. Aleksankina, N.B. Tikhonova, T.V. Fokina, A.P. Alexankin. Wrote the paper – N.B. Tikhonova. Edited the manuscript – A.P. Milovanov, M.N. Boltovskaya.

Литература/References

1. Zhang Z, Shao M, Hepler C, Zi Z, Zhao S, An YA et al. Dermal adipose tissue has high plasticity and undergoes reversible de-differentiation in mice. *J Clin Invest*. 2019;129(12):5327–42. DOI: 10.1172/JCI1130239.
2. Zhou BO, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios JJ, Naveiras O et al. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and hematopoiesis by secreting SCF. *Nat Cell Biol*. 2017;19(8):891–903. DOI: 10.1038/ncb3570.
3. Wang QA, Song A, Chen W, Schwalie PC, Zhang F, Vishvanath L et al. Reversible de-differentiation of mature white adipocytes into preadipocyte-like precursors during lactation. *Cell Metab*. 2018;28(2):282–288.e3. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.05.022.
4. Zhang LJ, Guerrero-Juarez CF, Hata T, Bapat SP, Ramos R, Plikus MV et al. Innate immunity. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science*. 2015;347(6217):67–71. DOI: 10.1126/science.1260972.
5. Frühbeck G, Méndez-Giménez L, Fernández-Formoso JA, Fernández S, Rodríguez A. Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev*. 2014;27(1):63–93. DOI: 10.1017/S095442241400002X.
6. Tynan GA, Hearnden CH, Oleszycka E, Lyons CL, Coutts G, O'Connell J et al. Endogenous oils derived from human adipocytes are potent adjuvants that promote IL-1 α -dependent inflammation. *Diabetes*. 2014;63(6):2037–50. DOI: 10.2337/db13-1476.
7. Nelson AM, Loy DE, Lawson JA, Katseff AS, Fitzgerald GA, Garza LA. Prostaglandin D2 inhibits wound-induced hair follicle neogenesis through the receptor, Gpr44. *J Invest Dermatol*. 2013;133(4):881–9. DOI: 10.1038/jid.2012.398.
8. Shook BA, Wasko RR, Mano O, Rutenberg-Schoenberg M, Rudolph MC, Zirak B et al. Dermal adipocyte lipolysis and myofibroblast conversion are required for efficient skin repair. *Cell Stem Cell*. 2020;26(6):880–895.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2020.03.013.
9. Shao X, Ai G, Wang L, Qin J, Li Y, Jiang H et al. Adipose-derived stem cells transplantation improves endometrial injury repair. *Zygote*. 2019;27(6):367–74. DOI: 10.1017/S096719941900042X.
10. Yotsumoto F, Iwaguro H, Harada Y, Sobajima S, Suwabe T, Miyamoto S. Adipose tissue-derived regenerative cells improve implantation of fertilized eggs in thin endometrium. *Regen Med*. 2020;15(7):1891–904. DOI: 10.2217/rme-2020-0037.
11. Sun H, Lu J, Li B, Chen S, Xiao X, Wang J et al. Partial regeneration of uterine horns in rats through adipose-derived stem cell sheets. *Biol Reprod*. 2018;99(5):1057–69. DOI: 10.1093/biolre/iy121.
12. Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: A quantitative and qualitative analysis. *Anim Reprod*. 2013; 10(4):677–83.
13. Andersson H, Rehm S, Stanislaus D, Wood CE. Scientific and regulatory policy committee (SRPC) paper: Assessment of cir-

- culating hormones in nonclinical toxicity studies III. female reproductive hormones. *Toxicol Pathol.* 2013;41(6):921–34. DOI: 10.1177/0192623312466959.
14. *Buhimschi CS, Zhao G, Sora N, Madri JA, Buhimschi IA.* Myometrial wound healing post-Cesarean delivery in the MRL/MpJ mouse model of uterine scarring. *Am J Pathol.* 2010;177(1):197–207. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091209.
 15. *Schlenger K, Höckel M, Schwab R, Frischmann-Berger R, Vaupel P.* How to improve the uterotomy healing. I. Effects of fibrin and tumor necrosis factor-alpha in the rat uterotomy model. *J Surg Res.* 1994;56(3):235–41. DOI: 10.1006/jsr.1994.1037.
 16. *Matarese V, Bernlohr DA.* Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *J Biol Chem.* 1988;263(28):14544–51. PMID: 2844775.
 17. *Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT.* The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis.* 2002;165(2):259–69. DOI: 10.1016/s0021-9150(02)00305-2.
 18. *Kim MH, Liu W, Borjesson DL, Curry FR, Miller LS, Cheung AL et al.* Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging. *J Invest Dermatol.* 2008;128(7):1812–20. DOI: 10.1038/sj.jid.5701223.
 19. *Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH.* Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* 2011;216(7):753–62. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.01.001.
 20. *Westwood FR.* The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol.* 2008;36(3):375–84. DOI: 10.1177/0192623308315665.
 21. *Williams T, Rogers AW.* Morphometric studies of the response of the luminal epithelium in the rat uterus to exogenous hormones. *J Anat.* 1980;130(Pt 4):867–81. PMID: 7429973.
 22. *Grunert G, Neumann G, Porcia M, Tchernitchin AN.* The estrogenic responses to clomiphene in the different cell types of the rat uterus: Morphometrical evaluation. *Biol Reprod.* 1987;37(3):527–38. DOI: 10.1095/biolreprod37.3.527.
 23. *Wood GA, Fata JE, Watson KL, Khokha R.* Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction.* 2007;133(5):1035–44. DOI:10.1530/REP-06-030.
 24. *Kaushic C, Frauendorf E, Rossoll RM, Richardson JM, Wira CR.* Influence of the estrous cycle on the presence and distribution of immune cells in the rat reproductive tract. *Am J Reprod Immunol.* 1998;39(3):209–16. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1998.tb00355.x.
 25. *Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ.* Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1545. PMID: 28714933.

Информация об авторах

Наталья Борисовна Тихонова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Андрей Петрович Милованов – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Валентина Викторовна Алексанкина – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Татьяна Васильевна Фокина – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Марина Николаевна Болтовская – доктор биологических наук, заведующая лабораторией патологии репродукции НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Андрей Павлович Алексанкин – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Author information

Natalya B. Tikhonova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0001-5437-6933>

Andrey P. Milovanov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0001-8804-0258>

Valentina V. Aleksankina – Cand. Sci. (Biol.), Junior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0001-9944-0230>

Tatyana V. Fokina – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-2467-7660>

Marina N. Boltovskaya – Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Pathology of Reproduction, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-9751-2066>

Andrey P. Aleksankin – Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0001-6686-0896>

К 100-летию со дня рождения Беллы Соломоновны Гусман (1921–1983)

To the 100th anniversary of Bella S. Gusman
(1921–1983)

Всего и надо, что взглядеться, – боже мой,
Всего и дела, что внимательно взглядеться, –
И не уйдешь, и никуда уже не деться
От этих глаз, от их внезапной глубины.
<...>

Но вот глаза – они уходят навсегда,
Как некий мир, который так и не открыли,
Как некий Рим, который так и не отрыли,
И не отрыть уже, и в этом вся печаль.

Юрий Левитанский



11 декабря 2021 года исполнилось 100 лет со дня рождения Беллы Соломоновны Гусман, профессора, доктора медицинских наук, заведующей лабораторией патологической анатомии болезней детского возраста Института морфологии человека АМН СССР. Чем больше времени отделяет нас от ухода Беллы Соломоновны, тем сильнее звучат в душе воспоминания об этом светлом человеке.

Б.С. Гусман родилась в Баку. В 1939 году она поступила на санитарно-гигиенический факультет Азербайджанского медицинского института. В 1944-м по окончании института была направлена на работу в Институт микробиологии и эпидемиологии Минздрава Азербайджанской ССР, где работала до 1947 года в должности врача патоморфологической лаборатории. В 1947 году Б.С. Гусман поступила в аспирантуру при лаборатории общей патологической анатомии (руководитель – академик АМН СССР А.И. Абрикосов) Института нормальной и патологической морфологии АМН СССР, которую закончила под руководством А.И. Струкова в 1950-м, защитив кандидатскую диссертацию на тему «Клапанный аппарат сердца при некоторых острых инфекциях». С 1951 по 1957 год работала в Баку, заведя патологоанатомическими отделениями в Институте офтальмологии и больнице № 47. В 1957 году Б.С. Гусман переехала в Москву и стала работать в лаборатории патологической анатомии болезней детского возраста АМН, возглавляемой академиком АМН СССР М.А. Скворцовым.

С 1961 года и до последних дней жизни Б.С. Гусман работала во вновь организованном Институте морфологии человека АМН СССР (директор – академик АМН СССР А.П. Авцын). Начиная с 1976 года Белла Соломоновна возглавляла лабораторию патологической анатомии болезней детского возраста. Ее исследования были посвящены проблеме иммуноморфологии дет-

ских инфекционных заболеваний, она занималась изучением вопросов экспериментальной патоморфологии инфекционных болезней (орнитоз, заражение L-формами бактерий, микоплазмоз). Особое внимание она обращала на структурные изменения, развивающиеся в органах иммуногенеза. В 1970 году Белла Соломоновна Гусман защитила докторскую диссертацию на тему «Имуноморфология некоторых детских инфекций», по данным экспериментальной и клинической патологии» и опубликовала эту работу в виде монографии.

Многолетние исследования Беллы Соломоновны Гусман и ее учеников были посвящены патологии респираторного микоплазмоза и смешанных микоплазма-вирусных инфекций. Экспериментальные работы проводились совместно с сотрудниками НИИ эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (в настоящее время Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи) и Института микробиологии Университета имени Гумбольдта (Берлин). В работах Б.С. Гусман и соавторов было показано, что экспериментальное инфицирование сирийских хомяков микоплазмой вызывает общее тяжелое заболевание с преимущественным поражением респираторного тракта с одновременным вовлечением в патологический процесс почек и центральной нервной системы. Б.С. Гусман в соавторстве со своими учениками впервые обнаружила, что ответ органов иммуногенеза на развитие экспериментальной опухоли в центральной нервной системе протекает двухфазно: в первой фазе происходит активация тимуса, лимфатических узлов и селезенки; на более поздних стадиях наступает угнетение реакции органов иммуногенеза. Она активно участвовала в решении многих практических проблем здравоохранения,

в частности выезжала в экспедиции в Магаданскую область для изучения географической патологии и иммуноморфологии распространенных там легочных заболеваний, а также в Хабаровск с целью уточнения причин детской заболеваемости и смертности в зоне строительства БАМа.

Б.С. Гусман – автор 120 работ, в том числе двух монографий, методических рекомендаций по диагностике острых респираторных заболеваний у детей. Итогом ее многолетней работы стало руководство «Патологическая анатомия болезней плода и ребенка» (соавтор профессор Т.Е. Ивановская, 1981), которое удостоено премии имени А.И. Абрикосова. И наверное, символично, что ученице Алексея Ивановича Абрикосова была присуждена премия его имени.

Под руководством Б.С. Гусман защищены четыре докторские и 15 кандидатских диссертаций. Белла Соломоновна Гусман награждена почетным знаком «Отличнику здравоохранения».

В жизни человека есть события, определяющие его судьбу. Встреча с Беллой Соломоновной определила наш путь. Существует высказывание писателя Андрея Арьева «...Людям свойственно увлекаться и тосковать лишь по тому, что их поразило в юности, и несхваченное, непознанное в молодости по-настоящему уже не понимается никогда». Вероятно, это положение может быть отнесено к той позиции, которая была передана Беллой Соломоновной своим ученикам. В наших воспоминаниях она осталась светлым, душевным человеком, у нее были высокие профессиональные качества. Общение с Беллой Соломоновной заставляло думать, не было докучающей опеки, четкие указания нужно было выполнять в поставленные сроки, развитие и решение задач, поставленных перед учеником, зависели от исполнителя.

Она окончила музыкальное училище, собиралась поступать в консерваторию. По настоянию отца – врача-рентгенолога Белла Соломоновна поступила в медицинский институт, но любовь к музыке осталась на всю жизнь. В доме было фортепиано, поэтому часто звучала музыка. А еще Белла Соломоновна пела в кругу друзей. Б.С. Гусман знала и любила литературу, музыку, живопись. Она говорила о новых книгах, спектаклях, кинофильмах, которые нужно читать и смотреть. Она учила не только нашей многотрудной специальности, но и мудрости жизни, отношению к людям.

Нам повезло, что мы встретили вдумчивого исследователя, доброжелательного учителя, обаятельную женщину.

Белла Соломоновна любила свою семью и трепетно относилась к родителям, мужу, детям, внучке. На всех хватало тепла ее сердца. Из многочисленных командировок всем привозила подарки. Долгие годы



дружбы связывали Беллу Соломоновну с ведущими морфологами – Т.Е. Ивановской, В.А. Одиноквой, Б.Г. Гольдиной.

При этом на первом месте всегда была работа. До последних дней жизни все помыслы Беллы Соломоновны были с сотрудниками любимой лаборатории.

Жаль, что ее не стало так рано... Жизненный и творческий путь Беллы Соломоновны – образец беззаветного служения своему Отечеству и избранной профессии. Неоценим вклад Б.С. Гусман в изучение морфологических аспектов инфекционной патологии детского возраста. Это направление получило дальнейшее развитие в работах патологоанатомов страны.

С глубокой благодарностью и признательностью вспоминают о Б.С. Гусман ее ученики, отмечая 100-летие со дня ее рождения.

*Е.М. Непомнящая,
доктор медицинских наук,
профессор НМИЦ онкологии Минздрава России,
Ростов-на-Дону,*

*Т.В. Безуглова,
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Научно-исследовательского института морфологии
человека имени академика А.П. Авцына, Москва*