

КЛИНИЧЕСКАЯ и ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОРФОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

При поддержке Российского общества патологоанатомов

Том 10 | № S4 | 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
агентства «Урал-Пресс»

70045 по каталогу «Пресса
России» через агентство 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

Зайратьянц О.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

Макарова О.В., доктор мед. наук, профессор, Москва, Россия

Ответственный секретарь

Болтовская М.Н., доктор биол. наук, профессор, Москва, Россия

Редакционная коллегия

Александрова М.А., доктор биол. наук,
Москва, Россия

Алексеева Н.Т., доктор мед. наук,
профессор, Воронеж, Россия

Андреева Е.Р., доктор биол. наук, доцент,
Москва, Россия

Банин В.В., член-корр. РАН, доктор мед.
наук, профессор, Москва, Россия

Большакова Г.Б., доктор биол. наук,
Москва, Россия

Буравков С.В., доктор мед. наук,
Москва, Россия

Гарновская М.Н., кандидат биол. наук,
доцент, Чарльстон, США

Ковригина А.М., доктор биол. наук,
профессор, Москва, Россия

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 **S4** | 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” agency catalog
70045 according to the “Pressa
Rosii” catalog via ARZI agency

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

Savel'yev, 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.



Специальный выпуск, посвященный 60-летию Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына

Этот спецвыпуск журнала «Клиническая и экспериментальная морфология» посвящен юбилейной конференции в честь 60-летия со дня основания ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына». Мы гордимся славной историей нашего института, организованного еще в 1961 году академиком АМН СССР Александром Павловичем Авцыным. В стенах нашего института трудилась плеяда выдающихся ученых и врачей, среди них члены Российской академии медицинских наук А.И. Струков, Н.К. Пермяков, В.А. Шахламов, М.Р. Сапин, Д.А. Жданов, профессора Л.Д. Лиознер, Б.Б. Фукс, Б.С. Гусман, Е.Н. Тер-Григорова, Г.Г. Автандилов, Л.К. Романова, И.А. Казанцева и многие другие.

В соответствии с приказом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 687 от 27.07.2021 НИИ морфологии человека присвоено имя основателя института, выдающегося ученого мирового уровня академика Александра Павловича Авцына.

Научные исследования, проводившиеся в институте, легли в основу оригинальных направлений медицины – микроэлементозов человека, географической патологии, патологии репродукции, иммунопатологии, ультраструктурной патологии клетки, онкоморфологии, проблем материнской смертности, инфекционной патологии, включая проблемы СПИДа, гриппа, новой коронавирусной инфекции и ряда других. Коллектив института объединяет высокопрофессиональных специалистов, больших энтузиастов, преданных науке, – патологоанатомов, гистологов, клеточных биологов, анатомов, эмбриологов, исследования которых вносят существенный вклад в развитие медицины – как фундаментальной, так и прикладной. С большой радостью мы отмечаем приток в наш институт высокообразованной молоде-



жи – клинических ординаторов, аспирантов и соискателей, хорошо владеющих не только русским, но и иностранными языками, что позволяет следить за периодическими зарубежными изданиями и изучать хрестоматийные пособия в оригинале. Выполненные молодыми учеными диссертационные исследования, особенно в последние годы, дают нам уверенность в том, что наша специальность в надежных руках.

В юбилейной конференции приняли участие выдающиеся представители Российской академии наук – академики В.П. Чехонин, В.П. Стародубов, А.М. Дыгай, Г.М. Савельева, А.А. Кубатиев, Л.В. Адамян, М.А. Курцер, члены-корреспонденты В.Е. Радзинский, Г.Н. Голухов. Ведущие ученые, заведующие кафедрами патологической анатомии и гистологии медицинских вузов Москвы и Санкт-Петербурга выступили с интересными докладами на актуальные темы. Особый интерес у участников конференции вызвали доклады академика РАН М.А. Курцера, члена-корреспондента

РАН В.Е. Радзинского, профессора М.Р. Оразова, посвященные вопросам акушерства, гинекологии и репродуктологии и продемонстрировавшие тесную связь патолога с клиницистами.

Данный выпуск журнала смог вместить лишь часть оформленных в виде научных статей материалов докладов участников конференции.

Благодарю всех организаторов, участников и гостей нашей юбилейной конференции. Желаю всем крепкого здоровья, интересного сотрудничества, расширения границ нашего института во имя процветания фундаментальной и практической медицины.

*С глубоким уважением ко всем коллегам –
Л.М. Михалева,
доктор медицинских наук, профессор,
директор НИИ морфологии человека имени
академика А.П. Авцына*

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ REVIEWS

*Л.Е. Гуревич, Е.В. Бондаренко,
О.А. Васюкова, Л.М. Михалева*
Роль транскрипционных факторов
«коктейля Яманаки» (OCT4, SOX2, KLF4,
c-Myc) в дифференцировке соматических
клеток, их злокачественной трансформации
и прогрессировании опухолей

7

*L.E. Gurevich, E.V. Bondarenko,
O.A. Vasyukova, L.M. Mikhaleva*
The role of Yamanaka cocktail transcription factors
(OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc) in the differentiation
of somatic cells, their malignant transformation,
and tumor progression

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCH

*А.Л. Черняев, М.В. Самсонова, А.В. Аверьянов,
М.А. Макарова, К.Ю. Михайличенко*
Патологическая анатомия и компьютерная
томография диффузных кистозных заболеваний
легких

23

*A.L. Chernyaev, M.V. Samsonova, A.V. Averyanov,
M.A. Makarova, K.Yu. Mikhaylichenko*
Anatomic pathology and computed tomography
of diffuse cystic lung diseases

*К.Ю. Мидибер, А.Е. Бирюков, В.В. Печникова,
Н.А. Грачева, Н.К. Шахпазян, З.В. Гюева,
Л.М. Михалева*
Клинико-морфологическая неоднородность рака
желудка диффузного типа

34

*K.Yu. Midiber, A.E. Biryukov, V.V. Pechnikova,
N.A. Gracheva, N.K. Shakhpazyan, Z.V. Gioeva,
L.M. Mikhaleva*
Clinical and morphological heterogeneity of diffuse
gastric cancer

Т.Г. Траль, Г.Х. Толибова
Морфологические варианты гравидарной
трансформации эндометрия при неразвивающейся
беременности после экстракорпорального
оплодотворения

42

T.G. Tral, G.Kh. Tolibova
Morphological variants of decidual endometrial
transformation in missed abortion after in vitro
fertilization

*Е.Л. Казачков, А.Ю. Шаманова, И.Е. Панова,
Д.М. Ростовцев, Т.Н. Шамаева*
Клеточное и стромальное микроокружение
при метастазирующей меланоме хориоидеи

52

*E.L. Kazachkov, A.Yu. Shamanova, I.E. Panova,
D.M. Rostovcev, T.N. Shamaeva*
Cellular and stromal microenvironment of metastatic
choroidal melanoma

О.В. Ковалева, И.В. Булычева, А.Н. Грачев,
Н.С. Бабкин, Э.Р. Мусаев, Н.Е. Кушлинский
Прогностическая значимость экспрессии лиганда
рецептора программируемой клеточной гибели
PD-L1 в хордомимах

61 O.V. Kovaleva, I.V. Boulytcheva, A.N. Gratchev,
N.S. Babkin, E.R. Musaev, N.E. Kushlinskii
Prognostic significance of programmed cell death
receptor ligand PD-L1 expression in chordoma

Ю.А. Кириллов, М.А. Козлова, Л.А. Макартеца,
И.А. Чернов, Д.А. Арешидзе
Влияние хронической алкогольной
интоксикации и постоянного освещения
на морфофункциональное состояние печени

68 Yu.A. Kirillov, M.A. Kozlova, L.A. Makartseva,
I.A. Chernov, D.A. Areshidze
The effect of chronic alcohol intoxication and constant
illumination on the morphological and functional state
of the liver

И.С. Цветков, Н.А. Золотова, А.М. Косырева,
Д.Ш. Джалилова, В.В. Куделькина, В.П. Черников,
В.А. Мхитаров, Л.П. Михайлова, Н.И. Соболева,
В.А. Разживина, М.Т. Добрынина,
С.Э. Гельперина, О.В. Макарова
Морфологическая характеристика
нефротоксического действия
доксорубицина и наносомальной формы
поли-лактид-ко-гликолид (PLGA)-доксорубицина

77 I.S. Tsvetkov, N.A. Zolotova, A.M. Kosyрева,
D.Sh. Dzhaliilova, V.V. Kudelkina, V.P. Chernikov,
V.A. Mkhitarov, L.P. Mikhailova, N.I. Soboleva,
V.A. Razzhivina, M.T. Dobrynina,
S.E. Gelperina, O.V. Makarova
Morphological characteristics of nephrotoxicity
of doxorubicin and doxorubicin PLGA-nanoparticle

ХРОНИКА EVENTS

Юбилейная конференция НИИ морфологии
человека имени академика А.П. Авцына

87 Conference on the 60th Anniversary of A.P. Avtsyn
Research Institute of Human Morphology

Роль транскрипционных факторов «коктейля Яманаки» (OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc) в дифференцировке соматических клеток, их злокачественной трансформации и прогрессировании опухолей

Л.Е. Гуревич¹, Е.В. Бондаренко^{1,3}, О.А. Васюкова², Л.М. Михалева²

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

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Москва, Россия

³ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Минздрава России, Москва, Россия

В работе рассмотрена роль транскрипционных факторов «коктейля Яманаки» (OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc) в механизмах дифференцировки пула полипотентных клеток, называемых опухолевыми стволовыми клетками (ОСК), и их участия в процессах злокачественной трансформации соматических клеток и прогрессирования опухолей.

Ранее считалось, что основным свойством опухолевых клеток, определяющим их злокачественный потенциал, является повышенная пролиферативная активность. В настоящее время имеется все больше аргументов в пользу и другой концепции, которая объясняет продолженный рост, метастазирование и резистентность к терапии наиболее злокачественных опухолей с небольшой, покоящейся и редко делящейся популяцией полипотентных опухолевых клеток.

Началом нового направления в области биологии развития считают 2006 год, когда японские ученые К. Такахаши и С. Яманака опубликовали результаты своих работ по изучению свойств эмбриональных стволовых клеток и экспериментов по прямому репрограммированию соматических терминально дифференцированных клеток. В результате проведенных исследований было доказано, что для поддержания полипотентных свойств клеток бывает достаточно четырех транскрипционных факторов – Oct4, SOX2, KLF4, c-Myc, которые впоследствии и получили название «коктейль Яманаки». SOX2 и Oct4 находятся на вершине иерархии транскрипционных факторов, регулирующих плюрипотентные свойства клеток, их дифференцировку и дедифференцировку.

ОСК представляют собой хотя и сложную, но очень перспективную мишень для разработки инновационных схем диагностики и таргетной терапии новообразований. С этой точки зрения такими таргетными точками могут служить факторы плюрипотентности, входящие в состав «коктейля Яманаки», воздействуя на которые, вероятно, удастся подавить или снизить злокачественный потенциал наиболее агрессивных опухолей и даже предотвратить канцерогенную трансформацию в случаях предопухолевого патологического состояния.

Ключевые слова: «коктейль Яманаки», OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc, злокачественная трансформация

Для корреспонденции: Лариса Евсеевна Гуревич. E-mail: larisgur@mail.ru

Для цитирования: Гуревич Л.Е., Бондаренко Е.В., Васюкова О.А., Михалева Л.М. Роль транскрипционных факторов «коктейля Яманаки» (OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc) в дифференцировке соматических клеток, их злокачественной трансформации и прогрессировании опухолей. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):7–22. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.7-22.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Московского областного научно-исследовательского клинического института имени М.Ф. Владимирского (НИР № 70) и государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына (№ АААА-А19-119021590053-6).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 08.10.2021. Получена после рецензирования 28.10.2021. Принята в печать 16.12.2021.

The role of Yamanaka cocktail transcription factors (OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc) in the differentiation of somatic cells, their malignant transformation, and tumor progression

L.E. Gurevich¹, E.V. Bondarenko^{1,3}, O.A. Vasyukova², L.M. Mikhaleva²

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

² A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

³ National Medical Research Center of Endocrinology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

The paper reviews the role of transcription factors that are part of the Yamanaka cocktail (OCT4, SOX2, KLF4, and c-Myc) in the mechanisms of tumor stem cell (TSC) differentiation (a pool of pluripotent cells), their participation in the malignant transformation of somatic cells, and in tumor progression.

Their increased proliferative activity, which determines their malignant potential, was believed to be the main feature of tumor cells. Currently, there is more evidence supporting another concept that explains the continued tumor growth, metastasis, and resistance to therapy of most malignant tumors with a small, resting, and rarely dividing population of pluripotent tumor cells.

Year 2006 is considered to be the beginning of a new direction in developmental biology when Japanese researchers K. Takahashi and S. Yamanaka published the results of their studies on the properties of embryonic stem cells and experiments on direct reprogramming of somatic terminally differentiated cells.

The research proved that four transcription factors were sufficient to maintain the pluripotent properties of cells, namely Oct4, SOX2, KLF4, and c-Myc, which were later called *the Yamanaka cocktail*. Such factors as SOX2 and Oct4 are at the top of the hierarchy of transcription factors that regulate the pluripotent properties of cells, their differentiation, and dedifferentiation.

TSCs represent, albeit a complex, but very promising target for the development of innovative products for the diagnosis of and targeted therapy for neoplasms. From this point of view, the factors of pluripotency, which are parts of the Yamanaka cocktail, could be such promising targets, whose effect will probably be able to suppress or reduce the malignant potential of the most aggressive tumors and even prevent carcinogenic transformation in cases of precancerous pathology.

Keywords: Yamanaka cocktail, OCT4, SOX2, KLF4, c-Myc, malignant transformation

Corresponding author: Larisa E. Gurevich. E-mail: larisgur@mail.ru

For citation: Gurevich L.E., Bondarenko E.V., Vasyukova O.A., Mikhaleva L.M. The role of Yamanaka cocktail transcription factors (OCT4, SOX2, KLF4, and c-Myc) in the differentiation of somatic cells, their malignant transformation, and tumor progression. *Clin. exp. morphology*. 2021;10(S4):7–22. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.7-22 (In Russ.).

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute (Research project No. 70) and State Assignment to A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology (No. AAAA-A19-119021590053-6).

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

Received 08.10.2021. **Received in revised form** 28.10.2021. **Accepted** 16.12.2021.

Фундаментальное значение в понимании механизмов канцерогенеза имеет изучение особенностей экспрессии и функционирования генов, играющих ключевую роль в дифференцировке стволовых клеток (СК) у эмбрионов и резервных тканевых полипотентных клеток у взрослых организмов. Изменения в программе функционирования клеточного генома могут серьезно менять программу дифференцировки и деления клеток. В настоящее время нет сомнений, что рак является гетерогенным заболеванием, а внутриопухолевая гетерогенность часто становится причиной неэффективности терапии и прогрессирования онкологических заболеваний [1, 2].

Опухоли представляют собой сложную экосистему, которая состоит не только из опухолевых клеток, но и содержит популяции различных инфильтрирующих эндотелиальных, кровяных клеток и клеток других типов, которые вместе именуется микроокружением опухоли и могут влиять на ее рост и прогрессирова-

ние, изменять клеточный метаболизм. Функционирование всей этой сложной экосистемы в конечном счете и ответственно за степень эффективности терапии [3]. В течение длительного времени преобладающей была концепция, которая постулировала, что основным свойством опухолевых клеток, определяющим их злокачественный потенциал, является повышенная пролиферативная активность, непосредственно связанная со скоростью их деления. Расширенное секвенирование генома продемонстрировало, что рак у одного пациента представляет собой гетерогенную смесь генетически разных субклонов опухолевых клеток [4, 5]. Уникальные мутации внутри каждого субклона могут по-разному влиять на функциональную гетерогенность опухоли. И сегодня действие большинства препаратов для лечения онкологических заболеваний обусловлено этой концепцией, то есть основывается на положении о том, что к лекарствам особенно чувствительны быстро

делящиеся опухолевые клетки. Многие из используемых методов лечения наиболее злокачественных новообразований в разной степени увеличивают сроки выживания пациентов, но не позволяют полностью излечить их.

В настоящее время широко обсуждается, изучается и находит подтверждение и другая концепция, которая заключается в том, что продолженный рост и метастазирование наиболее злокачественных опухолей обеспечивает очень небольшая, покоящаяся и редко делящаяся популяция полипотентных опухолевых клеток. Такие клетки сохраняются даже после «успешного» лечения злокачественных новообразований, они могут оставаться в покое в течение разного периода времени, которое зависит от типа опухоли и ее биологического потенциала – степени дифференцировки ее клеток. В определенный момент под воздействием различных эндогенных и экзогенных факторов эти клетки активируются, начинают делиться и образуют пулы опухолевых клеток, которые и ответственны за рецидивный рост и метастазирование опухолей и обычно устойчивы к ранее применявшимся схемам химиолучевой и таргетной терапии [6–8]. Клетки, обладающие подобными свойствами, называют опухолевыми стволовыми клетками (ОСК, CSC), а иногда – клетками, инициирующими рак, они обладают способностью к быстрому самообновлению, являющемуся одним из основных свойств полипотентных клеток. Как показано на моделях мышей *in vivo*, истинные стволовые клетки также обладают высокой канцерогенностью и могут генерировать целый спектр клонов раковых клеток [8, 9]. Самообновление – это важнейший биологический механизм, при котором стволовая клетка при делении производит одну (асимметричное деление) или две (симметричное деление) дочерние клетки, обеспечивающие сохранение или увеличение популяции стволовых клеток в течение длительного времени. Многие исследования установили, что генетические изменения при развитии рака следуют законам дарвиновской эволюции, в результате чего клетка, наделенная выгодной наследственной мутацией, дает потомство, имеющее преимущество в выживании по сравнению с другими клетками, в которых эта мутация отсутствует, а ее потомство будет производить доминирующую в опухоли популяцию клеток. Топологический отбор опухолей показал, что разные регионы обладают разными мутациями, которые отражают генетические субклоны, заселяющие разные части одной опухоли [10]. Было замечено, что клетки, вызывающие метастатические поражения, имели много дополнительных мутаций, то есть при метастазировании происходит дальнейшая клональная эволюция опухоли.

Гипотеза о том, что ОСК могут происходить непосредственно от имеющихся в норме в каждом органе тканевых полипотентных СК, основывается на наличии у них двух фундаментальных свойств: 1) способности к самообновлению, длительному выживанию, миграции,

разнонаправленной дифференцировке, лекарственной устойчивости и 2) способности накапливать генетические и эпигенетические аномалии, которые существенно увеличивают вероятность их злокачественной трансформации [5, 11, 12].

В конце XX века были получены данные, ставшие важными аргументами в пользу теории об особых свойствах популяции полипотентных СК. Несколько групп исследователей изучали гены различных факторов транскрипции (ФТ), необходимых для поддержания полипотентных свойств клеток с характеристиками СК, – Oct3/4 (POU5F1), SOX2 и Nanog. 2006 год, когда японские исследователи К. Takahashi и S. Yamanaka опубликовали результаты своих исследований по изучению свойств эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и экспериментов по прямому репрограммированию соматических терминально дифференцированных клеток, считают началом нового направления в области биологии развития [13]. В 2007 году К. Takahashi и S. Yamanaka получили СК из фибробластов кожи взрослого человека и назвали эти репрограммированные соматические клетки индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК, iPSC), которые во многом аналогичны по свойствам ЭСК и экспрессируют такой же набор ФТ [14]. Они выделили несколько десятков генов, активность которых в СК была заметно выше, чем в дифференцированных соматических клетках. Сейчас доказано, что ЭСК и ИПСК обладают способностью дифференцироваться во все известные клеточные типы взрослого организма. При определенных условиях в культуре ткани эти клетки могут неограниченно долго расти, сохраняя при этом нормальный набор хромосом. Опухолевые стволовые клетки (ОСК), выделенные из опухолей разных типов – эпителиальных, нейроэктодермальных или мезенхимальных, отличаются по своей способности к росту, экспрессии различных ФТ и гликопротеинов и по используемым ими сигнальным путям передачи. Анализ изменений, происходящих в фибробластах после их репрограммирования, показал, что спустя 10–15 дней после инфицирования соматических клеток ретровирусами, содержащими разные наборы ФТ, в них можно обнаружить эндогенную экспрессию таких факторов как Oct4, SOX2 и Nanog, одновременно с этим в них происходят реактивация теломеразы и инактивация X-хромосомы. Было показано, что каждая комбинация активированных ФТ нарушает нормальный гомеостаз клеток и переводит их в промежуточное состояние, которое характеризуется одновременной экспрессией нескольких факторов [15]. В результате проведенных исследований доказано, что для поддержания полипотентных свойств клеток бывает достаточно четырех ФТ – Oct4, SOX2, KLF4, c-Myc (сокращенно OKSM), которые впоследствии были названы «коктейлем Яманаки». Недифференцированные ИПСК, полученные после обработки «коктейлем Яманаки», обладали сходной с таковыми у ЭСК морфологией, ростовыми свойства-

ми и экспрессировали характерный набор ФТ [13, 14]. В экспериментальных работах доказано, что сверхэкспрессия даже небольшого количества ключевых ФТ способна запустить процесс репрограммирования клеток и перевести их в новое стабильное состояние, связанное с изменениями активности сотен генов, при этом по мере трансформации ИПСК в дифференцированные фибробласты размеры теломер в клетках уменьшались, достигая первоначальных [16]. В 2012 году за эти фундаментальные открытия в области биологии Синъя Яманака совместно с британским биологом Джоном Гёрдоном был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине. Свою собственную модель репрограммирования, которую они назвали двухфазным переключением (two-stage switch), в 2009 году предложили W. Scherer и S. Copley [17]. Согласно этой модели, на первом этапе происходит ремоделирование участков хроматина, где располагаются ключевые гены, ответственные за проявление свойств плюрипотентности, а на втором запускается весь транскрипционный каскад ее индукции.

Характеристика активности факторов транскрипции, входящих в состав «коктейля Яманаки»

1. Фактор транскрипции Oct3/4 (POU5F1)

ОCT4 (октамерсвязывающий фактор транскрипции 4), также известный как POU5F1 (фактор транскрипции 1-го класса 5-го домена POU), принадлежит к семейству ФТ домена POU и считается одним из ключевых факторов, участвующих в индукции и поддержании плюрипотентности, регуляции клеточной дифференцировки, а также является классическим про-онкогеном, сверхэкспрессия которого в неопухолевых соматических клетках способствует их трансформации в опухолевые. Экспрессия Oct3/4 характерна для зародышевых и эмбриональных половых клеток, этот фактор связывается с генами-мишенями на клетках, а СК особенно чувствительны к колебаниям уровня этого белка [18, 19].

В то время как экспрессия Oct4 поддерживает недифференцированное состояние плюрипотентных СК, отсутствие или снижение уровня экспрессии этого фактора, напротив, индуцирует процессы их дифференцировки, в результате чего возникает гетерогенная популяция дочерних клеток разной специфичности. Соматические клетки могут быть перепрограммированы в ИПСК путем стимуляции в них эктопической экспрессии ФТ, которые входят в «коктейль Яманаки». На сегодняшний день ИПСК были получены из разных популяций соматических клеток человека, а по экспрессии генов, метилированию промотора и потенциалу дифференцировки они мало отличались от истинных ЭСК человека. Так, В.В. Соловьева с соавт. [20], показали, что генетическая модификация мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток, выделенных из

зачатков третьих моляров человека, рекомбинантной плазмидой также приводит к увеличению в исследуемых клетках уровня экспрессии факторов транскрипции SOX2, Oct4 и Nanog. Ген *Oct4* человека может генерировать три изоформы мРНК (Oct4A, Oct4B и Oct4B1) путем альтернативного сплайсинга. Белок Oct4A является фактором транскрипции для ЭСК, а функция изоформ Oct4B пока не до конца ясна. D. Li et al. [21] обнаружили, что мРНК Oct4A и Oct4B одновременно экспрессируются в нескольких линиях опухолевых клеток и опухолевых тканях, а вариант Oct4B функционирует в качестве некодирующей РНК, модулирующей экспрессию Oct4A по miRNA-зависимому типу.

Из всех ФТ, необходимых для индукции ИПСК, Oct4 обязателен для эффективного перепрограммирования клеток, и, как полагают, он может действовать в качестве «привратника» при индукции плюрипотентности соматических клеток. Это хорошо согласуется с данными, свидетельствующими о том, что эктопическая экспрессия Oct4 в полипотентных клетках блокирует в них процессы дифференцировки [22, 23].

Как уже было сказано, клетки опухолей разных типов часто обладают свойствами, подобными свойствам СК и ИПСК, то есть способностью к длительному выживанию («бессмертию»), могут экспрессировать ФТ «коктейля Яманаки» (с-Мус, KLF4, SOX2, Oct4) и характеризуются высокой активностью теломеразы и геномной нестабильностью, ведущими к множественным хромосомным aberrациям. Фактор Oct4 обладает также антиапоптозным эффектом, активируя сигнальный каскад STAT3, что, в свою очередь, приводит к активации экспрессии антиапоптозного белка сурвивина. Экспрессия этих белков существенно выше в клетках химиорезистентных опухолей, чем в опухолях, хорошо отвечающих на терапию [24].

Экспрессия Oct4 наблюдается в клетках целого спектра злокачественных новообразований, что обычно коррелирует с более низкой степенью их дифференцировки, высоким инвазивным потенциалом и более коротким сроком выживаемости пациентов [25, 26]. Так, экспрессия Oct4 в нормальных клетках молочной железы стимулирует генерацию клеток, способных к злокачественной трансформации. Из таких клеток у голых мышей развивались агрессивные низкодифференцированные карциномы молочной железы, клетки которых экспрессировали эмбриональные ФТ, что позволило авторам экспериментов предложить эту модель для изучения новых онкогенных клеточных мишеней [27]. S. Soheili et al. в 2017 году обнаружили сверхэкспрессию Oct4 в тканях рака молочной железы при отсутствии или его слабой экспрессии в предопухолевой патологии в прилежащей к карциноме ткани. Сверхэкспрессию варианта Oct4B наблюдали в дольковых раках молочной железы, а варианты Oct4A и Oct4B1 – в протоковых раках (карциномах неспецифического типа) низкой степени злокачественности (Grade I и II). Кроме того, авторы выявили значитель-

ную корреляцию между уровнем экспрессии вариантов *Oct4* и экспрессией рецепторов к эстрогену и прогестерону, *Her2* и *p53* [28].

В СК человека с нокаутом гена *Oct4* меняется и профиль экспрессии других ФТ, в результате чего уровень экспрессии *Nanog* и *SOX2* снижается до 10–30% от контрольного. Напротив, в клетках линии *KhES1* с нокаутом гена *SOX2* снижался и уровень экспрессии *Oct4*, а уровень экспрессии *Nanog* снижался до 60% по сравнению с контролем. Важным механизмом в эмбриональном развитии организмов млекопитающих и определении агрессивного потенциала низкодифференцированных опухолей является эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) [29, 30]. На экспериментальных моделях рака простаты было показано, что в разных линиях раковых клеток, которые приобрели фенотипические характеристики ЭМТ, выявляли и сверхэкспрессию *Oct4* [31, 32]. Сверхэкспрессию *Oct4* считают новым потенциальным биомаркером патогенеза и дифференцировки карцином легкого (немелкоклеточных), этот фактор подавляет экспрессию E-кадгерина, что стимулирует ЭМТ и увеличивает инвазивный и метастатический потенциал опухолевых клеток. Специфическая терапия, направленная на *Oct4*, может блокировать ЭМТ и таким образом обеспечить более благоприятный клинический ответ на лечение рака легкого [33].

Сверхэкспрессию *Oct4* также наблюдали в различных клеточных линиях, полученных из плоскоклеточной карциномы пищевода, но она отсутствовала в клеточных линиях из здоровой ткани этого органа [34, 35], в участках метаплазии слизистой желудка при тяжелом гастрите, при этом наиболее интенсивной экспрессия данного фактора была в клетках злокачественных новообразований желудка [36, 37].

Экспрессию *Oct4* выявили в регенерирующей ткани печени (например, после частичной гепатэктомии), что, как полагают, обеспечивает ее высокую способность к регенерации [38]. В клеточных линиях, производных от гепатоцеллюлярного рака человека, уровень экспрессии *Oct4* был повышен, особенно в менее дифференцированных клеточных линиях, по сравнению с соответствующей нормальной тканью печени и тканью печени из участков цирроза [39].

Опухоли, клетки которых коэкспрессировали *Oct4* и *Nanog*, обладали более агрессивным биологическим потенциалом и имели менее благоприятный прогноз клинического течения заболевания, что, как полагают, в перспективе позволит использовать их в качестве биомаркеров для выделения пациентов в группу повышенного риска послеоперационных рецидивов. Сверхэкспрессия *Oct4* в СК ингибирует апоптоз с последующей активацией факторов *TCL1* и *AKT*. Этот же механизм играет важную роль в развитии химиорезистентности опухолей, поскольку в случае подавления сигнального пути *AKT* подавляется и пролиферативная активность опухолевых клеток. *Oct4* также индуцирует активацию

ABCG2 – мембранного транспортного канала, который функционирует как эффективный насос оттока, транспортирующий множество лекарственных средств, и может доставлять химиотерапевтические агенты, тем самым защищая клетки от повреждений [40]. Показано также, что в раке толстой кишки экспрессия в клетках *Oct4* была значительно интенсивнее, чем в окружающей неопухолевой ткани, при этом экспрессия этого фактора была особенно выражена в опухолях с высокой стадией TNM [41], это коррелировало с наличием у пациентов с колоректальным раком метастазов в печени [42]. Интенсивную экспрессию *Oct4* выявили на ранних стадиях развития рака поджелудочной железы, причем она была значительно выше в эпителии метаплазированных протоков (79,2%), чем в ткани опухолей (19,4%), что свидетельствует об особенно важной роли названного фактора на начальных стадиях формирования и роста этого типа новообразований [43]. Имеются также данные, подтверждающие наличие корреляции между уровнем экспрессии *Oct4* и более низкой степенью дифференцировки клеток аденокарциномы поджелудочной железы [44]. S. Polvani et al. показали, что при *Oct4*-положительном статусе опухолей поджелудочной железы уменьшался и срок выживаемости пациентов, у них чаще возникали метастазы в лимфатических узлах и в отдаленных органах [45].

Таким образом, фактор *Oct4* прочно зарекомендовал себя как один из ключевых, активно участвующих в механизмах канцерогенеза – формировании опухолевых популяций, обеспечении их высокого инвазивного и метастатического потенциала, чувствительности или устойчивости к разным видам терапии.

2. Фактор транскрипции *SOX2*

Гены семейства *SOX* (*SRY*-related HMG-box genes) содержат *SRY*-связанные гены HMG-боксы высокой подвижности, который находится на Y-хромосоме и участвует в определении пола. HMG-боксы представляют собой высококонсервативный ДНК-связывающий домен, имеющийся у всех видов эукариот. Домен HMG состоит примерно из 80 остатков, которые образуют три альфа-спирали в скрученной L-образной структуре. Вогнутая поверхность L-образной формы связывает малую бороздку ДНК. Две группы доменов HMG были классифицированы на основе их ДНК-связывающих свойств: HMG1 и родственные белки связываются с искаженными структурами ДНК неспецифическим образом, тогда как факторы транскрипции, такие как белки *SOX*, распознают специфические последовательности ДНК и связываются с ними. С нарушением регуляции активности членов семейства белков HMG связывают образование и рост многих солидных опухолей. По сравнению с соответствующими нормальными тканями сверхэкспрессия белков HMG1, HMG1 (Y) и HMG1-C наблюдается в клетках метастазов рака простаты, щитовидной железы и толстой кишки [46]. В конце XX века у млекопитающих было идентифици-

ровано более 20 различных генов семейства SOX [47]. Гены этого семейства кодируют множество ФТ, которые регулируют разные этапы развития организмов. Сравнение последовательностей в области этого домена позволило разделить гены *SOX* на восемь групп, где белки одной и той же группы имеют высокую идентичность как внутри, так и вне домена HMG-боксы, тогда как белки из разных групп обладают лишь частичной идентичностью.

Накоплено много прямых и косвенных доказательств того, что белки, кодируемые генами *SOX*, действуют как активаторы или репрессоры транскрипции, регулируют активность различных генов-мишеней, играют решающую роль в эмбриональном развитии и органогенезе, формировании опухолевой и неопухолевой патологии [46, 48, 49]. В качестве ФТ белки этого семейства являются ключевыми регуляторами транскрипции в СК, поддерживающими их плюрипотентные свойства [50, 51]. Белки *SOX* взаимодействуют с другими факторами, такими как Oct3/4, белками «цинкового пальца», основными белками структур спираль–петля–спираль и белками лейциновой «молнии» [50, 51], что дает возможность другим факторам транскрипции связывать большую бороздку и/или объединять регуляторные элементы и образовывать белковые комплексы.

Гены *SOX* у разных видов млекопитающих консервативны и имеют тканеспецифические особенности экспрессии. Эксперименты по нокауту генов *SOX* подтвердили, что они играют ключевую роль в эмбриогенезе. Помимо полового развития эти гены регулируют формирование зародышевого листка и формирование нервной системы. На клеточном уровне все больше данных указывает на важную роль факторов *SOX* в определении специфичности и степени дифференцировки разных клеточных типов. Гены *SOX2*, *SOX3*, *SOX10* участвуют в развитии нейронов. Нарушения функций гена *SOX3* связаны с возникновением X-связанной умственной отсталости. Было проведено по крайней мере одно прямое исследование онкогенного потенциала этого гена и обнаружено, что ectopическая экспрессия *SOX3* индуцирует онкогенную трансформацию куриных эмбриональных фибробластов. Экспрессия *SOX4* усиливается в злокачественных новообразованиях поджелудочной железы и яичников, в раке простаты, аденокистой карциноме слюнных желез, клеточных линиях карциномы мочевого пузыря. При канцерогенезе молочной железы *SOX4* считают потенциальным регулятором онкогена *HER2/neu* (c-ErbB2). Экспрессия гена *SOX5* наблюдается в ткани нормальных яичек и производных из них опухолей, а *SOX9* участвует в дифференцировке хондроцитов, и нарушения в экспрессии этого гена связаны с развитием болезни Ваарденбурга–Гиршпрунга – врожденной гипомиелинизирующей нейропатии (CHN). *SOX9* считается основным геном-регулятором дифференцировки хряща, он экспрессируется в мезенхимальных хондросаркомах. Сверхэкспрессия *SOX10* характерна

для меланом, но не в нормальной ткани кожи, его сверхэкспрессия коррелировала с высоким метастатическим потенциалом клеток меланомы K-1735 в отличие от линий клеток с низким метастатическим потенциалом. Этот ген имеет решающее значение в регуляции дифференцировки меланоцитов, являясь трансактиватором *MITF*. Экспрессия *SOX10* была также обнаружена в клеточных линиях анапластической олигодендроглиомы и аденокарциномы молочной железы. Ген *SOX17* тесно связан с формированием энтодермы, активность гена *SOX18* ассоциирует с дифференцировкой клеток эндотелия, а экспрессия мРНК *SOX18* обнаружена в меланомах, нейробластомах, карциномах поджелудочной железы, яичников и матки.

Продукты генов *SOX1*, *SOX2*, *SOX3* и *SOX21* выявлены в сыворотке крови пациентов с мелкоклеточным раком легкого, активность этих генов была повышена в аденокарциномах и плоскоклеточных карциномах легких. Экспрессия этих генов характерна и для ранних этапов развития эмбрионов, а в тканях взрослых организмов она снижается.

Фактор транскрипции *SOX2*, или секс-детерминированный регион гена Y-боксы 2, расположен на хромосоме 3q26.33 и является одним из членов большого семейства генов *SOX*. Особенно важную роль среди генов семейства *SOX* отводят *SOX2*, который входит в состав «коктейля Яманаки». Этот ген состоит из 317 аминокислот и содержит высококонсервативный ДНК-связывающий домен, бокс-домен группы высокой подвижности HMG (high-mobility group) из 79 аминокислот. В экспериментах показано, что *SOX2*-негативные эмбрионы погибли уже на стадии имплантации, а нокаут данного гена в СК мыши приводил к дифференцировке этих клеток в различные типы соматических клеток. *SOX2* не только немаловажен в поддержании пула тканевых полипотентных клеток у взрослых организмов, но и обладает способностью индуцировать полипотентные свойства дифференцированных соматических клеток. Так, сверхэкспрессия *SOX2*, обусловленная амплификацией в локусе соответствующего гена и умножением числа его копий у взрослых организмов, способствует репрограммированию соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки, что, в свою очередь, при определенных условиях может запускать механизмы их злокачественной трансформации. Фактор *SOX2* очень важен и полезен во время эмбриогенеза млекопитающих и в более позднем возрасте, но его экспрессия может быть и пагубной.

Высказывалась гипотеза, что локус 3q26.3, на котором расположен *SOX2*, является важнейшим мультионкогеном с множеством различных функций [52, 53]. Ген *SOX2* способствует поддержанию плюрипотентных свойств клеток ранних эмбрионов, мутации этого гена вызывают анофтальмию, редкую и тяжелую форму структурной аномалии глаза. *SOX2* обладает свойствами протоонкогена, и изменения в уровне его экспрес-

сии и амплификация гена были обнаружены в клетках опухолей разных типов – глиомах, опухолях молочной железы, легких, простаты, яичников, в костных саркомах и некоторых других новообразованиях [8, 46, 54]. Сверхэкспрессия *SOX2* в эмбриональных клетках человека способствует поддержанию плюрипотентных свойств клеток при дифференцировке нервной ткани и железистого эпителия, а уровень его экспрессии непосредственно влияет на скорость репрограммирования соматических клеток в ИПСК [55].

За последние десятилетия установлено, что *SOX2* экспрессируют клетки, как минимум, 25 разных форм рака, а уровень его экспрессии в активно пролиферирующих опухолевых клетках (слишком мало или слишком много) непосредственно связан и со скоростью роста опухолей [56]. У части пациентов с глиобластомой, раком яичников, пищевода, легких, полости рта, предстательной железы и придаточных пазух носа обнаруживают сверхэкспрессию *SOX2*, для большинства видов рака это было подтверждено и с помощью иммуногистохимического метода.

Амплификация гена *SOX2* обнаружена в 28% инвазивных карцином молочной железы, в том числе в 44% раков неспецифического типа, а также в карциномах *in situ* [57]. У пациенток с раком молочной железы иммуногистохимическим методом выявили сверхэкспрессию *SOX2* в ядрах клеток, в отличие от нормального эпителия молочной железы, в котором экспрессия была слабой или вообще отсутствовала [58, 59].

Одна из существующих гипотез предполагает, что сверхэкспрессия *SOX2* ассоциируется прежде всего с опухолями более низкой степени злокачественности, хотя есть данные, противоречащие ей и свидетельствующие о более сложном механизме, который в опухолях разных типов различен. В участках интраэпителиальной неоплазии поджелудочной железы экспрессия *SOX2* наблюдается редко, но сверхэкспрессия выявляется уже примерно в 60% низкодифференцированных вариантов опухолей и в инвазивных комплексах более дифференцированных вариантов [60].

При раке простаты процент *SOX2*-положительных клеток коррелирует с их градацией по Глисон [61]. Экспрессия *SOX2* подавляет нейроэндокринную трансформацию клеток рака простаты [62].

Экспрессия *SOX2* играет критически важную роль в процессах морфогенеза легкого [63, 64]. Сверхэкспрессия этого фактора у эмбрионов мыши приводит к нарушению формирования дистальных отделов легких с увеличением в дыхательных путях числа базальных и нейроэндокринных клеток [64]. *SOX2* активно участвует и в канцерогенезе эпителия легких, который служит пусковым механизмом для образования опухолей легкого с плоскоклеточной дифференцировкой [8]. Амплификация этого гена – очень частое событие в плоскоклеточных карциномах (ПКР) легкого из разных анатомических отделов, особенно опухолей с базалоидным типом дифференцировки. В ряде ис-

следований показано, что экспрессия *SOX2* является фактором прогноза ПКР легкого, и даже были выделены морфологические варианты этого типа рака: *SOX2*-позитивный и *SOX2*-негативный [65–67]. Экспрессия *SOX2* в ПКР легкого коррелировала с лучшей общей выживаемостью пациентов по сравнению с теми, у кого такая экспрессия отсутствовала (66 и 14 месяцев, соответственно, $p=0,048$). Экспрессия *SOX2* наблюдалась в 79% ПКР, 72% мелкоклеточных карцином, но только в 4–18% аденокарцином легкого [68]. В исследовании T. Wilbertz et al. амплификация *SOX2* показала тенденцию к лучшей выживаемости лишь в группе с высоким уровнем амплификации гена, хотя полученные данные не были статистически значимыми [69]. При иммуногистохимической диагностике ПКР легкого до настоящего времени широко используют стандартный набор маркеров – антитела к p63, цитокератинам 5/6 и высокого молекулярного веса (клон 34BE12), а при диагностике аденокарциномы легкого – TTF-1 и напсин А. Экспрессия p63 выявляется в 75% случаев ПКР легких, при этом часть низкодифференцированных карцином легких солидного строения с некоторыми морфологическими особенностями аденокарциномы или плоскоклеточной дифференцировки, которые имеют TTF-1-негативный иммунофенотип, но экспрессируют p63, бывает трудно классифицировать с уверенностью в ту или другую группу, особенно на небольших образцах диагностических биопсий. В таких случаях экспрессия *SOX2* может послужить дополнительным аргументом в пользу плоскоклеточной дифференцировки. L.M. Sholl et al. [70] показали, что интенсивная экспрессия *SOX2* сочетается с экспрессией p63 в 90% ПКР легкого, следовательно, использование этих двух маркеров одновременно позволяет поставить диагноз почти во всех случаях, включая низкодифференцированные варианты этого типа опухолей. В карциномах и нейроэндокринных карциномах легкого экспрессия *SOX2* была очень гетерогенной и существенно варьировала от случая к случаю. Интенсивную экспрессию *SOX2* наблюдали в 29% типичных и 17% атипичных карциноидов, 79% крупноклеточных и 67% мелкоклеточных нейроэндокринных карцином легкого. Хотя авторы не выявили никаких существенных различий в экспрессии *SOX2* между типичными и атипичными карциноидами легких, а также крупноклеточными и мелкоклеточными нейроэндокринными карциномами, они установили, что в низкодифференцированных нейроэндокринных карциномах легкого экспрессия этого фактора обычно была значительно более интенсивной, чем в высокодифференцированных карциноидах (72% и 23%, соответственно). В мелкоклеточных нейроэндокринных карциномах легких амплификация *SOX2* является очень частым событием [71]. Сверхэкспрессия *SOX2* была выявлена не только в ПКР легких, но и в ПКР головы и шеи. В 21% первичных ПКР головы и шеи амплификация *SOX2* была обнаружена FISH-методом, и сверхэкспрессия соответству-

ющего белка подтверждена иммуногистохимическим методом, что также коррелировало с молекулярными и клинико-патологическими параметрами. Амплификация *SOX2* и сверхэкспрессия соответствующего белка в ткани исключали инфицирование вирусом папилломы человека, но коррелировали с менее благоприятным прогнозом заболевания. Функциональная активность *SOX2* индуцировала экспрессию антиапоптотического белка BCL-2 и повышала устойчивость к проапоптотическим агентам, включая цисплатин. Это указывает на то, что данный фактор при ПКР головы и шеи является медиатором устойчивости к терапии, а использование *SOX2* и связанных с ним молекулярных сигнальных путей, в частности BCL-2, в качестве специфических мишеней может повысить эффективность терапии [70, 72]. Интенсивная или умеренно выраженная экспрессия *SOX2* была обнаружена во всех исследованных эмбриональных карциномах (100%).

Опубликованные к настоящему времени исследования показывают, что высокие уровни *SOX2* коррелируют с плохим прогнозом для пациентов с различными типами рака. Для пациентов с раком прямой кишки с повышенным уровнем *SOX2* характерна значительно более низкая выживаемость после химиолучевой терапии [73]. Для рака полости рта, пищевода, гепатоцеллюлярного рака, некоторых видов рака легких была выявлена корреляция между сверхэкспрессией *SOX2* и уменьшением сроков выживаемости пациентов [74–80] и увеличением метастатического потенциала опухолевых клеток [81–85].

В то же время при некоторых типах злокачественных новообразований, в частности при раке желудка и плоскоклеточном раке, сверхэкспрессия *SOX2* не всегда связана с плохим прогнозом, в отличие от низкого уровня его экспрессии. Пациенты с *SOX2*-положительным колоректальным раком живут меньше, чем с *SOX2*-отрицательным, и эта разница больше для пациентов с мутациями *BRAFV600E*, которые живут меньше, чем пациенты с *SOX2*-положительными опухолями, но без мутации *BRAF* [86]. Несколько недавних исследований показали, что экзогенное повышение *SOX2* может способствовать устойчивости к химиотерапевтическим средствам, которые в настоящее время используются в клинической практике. В работе P.M. Varesi et al. линии клеток рака яичников, которые не экспрессировали *SOX2* и были чувствительны к карбоплатину, цисплатину и паклитакселу, становились устойчивыми после стабильной эктопической экспрессии *SOX2* [87]. Больше того, в клеточной линии рака яичников, экспрессирующей *SOX2*, нокдаун данного гена с использованием коротких шпилечных РНК (shRNA) обеспечивает чувствительность к этим лекарствам, которая отменяется при эктопической повторной экспрессии *SOX2*. Схожие результаты наблюдались при изучении клеточных линий рака молочной железы, в которых стабильная сверхэкспрессия *SOX2* способствовала устойчивости к тамоксифену, в то время как стабиль-

ное подавление *SOX2* повышало их чувствительность к этому препарату [88]. Кроме того, стабильная сверхэкспрессия *SOX2* в клетках рака предстательной железы РС3 способствовала уклонению от апоптоза в клетках, обработанных паклитакселом [89]. Идентификация генов, позволяющих *SOX2* вносить существенный вклад в онкогенные свойства клеток, обеспечивает новую стратегию для определения терапевтических мишеней, которые могут блокировать рост *SOX2*-зависимых опухолей. Получено много данных, свидетельствующих об участии микро-РНК (miR) в функции нормальных эмбриональных клеток и соматических клеток взрослых организмов, а также опухолевых клеток. Помимо регуляции miR с помощью *SOX2* растет список miR, способных регулировать *SOX2* на посттранскрипционном уровне. Сообщается, что кроме miR на уровне *SOX2* в опухолевых клетках влияет несколько длинных некодирующих РНК (lncRNAs), обладающих функциями генов-регуляторов, – это класс РНК с длиной более 200 нуклеотидов, в которых отсутствуют кодирующие белок последовательности.

SOX2 пока не рассматривается в качестве потенциальной терапевтической мишени для целенаправленной терапии при ПКР, для которых прогресс в разработке эффективных схем лечения происходит намного медленнее, чем для аденокарцином. В то же время есть много аргументов, позволяющих рассматривать семейство белков SOX как потенциальные мишени для лечения рака с помощью моноклональных антител или низкомолекулярных ингибиторов. Экспрессия *SOX2* и/или амплификация этого гена в конечном счете смогут помочь выявить пациентов, для которых конкретная таргетная терапия, направленная на эту мишень, будет достаточно эффективной. Белки SOX проявляют онкогенную активность не только за счет своей способности к трансактивации, но также за счет взаимодействия с другими белками, что необходимо учитывать при разработке соответствующих ингибиторов. Одним из главных препятствий на пути к использованию моноклональных антител к большинству ФТ является их ядерная локализация. Чтобы решить эту проблему, при создании следующих поколений иммунотерапевтических препаратов делают акцент на разработку более мелких фрагментов моноклональных антител или новых соединений, которые будут способны лучше проникать в ткани и клетки, а также через гематоэнцефалический барьер, что особенно важно для лечения опухолей и других заболеваний ЦНС [90]. Альтернативные стратегии связывают с использованием малой интерферирующей РНК (миРНК). Разные исследования роли генов *SOX* в развитии рака продемонстрировали, что подавление экспрессии некоторых из этих генов с помощью siRNA значительно снижает рост и инвазивность злокачественных новообразований [48]. В настоящее время остается не совсем ясным прогностическое значение выявления ИГХ и FISH методами экспрессии *SOX2* у пациентов, получавших

терапию на основе препаратов платины, и может ли *SOX2*-положительный статус стать потенциальным модификатором ответа опухоли на терапию. Ответы на эти вопросы, вероятно, будут получены в ближайшем будущем. Во многих из этих типов рака экспрессия *SOX2* напрямую связана с быстрым ростом, метастазированием, лекарственной устойчивостью опухолей и плохим прогнозом. Таким образом, нацеливание на *SOX2* может улучшить выживаемость пациентов с некоторыми из наиболее трудно поддающихся лечению опухолями. Для многих видов рака, где экспрессия *SOX2* представляет собой серьезную угрозу, необходимы более целенаправленные исследования с целью поисков возможностей регуляции транскрипции *SOX2*, что пока крайне мало изучено в биологии рака.

3. Krüppel-like-factor 4

Krüppel-like-factor 4 (KLF4 или GKLF) – это ФТ, который является членом семейства KLF факторов транскрипции «цинкового пальца» и имеет три C₂H₂-цинковых пальца на карбоксильном конце. Семейство KLF факторов в свою очередь входит в состав большого семейства SP1-подобных факторов транскрипции. KLF4 интенсивно экспрессируют клетки разных тканей человека, в том числе эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта, кожи и некоторые другие. KLF4 участвует в регуляции клеточного деления и апоптоза, эпителиально-мезенхимальной трансформации (ЭМТ), в процессах дифференцировки эпителиальных клеток. С одной стороны, KLF4 обладает способностью действовать как опухолевый супрессор, индуцируя p21-зависимую остановку клеточного цикла, а с другой – в присутствии проонкогенных сигналов, таких как *RAS*, он может ингибировать апоптоз, воздействуя на комплекс Вах/p53. Эти два противоположных эффекта KLF4 могут объяснить и противоречивую роль данного фактора в злокачественном потенциале опухолей разных типов, которая тесно связана с активацией или ингибацией других онкогенных факторов. KLF4 играет важную роль в процессах пролиферации и дифференцировки эпителия кишечника, это значимое звено в механизмах канцерогенеза при разных типах злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) – желудка, пищевода, кишечника [91], обычно его экспрессия в раках ЖКТ постепенно утрачивается при прогрессировании опухоли, и это коррелирует с неблагоприятным клиническим течением заболевания [92–98]. Сверхэкспрессия KLF4 определяется в неделящихся клетках и вызывает остановку клеточного цикла, что особенно важно для предотвращения деления клеток с аномалиями ДНК. Некоторые исследования показали, что при определенных условиях фактор KLF4 может переключать механизм с клеточного выживания на активацию механизма клеточной гибели. Этот фактор экспрессируют клетки разных тканей и органов: в роговице и коже он обеспечивает барьерную функцию, являясь регулятором

генов, отвечающих за гомеостаз роговицы и проницаемости кожи; координирует нормальное формирование скелета; у мужчин регулирует сперматогенез; в эндотелии сосудов и лейкоцитах опосредует ответ на воспалительные стимулы и интенсивность воспалительных реакций.

M-Q. Ma et al. при изучении экспрессии KLF4 и его прогностического значения в злокачественных новообразованиях пищевода показали, что интенсивность экспрессии этого фактора была значительно выше в нормальной ткани пищевода, чем в опухолях этого органа (82,7% и 43,8%, соответственно) и зависела от степени их дифференцировки [99]. Общая выживаемость оказалась значительно лучше в той группе пациентов, у которых была обнаружена экспрессия KLF4, чем в группе с KLF4-негативными опухолями (средняя продолжительность жизни – 55 и 26 месяцев, а 5-летняя выживаемость 48,8% и 25,5%, соответственно). При раке желудка исследование образцов опухолей выявило значительно более высокую общую выживаемость пациентов с выраженной цитоплазматической экспрессией KLF4 в клетках опухолей, чем пациентов, в опухолях которых она была слабой или вообще отсутствовала [100]. В генно-инженерной модели у мышей с нокаутом KLF4 наблюдалась повышенная пролиферативная активность клеток слизистой желудка, что было импульсом для запуска предопухоловой патологии [91]. Известно, что в карциномах желудка часто выявляется аномальная активация β-катенина, с чем связывают усиленный рост опухолей, их инвазивный и метастатический потенциал, а на клеточных линиях раков желудка человека было показано, что KLF4 может ингибировать экспрессию этой адгезивной молекулы [95].

В литературе имеются достаточно противоречивые данные о том, является ли избыточная экспрессия KLF4 более благоприятным фактором клинического течения при всех типах рака пищеварительного тракта. Так, показано, что при гепатоцеллюлярном раке, особенно в менее дифференцированных вариантах этих опухолей с низкой общей выживаемостью пациентов, экспрессия KLF4, значительно интенсивнее, чем в окружающей неопухоловой ткани печени [98, 101]. J. Xu et al. оценивали экспрессию KLF4 в разных образцах ткани кишечника человека и обнаружили динамическое, зависимое от типа патологического процесса подавление его экспрессии – от ткани нормальной слизистой оболочки к аденоме и раку [97, 102]. Выживаемость пациентов с KLF4-положительным раком толстой кишки была выше, чем пациентов с KLF4-негативным [102]. В целом было показано, что утрата KLF4 является независимым предиктором для оценки выживаемости и возникновения рецидивов у пациентов с раком толстой кишки [97, 103]. При исследовании роли экспрессии KLF4 в популяции кишечных стволовых клеток *Bmi1* показано, что эта популяция обычно медленно делится, устойчива к радиационному поражению и ответственна

за регенерацию кишечного эпителия после такого поражения [104, 105].

Сверхэкспрессия KLF4 в клеточных линиях, полученных из аденокарцином поджелудочной железы, сопровождалась существенным уменьшением скорости их пролиферации [106]. С другой стороны, во многих случаях экспрессия белка KLF4 вообще отсутствовала (в 86,8% из 38 исследованных образцов). Больше того, утрата KLF4 была подтверждена в предопухоловой патологии, которая предшествовала возникновению аденокарцином [107].

4. Фактор трансформации *c-Myc*

c-Myc – еще один из ключевых ФТ, вовлеченных в транскрипцию генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, апоптоза, метаболизма и синтеза многих белков. *Myc* кодируется геном *Myc*, который регулирует экспрессию около 15% всех генов, структуру хроматина, изменяя ацетилирование гистонов в участках, богатых генами, и в некодирующих регионах. *Myc* содержит два альтернативных старт-кодона: классический AUG старт-кодон во втором экзоне и более редкий CUG в первом. В результате образуются две изоформы *Myc*: *Myc1* (длинная) и *Myc2* (короткая). Они идентичны по аминокислотной последовательности, но *Myc1* имеет дополнительный короткий N-концевой участок. Среди мишеней *Myc* есть гены, участвующие также в пролиферации и дифференцировке клеток, апоптозе и регуляции метаболизма.

Активацию *c-Myc* наблюдают почти в половине всех типов опухолей человека, где он действует как онкоген, регулирующий многие проонкогенные факторы транскрипции и сигнальные каскады, такие как KRAS/AKT/PEN [108]. ARF-p53 путь опосредует *c-Myc*-зависимый апоптоз [109]. Сверхэкспрессия *c-Myc* была выявлена в 40% раков желудка [110], в некоторых карциномах кишечника [111]. *c-Myc* действует как онкогенный фактор в злокачественных новообразованиях кишечника, где он является мишенью при передаче сигналов по β -катенин/TCF пути. В аденокарциномах поджелудочной железы сверхэкспрессия *c-Myc* коррелирует с уменьшением общей выживаемости пациентов [112]. Сверхэкспрессия *c-Myc* наблюдается и в ряде доброкачественных поражений, в частности при хроническом атрофическом гастрите и язве желудка [113]. Экспрессию *c-Myc* может стимулировать *Helicobacter pylori*, а при эффективном лечении НР-ассоциированной патологии интенсивность экспрессии данного фактора уменьшается [114].

Активация *c-Myc* – ключевой этап при онкогенном репрограммировании терминально дифференцированных гепатоцитов [115]. Уровень экспрессии *c-Myc* коррелирует с уровнем дифференцировки опухолевых клеток рака кишечника: низкий уровень экспрессии этого фактора способствует усиленной пролиферации клеток с активацией в них дополнительных репрограммирующих факторов транскрипции, таких как Nanog

или Oct4. В результате этих изменений менее дифференцированные опухоли имеют худший прогноз, чем более дифференцированные варианты [116, 117]. Неоднократно было подтверждено, что подавление активности *Myc* приводит к уменьшению размеров опухолей разного происхождения, поэтому полагают, что этот фактор является очень привлекательной мишенью для противораковой терапии. Реципрокную хромосомную транслокацию t(8;14), при которой ген *Myc* оказывается под контролем регуляторных элементов локуса, часто обнаруживают при лимфоме Беркитта, реже при других В-клеточных лимфопролиферативных заболеваниях. Сверхэкспрессия *c-Myc* способствует индукции апоптоза [118], поэтому существует гипотеза, что *c-Myc* служит пусковым механизмом при злокачественной трансформации предопухоловых изменений в печени в гепатоцеллюлярный рак [119]. Это подтверждается и данными, полученными на генно-инженерной модели гепатоцеллюлярных карцином у мышей [120].

Перспективы использования ФТ для лечения злокачественных новообразований

Вся совокупность полученных в последние годы данных свидетельствует о том, что перепрограммирование соматических клеток имеет много общих черт с механизмами канцерогенеза. Таргетная терапия злокачественных новообразований основана на феномене, называемом онкогенной зависимостью, когда рост клеток опухолей зависит от одного или нескольких онкопротеинов, активированных на генетическом уровне, которые и обеспечивают злокачественный иммунофенотип клеток. По этой причине раковые клетки более уязвимы для ингибирования критических онкопротеинов, чем нормальные клетки. Сейчас известно и успешно используется на практике много различных ингибиторов и моноклональных антител, которые нацелены на определенные онкогены, в частности это препараты, предназначенные для ингибирования активности рецепторов тирозинкиназ и сигнальных молекул, таких как BCR-ABL, EGFR, ERBB2, PI3K/mTOR, MEK, BRAF и другие. Тем не менее у них есть общий недостаток – приобретенная резистентность к данным препаратам. По этой причине были разработаны препараты второго поколения, которые действуют против разных доменов одних и тех же молекул или против молекул, функционально связанных с первыми. Это привлекло пристальное внимание разработчиков и ученых к изучению возможностей использования в качестве терапевтических мишеней экспрессии в клетках опухолей различных ФТ [48].

В 2003 году M. Al-Hajj et al. впервые идентифицировали ОСК в раке молочной железы [121]. Эти клетки были также идентифицированы в различных опухолях эпителиального и нейроэктодермального происхождения, а позже в опухолях мезенхимального происхождения, меланомах, остеосаркомах и хондро-

саркомах [122], раке простаты [123], яичников, желудка [124], легкого [125]. ОСК, изолированные из опухолей разных типов, имели некоторые общие характеристики, включая лекарственную резистентность, способность к асимметричному делению и возобновлению опухолевого роста. Такие факторы, как *SOX2* и *Ost4*, находятся на вершине иерархии ФТ, регулирующих плюрипотентные свойства клеток, их дифференцировку и дедифференцировку.

ОСК обычно устойчивы к химиотерапии и могут оставаться в состоянии покоя в течение длительного периода, поскольку ФТ играют решающую роль в выживании опухолевых клеток, их злокачественном и метастатическом потенциале. ОСК используют те же механизмы, которые предохраняют нормальные СК от повреждений и цитотоксических воздействий. Уникальность свойств ОСК в том, что они могут генерировать гетерогенные клеточные популяции с различным фенотипом, функциями и профилем экспрессии генов. Фенотип клеток некоторых типов злокачественных опухолей, особенно низкодифференцированных и недифференцированных, мало отличается от фенотипа недифференцированных ЭСК [126, 127].

Очевидно, что ОСК представляют собой хотя и сложную, но очень перспективную мишень для разработки инновационных схем таргетной терапии новообразований, что в сочетании со стандартным химиотерапевтическим лечением способно обеспечить более эффективный ответ. С этой точки зрения такими перспективными мишенями могут служить факторы плюрипотентности, входящие в состав «коктейля Яманаки» (*Ost4*, *SOX2*, *KLF4* и *c-Myc*), путем воздействия на экспрессию которых, вероятно, удастся подавить или снизить злокачественный потенциал наиболее агрессивных опухолей и даже предотвращать канцерогенную трансформацию в случаях предопухолевой патологии.

Разработка технологии репрограммирования соматических клеток под воздействием ФТ и получения ИСК млекопитающих, включая человека, открыла новые перспективы в изучении *in vitro* молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе наиболее тяжелых заболеваний человека. Тот факт, что технология репрограммирования позволяет получать ИСК из отдельных дифференцированных соматических клеток больных и здоровых пациентов, создает ей существенные преимущества перед технологией ЭСК, что, в свою очередь, открывает большие перспективы в развитии персонализированной медицины. СК получают из соматических клеток взрослого организма, и к их важным преимуществам относится то, что эти клетки обладают индивидуальной специфичностью, что особенно важно при разработке подходов к индивидуальной клеточной терапии.

Одной из наиболее актуальных проблем современной фармакологии и медицины является создание эффективных и безопасных лекарственных препаратов, направленных на лечение каждого конкретного типа

заболеваний у конкретных индивидуумов. Характеристика «стволовости» опухолевых клеток является важным фактором, влияющим на неудачи терапии, и потребуются совершенно новые подходы для того, чтобы добиться успеха. Опухоли на разных стадиях прогрессирования могут существенно отличаться, поскольку различается их мутационная нагрузка. Так, образцы биопсий, используемые для исследования, могут быть нерепрезентативными для всей первичной опухоли, а отбор образцов из нескольких разных участков новообразования очень важен для получения различных генетических клонов опухоли. Особенно необходимым является выявление самого опасного клона раковых клеток, демонстрирующих неограниченный потенциал роста. Понимая свойства «стволовости» клонов внутри опухолей, мы сможем получить представление о наиболее неблагоприятных клеточных клонах, которые могут управлять последовательными циклами роста опухоли и обладают механизмом, защищающим их от воздействия лучевых методов терапии и химиотерапии. Спектр экспрессии генов «стволовых» опухолевых клеток коррелирует с результатами лечения пациентов, что еще раз подтверждает актуальность изучения свойств «стволовости» в опухолях разного типа и степени дифференцировки. Разнообразие опухолевых клеток на генетическом и функциональном уровне увеличивает приспособленность опухоли, и более эффективные методы лечения потребуют понимания и учета этого разнообразия. Возможность регулировать дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток может стать ключом для массового их применения в клеточной терапии при лечении различных тяжелых заболеваний человека и для коррекции врожденных генетических аномалий. С этой точки зрения очень актуальными являются исследования ФТ, которые входят в состав «коктейля Яманаки».

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. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275–91. DOI: 10.1016/j.stem.2014.02.006.
3. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour microenvironment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501(7467):346–54. DOI: 10.1038/nature12626.
4. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501(7467):338–45. DOI: 10.1038/nature12625.
5. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306–13. DOI: 10.1038/nature10762.
6. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(4):275–84. DOI: 10.1038/nrc1590.
7. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105–11. DOI: 10.1038/35102167.

8. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, La Noce M et al. Cancer stem cells in solid tumors: An overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J*. 2013;27(1):13–24. DOI: 10.1096/fj.12-218222.
9. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:675–99. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154.
10. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205.
11. Новосадова Е.В., Гривенников И.А. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: от получения до применения в биохимических и биомедицинских исследованиях. *Успехи биологической химии*. 2014;54:3–38.
Novosadova EV, Grivennikov IA. Induced pluripotent stem cells: From obtaining to application in biochemical and biomedical research. *Advances in Biological Chemistry*. 2014;54:3–38 (In Russ.).
12. Clevers H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nat Med*. 2011;17(3):313–9. DOI: 10.1038/nm.2304.
13. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
14. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
15. Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):230–40. DOI: 10.1016/j.stem.2008.02.001
16. Yehzekel S, Rebibo-Sabbah A, Segev Y, Tzukerman M, Shaked R, Huber I et al. Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics*. 2011;6(1):63–75. DOI: 10.4161/epi.6.1.13390.
17. Schepers W, Copray S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Rev Rep*. 2009;5(3):204–23. DOI: 10.1007/s12015-009-9077-x.
18. Samardzija C, Quinn M, Findlay JK, Ahmed N. Attributes of Oct4 in stem cell biology: Perspectives on cancer stem cells of the ovary. *J Ovarian Res*. 2012;5(1):37. DOI: 10.1186/1757-2215-5-37.
19. Trosko JE. From adult stem cells to cancer stem cells: Oct-4 Gene, cell-cell communication, and hormones during tumor promotion. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1089:36–58. DOI: 10.1196/annals.1386.018.
20. Соловьёва В.В., Блаатт Н.Л., Гусева Д.С., Ялвак М.Э., Шахин Ф., Исламов Р.Р. и др. Исследование экспрессии факторов транскрипции плюрипотентности в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках из третьих моляров человека, трансфицированных плазмидой pBud-SOX2-oct4. *Гены и клетки*. 2015;10(2):1–6.
Solovyeva VV, Blatt NL, Guseva DS, Yalvac ME, Sahin F, Islamov RR et al. Expression of pluripotency transcription factors in human third molar tooth germ derived multipotent mesenchymal stromal cells transfected by plasmid pBud-SOX2-Oct4. *Genes & Cells*. 2015; 10(2):1–6 (In Russ.).
21. Li D, Yang ZK, Bu JY, Xu CY, Sun H, Tang JB et al. OCT4B modulates OCT4A expression as ceRNA in tumor cells. *Oncol Rep*. 2015;33(5):2622–30. DOI: 10.3892/or.2015.3862.
22. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*. 2005;121(3):465–77. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.018.
23. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K et al. Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*. 2014;156(4):663–77. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.005.
24. Wen K, Fu Z, Wu X, Feng J, Chen W, Qian J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Lett*. 2013;333(1):56–65. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.01.009.
25. Huang P, Chen J, Wang L, Na Y, Kaku H, Ueki H et al. Implications of transcriptional factor, OCT-4, in human bladder malignancy and tumor recurrence. *Med Oncol*. 2012;29(2):829–34. DOI: 10.1007/s12032-011-9962-4.
26. Zhang X, Han B, Huang J, Zheng B, Geng Q, Aziz F et al. Prognostic significance of OCT4 expression in adenocarcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(10):961–6. DOI: 10.1093/jco/hyq066.
27. Beltran AS, Rivenbark AG, Richardson BT, Yuan X, Quian H, Hunt JP et al. Generation of tumor-initiating cells by exogenous delivery of OCT4 transcription factor. *Breast Cancer Res*. 2011;13(5):R94. DOI: 10.1186/bcr3019.
28. Soheili S, Asadi MH, Farsinejad A. Distinctive expression pattern of OCT4 variants in different types of breast cancer. *Cancer Biomark*. 2017;18(1):69–76. DOI: 10.3233/CBM-160675
29. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007;39(3):305–18. DOI: 10.1080/00313020701329914.
30. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420–8. DOI: 10.1172/JCI39104.
31. Esch D, Vahokoski J, Groves MR, Pogenberg V, Cojocaru V, Vom Bruch H et al. A unique Oct4 interface is crucial for reprogramming to pluripotency. *Nat Cell Biol*. 2013;15(3):295–301. DOI: 10.1038/ncb2680
32. Sternecker J, Höing S, Schöler HR. Concise review: Oct4 and more: the reprogramming expressway. *Stem Cells*. 2012;30(1):15–21. DOI: 10.1002/stem.765.
33. Li LI, Lv Y, Zhang Y, He L, Zhang H. Expression and clinical significance of Oct-4 and E-cad in non-small-cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2016;11(1):234–6. DOI: 10.3892/ol.2015.3856.
34. Zhou X, Huang GR, Hu P. Over-expression of Oct4 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cells*. 2011;32(1):39–45. DOI: 10.1007/s10059-011-2315-5.
35. Wang Q, He W, Lu C, Wang Z, Wang J, Giercksky KE et al. Oct3/4 and SOX2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2009;29(4):1233–41. PMID: 19414369.

36. Al-Marzoqee FY, Khoder G, Al-Awadhi H, John R, Beg A, Vincze A et al. Upregulation and inhibition of the nuclear translocation of Oct4 during multistep gastric carcinogenesis. *Int J Oncol*. 2012;41(5):1733–43. DOI: 10.3892/ijo.2012.1608.
37. Chen Z, Xu WR, Qian H, Zhu W, Bu XF, Wang S et al. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2009;99(7):414–9. DOI: 10.1002/jso.21270.
38. Bhave VS, Paranjpe S, Bowen WC, Donthamsetty S, Bell AW, Khillan JS et al. Genes inducing iPS phenotype play a role in hepatocyte survival and proliferation in vitro and liver regeneration in vivo. *Hepatology*. 2011;54(4):1360–70. DOI: 10.1002/hep.24507.
39. Dong Z, Zeng Q, Luo H, Zou J, Cao C, Liang J et al. Increased expression of OCT4 is associated with low differentiation and tumor recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2012;208(9):527–33. DOI: 10.1016/j.prp.2012.05.019.
40. Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, Yang ZF, Lu P, Chen KK et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway. *Hepatology*. 2010;52(2):528–39. DOI: 10.1002/hep.23692.
41. Gazouli M, Roubelakis MG, Theodoropoulos GE, Papailiou J, Vaiopoulou A, Pappa KI et al. OCT4 spliced variant OCT4B1 is expressed in human colorectal cancer. *Mol Carcinog*. 2012;51(2):165–73. DOI: 10.1002/mc.20773.
42. Fujino S, Miyoshi N. Oct4 gene expression in primary colorectal cancer promotes liver metastasis. *Stem Cells Int*. 2019;2019:7896524. DOI: 10.1155/2019/7896524.
43. Wen J, Park JY, Park KH, Chung HW, Bang S, Park SW et al. Oct4 and Nanog expression is associated with early stages of pancreatic carcinogenesis. *Pancreas*. 2010;39(5):622–6. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181c75f5e.
44. Lin H, Sun LH, Han W, He TY, Xu XJ, Cheng K et al. Knockdown of OCT4 suppresses the growth and invasion of pancreatic cancer cells through inhibition of the AKT pathway. *Mol Med Rep*. 2014;10(3):1335–42. DOI: 10.3892/mmr.2014.2367.
45. Polvani S, Tarocchi M, Tempesti S, Mello T, Ceni E, Buccoliero F et al. COUP-TFII in pancreatic adenocarcinoma: Clinical implication for patient survival and tumor progression. *Int J Cancer*. 2014;134(7):1648–58. DOI: 10.1002/ijc.28502.
46. Dong C, Wilhelm D, Koopman P. SOX genes and cancer. *Cytogenet Genome Res*. 2004, 105:442–7. DOI: 10.1159/000078217.
47. Schepers GE, Teasdale RD, Koopman P. Twenty pairs of sox: Extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell*. 2002;3(2):167–70. DOI: 10.1016/s1534-5807(02)00223-x.
48. Castillo SD, Sanchez-Céspedes M. The SOX family of genes in cancer development: Biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(9):903–19. DOI: 10.1517/14728222.2012.709239.
49. Zhu Y, Li Y, Jun Wei JW, Liu X. The role of SOX genes in lung morphogenesis and cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):15767–83. DOI: 10.3390/ijms131215767.
50. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 2006;442(7102):533–8. DOI: 10.1038/nature04915.
51. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2006;444(7117):364–8. DOI: 10.1038/nature05284.
52. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005;122(6):947–56. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.020.
53. Kendall J, Liu Q, Bakleh A, Krasnitz A, Nguyen KC, Lakshmi B et al. Oncogenic cooperation and coamplification of developmental transcription factor genes in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(42):16663–8. DOI: 10.1073/pnas.0708286104.
54. Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J et al. Mutations within SOX2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2442–55. DOI: 10.1172/JCI28658.
55. Yamaguchi S, Hirano K, Nagata S, Tada T. SOX2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. *Stem Cell Res*. 2011;6(2):177–86. DOI: 10.1016/j.scr.2010.09.004.
56. Wuebben EL, Rizzino A. The dark side of SOX2: Cancer – a comprehensive overview. *Oncotarget*. 2017;8(27):44917–43. DOI: 10.18632/oncotarget.16570.
57. Lengerke C, Fehm T, Kurth R, Neubauer H, Scheble V, Müller F et al. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer*. 2011;11:42. DOI: 10.1186/1471-2407-11-42.
58. Chen Y, Shi L, Zhang L, Li R, Liang J, Yu W et al. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem*. 2008;283(26):17969–78. DOI: 10.1074/jbc.M802917200.
59. Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, Rodriguez-Gil Y, Martinez MA, Hernandez L et al. SOX2: A possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol*. 2007;20(4):474–81. DOI: 10.1038/modpathol.3800760.
60. Sanada Y, Yoshida K, Ohara M, Oeda M, Konishi K, Tsutani Y. Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: Comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intraductal components. *Pancreas*. 2006;32(2):164–70. DOI: 10.1097/01.mpa.0000202947.80117.a0.
61. Kregel S, Kiriluk KJ, Rosen AM, Cai Y, Reyes EE, Otto KB et al. SOX2 is an androgen receptor-repressed gene that promotes castration-resistant prostate cancer. *PLoS One*. 2013;8(1):e53701. DOI: 10.1371/journal.pone.0053701.
62. Kwon OJ, Zhang L, Jia D, Zhou Z, Li Z, Haffner M et al. De novo induction of lineage plasticity from human prostate luminal epithelial cells by activated AKT1 and c-Myc. *Oncogene*. 2020;39(48):7142–51. DOI: 10.1038/s41388-020-01487-6.
63. Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S et al. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*. 2004;26(2–4):148–65. DOI: 10.1159/000082134.
64. Gontan C, de Munck A, Vermeij M, Grosveld F, Tibboel D, Rottier R. SOX2 is important for two crucial processes in lung development: Branching morphogenesis and epithelial cell dif-

- ferentiation. *Dev Biol.* 2008;317(1):296–309. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.02.035.
65. Saijo T, Ishii G, Nagai K, Funai K, Nitadori J, Tsuta K et al. Differences in clinicopathological and biological features between central-type and peripheral-type squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2006;52(1):37–45. DOI: 10.1016/j.lungcan.2005.12.006.
 66. Watanabe Y, Yokose T, Sakuma Y, Hasegawa C, Saito H, Yamada K et al. Alveolar space filling ratio as a favorable prognostic factor in small peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2011;73(2):217–21. DOI: 10.1016/j.lungcan.2010.12.001.
 67. Yousem SA. Peripheral squamous cell carcinoma of lung: Patterns of growth with particular focus on airspace filling. *Hum Pathol.* 2009;40(6):861–7. DOI: 10.1016/j.humpath.2008.11.008.
 68. Tsuta K, Tanabe Y, Yoshida A, Takahashi F, Maeshima AM, Asamura H et al. Utility of 10 immunohistochemical markers including novel markers (desmocollin-3, glypican 3, S100A2, S100A7, and SOX-2) for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the Lung. *J Thorac Oncol.* 2011;6(7):1190–9. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318219ac78.
 69. Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl AC, Scheble VJ, Maier S et al. SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol.* 2011;24(7):944–53. DOI: 10.1038/modpathol.2011.49.
 70. Sholl LM, Long KB, Hornick JL. SOX2 expression in pulmonary non-small cell and neuroendocrine carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010;18(1):55–61. DOI: 10.1097/PAI.0b013e3181b16b88.
 71. Rudin CM, Durinck S, Stawiski EW, Poirier JT, Modrusan Z, Shames DS et al. Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nat Genet.* 2012;44(10):1111–6. DOI: 10.1038/ng.2405.
 72. Schröck A, Bode M, Göke FJ, Bareiss PM, Schairer R, Wang H et al. Expression and role of the embryonic protein SOX2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2014;35(7):1636–42. DOI: 10.1093/carcin/bgu094.
 73. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(12):3488–98. DOI: 10.1245/s10434-009-0617-z.
 74. Chou YT, Lee CC, Hsiao SH, Lin SE, Lin SC, Chung CH et al. The emerging role of SOX2 in cell proliferation and survival and its crosstalk with oncogenic signaling in lung cancer. *Stem Cells.* 2013;31(12):2607–19. DOI: 10.1002/stem.1518.
 75. Du L, Yang Y, Xiao X, Wang C, Zhang X, Wang L et al. SOX2 nuclear expression is closely associated with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011;47(8):709–13. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.05.017.
 76. Lee SH, Oh SY, Do SI, Lee HJ, Kang HJ, Rho YS et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2014;111(11):2122–30. DOI: 10.1038/bjc.2014.528.
 77. Sun C, Sun L, Li Y, Kang X, Zhang S, Liu Y. SOX2 expression predicts poor survival of hepatocellular carcinoma patients and it promotes liver cancer cell invasion by activating Slug. *Med Oncol.* 2013;30(2):503. DOI: 10.1007/s12032-013-0503-1.
 78. Zhang J, Chang DY, Mercado-Urbe I, Liu J. Sex-determining region Y-box 2 expression predicts poor prognosis in human ovarian carcinoma. *Hum Pathol.* 2012;43(9):1405–12. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.10.016.
 79. Wang Q, He W, Lu C, Wang Z, Wang J, Giercksky KE et al. Oct3/4 and SOX2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1233–41. PMID: 19414369.
 80. Wang X, Ji X, Chen J, Yan D, Zhang Z, Wang Q et al. SOX2 enhances the migration and invasion of ovarian cancer cells via Src kinase. *PLoS One.* 2014;9(6):e99594. DOI: 10.1371/journal.pone.0099594.
 81. Chen Y, Huang Y, Zhu L, Chen M, Huang Y, Zhang J et al. SOX2 inhibits metastasis in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016;142(6):1221–30. DOI: 10.1007/s00432-016-2125-4.
 82. Han X, Fang X, Lou X, Hua D, Ding W, Foltz G et al. Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One.* 2012;7(8):e41335. DOI: 10.1371/journal.pone.0041335.
 83. Neumann J, Bahr F, Horst D, Kriegl L, Engel J, Luque RM et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC Cancer.* 2011;11:518. DOI: 10.1186/1471-2407-11-518.
 84. Saigusa S, Mohri Y, Ohi M, Toiyama Y, Ishino Y, Okugawa Y et al. Podoplanin and SOX2 expression in esophageal squamous cell carcinoma after neoadjuvant chemo-radiotherapy. *Oncol Rep.* 2011 Nov;26(5):1069–74. DOI: 10.3892/or.2011.1408.
 85. Zhang X, Yu H, Yang Y, Zhu R, Bai J, Peng Z et al. SOX2 in gastric carcinoma, but not Hath1, is related to patients' clinicopathological features and prognosis. *J Gastrointest Surg.* 2010;14(8):1220–6. DOI: 10.1007/s11605-010-1246-3.
 86. Lundberg IV, Löfgren Burström A, Edin S, Eklöf V, Öberg Å, Stenling R et al. SOX2 expression is regulated by BRAF and contributes to poor patient prognosis in colorectal cancer. *PLoS One.* 2014;9(7):e101957. DOI: 10.1371/journal.pone.0101957.
 87. Bareiss PM, Paczulla A, Wang H, Schairer R, Wiehr S, Kohlhöfer U, Rothfuss OC et al. SOX2 expression associates with stem cell state in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(17):5544–55. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4177.
 88. Piva M, Domenici G, Iriando O, Rábano M, Simões BM, Comaills V et al. SOX2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med.* 2014;6(1):66–79. DOI: 10.1002/emmm.201303411.
 89. Li D, Zhao LN, Zheng XL, Lin P, Lin F, Li Y et al. SOX2 is involved in paclitaxel resistance of the prostate cancer cell line PC-3 via the PI3K/Akt pathway. *Mol Med Rep.* 2014;10(6):3169–76. DOI: 10.3892/mmr.2014.2630.
 90. Enever C, Batuwangala T, Plummer C, Sepp A. Next generation immunotherapeutics – honing the magic bullet. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20(4):405–11. DOI: 10.1016/j.copbio.2009.07.002.
 91. Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Actman L, McNally SR, Silberg DG et al. Loss of KLF4 in mice causes altered proliferation

- and differentiation and precancerous changes in the adult stomach. *Gastroenterology*. 2005;128(4):935–45. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.02.022.
92. Wei D, Kanai M, Huang S, Xie K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*. 2006;27(1):23–31. DOI: 10.1093/carcin/bgi243.
 93. Yang Y, Goldstein BG, Chao HH, Katz JP. KLF4 and KLF5 regulate proliferation, apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2005;4(11):1216–21. DOI: 10.4161/cbt.4.11.2090.
 94. Wei D, Gong W, Kanai M, Schlunk C, Wang L, Yao JC et al. Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res*. 2005;65(7):2746–54. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3619.
 95. Zhang N, Zhang J, Shuai L, Zha L, He M, Huang Z et al. Krüppel-like factor 4 negatively regulates β -catenin expression and inhibits the proliferation, invasion and metastasis of gastric cancer. *Int J Oncol*. 2012;40(6):2038–48. DOI: 10.3892/ijo.2012.1395.
 96. Choi BJ, Cho YG, Song JW, Kim CJ, Kim SY, Nam SW et al. Altered expression of the KLF4 in colorectal cancers. *Pathol Res Pract*. 2006;202(8):585–9. DOI: 10.1016/j.prp.2006.05.001.
 97. Patel NV, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. Expression of the tumor suppressor Krüppel-like factor 4 as a prognostic predictor for colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(10):2631–8. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0677.
 98. Li Q, Gao Y, Jia Z, Mishra L, Guo K, Li Z et al. Dysregulated Krüppel-like factor 4 and vitamin D receptor signaling contribute to progression of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;143(3):799–810.e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.05.043.
 99. Ma MQ, Zhang HD, Tang P, Jiang HJ, Chen CG. Association of Krüppel-like factor 4 expression with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(10):6679–85. PMID: 25400747.
 100. Hsu LS, Chan CP, Chen CJ, Lin SH, Lai MT, Hsu JD et al. Decreased Krüppel-like factor 4 (KLF4) expression may correlate with poor survival in gastric adenocarcinoma. *Med Oncol*. 2013;30(4):632. DOI: 10.1007/s12032-013-0632-6.
 101. Yin X, Li YW, Jin JJ, Zhou Y, Ren ZG, Qiu SJ et al. The clinical and prognostic implications of pluripotent stem cell gene expression in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2013;5(4):1155–62. DOI: 10.3892/ol.2013.1151.
 102. Xu J, Lü B, Xu F, Gu H, Fang Y, Huang Q et al. Dynamic down-regulation of Krüppel-like factor 4 in colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(8):891–8. DOI: 10.1007/s00432-008-0353-y.
 103. Lee HY, Ahn JB, Rha SY, Chung HC, Park KH, Kim TS et al. High KLF4 level in normal tissue predicts poor survival in colorectal cancer patients. *World J Surg Oncol*. 2014;12:232. DOI: 10.1186/1477-7819-12-232.
 104. Kuruvilla JG, Kim CK, Ghaleb AM, Bialkowska AB, Kuo CJ, Yang VW. Krüppel-like factor 4 modulates development of BMI1(+) intestinal stem cell-derived lineage following γ -radiation-induced gut injury in mice. *Stem Cell Reports*. 2016;6(6):815–24. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.04.014.
 105. Yan KS, Chia LA, Li X, Ootani A, Su J, Lee JY et al. The intestinal stem cell markers *Bmi1* and *Lgr5* identify two functionally distinct populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(2):466–71. DOI: 10.1073/pnas.1118857109.
 106. Wei D, Kanai M, Jia Z, Le X, Xie K. Krüppel-like factor 4 induces p27Kip1 expression in and suppresses the growth and metastasis of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68(12):4631–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5953.
 107. Zammarchi F, Morelli M, Menicagli M, Di Cristofano C, Zavgaglia K, Paolucci A et al. KLF4 is a novel candidate tumor suppressor gene in pancreatic ductal carcinoma. *Am J Pathol*. 2011;178(1):361–72. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.021.
 108. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899–905. DOI: 10.1038/nature08822.
 109. Gabay M, Li Y, Felsner DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(6):a014241. DOI: 10.1101/cshperspect.a014241.
 110. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007;446(7132):153–8. DOI: 10.1038/nature05610.
 111. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(5):502–11. DOI: 10.1056/NEJMra072367.
 112. He C, Jiang H, Geng S, Sheng H, Shen X, Zhang X et al. Expression and prognostic value of c-Myc and Fas (CD95/APO1) in patients with pancreatic cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(2):742–50. PMID: 24551298.
 113. Kraft P, Yen YC, Stram DO, Morrison J, Gauderman WJ. Exploiting gene-environment interaction to detect genetic associations. *Hum Hered*. 2007;63(2):111–9. DOI: 10.1159/000099183.
 114. Kim CG, Choi JJ, Lee JY, Cho SJ, Nam BH, Kook MC et al. Biopsy site for detecting *Helicobacter pylori* infection in patients with gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(3):469–74. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05679.x.
 115. Holczbauer A, Factor VM, Andersen JB, Marquardt JU, Kleiner DE, Raggi C et al. Modeling pathogenesis of primary liver cancer in lineage-specific mouse cell types. *Gastroenterology*. 2013;145(1):221–31. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.03.013.
 116. Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, Rajendran PS, Rothenberg ME, Leyrat AA et al. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat Biotechnol*. 2011;29(12):1120–7. DOI: 10.1038/nbt.2038.
 117. Merlos-Suárez A, Barriga FM, Jung P, Iglesias M, Céspedes MV, Rossell D et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell*. 2011;8(5):511–24. DOI: 10.1016/j.stem.2011.02.020.
 118. Akita H, Marquardt JU, Durkin ME, Kitade M, Seo D, Conner EA et al. MYC activates stem-like cell potential in hepatocarcinoma by a p53-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2014;74(20):5903–13. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0527.
 119. Kaposi-Novak P, Libbrecht L, Woo HG, Lee YH, Sears NC, Coulouarn C et al. Central role of c-Myc during malignant conversion in human hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*. 2009;69(7):2775–82. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3357.

120. *Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson A, Beer S, Mandl S et al.* MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*. 2004;431(7012):1112–7. DOI: 10.1038/nature03043.
121. *Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(7):3983–8. DOI: 10.1073/pnas.0530291100.
122. *Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, De Francesco F, Pirozzi G, Graziano A et al.* Detection and characterization of CD133⁺ cancer stem cells in human solid tumours. *PLoS One*. 2008;3(10):e3469. DOI: 10.1371/journal.pone.0003469.
123. *Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ.* Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 2005;65(23):10946–51. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2018.
124. *Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R et al.* Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*. 2009;27(5):1006–20. DOI: 10.1002/stem.30.
125. *Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G et al.* The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009;36(3):446–53. DOI: 10.1016/j.ejcts.2009.03.063.
126. *Arsic N, Gadea G, Lagerqvist EL, Busson M, Cahuzac N, Brock C et al.* The p53 isoform $\Delta 133p53\beta$ promotes cancer stem cell potential. *Stem Cell Reports*. 2015;4(4):531–40. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.02.001.
127. *Curry EL, Moad M, Robson CN, Heer R.* Using induced pluripotent stem cells as a tool for modelling carcinogenesis. *World J Stem Cells*. 2015;7(2):461–9. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i2.461.

Информация об авторах

Лариса Евсеевна Гуревич – доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения морфологической диагностики отдела онкологии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

Екатерина Владимировна Бондаренко – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения морфологической диагностики отдела онкологии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского; врач-патологоанатом отдела фундаментальной морфологии НМИЦ эндокринологии.

Олеся Александровна Васюкова – младший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Author information

Larisa E. Gurevich – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher, Department of Morphological Diagnostics, Oncology Department, MF Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute.
<https://orcid.org/0000-0002-9731-3649>

Ekaterina V. Bondarenko – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Department of Morphological Diagnostics, Oncology Department, MF Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute; Pathologist, Fundamental Morphology Department, National Medical Research Center of Endocrinology.
<https://orcid.org/0000-0003-2122-2297>

Olesya A. Vasyukova – Junior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0001-6068-7009>

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

Патологическая анатомия и компьютерная томография диффузных кистозных заболеваний легких

А.Л. Черняев^{1,2,4}, М.В. Самсонова^{1,3}, А.В. Аверьянов¹, М.А. Макарова^{1,4}, К.Ю. Михайличенко¹

¹ ФГБУ Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

² ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Москва, Россия

³ ГБУЗ Московский клинический научный центр имени А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Введение. Кистозные болезни легких относятся к редким (орфанным) заболеваниям. Кисты легких – важный рентгеноморфологический признак, способствующий правильной постановке диагноза. Цель исследования – описать патологоанатомические и компьютерно-томографические особенности легочного лангергансоподобного гистиоцитоза (ЛЛКГ), лимфангиолейомиоматоза (ЛАМ), первичных злокачественных опухолей легких, эндометриоза легких.

Материалы и методы. Были изучены видеоторакоскопические биопсии легких от 139 больных: ЛАМ – 86 пациентов, ЛЛКГ – 47, первичная периферическая аденокарцинома легких – три пациента, эндометриоз легких – три пациента. Средний возраст больных при ЛАМ составлял 41±10 года, при ЛЛКГ – 32±11 года, с аденокарциномой легких – 62±3,5 года, с эндометриозом – 32±4,1 года. Всем перед взятием биопсии проводили компьютерную томографию легких высокого разрешения (КТВР). Было проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование кусочков ткани легких, полученных во время операций. В исследовании использовали антитела к CD1a, SMA, HMB-45, CD207 (лангерин), рецепторам к прогестерону, эстрогену, CD 10.

Результаты. Описаны особенности кистозных изменений легких, выявленные при компьютерной томографии высокого разрешения, гистологические и иммуногистохимические изменения в стенках кистозных полостей и по их периферии у больных при легочном лангергансоподобном гистиоцитозе, лимфангиолейомиоматозе, первичных злокачественных опухолях легких, эндометриозе легких.

Заключение. Многообразие причин возникновения кист в легких потребовало проведения дифференциальной диагностики с учетом возраста пациентов, данных КТВР, указывающих на локализацию процесса, патологической анатомии и иммуногистохимического исследования с использованием необходимых маркеров.

Ключевые слова: кистозные болезни легких, компьютерная томография, патологическая анатомия, лангергансоподобный гистиоцитоз, лимфангиолейомиоматоз, злокачественные опухоли, эндометриоз

Для корреспонденции: Андрей Львович Черняев. E-mail: cheral12@gmail.com

Для цитирования: Черняев А.Л., Самсонова М.В., Аверьянов А.В., Макарова М.А., Михайличенко К.Ю. Патологическая анатомия и компьютерная томография диффузных кистозных заболеваний легких. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):23–33. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.23-33.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 17.09.2021. Получена после рецензирования 30.09.2021. Принята в печать 16.12.2021.

Anatomic pathology and computed tomography of diffuse cystic lung diseases

A.L. Chernyayev^{1,2,4}, M.V. Samsonova^{1,3}, A.V. Averyanov¹, M.A. Makarova^{1,4}, K.Yu. Mikhaylichenko¹

¹ Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russia

² A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

³ A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Introduction. Cystic lung diseases are rare (orphan) diseases. Lung cysts are an important X-ray and morphological sign that contributes to the correct diagnosis.

The aim of the research was to describe histologic features and computed tomography findings in patients with pulmonary Langerhans cell histiocytosis (PLCH), lymphangiomyomatosis (LAM), primary malignant lung tumors, and endometriosis of the lung.

Materials and methods. We evaluated video-assisted surgical lung biopsies from 139 patients, with 86 patients having LAM, 47 having PLCH, and in three having primary peripheral lung adenocarcinoma and endometriosis of the lung. The average age of patients with LAM was 41 ± 10 years, LCG – 32 ± 11 years, lung adenocarcinoma – 62 ± 3.5 years, and endometriosis of the lung – 32 ± 4.1 years. All patients had undergone high-resolution computed tomography of the lungs (HRCT) before the biopsy was obtained. We performed histological and immunohistochemical examinations of lung tissue specimens. Antibodies to CD1a, SMA, HMB-45, CD207 (langerin), CD10, receptors to progesterone, and estrogen were used in the study.

Results. We described HRCT, histological, and immunohistochemical features of cystic lung diseases, including characteristics of the walls of cystic cavities in patients with PLCH, LAM, primary malignant lung tumors, and endometriosis of the lung.

Conclusion. The variety of causes of lung cysts required a differential diagnosis, considering the patients' ages, HRCT data indicating the localization of the pathological process, histology, and immunohistochemistry if necessary.

Keywords: cystic lung diseases, computed tomography, pathological anatomy, Langerhans cell histiocytosis, lymphangioleiomyomatosis, malignant tumors, endometriosis

Corresponding author: Andrey L. Chernyaev. E-mail: cheral12@gmail.com

For citation: Chernyaev A.L., Samsonova M.V., Averyanov A.V., Makarova M.A., Mikhaylichenko K.Yu. Anatomic pathology and computed tomography of diffuse cystic lung diseases. Clin. exp. morphology. 2021;10(S4):23–33. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.23-33 (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 17.09.2021. **Received in revised form** 30.09.2021. **Accepted** 16.12.2021.

Введение

Кистозные заболевания легких – группа гетерогенных болезней, при которых ведущим рентгеноморфологическим синдромом является образование множественных кист в легких. Кисты представляют собой полости, как правило заполненные воздухом, четко отграниченные от легочной паренхимы тонкой (<2 мм) стенкой [1]. Предполагается, что причины развития кистозных изменений в легких – клапанная обструкция терминальных бронхиол (фолликулярный бронхолит, метастазы рака) [2], ишемическое повреждение терминальных бронхиол с их последующей дилатацией (амилоидоз, лимфоцитарная пневмония) [3], локальная деградация матриксных металлопротеиназ, подопланина при снижении антипротеазной защиты протеолитическими ферментами (лимфангиолейомиоматоз (ЛАМ), легочный лангергансноклеточный гистиоцитоз (ЛЛКГ), синдром Берта–Хогга–Дюбе) [4].

В 2015 году эксперты Американского торакального общества предложили классификацию диффузных кистозных заболеваний легких [5] (табл.).

Большая масса заболеваний из приведенных в таблице относится к редким (орфанным) болезням, для которых кистозное поражение легких – один из основных рентгеноморфологических признаков, способствующих правильной постановке диагноза. В нашей практике наиболее часто из кистозных болезней легких встречались ЛЛКГ, ЛАМ, опухоли легких, эндометриоз легких.

ЛЛКГ – редкое заболевание, характеризующееся инфильтрацией паренхимы легких специфическими дендритными клетками (CD1a⁺), носящими название «клетки Лангерганса» [6]. ЛЛКГ является представи-

телем гистиоцитозов – группы заболеваний, вызванных пролиферацией клеток моноцитарно-макрофагальной и дендритной линий. Распространенность ЛЛКГ точно не установлена, но среди пациентов с диффузными паренхиматозными заболеваниями легких эта патология встречается примерно в 4–5% наблюдений [7]. Возраст пациентов колеблется от 20 до 40 лет [8]. По данным одних авторов, среди заболевших преобладают мужчины [9], по данным других, – женщины [10]. Главным фактором риска ЛЛКГ в 95% наблюдений было табакокурение (активные или бывшие курильщики, регулярный контакт с табачным дымом) [9, 10]. Клетки, о которых идет речь, впервые были описаны Паулем Лангергансом в 1868 году [11], впоследствии Virbeck et al. [12] обнаружили при электронномикроскопическом исследовании, что клетки Лангерганса содержат в цитоплазме характерные гранулы или X-тельца. Предполагают, что дендритные клетки могут появляться в легких из циркулирующих незрелых дендритных клеток под действием хемокинов, в результате дифференцировки предшественников под действием местных цитокинов, а также, возможно, вследствие пролиферации предполагаемых клеток-предшественников непосредственно в легком или легочных макрофагов, трансдифференцирующихся в дендритные клетки [13]. «Эпителиальный» тип дендритных клеток характеризуется экспрессией CD1a, E-кадгерина, лангерина и S-100 [13]. Клетки Лангерганса пролиферируют медленно, болезнь часто спонтанно регрессирует, в конечной фиброзно-кистозной стадии заболевания клетки Лангерганса практически отсутствуют [14].

ЛАМ – редкое системное неопластическое заболевание, ассоциированное с развитием кистозных

Классификация диффузных кистозных заболеваний легких |
Classification of diffuse cystic lung diseases

Группа Group	Заболевания Diseases
Неопластические Neoplastic	ЛАМ, ЛЛКГ, нелангергансоклочные гистиоцитозы, болезнь Эрджейма–Честера, первичные или метастатические новообразования (аденокарциномы, саркомы, лейомиомы) LAM, PLCH, non-Langerhans cell histiocytosis, Erdheim–Chester disease, primary or metastatic neoplasms (adenocarcinomas, sarcomas, leiomyomas)
Генетически детерминированные Genetically determined	Синдром Берта–Хогга–Дюбе, синдром Протея, синдром Эллерса–Данло, синдром Марфана, нейрофиброматоз, врожденная бронхолегочная дисплазия (мальформация) Birt–Hogg–Dubé syndrome, Proteus syndrome, Ehlers–Danlos syndrome, Marfan syndrome, neurofibromatosis, congenital bronchopulmonary dysplasia (malformation)
Ассоциированные с лимфопролиферативными заболеваниями Associated with lymphoproliferative diseases	Фолликулярный бронхиолит/лимфоцитарная интерстициальная пневмония, синдром Шегрена, амилоидоз, болезнь депозитов легких цепей Follicular bronchiolitis/lymphocytic interstitial pneumonia, Sjogren’s syndrome, amyloidosis, lung chain deposition disease
Инфекционные Infectious	Пневмоцистная пневмония, стафилококковая инфекция, рецидивирующий респираторный папилломатоз, парагонимоз, кокцидиомикоз Pneumocystis pneumonia, staphylococcal infection, recurrent respiratory papillomatosis, paragonimosis, coccidiomycosis
Ассоциированные с интерстициальными заболеваниями легких Associated with interstitial lung diseases	Гиперчувствительный пневмонит; десквамативная интерстициальная пневмония Hypersensitivity pneumonitis; desquamative interstitial pneumonia
Ассоциированные с табакокурением Associated with smoking	ЛЛКГ, десквамативная интерстициальная пневмония, респираторный бронхиолит PLCH, desquamative interstitial pneumonia, respiratory bronchiolitis
Другие/смешанные Other/mixed	Посттравматические псевдокисты; легкие «глотателей огня»; синдром гиперпродукции IgE, эндометриоз легких Post-traumatic pseudocysts; Fire eater’s lung; hyper-IgE syndrome, endometriosis of the lung
Заболевания с кистоподобными изменениями Diseases with cyst-like changes	Эмфизема легких; бронхоэктазы, «сотое легкое» при ИЛФ и ФГП Emphysema; bronchiectasis, “honeycomb lung” in IPF and FHP

ЛАМ – лимфангиолейомиоматоз легких, ЛЛКГ – легочный лангергансоклочный гистиоцитоз легких, ИЛФ – интерстициальный легочный фиброз, ФГП – фиброзный гиперчувствительный пневмонит
LAM – lymphangioliomyomatosis of the lungs, PLCH – pulmonary Langerhans cell histiocytosis, IPF – interstitial pulmonary fibrosis, FHP – fibrotic hypersensitivity pneumonitis

образований в легких, хилезных гидротораксов, опухолей диафрагмы, поддиафрагмальных отделов, почек, забрюшинной жировой клетчатки. В подавляющем большинстве наблюдений ЛАМ развивается у женщин детородного возраста [15, 16]. Выделяют два варианта ЛАМ: спорадический и ассоциированный с туберозным склерозом [16]. Туберозный склероз (ТС) – аутосомно-доминантное заболевание, основными клиническими проявлениями которого являются ангиофиброматоз лица, нетравматические околоногтевые фибромы, гипопигментные пятна (больше трех), «шагреневая кожа», множественные гамартомы сетчатки, корковые туберсы, субэпендимарные узлы, гигантоклеточная астроцитома, множественные или одиночные рабдомиомы сердца, множественные ангиомиолипомы почек и поражение легких [15]. Патогенез заболевания изучен недостаточно, однако имеет место генетическая предрасположенность, развитие заболевания связано с наличием мутаций в генах *TSC1* и *TSC2*.

Некоторые авторы относят заболевание к многофокусным гамартомным поражениям, в прогрессировании которых важную роль играют женские половые гормоны. Течение болезни неуклонно прогрессирующее. Активизация процесса отмечается во время беременности и родов, при приеме контрацептивных препаратов. Процесс пролиферации гладких мышц может захватывать и лимфатическую систему грудного и/или брюшного отделов, вызывая их сдавление и развитие хилоторакса и/или хилезного асциты.

При дифференциальной диагностике ЛАМ с другими заболеваниями, при которых возможна пролиферация гладких мышц (в частности, при интерстициальном фиброзе), используют иммуногистохимические маркеры – актин гладких мышц (SMA), маркер меланомы (HMB-45), последний не выявляют в нормальных гладких мышцах. Кроме того, присутствие HMB-45 подтверждено при ретроперитонеальной форме ЛАМ, в ангиомиолипоме почки при наличии или отсутствии

ТС, а также в светлоклеточной опухоли легкого и почечноклеточном раке у пациентов с ТС [17–19].

Одной из опухолей легкого, при которой формируются кистозные полости, является периферическая аденокарцинома, как правило с первично-множественным ростом. Такой рак обычно развивается медленно в течение двух и более лет [20, 21]. Причинами, в результате которых возникают кистозные полости, являются центральный некроз опухоли, обструкция просвета бронха, подходящего в зону опухоли, деструкция межальвеолярных перегородок опухолевыми клетками, развитие булл, кист и сот по периферии опухоли, повреждение межальвеолярных перегородок за счет слизи, вырабатываемой опухолевыми клетками, аутофагоцитоз опухолевых клеток, имеют значения также свойства самой опухоли [22–24].

Одна из относительно редких форм эндометриоза – экстрагенитальный эндометриоз (ЭГЭ), для которого характерно развитие эндометриоидной ткани в разных органах, в том числе в легких. Частота ЭГЭ составляет 6–8% общего числа наблюдений эндометриоза [25–27]. Появление функционирующего эндометрия в грудной клетке связано с гематогенным метастазированием. При этом клиническими симптомами болезни являются рецидивирующие пневмотораксы, кровохарканье, кашель, боли в грудной клетке, связанные с менструальным циклом [27, 28]. При КТВР обнаруживаются 4 варианта патологии: затемнение по типу «матового стекла», узловые тени, нередко с эксцентрично расположенными полостями, ограниченные буллезные трансформации или единичные тонкостенные полости, не содержащие жидкость. Эти рентгенологические признаки, сочетающиеся с кровохарканьем и болями в грудной клетке, нередко расцениваются как проявление туберкулезного или опухолевого поражения легких. Окончательный диагноз «экстрагенитальный эндометриоз» устанавливается только при гистологическом и иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании с обнаружением рецепторов эстрогена и прогестерона [28, 29].

Цель исследования – описать патологоанатомические и компьютерно-томографические изменения при кистозных заболеваниях легких на материале видеоторакоскопических биопсий, полученных от пациентов с ЛАМ, ЛКГ, первичной периферической аденокарциномой легких, эндометриозом.

Материалы и методы

Изучены видеоторакоскопические (ВТС) биопсии легких от 139 больных: ЛАМ – 86 пациентов, ЛКГ – 47, первичная периферическая аденокарцинома легких – три пациента, эндометриоз – три пациента. Средний возраст пациентов с ЛАМ составлял 41 ± 10 года, с ЛЛКГ – 32 ± 11 года, с аденокарциномой легких – $62 \pm 3,5$ года, с эндометриозом – $32 \pm 4,1$ года.

Всем пациентам перед взятием биопсии выполняли компьютерную томографию легких высокого разрешения (КТВР).

Кусочки ткани легкого, полученные при операции, обрабатывали по общепринятой методике, заливали в парафин и изготавливали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином и фукселином. Для ИГХ исследования использовались гистологические парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм, которые наносили на высокоадгезивные стекла и высушивали в термостате при температуре $+70^\circ\text{C}$ в течение 2 часов. Окрашивание выполнялось с использованием двухэтапного стрептавидин-биотин-пероксидазного метода с демаскировкой антигена и применением наборов моноклональных и поликлональных антител. Иммуногистохимическое окрашивание проводилось в иммунопейнерах Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH (Roche, США) на парафиновых срезах по стандартной методике. В исследовании использовали следующие антитела: CD1a, SMA, HMB-45, к рецепторам прогестерона и эстрогена, CD 10 (Novocastra, Великобритания), CD207 (лангерин) (Cell Marque, США).

Результаты

При КТВР у пациентов с ЛЛКГ наблюдали множественные мелкие гомогенные центрилобулярные очажки с неправильными, но четкими контурами, редко превышающие в размерах 5 мм, в единичных наблюдениях они достигали 1 см. У большинства пациентов имели место множественные очажки в сочетании с относительно толстостенными мелкими и более крупными тонкостенными кистами при толщине стенок менее или равной 2 мм. Очажки в процессе развития болезни могут увеличиваться, в центре очагов более 5 мм в диаметре нередко появляются фокусы просветления, что считается началом формирования кист. В 85% наблюдений кистозные полости локализовались в верхних и средних отделах легких с практически неизменными базальными отделами (рис. 1). В двух наблюдениях у женщин кисты локализовались во всех отделах легких, которые не позволяли исключить ЛАМ. У семи пациентов из 47 первым симптомом заболевания явились пневмотораксы. При гистологическом исследовании обнаружены перибронхиолярные гранулемы разнообразного сос-



Рис. 1. ЛЛКГ. КТВР. Кистозные полости, локализующиеся преимущественно в верхних и средних долях
Fig. 1. PLCH. HRCT. Cystic cavities, localized mainly in the upper and middle lobes

тава типичного лапчатого вида, распространяющиеся на прилежащие межальвеолярные перегородки (рис. 2). В составе гранулем наблюдали клетки Лангерганса, пигментированные макрофаги, эозинофилы, лимфоциты, плазматические клетки (рис. 3), фибробласты, изредка встречались гигантские клетки инородных тел. Наличие пигментированных макрофагов в составе гранулем и в просветах альвеол отражает приверженность к курению. Помимо гранулем характерной лапчатой формы обнаруживали гранулемы неправильной формы, а также инфильтраты различной величины. У части пациентов наблюдали участки интерстициального фиброза с наличием кистозных полостей, выстланных однорядным кубическим эпителием, в стенках которых определяли очаговые лимфогистиоцитарные инфильтраты. При им-

муногистохимическом исследовании в составе гранулем были выявлены клетки Лангерганса, положительно окрашенные CD1a и/или CD 207 (лангерин) (рис. 4, 5).

На КТВР при ЛАМ обнаруживали множественные кисты округлой формы, не сливающиеся между собой, диаметром от 2–5 мм, единичные достигали размера 25–30 мм, расположенные во всех долях легких среди неизменной ткани (рис. 6).

При гистологическом исследовании гладкомышечные разрастания при ЛАМ состояли из компактно собранных атипичных пролиферирующих гладкомышечных клеток удлиненной, веретеновидной или овальной формы, располагающихся вокруг бронхиол, в межальвеолярных перегородках, вокруг артерий, вен, лимфатических протоков и в плевре. Наиболее

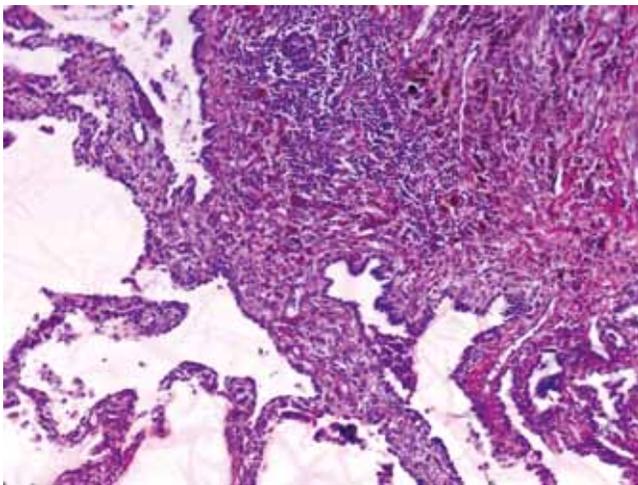


Рис. 2. ЛЛКГ. Перибронхиальная гранулема неправильной формы, состоящая из гистиоцитов, пигментированных макрофагов, лимфоцитов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 2. PLCH. Peribronchial granuloma of irregular shape, consisting of histiocytes, pigmented macrophages, and lymphocytes. H&E stain, $\times 100$

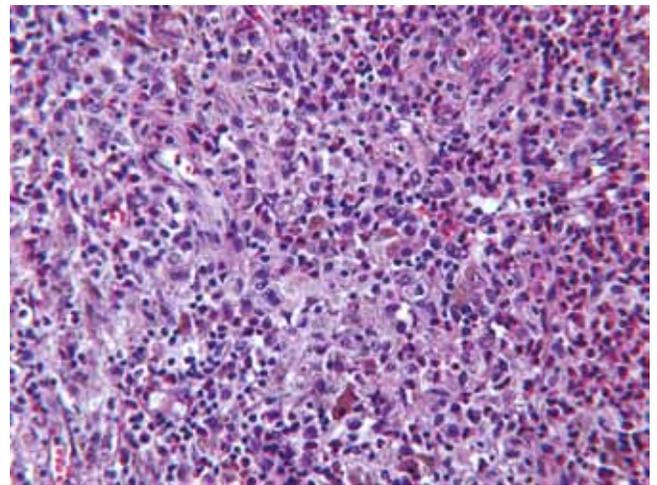


Рис. 3. ЛЛКГ. Полиморфноклеточный состав гранулемы: гистиоциты, лимфоциты, эозинофилы, пигментированные макрофаги. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 3. PLCH. Granuloma consisting of histiocytes, lymphocytes, eosinophils, and pigmented macrophages. H&E stain, $\times 400$

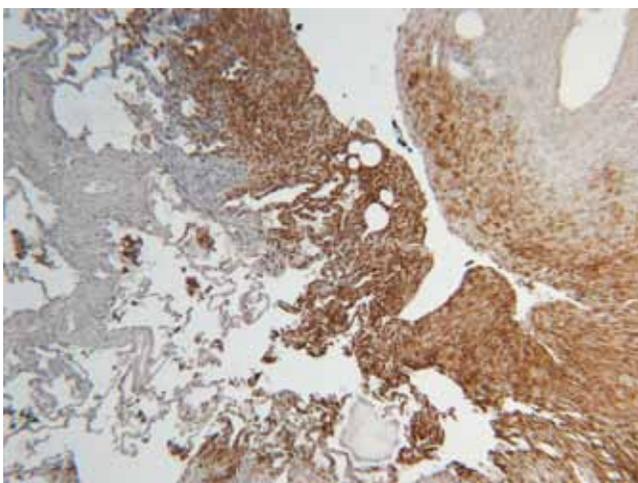


Рис. 4. ЛЛКГ. Экспрессия лангерина (CD207) в гранулеме. Иммуногистохимическая реакция, $\times 40$

Fig. 4. PLCH. Langerin (CD207) expression in granuloma. IHC, $\times 40$

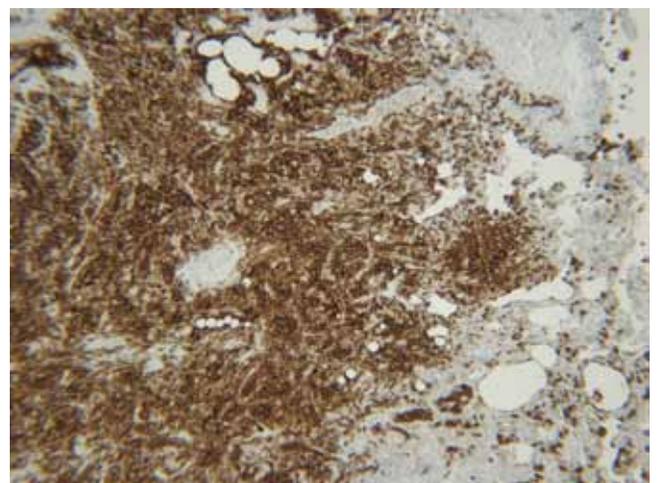


Рис. 5. ЛЛКГ. Экспрессия CD1a в клетках гранулемы в стенке кистозной полости. Иммуногистохимическая реакция, $\times 40$

Fig. 5. PLCH. CD1a expression in granuloma cells in the cystic cavity wall. IHC, $\times 40$



Рис. 6. ЛАМ. КТВП. Множественные кистозные полости во всех отделах легких среди неизменной ткани легких
Fig. 6. LAM. HRCT. Multiple cystic cavities in all lung lobes among the unaltered lung tissue

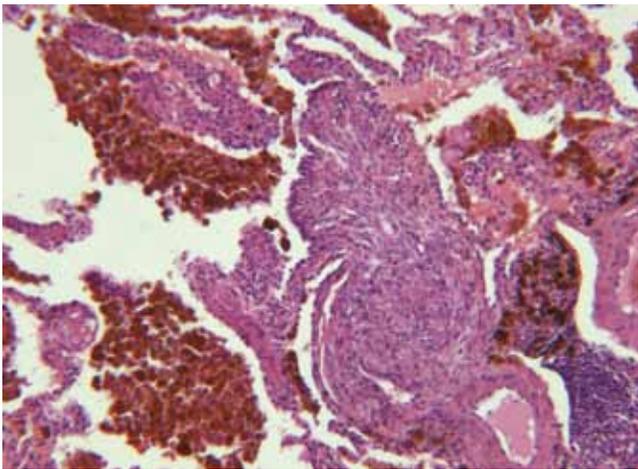


Рис. 8. ЛАМ. Гладкомышечный узелок в стенке кистозной полости, скопления сидерофагов в просвете полости. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$
Fig. 8. LAM. Smooth muscle nodule in the cystic cavity wall, clusters of siderophages in the cavity lumen. H&E stain, $\times 100$

часто гладкомышечные узелки встречались в стенках мелких воздушных кист (рис. 7, 8). Кроме того, были обнаружены скопления эритроцитов и гемосидерина в полостях альвеол. У 15 пациентов имело место кровохарканье, у 22 наблюдали хилоторакс. При иммуногистохимическом исследовании в гладкомышечных узелках наблюдали положительную реакцию с α -актином гладких мышц (SMA), маркером меланомы (HMB-45), который не выявляется в нормальных и пролиферирующих гладких мышцах (рис. 9). В пяти наблюдениях HMB-45 был обнаружен в ангиомиолипомах почек и лимфангиомиолипомах забрюшинного пространства.

При КТВР при аденокарциномах были обнаружены множественные кистозные полости округлой и неправильной формы с участками уплотнений в одной или нескольких стенках (рис. 10). Во всех наблюдениях периферического рака легкого с кистозными изменениями легких диагностирована инвазивная ацинарная аденокарцинома, состоящая из призматических клеток с маленьким ядром (рис. 11). Продолжительность заболевания от момента выявления опухоли составила от 2 лет до 3,5 года.

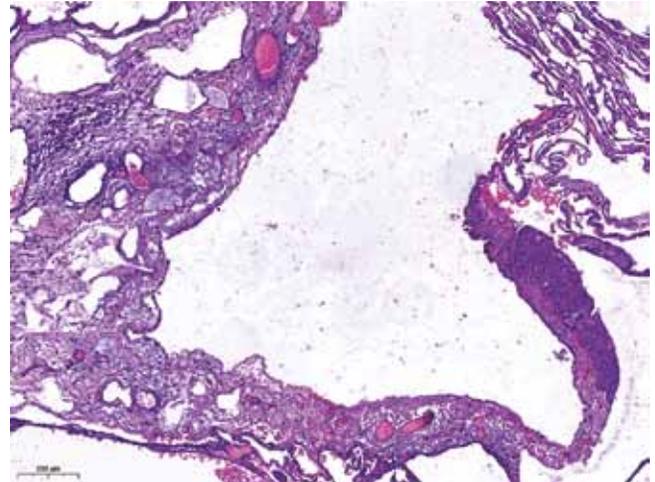


Рис. 7. ЛАМ. Гладкомышечные узелки в стенке кистозной полости. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 60$
Fig. 7. LAM. Smooth muscle nodules in the cystic cavity wall. H&E stain, $\times 60$

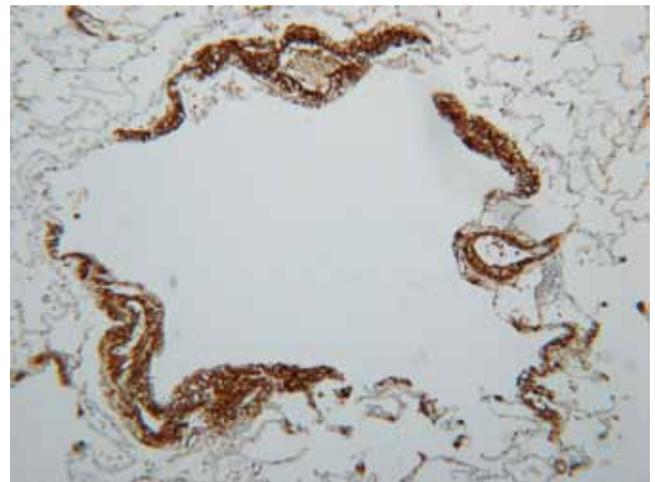


Рис. 9. ЛАМ. Экспрессия HMB-45 в узелке в стенке кистозной полости. Иммуногистохимическая реакция, $\times 40$
Fig. 9. LAM. HMB-45 expression in a nodule in the wall of the cystic cavity. IHC, $\times 40$

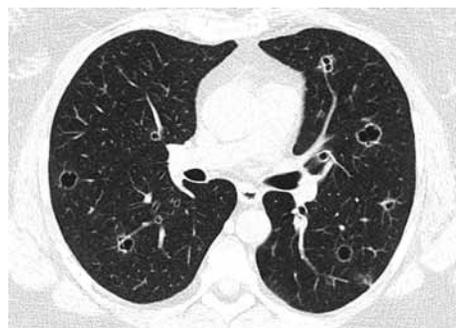


Рис. 10. Рак легкого. КТВР. Кистозные полости со стенками различной толщины
Fig. 10. Lung cancer. HRCT. Cystic cavities with walls of various thicknesses

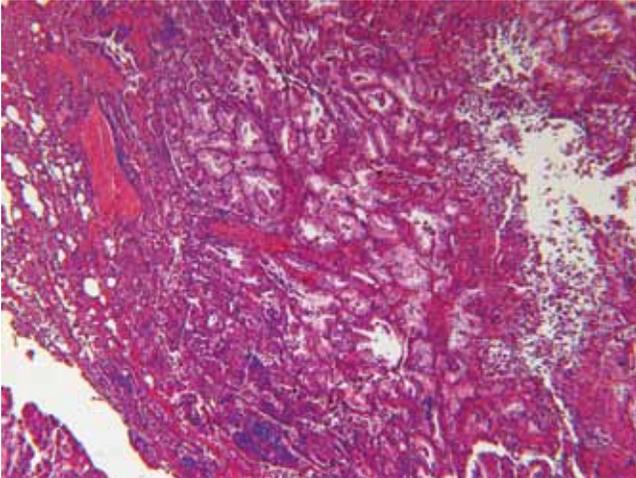


Рис. 11. Ацинарная аденокарцинома. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 25$

Fig. 11. Acinar adenocarcinoma. H&E stain, $\times 25$



Рис. 12. Эндометриоз. КТВР. Кистозные полости, одна из которых по периферии участка консолидации

Fig. 12. Endometriosis. HRCT. Cystic cavities, one of which is on the periphery of the consolidation

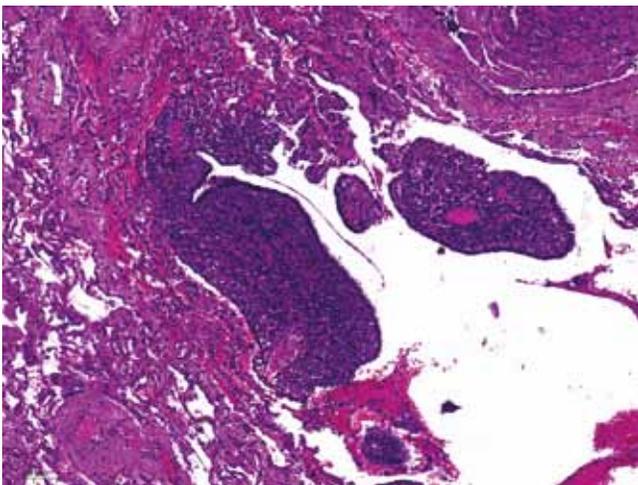


Рис. 13. Эндометриоз. Узелки, состоящие из цитогенной стромы, выстланные кубическим эпителием в стенке кистозной полости. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 40$

Fig. 13. Endometriosis. Nodules consisting of cytotrogenic stroma lined with cubic epithelium in the cystic cavity wall. H&E stain, $\times 40$

При эндометриозе картина при КТВР легких может быть разнообразной, с наличием разнокалиберных полостей округлой и неправильной формы, с разной толщиной стенок, сочетающихся с участками консолидации (рис. 12). При микроскопическом исследовании в легочной ткани обнаруживали полости, стенки которых были представлены разнонаправленными разрастаниями веретеновидных клеток, а также участками цитогенной стромы с наличием местами желез, выстланных кубическим эпителием, на отдельных участках в виде сосочков (рис. 13). На описанных выше участках была обнаружена экспрессия рецепторов к эстрогену, прогестерону (рис. 14), CD10 (рис. 15). Такие изменения сочетались с очаговыми кровоизлияниями и/или отложениями гемосидерина.

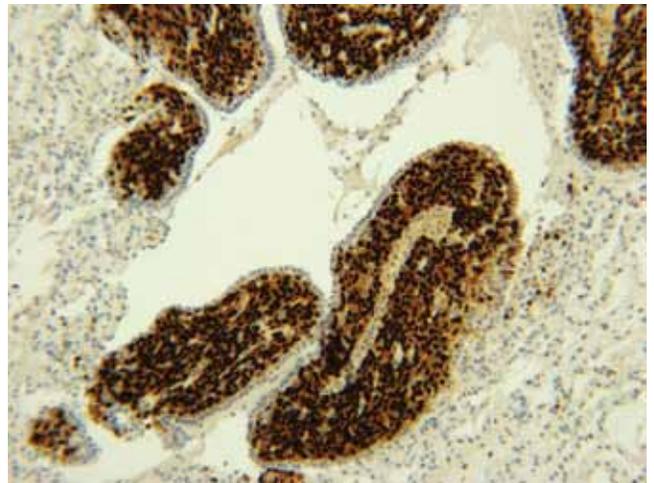


Рис. 14. Эндометриоз. Экспрессия рецепторов прогестерона в стромальных клетках. Иммуногистохимическая реакция, $\times 100$

Fig. 14. Endometriosis. Expression of progesterone receptors in stromal cells. IHC, $\times 100$

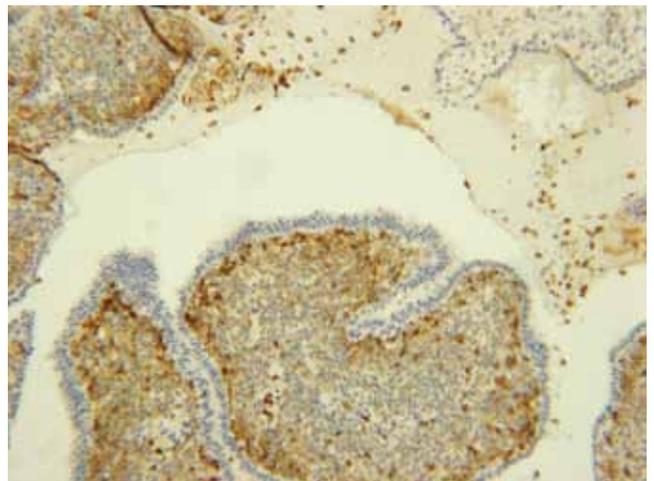


Рис. 15. Эндометриоз. Экспрессия CD10 в стромальных клетках узелков. Иммуногистохимическая реакция, $\times 100$

Fig. 15. Endometriosis. CD10 expression in stromal cells of the nodules. IHC, $\times 100$

Обсуждение

Полостные образования в легких при КТВР делят на кисты, буллы и соты. Соты имеют толщину стенки менее 2 мм среди неизменной ткани легких; толщина стенки у булл – менее 1 мм, а их диаметр больше 1 см, толщина стенок сот равняется 1–3 мм, диаметр колеблется от 3 до 10 мм [30]. Диффузные кистозные изменения легких возникают при ЛАМ, ЛЛКГ, синдроме Берта–Хогга–Дюбе, при лимфоцитарной интерстициальной пневмонии, обнаруживаемой при лейкозах и лимфомах, при первичных и метастатических злокачественных образованиях, при врожденной аденоматозной мальформации легких, реже при пневмоцистной и стафилококковой пневмонии, метастатическом эндометриозе [31–35]. Кистозные болезни легких чаще наблюдаются при орфанных заболеваниях, однако у многих из них кисты не являются облигатным симптомом [31]. При ЛАМ и ЛЛКГ образование кист в ткани легких – неотъемлемый рентгеноморфологический признак, играющий основную роль для правильной постановки диагноза [36]. ЛАМ и ЛЛКГ – наиболее частые кистозные болезни легких, имеющие яркую рентгеноморфологическую картину, но во многих случаях требуется дифференциальная диагностика с другими заболеваниями [34, 37].

ЛАМ, ЛЛКГ, опухоли легких, эндометриоз часто протекают бессимптомно, манифестируя спонтанными рецидивирующими пневмотораксами, имеют сходную клиническую картину, что затрудняет правильную диагностику этих заболеваний [5, 30, 31, 34].

Клиническими проявлениями ЛАМ являются одышка, кашель, кровохарканье, боли в грудной клетке, усиливающиеся при дыхании, появление рецидивирующего хилоторакса, которые часто совпадают с менструацией. При ЛАМ возможны три основных процесса, связанных с развитием кист: 1) расширение легочных ацинусов в результате обструкции терминальных бронхиол и поступления через них воздуха, 2) ишемия вследствие некроза стенок терминальных и респираторных бронхиол, 3) ремоделирование ткани легких под действием протеолитических ферментов [16, 38, 39]. Дополнительными признаками, указывающими на ЛАМ, являются ангиомиолипому почек и лимфангиолипому забрюшинной жировой клетчатки. Гистологический маркер дифференциального диагноза при ЛАМ – наличие кистозных полостей с гладкомышечными узелками в их стенках с положительной ИГХ реакцией с НМВ-45. Гладкомышечные пучки могут быть обнаружены при фиброзном гиперчувствительном пневмоните, обычной интерстициальной пневмонии, метастатической доброкачественной лейомиоме, эндометриальной стромальной саркоме при наличии веретенообразных клеток, однако при этих заболеваниях маркер НМВ-45 отрицательный [34].

Диагноз «легочный лангергансочелочный гистиоцитоз» устанавливают на основании клинических

проявлений в виде медленно нарастающей одышки, развития спонтанного пневмоторакса, несахарного диабета у молодых людей 20–40 лет с анамнезом активного курения с раннего возраста. Медиана выживаемости с момента постановки диагноза составляет 12,5–13 лет. При ЛЛКГ на КТВР выявляют узелки неправильной причудливой формы диаметром от 1 до 10 мм, как правило, сосредоточенные вокруг терминальных бронхиол. При КТВР кистозные полости появляются на более поздних стадиях заболевания, могут варьировать по толщине стенок от типичных тонкостенных кист до толстостенных полостей, обычно располагаются в верхних и средних долях. На более поздних стадиях ЛЛКГ во многих случаях число клеток Лангерганса может уменьшаться, а иногда они и вовсе отсутствуют. При этом наблюдается заметное расширение воздушного пространства с фиброзом межальвеолярных перегородок и звездчатыми бронхиолоцентрическими рубцами, также часто встречаются облитерированные ветви легочных артерий и вен, иногда с минерализацией эластики с сопутствующей гранулематозной реакцией, называемой эндогенным пневмокониозом [40]. Тем не менее в случае классической клинко-рентгенологической картины и при отсутствии сомнений в диагнозе морфологическая верификация не является облигатной [41]. Диагноз часто требует подтверждения путем последующего гистологического и иммуногистохимического (CD1a, CD 207) исследований криобиопсий и ВТС биопсии легкого. ЛЛКГ на стадии изолированных очаговых изменений легких необходимо дифференцировать с саркоидозом легких, диссеминированным туберкулезом, силикозом и другими пневмокониозами, метастатическим поражением легких.

Причинами развития кист при первичных и метастатических поражениях легких являются центральные некрозы, обструкция опухолью прилежащих бронхиол, деструкция межальвеолярных перегородок опухолевыми клетками и/или слизью (муцином), аутофагоцитоз опухолевых клеток, свойства самой опухоли [21, 24]. Кистозные полости при КТВР могут располагаться локально в отдельных сегментах и долях легких, иногда при наличии вокруг них участков «матового стекла» или консолидатов [35]. Кистозные полости возникают у 7% пациентов, средний возраст которых составляет 63,5 года. С учетом медленного роста таких опухолей течение благоприятное, поэтому лобэктомия или клиновидная резекция еще больше улучшают прогноз заболевания [21].

Похожие изменения при КТВР выявляют при эндометриозе. При этой патологии первыми признаками болезни могут быть рецидивирующей пневмоторакс и кровохарканье в период менструации [29]. Определение уровня ракового антигена СА-125 в сыворотке крови коррелирует с активностью заболевания и является маркером для оценки эффективности лечения и обнаружения рецидивов [42].

Заключение

Диффузные кистозные заболевания легких возникают в результате множества патофизиологически различных процессов. Наличие кист в легочной паренхиме создает уникальные физиологические и клинические последствия при респираторных заболеваниях. Многообразие причин возникновения кист в легких требует проведения многоплановой дифференциальной диагностики с учетом возраста пациентов, клинической картины, данных компьютерной томографии легких высокого разрешения, указывающих на локализацию процесса, характерных морфологических изменений и иммуногистохимических маркеров в биопсиях легких. Следует помнить, что кистозные болезни легких могут возникать при многих других заболеваниях, указанных в таблице настоящего исследования.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – А.Л. Черняев, М.В. Самсонова, А.В. Аверьянов.
Сбор и обработка материала – А.Л. Черняев, М.В. Самсонова, М.А. Макарова, К.Ю. Михайличенко.
Написание текста – А.Л. Черняев, М.В. Самсонова, А.В. Аверьянов.
Редактирование – М.В. Самсонова, А.В. Аверьянов, М.А. Макарова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – A.L. Chernyaev, M.V. Samsonova, A.V. Averyanov.
Collected the data and performed the analysis – A.L. Chernyaev, M.V. Samsonova, M.A. Makarova, K.Yu. Mikhaylichenko.
Wrote the paper – A.L. Chernyaev, M.V. Samsonova, A.V. Averyanov.
Edited the manuscript – M.V. Samsonova, A.V. Averyanov, M.A. Makarova.

Литература/References

1. *Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McLoud TC, Müller NL, Remy J.* Fleischner Society: Glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology.* 2008;246(3):697–722. DOI: 10.1148/radiol.2462070712.
2. *Kikuchi E, Kinoshita I, Yamazaki K, Itoh T, Shimizu T, Shimizu H et al.* Epithelioid sarcoma presenting as pulmonary cysts with cancer antigen 125 expression. *Respirology.* 2006;11(6):826–9. DOI: 10.1111/j.1440-1843.2006.00925.x.
3. *Ohdama S, Akagawa S, Matsubara O, Yoshizawa Y.* Primary diffuse alveolar septal amyloidosis with multiple cysts and calcification. *Eur Respir J.* 1996;9(7):1569–71. DOI: 10.1183/09031936.96.09071569.
4. *Colombat M, Caudroy S, Lagonotte E, Mal H, Danel C, Stern M et al.* Pathomechanisms of cyst formation in pulmonary light chain deposition disease. *Eur Respir J.* 2008;32(5):1399–403. DOI: 10.1183/09031936.00132007.
5. *Gupta N, Vassallo R, Wikenheiser-Brokamp KA, McCormack FX.* Diffuse cystic lung disease. Part I. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(12):1354–66. DOI: 10.1164/rccm.201411-2094CI.
6. *Favara BE, Feller AC, Pauli M, Jaffe ES, Weiss LM, Arico M et al.* Contemporary classification of histiocytic disorders. The WHO Committee on Histiocytic/Reticulum Cell Proliferations. Reclassification Working Group of the Histiocyte Society. *Med Pediatr Oncol.* 1997;29(3):157–66. DOI: 10.1002/(sici)1096-911x(199709)29:3<157::aid-mpo1>3.0.co;2-c.
7. *Gaensler EA, Carrington CB.* Open biopsy for chronic diffuse infiltrative lung disease: Clinical, roentgenographic, and physiological correlations in 502 patients. *Ann Thorac Surg.* 1980;30(5):411–26. DOI: 10.1016/s0003-4975(10)61291-x.
8. *Tazi A, Soler P, Hance AJ.* Adult pulmonary Langerhans' cell histiocytosis. *Thorax.* 2000;55(5):405–16. DOI: 10.1136/thorax.55.5.405.
9. *Delobbe A, Durieu J, Duhamel A, Wallaert B.* Determinants of survival in pulmonary Langerhans' cell granulomatosis (histiocytosis X). *Eur Respir J.* 1996;9(10):2002–6. DOI: 10.1183/09031936.96.09102002.
10. *Travis WD, Borok Z, Roum JH, Zhang J, Feuerstein I, Ferrans VJ et al.* Pulmonary Langerhans cell granulomatosis (histiocytosis X). A clinicopathologic study of 48 cases. *Am J Surg Pathol.* 1993;17(10):971–86. DOI: 10.1097/0000478-199310000-00002.
11. *Langerhans P.* Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat.* 1868;44:325–37. DOI: 10.1007/BF01959006.
12. *Birbeck MS, Breathnach AD, Everall JD.* An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol.* 1961;37(1):51–64. DOI: 10.1038/jid.1961.80.
13. *Samuel P, Hammar SP, Allen TC.* Histiocytosis and storage diseases. In: JF Tomashefski Jr, PT Cagle, CF Farver, AE Fraire (eds.). *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology.* 3rd ed. V. 1. Springer: Verlag New York. 2008. P. 600–650. DOI: 10.1007/978-0-387-68792-6.
14. *Vermaelen K, Pauwels R.* Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(5):530–51. DOI: 10.1164/rccm.200410-1384SO.
15. *Moss J, Avila NA, Barnes PM, Litzenberger RA, Bechtel J, Brooks PG et al.* Prevalence and clinical characteristics of lymphangioleiomyomatosis (LAM) in patients with tuberous sclerosis complex. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(4):669–71. DOI: 10.1164/ajrccm.164.4.2101154.
16. *Johnson SR, Cordier JF, Lazor R, Cottin V, Costabel U, Harari S et al.* European Respiratory Society guidelines for the diagnosis and management of lymphangioleiomyomatosis. *Eur Respir J.* 2010;35(1):14–26. DOI: 10.1183/09031936.00076209.
17. *Sullivan EJ.* Lymphangioleiomyomatosis: A review. *Chest.* 1998;114(6):1689–703. DOI: 10.1378/chest.114.6.1689.
18. *Matsumoto Y, Horiba K, Usuki J, Chu SC, Ferrans VJ, Moss J.* Markers of cell proliferation and expression of melanosomal antigen in lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;21(3):327–36. DOI: 10.1165/ajrcmb.21.3.3693.
19. *Song DH, Choi IH, Ha SY, Han KM, Lee JJ, Hong ME et al.* Extrapulmonary lymphangioleiomyoma: Clinicopathological analysis of 4 cases. *Korean J Pathol.* 2014;48(3):188–92. DOI: 10.4132/KoreanJPathol.2014.48.3.188.
20. *Sandhu JS, Goodman PC.* Pulmonary cysts associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *Radiology.* 1989;173(1):33–5. DOI: 10.1148/radiology.173.1.2789413.
21. *Yoshida T, Harada T, Fuke S, Konishi J, Yamazaki K, Kaji M et al.* Lung adenocarcinoma presenting with enlarged and

- multiloculated cystic lesions over 2 years. *Respir Care*. 2004;49(12):1522–4. PMID: 15571644.
22. Ohba S, Takashima T, Hamada S, Kitagawa M. Multiple cystic cavitory alveolar-cell carcinoma. *Radiology*. 1972;104(1):65–6. DOI: 10.1148/104.1.65.
 23. Adams DO. The granulomatous inflammatory response: A review. *Am J Pathol*. 1976;84(1):164–91. PMID: 937513.
 24. Imai S, Sekigawa S, Yamamoto H, Tsubura Y, Miyanaga M, Narita N et al. Bronchioloalveolar adenocarcinoma with multiple cysts. *Acta Pathol Jpn*. 1982;32(4):677–82. DOI: 0.1111/j.1440-1827.1982.tb02069.x.
 25. Адамян Л.В., Кулаков В.И., Андреева Е.Н. Эндометриозы: Руководство для врачей. 2-е изд. Москва: Медицина, 2006. 416 с.
Adamyun LV, Kulakov VI, Andreeva EN. Endometriosis: A manual for physicians. 2nd ed. Moscow: Medicine, 2006. 416 p. (In Russ.).
 26. Цвелев Ю.В., Абашиш В.Г., Шмидт А.А. Эндометриоз: современные взгляды на этиологию, терминологию. Вестник Российской военно-медицинской академии. 2007;4(20):42–47. Tsvelyov YuV, Abashin VG, Shmidt AA. Endometriosis: current judgments upon etiology, terminology and classification. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2007;4(20):42–47 (In Russ.).
 27. Alifano M, Trisolini R, Cancellieri A, Regnard JF. Thoracic endometriosis: Current knowledge. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(2):761–9. DOI: 10.1016/j.athoracsur.2005.07.044.
 28. Agarwal N, Subramanian A. Endometriosis – morphology, clinical presentations and molecular pathology. *J Lab Physicians*. 2010;2(1):1–9. DOI: 10.4103/0974-2727.66699.
 29. Двораковская И.В., Печенникова В.А., Ариэль Б.М., Платонова И.С., Новикова Л.Н., Оржеешковский О.В. и др. Легочный эндометриоз как одна из форм эндометриозной болезни. Пульмонология. 2016;26(4):459–465. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-459-465.
Dvorakovskaya IV, Pechennikova VA, Ariel BM, Platonova IS, Novikova LN, Orzheshkovskiy OV et al. Pulmonary endometriosis as a form of endometrial disease. *Pulmonologiya (Russian Pulmonology)*. 2016;26(4):459–465. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-4-459-465.
 30. Raoof S, Bondalapati P, Vidyula R, Ryu JH, Gupta N, Raoof S et al. Cystic lung diseases algorithmic approach. *Chest*. 2016;150(4):945–65. DOI: 10.1016/j.chest.2016.04.026.
 31. Bush A. Rare lung diseases: Congenital malformations. *Indian J Pediatr*. 2015;82(9):833–40. DOI: 10.1007/s12098-015-1800-9.
 32. Giordani MT, Tamarozzi F, Kaminstein D, Brunetti E, Heller T. Point-of-care lung ultrasound for diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia: Notes from the field. *Crit Ultrasound J*. 2018;10(1):8. DOI: 10.1186/s13089-018-0089-0.
 33. Chen A, Karwoski RA, Gierada DS, Bartholmai BJ, Koo CW. Quantitative CT analysis of diffuse lung disease. *Radiographics*. 2020;40(1):28–43. DOI: 10.1148/rg.2020190099.
 34. Obaidat B, Yazdani D, Wikenheiser-Brokamp KA, Gupta N. Diffuse cystic lung diseases. *Respir Care*. 2020;65(1):111–26. DOI: 10.4187/respcare.07117.
 35. Todhe P, Sharma N, Shetty A, Ochieng P. Pulmonary mucinous cystadenocarcinoma: An unusual presentation and literature review. *BMJ Case Rep*. 2020;13(7):e235567. DOI: 10.1136/bcr-2020-235567.
 36. Clarke BE. Cystic lung disease. *J Clin Pathol*. 2013;66(10):904–8. DOI: 10.1136/jclinpath-2012-201297.
 37. Gupta N, Finlay GA, Kotloff RM, Strange C, Wilson KC, Young LR et al. Lymphangioliomyomatosis diagnosis and management: High-resolution chest computed tomography, transbronchial lung biopsy, and pleural disease management. An Official American Thoracic Society/Japanese Respiratory Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;196(10):1337–48. DOI: 10.1164/rccm.201709-1965ST.
 38. Abbott GF, Rosado-de-Christenson ML, Frazier AA, Franks TJ, Pugatch RD, Galvin JR. From the archives of the AFIP: Lymphangioliomyomatosis: Radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2005;25(3):803–28. DOI: 10.1148/rg.253055006.
 39. Harari S, Torre O, Cassandro R, Taveira-DaSilva AM, Moss J. Bronchoscopic diagnosis of Langerhans cell histiocytosis and lymphangioliomyomatosis. *Respir Med*. 2012;106(9):1286–92. DOI: 10.1016/j.rmed.2012.06.012.
 40. Jones KD. Pulmonary cystic disease and its mimics. *Surg Pathol Clin*. 2020;13(1):141–63. DOI: 10.1016/j.path.2019.11.007.
 41. Suri HS, Yi ES, Nowakowski GS, Vassallo R. Pulmonary langerhans cell histiocytosis. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7:16. DOI: 10.1186/1750-1172-7-16.
 42. Двораковская И.В., Ариэль Б.М. Эндометриоз легких. В кн.: М.М. Илькович (ред.). Диффузные паренхиматозные заболевания легких. Москва: ГЕОТАР-Медиа, 2021. С. 404–411. DOI: 10.33.029/9704-5908-9-DPL-2021.
Dvorakovskaya IV, Ariel BM. Lung endometriosis. In: MM Ilkovich (ed.). Diffuse parenchymatous lung diseases. Moscow: GEOTAR-Media, 2021. P. 440–411. DOI: 10.33.029/9704-5908-9-DPL-2021.

Информация об авторах

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

Мария Викторовна Самсонова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией патологической анатомии НИИ пульмонологии ФМБА России, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии МКНЦ им. А.С. Логинова.

Александр Вячеславович Аверьянов – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела фундаментальной пульмонологии НИИ пульмонологии ФМБА России.

Марина Алексеевна Макарова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры госпитальной терапии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

Кирилл Юрьевич Михайличенко – научный сотрудник лаборатории патологической анатомии НИИ пульмонологии ФМБА России.

Author information

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

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

Alexsandr V. Averyanov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Fundamental Pulmonology Department, Research Institute of Pulmonology.

<https://orcid.org/0000-0003-1031-6933>

Marina A. Makarova – Cand. Sci. (Med), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, Pediatric Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University.

<https://orcid.org/0000-0003-4913-087X>

Kirill Yu. Mikhaylichenko – Researcher, Pathology Department, Research Institute of Pulmonology.

<https://orcid.org/0000-0002-9795-7022>

Клинико-морфологическая неоднородность рака желудка диффузного типа

К.Ю. Мидибер^{1,2,3}, А.Е. Бiryukov^{1,2}, В.В. Печникова^{1,2}, Н.А. Грачева²,
Н.К. Шахпазян², З.В. Гиоева⁴, Л.М. Михалева^{1,2}

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Москва, Россия

² ГБУЗ Городская клиническая больница № 31 Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, Владикавказ, Россия

Введение. Несмотря на возможности диагностики и лечения пациентов онкологического профиля, рак желудка занимает 5-е место по распространенности в мире среди всех онкологических заболеваний. Рак желудка диффузного типа чаще встречается у молодых пациентов и, как правило, имеет более агрессивное течение по сравнению с интестинальным типом. Современные представления об этиопатогенезе и молекулярно-генетической структуре опухоли позволяют по-новому взглянуть на рак желудка диффузного типа в свете пересмотренных классификаций, рекомендаций, а также подходов к интерпретации данных патоморфологического исследования. Цель работы – провести многофакторный анализ пациентов с раком желудка диффузного типа.

Материалы и методы. В исследование вошли 124 пациента с раком желудка диффузного типа. Изучены истории болезни, протоколы эндоскопических и хирургических операций, проведен анализ половых и возрастных групп и первичной локализации опухолевого процесса. Из 124 пациентов была сформирована группа, состоящая из 25 наблюдений, в которой проведен обширный ряд диагностических мероприятий с использованием гистологического, гистохимического, иммуногистохимического, молекулярно-генетического методов и ПЦР диагностики.

Результаты. В общей группе из 124 пациентов средний возраст мужчин составил 67,5 года ($\pm 12,4$), а женщин 71 год ($\pm 15,41$). Злокачественная опухоль встречалась чаще в дистальных отделах желудка. В группе из 25 пациентов *Helicobacter pylori* была обнаружена только в двух наблюдениях. Вирус Эпштейна–Барр выявлен у 11 пациентов из 25 методом ПЦР в режиме реального времени. Исследование иммунофенотипа рака желудка диффузного типа с применением широкой панели антител продемонстрировало неоднородность экспрессии при оценке в обоих компонентах злокачественной опухоли. Обращает на себя внимание экспрессия маркеров СК7, Muc1, Muc2, Muc 5AC у пациентов с молекулярно-генетическим подтипом, обусловленным микросателлитной нестабильностью.

Заключение. Иммунофенотипическая неоднородность рака желудка диффузного типа требует дальнейшего изучения. Необходимо создание единого протокола патологоанатомического исследования, включающего в себя молекулярно-генетическое и иммуногистохимическое исследования, что является основой для назначения современного лечения пациентов данного профиля.

Ключевые слова: рак желудка, онкоморфология, иммуногистохимия, молекулярная генетика

Для корреспонденции: Константин Юрьевич Мидибер. E-mail: midiberkonst@gmail.com

Для цитирования: Мидибер К.Ю., Бiryukov А.Е., Печникова В.В., Грачева Н.А., Шахпазян Н.К., Гиоева З.В., Михалева Л.М. Клинико-морфологическая неоднородность рака желудка диффузного типа. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):34–41. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.34-41.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына (№ АААА-А19-119021590053-6).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 30.08.2021. Получена после рецензирования 10.09.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Clinical and morphological heterogeneity of diffuse gastric cancer

К. Yu. Midiber^{1,2,3}, A. E. Biryukov^{1,2}, V. V. Pechnikova^{1,2}, N. A. Gracheva²,
N. K. Shakhpazyan², Z. V. Gioeva⁴, L. M. Mikhaleva^{1,2}

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² City Clinical Hospital No. 31 of the Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia, Medical Institute, Moscow, Russia

⁴ North Ossetian State Medical Academy of the Ministry of Health of Russia, Vladikavkaz, Russia

Introduction. Despite various diagnostic testing and treatment options, stomach cancer ranks 5th in terms of global morbidity among all cancers. Diffuse gastric cancer occurs more frequently in younger patients and

has a more aggressive course than the intestinal type. Modern ideas about the etiology, pathogenesis, and molecular structure of a tumor allow us to take a new look at diffuse gastric cancer in the light of revised classifications, recommendations, as well as approaches to the interpretation of morphological research data. Therefore, the study aimed to conduct a multifactorial analysis of patients with diffuse gastric cancer.

Materials and methods. The study included 124 patients with diffuse gastric cancer. Clinical data (medical histories, protocols of endoscopic and surgical operations, sex, and age groups) and the primary tumor localization were analyzed. We formed a group of 25 observations out of 124 patients. In the group, we carried out a range of diagnostic measures: histological, histochemical, immunohistochemical, and molecular assays, as well as PCR testing.

Results. In the group of 124 patients, the age of men averaged 67.5 (± 12.4) years and that of women, 71 (± 15.41) years. The malignant tumors were more frequently detected in distal parts of the stomach. In the group of 25 patients, *Helicobacter pylori* were present only in 2 cases. We detected the Epstein-Barr virus in 11 patients out of 25 using real-time PCR method. A study of the immunophenotype of diffuse gastric cancer using a wide panel of antibodies demonstrated heterogeneity of expression in both components of a malignant tumor. The expression of CK7, Muc1, Muc2, and Muc5AC markers in patients with a microsatellite unstable molecular subtype was noteworthy.

Conclusion. The immunophenotypic heterogeneity of diffuse gastric cancer requires further research. It is necessary to create a standardized pathology evaluation protocol, including molecular and immunohistochemical tests that is the basis for modern management of cancer patients with diffuse gastric cancer.

Keywords: gastric cancer, surgical pathology, immunohistochemistry, molecular genetics

Corresponding author: Konstantin Yu. Midiber. E-mail: midiberkonst@gmail.com

For citation: Midiber K.Yu., Biryukov A.E., Pechnikova V.V., Gracheva N.A., Shakhpazyan N.K., Gioeva Z.V., Mikhaleva L.M. Clinical and morphological heterogeneity of diffuse gastric cancer. Clin. exp. morphology. 2021;10(S4):34–41. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.34-41 (In Russ.).

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

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology (No. AAAA-A19-119021590053-6).

Received 30.08.2021. **Received in revised form** 10.09.2021 **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Рак желудка (РЖ) продолжает занимать лидирующие позиции в структуре онкологической заболеваемости и смертности как в Российской Федерации [1], так и в мире [2, 3].

Существует множество различных систем классификации рака желудка [4], однако повсеместное распространение получили классификации Lauren и The World Health Organization (WHO). Классификация Lauren в классическом виде разделяет РЖ на интестинальный, диффузный и смешанный типы [5]. Известно, что около 15–20% карцином в соответствии с классификацией Lauren не может быть отнесено ни к одной из групп, в то время как классификация WHO располагает широким спектром морфологических типов [6], что объясняет необходимость использования двух классификаций одновременно [7]. Рак желудка диффузного типа (РЖДТ) согласно классификации Lauren обозначается как карцинома желудка из плохо сцепленных клеток в соответствии с классификацией WHO [8].

Частым морфологическим компонентом РЖДТ являются перстневидные клетки, и для стандартизированного подхода к их оценке существует мнение, высказанное многопрофильной группой экспертов, принадлежащих к европейскому отделению Международной ассоциации рака желудка (European Chapter of International Gastric Cancer Association, IGCA) [9].

Таким образом, исходя из процентного содержания перстневидно-клеточного компонента в структуре опухоли, было предложено разделение на три группы: SCR 1 (SRC – signet ring cell) (>90% в составе опухоли), SCR 2 (<90%, но более 10% в составе опухоли) и SCR 3 (менее 10% в составе опухоли). Данный подход позволяет провести четкую дифференцировку в рамках гистологических форм, обозначенных в классификации WHO. Так, SCR 1 следует трактовать как перстневидно-клеточный подтип, SCR 2 – как комбинированную карциному из плохо сцепленных клеток с перстневидно-клеточной карциномой, а SCR 3 – как карциному из плохо сцепленных клеток неспецифического подтипа.

По данным литературы, РЖДТ может быть наследственным (обусловленным мутацией гена *CDH1*) и спорадическим [10, 11]. По поводу последнего до настоящего времени не существует единого мнения в отношении главенствующего этиологического фактора.

Кроме того, остается нерешенным вопрос, связанный как с патоморфологическим диагностическим подходом, так и с выбором адекватной тактики лечения.

Целью настоящего исследования является многофакторная характеристика пациентов с раком желудка диффузного типа, включающая этиологические, клинико-морфологические, иммунофенотипические и молекулярно-генетические особенности опухоли.

Материалы и методы

В исследование включены 124 пациента с РЖДТ, проходившие обследование в ГКБ № 31 Департамента здравоохранения города Москвы с 2018 по 2021 год, которым были выполнены гастробиопсия или оперативное вмешательство в объеме резекции желудка/гастрэктомии. Критерии включения пациентов: диагностированный РЖДТ на светооптическом уровне при рутинной окраске гематоксилином и эозином с дополнительной ШИК реакцией в сочетании с альциановым синим. Обязательным являлось изучение истории болезни, протоколов эндоскопических и хирургических операций с анализом половых и возрастных групп, а также первичной локализации опухолевого процесса. Далее отобрана группа из 25 пациентов, к которым был применен необходимый диагностический объем исследований. Оценка процентного содержания перстневидно-клеточного компонента опухоли с градацией полученных данных проводилась по системе IGCA. Для определения этиологического фактора проведены гистохимическая окраска по Романовскому–Гимзе и иммуногистохимическое исследование с кроличьими поликлональными антителами к *Helicobacter pylori* (Cell Marque, США) с целью сравнительной оценки возможности определения данного возбудителя двумя методами. Кроме того, выполнена ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно меченых олигонуклеотидных зондов для детекции продуктов амплификации ДНК вируса Эпштейна–Барр (EBV), цитомегаловируса (CMV) и вируса герпеса 6-го типа (HHV6) («АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6-скрин-FL», ЦНИИ эпидемиологии, Россия). Количественный анализ проводился путем сравнения данных амплификации ДНК исследуемых образцов с контрольными с известной концентрацией фрагментов ДНК EBV/CMV/HHV6. ПЦР проводилась с помощью термоциклера C1000 с оптическим модулем CFX96 (Bio-Rad, США), обработка данных ПЦР – с помощью программного обеспечения CFX Manager v.3.1 (Bio-Rad, США).

Проведено иммуногистохимическое исследование с панелью антител к E-cadherin (VENTANA anti-E-cadherin Mouse Monoclonal Primary Antibody), CK7 (Leica Biosystems BOND™ Ready-to-Use Primary Antibody Cytokeratin 7 (RN7), CK20 (VENTANA CONFIRM™ anti-Cytokeratin 20 (SP33) Rabbit Monoclonal Primary Antibody), CDX2 (VENTANA BenchMark™, Rabbit Monoclonal Primary Antibody), Hepatoc (VENTANA BenchMark™ HAS (OCH1E5), Muc1 (VENTANA MRQ-17), Muc2 (VENTANA MRQ-18), Muc5AC (VENTANA MRQ-19), определены HER2 (VENTANA anti-HER2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal Primary Antibody) и PD-L1 (VENTANA PD-L1 (SP263) Assay) статусы опухоли. Для оценки PD-L1 статуса использовалась система Combined Positive Score (CPS) с пороговым значением 1%. Определение молекулярно-генетической подгруппы

с целью выявления подтипа, обусловленного микросателлитной нестабильностью (MSI), проведено с использованием антител (VENTANA Primary mouse monoclonal antibodies anti-MSH2 (G219-1129); Primary mouse monoclonal antibodies anti-MLH-1 (M1); Primary mouse monoclonal antibodies anti-PMS-2 (MRQ-28); Primary rabbit monoclonal antibodies anti-MSH6 (SP93) и EBV-ассоциированных карцином желудка (Epstein-Barr Virus (CS1-4) Mouse Monoclonal Antibody).

Результаты исследования

В ходе проведенного исследования установлено, что из 124 обследованных пациентов мужчин было 61, а женщин – 63. Возраст мужчин варьировал от 29 до 88 лет ($67,5 \pm 12,4$ года), женщин – от 39 до 96 лет ($71,03 \pm 15,41$ года). По данным протоколов эндоскопического исследования первичная локализация опухолевого процесса у мужчин была выявлена в кардиальном отделе желудка у пяти пациентов (8%), в теле – у 20 (33%), в антральном отделе – у 10 (16,5%), а в области привратника – в четырех наблюдениях (6,5%) (рис. 1). Одновременное поражение двух локализаций – кардиального отдела и дна желудка – наблюдалось у двух пациентов (3%), а тела и антрального отдела – у трех (5%). Поражение двух и более локализаций выявлено у 17 пациентов (28%) с РЖДТ (рис. 1).

У женщин опухолевый процесс был выявлен в кардиальном отделе желудка у трех пациенток (5%), в теле – у 30 (47,5%), в антральном отделе – у восьми (13%) и в области привратника – в четырех наблюдениях (6,5%) (рис. 2). Одновременное поражение двух локализаций – кардиального отдела и дна желудка – выявлено у трех пациенток (5%), тела и антрального отдела – у четырех (6%). Поражение двух и более локализаций отмечено у 11 пациенток (17%) с РЖДТ (рис. 2).

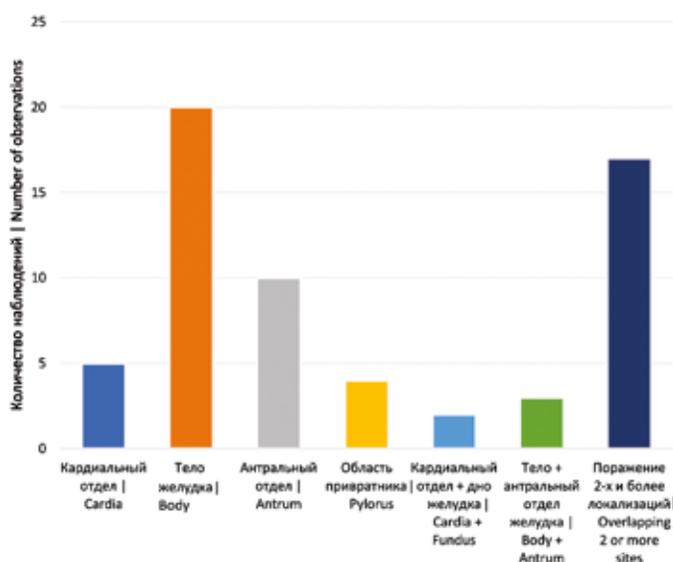


Рис. 1. Первичная локализация опухолевого процесса у мужчин
Fig. 1. Primary tumor localization in male patients

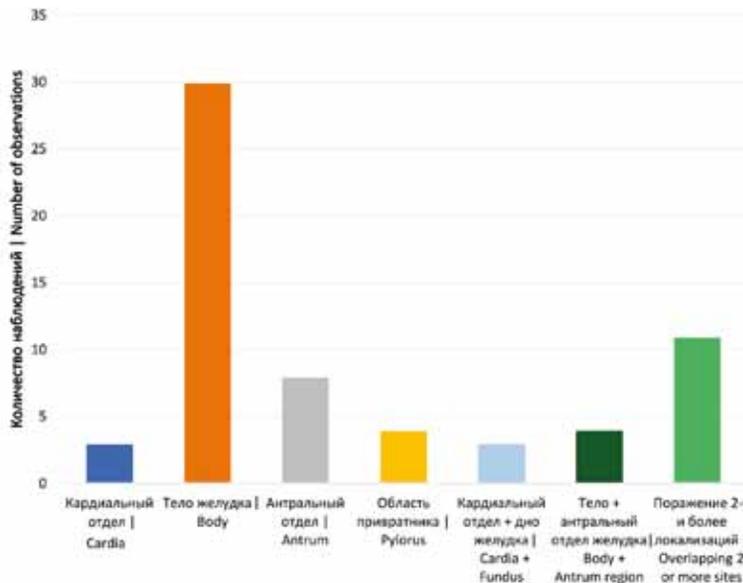


Рис. 2. Первичная локализация опухолевого процесса у женщин
Fig. 2. Primary tumor localization in female patients

Следующим этапом нашего исследования стало проведение анализа процентного содержания перстневидно-клеточного компонента опухоли, где 25 обследованных пациентов были оценены на наличие критериев согласно рекомендациям экспертов Международной ассоциации рака желудка [9]. Так, большую часть наблюдений – 23 случая (92%) отнесли к группе SRC 2, а оставшиеся два (8%) – к SRC 3. В нашем материале случаи, подходящие под критерии группы SCR 1, не обнаружены.

Анализ на *H. pylori* показал, что два использованных метода в нашем исследовании продемонстрировали однотипный результат – *H. pylori* была выявлена у 8% обследованных пациентов.

При анализе результатов иммуногистохимического исследования в данной группе выявлена положительная экспрессия E-cadherin у 21 пациента (84%) в обоих компонентах опухоли, из них у 19 (90,5%) – диффузный характер реакции, у двух (9,5%) экспрессия носила очаговый характер (табл.).

Положительная реакция с антителом к СК7 определена в 18 случаях (72%). При этом в 11 наблюдениях (61%) выявлена диффузная равномерная реакция в обоих компонентах опухоли, в пяти (28%) экспрессия носила очаговый характер только вне перстневидно-клеточного компонента РЖДТ, а в двух (11%) – внутри него.

Положительная экспрессия СК20 отмечалась в 11 наблюдениях (44%), при этом в восьми из них (73%) была равномерная диффузная реакция в обоих компонентах опухоли. В оставшихся трех случаях (27%) определена мозаичная реакция: в одном наблюдении отмечена положительная диффузная экспрессия внутри перстневидно-клеточного компонента при очаговой реакции в другом компоненте, во втором – положительная диффузная экспрессия СК20 в перстневидно-кле-

точном компоненте при отсутствии реакции в другом компоненте, в третьем – негативная реакция в перстневидно-клеточном компоненте при очаговой положительной экспрессии в другом компоненте злокачественной опухоли желудка.

При ИГХ исследовании с антителом к CDX2 чуть больше чем в половине наблюдений определена положительная экспрессия – в 13 из 25 случаев (52%). При этом в 12 случаях (92%) выявлена равномерная диффузная реакция в обоих компонентах опухоли и лишь в одном (8%) – негативная реакция в перстневидно-клеточном компоненте при очаговой положительной экспрессии в другом компоненте злокачественной опухоли желудка.

Положительная реакция с антителом к Hepatoc определена у 14 пациентов (56%), из них у 12 (86%) отмечена диффузная равномерная, а у двух (14%) – очаговая экспрессия в обоих компонентах опухоли.

При ИГХ исследовании экспрессии муцинов (Muc1, Muc2, Muc5AC) получены следующие результаты: положительная экспрессия Muc1 выявлена в 18 наблюдениях (72%), при этом в 16 (89%) отмечена экспрессия в обоих компонентах опухоли, в трех из них (17%) очаговая, а в двух других случаях (11%) диффузная положительная экспрессия определялась только в перстневидно-клеточном компоненте.

Экспрессия Muc2 была обнаружена лишь у пяти пациентов (20%), в четырех наблюдениях (80%) она носила очаговый характер в обоих опухолевых компонентах, а в одном (20%) локализовалась очагово только в перстневидно-клеточном компоненте.

Экспрессия Muc5AC была положительной у 15 пациентов (60%), в 10 наблюдениях (67%) имела диффузный равномерный характер в обоих компонентах опухоли, в четырех (26,5%) отмечался очаговый характер экспрессии только вне перстневидно-клеточного компонента, а в одном случае (6,5%) внутри него (табл.).

В соответствии с дизайном нашего исследования был определен HER2 статус опухоли: у одного пациента (4%) выявлен положительный, у одного (4%) – неопределенный HER2 статус, у остальных (92%) – отрицательный HER2 статус.

С целью выявления чувствительности опухолевых клеток к воздействию препаратов для таргетной иммунотерапии был исследован PD-L1 статус опухоли. Положительный результат получен у четырех пациентов (16%), при этом в двух наблюдениях CPS составил >1, но <10, в одном случае >10, но <20 и еще у одного пациента показатель CPS был равен 100.

Выявление микросателлитной нестабильности в опухоли с целью определения молекулярного подтипа злокачественной опухоли желудка проводили с помощью ИГХ исследования, в ходе которого у двух пациентов из 25 (8%) была подтверждена MSI. При этом

Характер положительной экспрессии ИГХ маркеров в общей группе (n=25) в различных компонентах рака желудка диффузного типа (РЖДТ) | Types of positive expression of immunohistochemical markers in the group (n=25) in various components of diffuse gastric cancer

Название ИГХ маркера Name of IHC marker	Равномерная экспрессия между компонентами опухоли Even expression within tumor components	Экспрессия вне перстневидно-клеточного компонента Expression on the outside of signet-ring cell component	Экспрессия в перстневидно-клеточном компоненте Expression in signet-ring cell component	Всего пациентов с положительной реакцией (% от n) Total number of patients with positive reaction (% from n)
E-cadherin	Диффузный характер – 19 (90,5%) Diffuse – 19 (90,5%)	–	–	21 (84%)
	Очаговый характер – 2 (9,5%) Local – 2 (9,5%)	–	–	
CK7	Диффузный характер – 11 (61%) Diffuse – 11 (61%)	Диффузный характер – 0 Diffuse – 0	Диффузный характер – 2 (11%) Diffuse – 2 (11%)	18 (72%)
	Очаговый характер – 0 Local – 0	Очаговый характер – 5 (28%) Local – 5 (28%)	Очаговый характер – 0 Local – 0	
CK20	Диффузный характер – 8 (73%) Diffuse – 8 (73%)	Диффузный характер – 0 Diffuse – 0	Диффузный характер – 2 (18%) Diffuse – 2 (18%)	11 (44%)
	Очаговый характер – 0 Local – 0	Очаговый характер – 1 (9%) Local – 1 (9%)	Очаговый характер – 0 Local – 0	
CDX2	Диффузный характер – 12 (92%) Diffuse – 12 (92%)	Диффузный характер – 0 Diffuse – 0	–	13 (52%)
	Очаговый характер – 0 Local – 0	Очаговый характер – 1 (8%) Local – 1 (8%)	–	
Hepatic	Диффузный характер – 12 (86%) Diffuse – 12 (86%)	–	–	14 (56%)
	Очаговый характер – 2 (14%) Local – 2 (14%)	–	–	
MUC1	Диффузный характер – 13 (72%) Diffuse – 13 (72%)	–	Диффузный характер – 2 (11%) Diffuse – 2 (11%)	18 (72%)
	Очаговый характер – 3 (17%) Local – 3 (17%)	–	Очаговый характер – 0 Local – 0	
MUC2	Диффузный характер – 0 Diffuse – 0	–	Диффузный характер – 0 Diffuse – 0	5 (20%)
	Очаговый характер – 4 (80%) Local – 4 (80%)	–	Очаговый характер – 1 (20%) Local – 1 (20%)	
Muc5AC	Диффузный характер – 10 (67%) Diffuse – 10 (67%)	Диффузный характер – 0 Diffuse – 0	Диффузный характер – 1 (6,5%) Diffuse – 1 (6,5%)	15 (60%)
	Очаговый характер – 0 Local – 0	Очаговый характер – 4 (26,5%) Local – 4 (26,5%)	Очаговый характер – 0 Local – 0	

ИГХ – иммуногистохимический | ИHC – immunohistochemical

у одного из них выявлен высокий уровень микросателлитной нестабильности – MSI-High (MSI-H), а у другого низкий – MSI-Low (MSI-L) с мутацией гена *MSH6*.

В рамках определения одного из возможных этиологических факторов развития РЖДТ мы выявляли наличие следующих вирусов: EBV, CMV, HHV6. С целью сравнения возможности качественного и количественного определения наличия EBV исследование прово-

дили параллельно двумя методами: ИГХ и ПЦР. При иммуногистохимическом исследовании с антителами к EBV мы не обнаружили положительной экспрессии, подтверждающей наличие вируса Эпштейна–Барр в данной группе. При проведении ПЦР у тех же пациентов положительный результат на наличие EBV был выявлен у 11 (44%). Наряду с EBV при ПЦР выявлены фрагменты ДНК к CMV у четырех пациентов (16%) и к HHV6 в двух наблюдениях (8%). Так, сочетание EBV/

CMV было выявлено у трех пациентов, EBV/HHV6 – у одного, CMV/HHV6 – у одного.

Обсуждение

По последним данным мировой научной литературы, большинство авторов сходятся во мнении, что раком желудка кишечного типа чаще страдают мужчины, в то время как диффузный тип встречается у мужчин и женщин с равной частотой [12]. Это утверждение объясняется тем, что в карциномах кишечного типа немаловажную роль играют такие факторы риска как табакокурение, потребление алкоголя и поступление в организм пищевых канцерогенов, что все-таки чаще встречается у мужчин. С другой стороны, генетические факторы считаются более значимыми у женщин, однако ни одна из этих гипотез, объясняющих гендерные различия, не подтвердилась [7, 13]. По результатам нашего исследования, средний возраст среди мужчин составил 67,5 года ($\pm 12,4$), а самому молодому пациенту было 29 лет, в то время как средний возраст среди женщин составил 71 год ($\pm 15,41$), самой молодой пациентке было 39 лет, разница между группами – 3,5 года.

В крупном исследовании связи гистологических форм карциномы желудка с их локализацией получены данные, что рак желудка кишечного типа чаще локализуется в дистальных отделах, в то время как диффузный тип – в проксимальных [14]. В своем исследовании мы не ставили целью оценить корреляцию разных гистологических типов с локализацией поражений, однако при оценке эндоскопических протоколов исследования в дистальных отделах (антральная часть и привратник) опухоль встречалась чаще, чем в проксимальных (кардиальный отдел и дно желудка).

Этиопатогенез рака желудка диффузного типа все еще остается недостаточно изученным, существует множество теорий, но однозначного мнения по этому вопросу нет. *H. pylori* как один из возможных этиологических факторов по сей день является предметом дискуссий, что может значительно расширить наши представления о новых возможных путях канцерогенеза. Так, по данным литературы, имеется мнение, что существует взаимосвязь между возможной канцерогенной микробиотой желудка и наличием *H. pylori*. Вызывая язвенную болезнь и поддерживая высокую кислотность желудка, наличие *H. pylori*, вероятно, позволяет избежать заражения желудка другой канцерогенной кишечной микробиотой, это подтверждается тем фактом, что пациенты с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки имеют более низкий риск развития карциномы желудка кишечного типа, чем в популяции в целом [15]. Эрадикация *H. pylori* может способствовать размножению определенных бактерий, которые, вероятно, играют роль в канцерогенезе при РЖДТ [12, 16, 17]. В нашей работе, с использованием гистохимического и иммуногистохимического методов, *H. pylori* была обнаружена у двух пациентов из 25. Данные о ранее проведенной эрадикации *H. pylori* не оценивались.

В последние годы в отечественной и зарубежной научной литературе практически не было новых сведений об исследовании иммунофенотипа РЖДТ с применением широких панелей антител. Проведя сравнение с результатами имеющихся работ [18–20], мы не нашли каких-либо значимых различий с собственными результатами.

Согласно исследованию проекта The Cancer Genome Atlas (TCGA), рак желудка разделен на четыре молекулярно-генетических подтипа [21]. Несмотря на тот факт, что РЖДТ является генетически стабильным подтипом, в своем исследовании мы сделали акцент на EBV-ассоциированном раке желудка и подтипе, обусловленном микросателлитной нестабильностью (MSI). Известно, что EBV-ассоциированный рак желудка составляет 9%, а подтип, обусловленный MSI, – 22% в структуре всех карцином желудка. Тем не менее многие научные статьи указывают на обнаружение MSI в РЖДТ. В своем исследовании мы наблюдали MSI РЖДТ всего у двух пациентов из 25, причем у одного из них был MSI-H, у второго – MSI-L с мутацией гена *MSH6*. Мы обнаружили, что оба эти наблюдения также объединялись следующими параметрами: в обоих случаях возраст пациентов был больше 75 лет, имелась отличительная особенность муцинового профиля: очаговая экспрессия MUC1 наблюдалась преимущественно в перстневидноклеточном компоненте, MUC2 положительные клетки располагались преимущественно в перстневидно-клеточном компоненте, при этом отмечалось отсутствие окрашивания к MUC5AC. При этом экспрессия CK7 определялась в перстневидно-клеточном компоненте опухоли. Выявленные нами иммунофенотипические особенности могут быть крайне важными для дальнейших исследований, так как до настоящего времени в литературе существуют единичные сведения о неоднородности РЖДТ [22, 23]. Считаем, что углубленное и расширенное исследование этой проблемы на большом клиническом материале, несомненно, оптимизирует выбор тактики ведения пациентов данного профиля.

Противоречивые, на первый взгляд, результаты, полученные нами в ходе диагностики вируса EBV методом ИГХ и ПЦР в режиме реального времени, обусловлены более высокой специфичностью метода ПЦР в режиме реального времени, что связано с определением фрагментов ДНК, оставшихся в клетках памяти человека после перенесенной инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр, которая часто протекает в латентной форме [24]. С другой стороны, есть данные, которые не исключают роль EBV, CMV и HHV6 как возможных участников в канцерогенезе [25]. При этом использование ИГХ метода является обязательным с целью определения молекулярно-генетического подтипа, ассоциированного с EBV. Полученные нами результаты подтверждают необходимость увеличения числа обследованных пациентов с РЖДТ.

Позитивный PD-L1 и HER2 статус опухоли не коррелировал с наличием MSI и не проявлял значимых

различий в иммунофенотипе опухоли по сравнению с PD-L1 и HER2 негативным статусом.

Заключение

Для реализации полноценного диагностического потенциала в отношении рака желудка диффузного типа необходимо комплексное исследование опухоли с применением гистохимических, иммуногистохимических методов и полимеразно-цепной реакции. В патологоанатомическом заключении следует отражать процент перстневидных клеток, используя критерии, предложенные экспертами Международной ассоциации рака желудка. Обязательными методами исследования являются иммуногистохимический для уточнения иммунофенотипа опухоли, HER2 и PD-L1 статуса, а также полимеразная цепная реакция. При оценке ИГХ реакции следует учитывать экспрессию антител в обоих компонентах опухоли. Определение молекулярного подтипа опухоли и ее статуса в отношении HER2 и PD-L1 будет являться решающим моментом для создания персонализированного подхода к ведению пациента. Малоизученными, но немаловажными остаются понимание этиопатогенеза и канцерогенеза рака желудка диффузного типа, того, какую роль в нем играют *Helicobacter pylori*, бактериальная, вирусная микробиота и каковы возможные пути их воздействия на генетическую составляющую РЖДТ. Научные данные последних лет, которые утверждают наличие неоднородности рака желудка диффузного типа, могут значительно расширить наши знания о природе данной карциномы и, возможно, в будущем сформировать критерии для объективной диагностики и выбора тактики лечения.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – К.Ю. Мидибер, Л.М. Михалева.
Сбор и обработка материала – К.Ю. Мидибер, А.Е. Бирюков, В.В. Печникова, Н.А. Грачева, Н.К. Шахпазян, З.В. Гюева.
Написание текста – К.Ю. Мидибер.
Редактирование – Л.М. Михалева.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – K.Yu. Midiber, L.M. Mikhaleva.
Collected the data and performed the analysis – K.Yu. Midiber, A.E. Biryukov, V.V. Pechnikova, N.A. Gracheva, N.K. Shakhpazyan, Z.V. Gioeva.
Wrote the paper – K.Yu. Midiber.
Edited the manuscript – L.M. Mikhaleva.

Литература/References

1. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова (ред.). Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, 2020. 252 с.
AD Kaprin, VV Starinskiy, AO Shakhzadova (eds.). Malignant neoplasms in Russia in 2019 (incidence and mortality). Moscow:

- P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2020. 252 p. (In Russ.).
2. CP Wild, E Weiderpass, BW Stewart (eds.). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon: IARC, 2020. Available from: <https://shop.iarc.fr/products/world-cancer-report-cancer-research-for-cancer-prevention-pdf> (Accessed 25th August 2021).
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
4. Карнаухов Н.С., Хомерики С.Г., Дерижанова И.С., Манцов А.А., Израйлов П.Е., Цвиркун В.В. и др. Карцинома желудка из плохо сцепленных клеток. Правомочность использования термина и варианты перевода. *Архив патологии.* 2021;83(4):69–72. DOI: 10.17116/patol20218304169.
Karnaukhov NS, Homeriki SG, Derizhanova IS, Mantsov AA, Izrailov RE, Tsvirkun VV et al. Poorly cohesive gastric carcinoma. Validity of using the term; translation variants. *Arkhiv Patologii.* 2021;83(4):69–72. DOI: 10.17116/patol20218304169.
5. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1965;64:31–49. DOI: 10.1111/apm.1965.64.1.31.
6. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology.* 2020;76(2):182–8. DOI: 10.1111/his.13975.
7. Waldum HL, Fossmark R. Types of gastric carcinomas. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12):4109. DOI: 10.3390/ijms19124109.
8. The WHO Classification of Tumours Editorial Board (eds.). WHO classification of tumours. Digestive system tumors. V. 1. 5th ed. Lyon: IARC, 2019. 635 p.
9. Mariette C, Carneiro F, Grabsch HI, van der Post RS, Allum W, de Manzoni G. Consensus on the pathological definition and classification of poorly cohesive gastric carcinoma. *Gastric Cancer.* 2019;22(1):1–9. DOI: 10.1007/s10120-018-0868-0.
10. Михалева Л.М., Мидибер К.Ю., Печникова В.В., Васюкова О.А., Гуцин М.Ю. Патоморфологические и молекулярно-генетические особенности диффузного типа рака желудка. *Бюллетень сибирской медицины.* 2021;20(2):168–175. DOI: 10.20538/1682-0363-2021-2-168-175.
Mikhaleva LM, Midiber KYu, Pechnikova VV, Vasyukova OA, Gushchin MYu. Pathomorphological and molecular genetic features of diffuse gastric cancer. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2021;20(2):168–175 (In Russ.). DOI: 10.20538/1682-0363-2021-2-168-175.
11. Goud HK, Mehkari Z, Mohammed L, Javed M, Althwanay A, Ahsan F et al. Significance of E-cadherin gene mutations in patients with hereditary diffuse gastric cancer syndrome: A systematic review. *Cureus.* 2020;12(9):e10406. DOI: 10.7759/cureus.10406.
12. Assumpção PP, Barra WF, Ishak G, Coelho LGV, Coimbra FJF, Freitas HC et al. The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma. *BMC Gastroenterol.* 2020;20(1):223. DOI: 10.1186/s12876-020-01354-4.
13. Henson DE, Dittus C, Younes M, Nguyen H, Albores-Saavedra J. Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: Increase in the sig-

- net ring cell type. Arch Pathol Lab Med. 2004;128(7):765–70. DOI: 10.5858/2004-128-765-DTITIA.
14. Wu H, Rusiecki JA, Zhu K, Potter J, Devesa SS. Stomach carcinoma incidence patterns in the United States by histologic type and anatomic site. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(7):1945–52. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0250.
 15. de Assumpção PP, Araújo TMT, de Assumpção PB, Barra WF, Khayat AS, Assumpção CB et al. Suicide journey of *H. pylori* through gastric carcinogenesis: The role of non-*H. pylori* microbiome and potential consequences for clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38(9):1591–7. DOI: 10.1007/s10096-019-03564-5.
 16. Wang LL, Yu XJ, Zhan SH, Jia SJ, Tian ZB, Dong QJ. Participation of microbiota in the development of gastric cancer. World J Gastroenterol. 2014;20(17):4948–52. DOI: 10.3748/wjg.v20.i17.4948.
 17. Take S, Mizuno M, Ishiki K, Kusumoto C, Imada T, Hamada F et al. Risk of gastric cancer in the second decade of follow-up after *Helicobacter pylori* eradication. J Gastroenterol. 2020;55(3):281–8. DOI: 10.1007/s00535-019-01639-w.
 18. İlhan Ö, Han Ü, Önal B, Çelik SY. Prognostic significance of MUC1, MUC2 and MUC5AC expressions in gastric carcinoma. Turk J Gastroenterol. 2010;21(4):345–52. DOI: 10.4318/tjg.2010.0119.
 19. Завьялова М.В., Степанов И.В., Вторушин С.В., Савенкова О.В., Григорьева Е.С., Августинович А.В. и др. Экспрессионные характеристики диффузного и кишечного типов рака желудка. Сибирский онкологический журнал. 2012;3:67–73. *Zavyalova MV, Stepanov IV, Vtorushin SV, Savenkova OV, Grigoryeva ES, Avgustinovich AV et al.* Expression characteristics of diffuse- and intestinal-type gastric carcinomas. Siberian Journal of Oncology. 2012;3:67–73 (In Russ.).
 20. Wong HH, Chu P. Immunohistochemical features of the gastrointestinal tract tumors. J Gastrointest Oncol. 2012;3(3):262–84. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.019.
 21. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. Nature. 2014;513(7517):202–9. DOI: 10.1038/nature13480.
 22. Fukamachi H, Kim SK, Koh J, Lee HS, Sasaki Y, Yamashita K et al. A subset of diffuse-type gastric cancer is susceptible to mTOR inhibitors and checkpoint inhibitors. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):127. DOI: 10.1186/s13046-019-1121-3.
 23. Kim SK, Kim HJ, Park JL, Heo H, Kim SY, Lee SI et al. Identification of a molecular signature of prognostic subtypes in diffuse-type gastric cancer. Gastric Cancer. 2020;23(3):473–82. DOI: 10.1007/s10120-019-01029-4.
 24. Tavakoli A, Monavari SH, Solaymani Mohammadi F, Kiani SJ, Armat S, Farahmand M. Association between Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. BMC Cancer. 2020;20(1):493. DOI: 10.1186/s12885-020-07013-x.
 25. Cantalupo PG, Katz JP, Pipas JM. Viral sequences in human cancer. Virology. 2018;513:208–16. DOI: 10.1016/j.virol.2017.10.017.

Информация об авторах

Константин Юрьевич Мидибер – научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, врач-патологоанатом ГКБ № 31, ассистент кафедры патологической анатомии Медицинского института РУДН.

Андрей Евгеньевич Бирюков – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, врач-патологоанатом ГКБ № 31.

Валентина Викторовна Печникова – младший научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, врач-патологоанатом ГКБ № 31.

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

Николай Константинович Шахпазян – кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики ГКБ № 31.

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

Людмила Михайловна Михалева – доктор медицинских наук, профессор, директор, заведующая лабораторией клинической морфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, заведующая патологоанатомическим отделением ГКБ № 31.

Author information

Konstantin Yu. Midiber – Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology; Pathologist, City Clinical Hospital No. 31; Assistant, Pathology Department, Medical Institute, Peoples' Friendship University of Russia. <https://orcid.org/0000-0002-1426-968X>

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

Valentina V. Pechnikova – Junior Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology; Pathologist, City Clinical Hospital No. 31. <https://orcid.org/0000-0001-5896-4556>

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

Nikolay K. Shakhpazyan – Cand. Sci. (Med.), Clinical Laboratory Diagnostics Physician, City Clinical Hospital No. 31. <https://orcid.org/0000-0003-3386-7746>

Zarina V. Gioeva – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with Forensic Medicine, North Ossetian State Medical Academy. <https://orcid.org/0000-0002-5456-8692>

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

Морфологические варианты гравидарной трансформации эндометрия при неразвивающейся беременности после экстракорпорального оплодотворения

Т.Г. Траль^{1,2}, Г.Х. Толибова^{1,3}

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Высокая частота репродуктивных потерь I триместра, независимо от наступления беременности естественным путем или в результате применения методов вспомогательной репродукции, по-прежнему остается актуальной проблемой. Одним из способов выявления этиологии прерывания беременности является гистологическое исследование abortивного материала, в частности исследование гравидарной трансформации, которой в клинической практике, к сожалению, уделяется недостаточное внимание. Цель исследования – изучить гравидарную трансформацию эндометрия в abortивном материале неразвивающейся беременности после применения методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

Материалы и методы. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование гравидарной трансформации эндометрия проведено в 153 образцах abortивного материала при неразвивающейся беременности 5–8 недель эмбриогистологического срока после ЭКО и 15 образцах abortивного материала прогрессирующей беременности на аналогичных сроках. Abortивный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и проводили стандартное гистологическое исследование. Иммуногистохимическим методом оценивали экспрессию рецепторов эстрогена и прогестерона в железах и строме компактного слоя гравидарного эндометрия.

Результаты. Верифицированы пять вариантов гравидарной трансформации стромы и желез эндометрия при неразвивающейся беременности после ЭКО. Морфологические особенности гравидарной трансформации эндометрия при неразвивающейся беременности после ЭКО характеризуются полноценной и неполноценной трансформацией стромального компонента с разными вариантами трансформации желез эндометрия и десинхронизмом экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона.

Заключение. Впервые описанные морфологические варианты гравидарной трансформации эндометрия в abortивном материале после ЭКО, в свою очередь, служат новым направлением исследования эндометриального фактора как одной из главных детерминант повторных неудач имплантации и репродуктивных потерь ранних сроков, который зачастую остается вне фокуса внимания специалистов.

Ключевые слова: неразвивающаяся беременность, полноценная и неполноценная гравидарная трансформация эндометрия, рецепторы эстрогена и прогестерона, ЭКО

Для корреспонденции: Татьяна Георгиевна Траль. E-mail: ttg.tral@yandex.ru

Для цитирования: Траль Т.Г., Толибова Г.Х. Морфологические варианты гравидарной трансформации эндометрия при неразвивающейся беременности после экстракорпорального оплодотворения. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):42–51. DOI: 10.31088/СЕМ2021.10.S4.42-51.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 18.08.2021. Получена после рецензирования 02.09.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Morphological variants of decidual endometrial transformation in missed abortion after in vitro fertilization

T.G. Tral^{1,2}, G.Kh. Tolibova^{1,3}

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, Saint Petersburg, Russia

² St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia

³ I.I. Mechnikov North-Western State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg, Russia

Introduction. High prevalence of early pregnancy loss regardless of methods of conception still remains a relevant problem. One of the ways to identify the etiology of pregnancy loss is a histological examination

of the products of conception (POC), decidualization in particular, which often remains underestimated in clinical practice. The aim of the study was to evaluate the decidualization of the endometrium in the retained POC after IVF.

Materials and methods. Histological and immunohistochemical analysis of decidualized endometrium was carried out on 153 samples of retained POC around 5–8 weeks of gestation after IVF and on 15 samples of POC after artificial abortion. The POC was fixed in a 10% neutral formaldehyde solution, and a standard histological examination was performed. The immunohistochemical study was carried out to evaluate the expression of estrogen and progesterone receptors in the endometrial glands and stromal cells of the decidualized endometrium compact layer.

Results. We verified 5 types of decidual endometrial stromal and glandular transformation of a missed abortion material after IVF. The morphological features of decidualized endometrium in missed abortion after IVF are characterized by a complete and impaired stromal transformation with various types of glandular transformation and disynchronous expression of estrogen and progesterone receptors.

Conclusion. We described the morphological variants of the decidual endometrial transformation in POC after IVF, which serve a new direction to the understanding of endometrial factor as one of the main determinants of recurrent implantation and reproductive failure often remaining out of the specialist's focus.

Keywords: missed abortion, complete and incomplete gravidar transformation of the endometrium, estrogen and progesterone receptors, IVF

Corresponding author: Tatiana G. Tral. E-mail: ttg.tral@yandex.ru

For citation: Tral T.G., Tolibova G.Kh. Morphological variants of decidual endometrial transformation in missed abortion after in vitro fertilization. Clin. exp. morphology. 2021;10(S4):42–51. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.42-51 (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 18.08.2021. **Received in revised form** 02.09.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Общеизвестно, что благополучие нации в целом зависит от демографической ситуации в стране. Сложившаяся неоднозначная демографическая ситуация вкпе с пандемией COVID-19 в Российской Федерации и в мире в целом вызывают особую тревогу. Следует признать тот факт, что, несмотря на многочисленные меры, принимаемые правительством для решения демографических проблем на разных уровнях, современное общество не готово нести ответственность за сохранение и преумножение репродуктивного потенциала.

Одним из факторов демографических проблем является поздняя реализация репродуктивной функции у женщин и мужчин. Доказано, что с увеличением возраста растет груз не только соматической, но также гинекологической и урологической патологии, что служит причиной бесплодия, невынашивания беременности и неэффективных циклов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [1–5].

Программы ВРТ на сегодняшний день служат единственным методом преодоления бесплодия. Известно, что основными детерминантами эффективности ВРТ являются морфологически качественный эмбрион, эндометрий, адекватная гормональная стимуляция и поддержка наступившей беременности, однако как сам эндометрий, так и эмбрион могут быть слабым звеном, обуславливая повторные неудачи имплантации и ранние репродуктивные потери [6–10].

На фоне огромных успехов в эмбриологии изучение эндометрия как детерминанты успешной беременности идет слишком медленно, что не позволяет сформировать

единое мнение о методах диагностики с последующей возможностью коррекции состояния эндометрия. В то же время доказано, что нарушение рецепторного профиля эндометрия, ишемия ткани, склероз сосудов, фиброз и фибропластические изменения стромального компонента, хронический эндометрит формируют эндометриальную дисфункцию, которая приводит к нарушению имплантации, плацентации и гибели эмбриона у пациентки с бесплодием, невынашиванию беременности и неэффективности протоколов ВРТ [11–17].

Именно исходное состояние эндометрия является главным фактором его трансформации при наступившей беременности. Процесс децидуализации эндометрия предшествует последующей gravidарной трансформации и начинается на постовуляторном этапе с секреторного моделирования желез и стромы эндометрия, люминального эпителия и сосудистого русла. Эндометриальная строма представляет собой основной субстрат развития беременности, претерпевающий предецидуальную и децидуальную дифференцировку под влиянием гормонов и широкого спектра биологически активных молекул. Как следствие этих процессов, децидуальный, а в последующем gravidарный эндометрий приобретает защитные и регуляторные функции [18–23].

Gravidарная перестройка эндометрия – конечный этап циклической трансформации эндометрия в случае наступления беременности и служит отражением полного спектра структурных и молекулярно-биологических процессов адекватного взаимодействия гипоталамо-гипофизарно-яичниковых связей и эмбрионально-эндометриального консенсуса [24–29].

Несомненно, исследование гравидарной трансформации эндометрия в связи с высокой частотой репродуктивных потерь I триместра как при естественно наступившей беременности, так и при беременности, наступившей после ВРТ, является важной задачей, которой в клинической практике, к сожалению, уделяется недостаточное внимание.

Цель исследования – изучить гравидарную трансформацию эндометрия в абортном материале неразвивающейся беременности после применения методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

Материалы и методы

Гистологическое исследование

Гистологическое исследование проведено на 153 образцах абортного материала после ЭКО при неразвивающейся беременности 5–8 недель, поступивших в патологоанатомическое отделение НИИ АГиР им. Д.О. Отта, и 15 образцах абортного материала после прерывания беременности (хирургическим путем) по желанию женщины (контрольная группа) на аналогичном сроке. Критерии включения в исследование: возраст 25–40 лет, неразвивающаяся беременность после ЭКО у пациенток с трубно-перитонеальным фактором, маточным фактором, нормальным содержанием овариальных и гипофизарных гормонов в сыворотке крови, а также нормальным уровнем антимюллера гормона.

Операционный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине (рН 7,2), после стандартной гистологической проводки в гистопроцессоре Leica TP1020 (Leica, Германия) заливали в парафин на приборе модульной системы заливки TES 99 (Medite, Германия). Из полученных блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм на микротоме Rotary 3002 (PFM, Германия) и окрашивали их гематоксилином и эозином («БиоВитрум», Россия). Исследование проводили на микроскопе Olympus CX31 (Япония) при $\times 100$, $\times 400$. Оценивали наличие маточной беременности (инвазию трофобласта в зоне плацентарного ложа), полноценность гравидарной трансформации компактного и спонгиозного слоев эндометрия (стромы и желез), состояние спиральных артерий, наличие инфильтрации (экссудативной/продуктивной) и других изменений.

Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на парафиновых срезах по стандартному одноэтапному протоколу с использованием первичных антител к рецепторам эстрогенов и прогестерона в стандартных разведениях: ER (клон 1D5, 1:60), PR (клон PR 636, 1:50) (DakoCytomation, Дания). Количественную и качественную оценку экспрессии рецепторов половых гормонов проводили полуколичественным методом Histochemical Score = $\Sigma P(i) \times I$, где $P(i)$ – процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью, I – интенсивность окрашивания от 0 до 3 баллов: от-

сутствие экспрессии (0 баллов), слабая экспрессия (1 балл), умеренная экспрессия (2 балла), выраженная экспрессия (3 балла). Максимальное значение показателя должно соответствовать 300 единицам. Кроме того, в результатах оценивали равномерность распределения экспрессии. Оценку экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона проводили только в компактном слое эндометрия, поскольку при неполноценной трансформации дифференцировка на слои отсутствует.

Статистический анализ данных

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 13 (StatSoft Russia, Россия). Методы дескриптивной статистики включали оценку среднего арифметического (M) и ошибки среднего (m) для признаков, имеющих непрерывное распределение, а также частоты встречаемости признаков с дискретными значениями. Гистологическое исследование является описательным.

Результаты и обсуждение

Гистологическое строение абортного материала, полученного после прерывания беременности по желанию женщины, характеризуется полноценной гравидарной перестройкой компактного и спонгиозного слоев эндометрия. Компактный слой эндометрия представлен зрелыми децидуоцитами эпителиодного типа с обильной цитоплазмой и светлым пузырьковидным ядром. Клетки компактно прилегают друг к другу, отмечаются слабо выраженный отек и скудная лимфоидная инфильтрация. Железы компактного слоя с щелевидным или несколько экстазированным просветом, выстланы низким кубическим эпителием. Спонгиозный слой представлен обилием желез пилообразной формы, разделенных тонкой прослойкой цитогенной стромы со множественными островками толстостенных клубков спиральных артерий. Прослеживается четкое деление эндометрия на компактный и спонгиозный слои (рис. 1 А). Спиральные артерии в виде толстостенных клубков. Умеренная степень инвазии трофобласта в зоне плацентарного ложа.

Рецепторный профиль эндометрия в абортном материале от пациенток с прогрессирующей беременностью выявил следующие паттерны: в строме эндометрия верифицирована умеренно выраженная экспрессия рецепторов эстрогена ($120,8 \pm 5,1$), а в железах преимущественно слабо выраженная экспрессия ($100,0 \pm 3,2$); экспрессия рецепторов прогестерона в железах отсутствовала, а в строме эндометрия верифицирована равномерная выраженная экспрессия, соответствующая 250–280 баллам ($250,6 \pm 4,7$, рис. 2 А и АА).

При гистологическом исследовании абортного материала неразвивающейся беременности после ЭКО впервые верифицированы пять морфологических вариантов гравидарной трансформации эндометрия: I вариант – полноценная гравидарная трансформация стромы и желез эндометрия; II вариант – полноценная

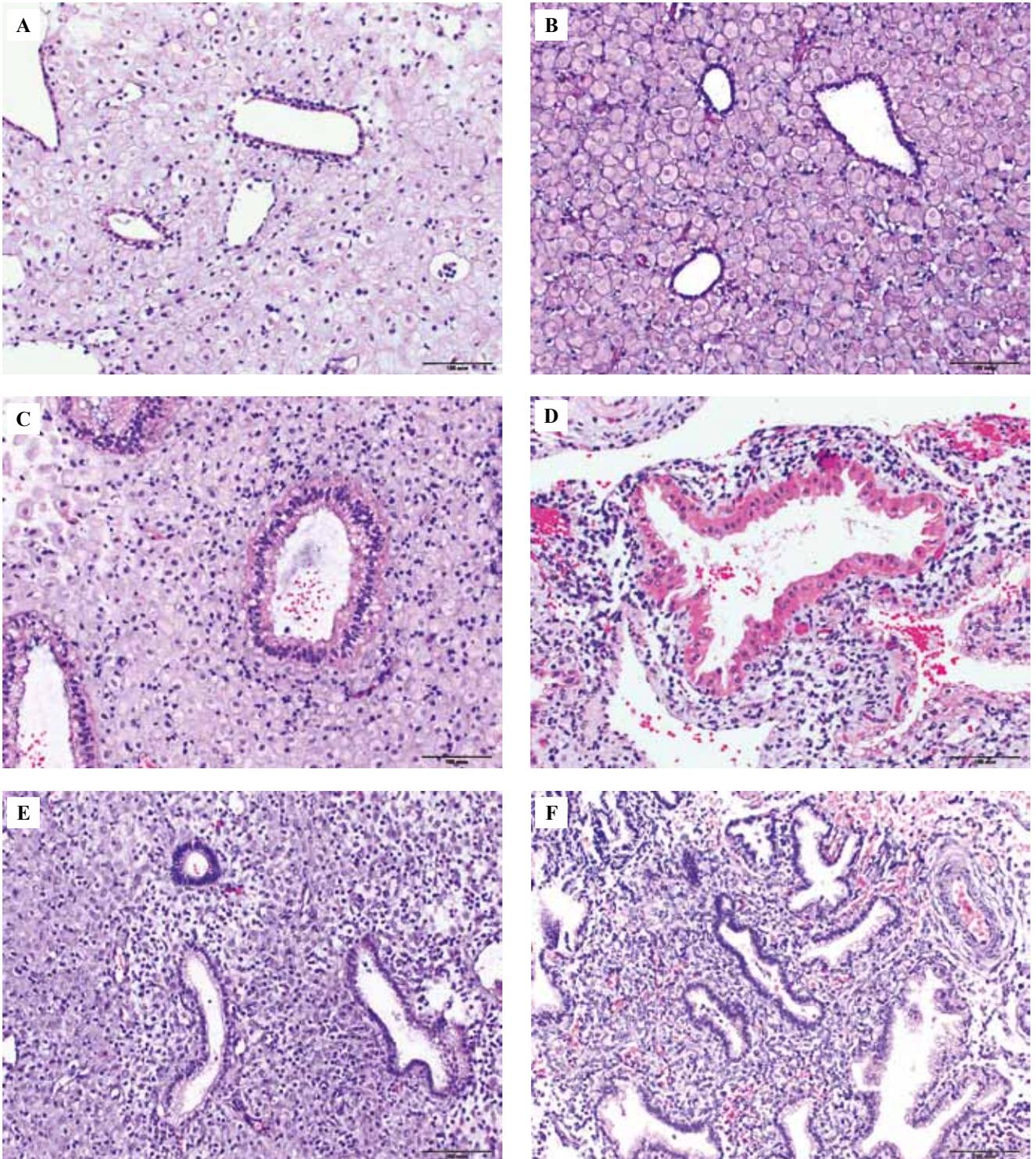


Рис. 1. Морфологические варианты гравидарной трансформации стромы и желез гравидарного эндометрия в абортивном материале. Контрольная группа: А – полноценная гравидарная трансформация стромы и желез. После ЭКО: В – полноценная гравидарная трансформация стромы и желез; С – полноценная гравидарная трансформация стромы с железами секреторного типа; D – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами секреторного типа; E – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами пролиферативного типа; F – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами секреторного и пролиферативного типа. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 1. Morphological variants of decidual stromal and glandular endometrial transformation in missed abortion. Control group: A – complete decidual stromal and glandular transformation. After IVF: B – complete decidual stromal and glandular transformation; C – complete decidual stromal transformation with glands of secretory type; D – impaired decidual stromal transformation with glands of secretory type; E – impaired decidual stromal transformation with glands of proliferative type; F – impaired decidual stromal transformation with glands of secretory and proliferative type. H&E, $\times 200$

гравидарная трансформация стромы с железами секреторного типа; III вариант – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами секреторного типа; IV вариант – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами пролиферативного типа; V вариант – неполноценная секреторная трансформация стромы с железами секреторного и пролиферативного типа.

I вариант – полноценная гравидарная трансформация стромы и желез эндометрия

При световой микроскопии данный тип трансформации гравидарного эндометрия сходен с таковым в абортном материале после прерывания беременности, наступившей естественным путем. Компактный слой представлен зрелыми децидуоцитами, плотно прилежащими друг к другу, образуя единый эпителиальный пласт. Цитоплазма превалирует, ядра децидуоцитов округлые, просветленные. Железы компактного слоя с щелевидным или овоидным просветом, выстланы уплощенным кубическим эпителием с незначительным количеством цитоплазмы и секрета в просвете. Спонгиозный слой представлен железами пилообразной формы, выраженным феноменом Ариас–Стеллы и тонкой прослойкой цитогенной стромы. Умеренная инвазия трофобласта в зоне плацентарного ложа. Спиральные маточные артерии в виде клубков, с выраженной гладкомышечной интимой. Четкое деление эндометрия на компактный и спонгиозный слои (рис. 1 В).

Несмотря на сходное гистологическое строение гравидарного эндометрия с таковым в абортном материале при беременности, наступившей естественным путем, при иммуногистохимическом исследовании наблюдаются некоторые отличия. Слабо выраженная (до 100 баллов) экспрессия рецепторов эстрогена с неравномерным распределением в строме и железах компактного слоя эндометрия ($90,6 \pm 6,6$ и $70,0 \pm 4,5$, соответственно), которая имела тенденцию к снижению по сравнению с аналогичными показателями гравидарного эндометрия при естественной беременности. Экспрессия рецептора прогестерона в железах эндометрия встречалась в единичных случаях ($n=5$) в диапазоне от 60 до 100 баллов ($66,7 \pm 10,2$). В стромальном компоненте гравидарного эндометрия экспрессия рецептора прогестерона распределена неравномерно с преобладанием умеренно выраженной экспрессии $189,7 \pm 5,6$ балла (рис. 2 В и ВВ).

II вариант – полноценная гравидарная трансформация стромы с железами секреторного типа

Гравидарная трансформация стромы компактного слоя эндометрия имеет эпителиоидное строение, представленное зрелыми децидуоцитами, среди которых расположены железы секреторного типа. Железы вытянутой формы, с овоидным или слабо звездчатым строением, высоким цилиндрическим эпителием. Ядра светлые, пузырьковидные. Цитоплазма обильная, с нечетким апикальным краем и признаками апокриновой

секреции. Спонгиозный слой эндометрия преимущественно с гиперсекреторными железами, выраженным феноменом Ариас–Стеллы. Межжелезистая прослойка цитогенной стромы тонкая. Умеренная инвазия трофобласта в плацентарном ложе. Крупные клубки спиральных артерий. Четкое деление эндометрия на компактный и спонгиозный слои (рис. 1 С).

Иммуногистохимическая картина характеризуется умеренно выраженной экспрессией с неравномерным распределением рецепторов эстрогена в эпителиоцитах компактного слоя эндометрия ($119,4 \pm 5,6$) и секреторноподобных железах эндометрия ($139,7 \pm 10,7$). Для рецептора прогестерона в строме характерна умеренно выраженная экспрессия с равномерным распределением ($175,5 \pm 7,6$), а в железах выявлена слабо выраженная экспрессия с неравномерным распределением ($80,0 \pm 6,7$) (рис. 2 С и СС).

III вариант – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами секреторного типа

Неполноценная гравидарная трансформация стромы эндометрия в абортном материале после ЭКО представлена отечной стромой секреторного типа с незрелыми децидуоцитами полигональной формы, не формирующими единый эпителиальный пласт, с ядром овоидной формы. Железы компактного слоя секреторного типа с разной выраженностью секреторной активности цилиндрического эпителия. Клубки спиральных артерий сформированы слабо, мышечный слой развит недостаточно. В отечной целлюлярной строме разная степень лимфогистиоцитарной инфильтрации. Умеренная или слабая инвазия трофобласта. Деление на компактный и спонгиозный слои не прослеживается (рис. 1 D).

Иммуногистохимический профиль гравидарного эндометрия характеризуется умеренно выраженной экспрессией рецепторов эстрогена как в строме, так и в железах эндометрия ($128,3 \pm 6,7$ и $179,2 \pm 6,7$ балла, соответственно). Экспрессия рецептора прогестерона в структурах гравидарного эндометрия также соответствует умеренным значениям в строме ($189,2 \pm 6,8$) и железах ($123,3 \pm 8,7$). Необходимо отметить, что, несмотря на неполноценность гравидарной трансформации стромы, значения экспрессии рецептора прогестерона имеют только тенденцию к снижению по сравнению с контрольной группой (рис. 2D и DD), поскольку в цикле ЭКО применяются препараты прогестеронового ряда. Кроме того, известно, что в течение циклической трансформации эндометрия наименьшим колебаниям экспрессии рецептора прогестерона подвержена именно строма эндометрия.

IV вариант – неполноценная гравидарная трансформация стромы с железами пролиферативного типа

Светооптические параметры данного морфологического варианта гравидарной трансформации в аборт-

тивном материале после применения протоколов ЭКО указывают на значительную структурно-биологическую недостаточность эндометрия.

Строма эндометрия представлена фибробластами с разной выраженностью развития цитоплазмы, от слабо выраженных изменений до формирования предецидуальных и незрелых децидуальных клеток. Отмечаются неравномерный отек, плазмоцитарно-лимфоцитарная инфильтрация с незначительной примесью нейтрофильных лейкоцитов. Железистый компонент эндометрия носит черты желез пролиферативного типа: от тубулярного до полигонального строения с пикнотическими гипохромными ядрами и слабо выраженной цитоплазмой с ровным апикальным краем. Слабая или умеренная инвазия трофо-

бласта. Клубки спиральных артерий выражены слабо. Деления на компактный и спонгиозный слой нет (рис. 1 Е).

Результаты иммуногистохимического исследования рецепторного профиля выявляют выраженную экспрессию рецепторов эстрогена и в стромальном, и в железистом компоненте гравидарного эндометрия ($203,3 \pm 4,4$ – $215,0 \pm 6,8$). Экспрессия рецептора прогестерона в гистогенетических структурах эндометрия характеризовалась как умеренно выраженной экспрессией в строме и железах эндометрия, так и выраженной ($193,3 \pm 8,6$ и $201,6 \pm 7,9$, соответственно) и имела сходные данные с экспрессией рецепторов эстрогена и прогестерона в пролиферативную фазу менструального цикла (рис. 2 Е и ЕЕ).

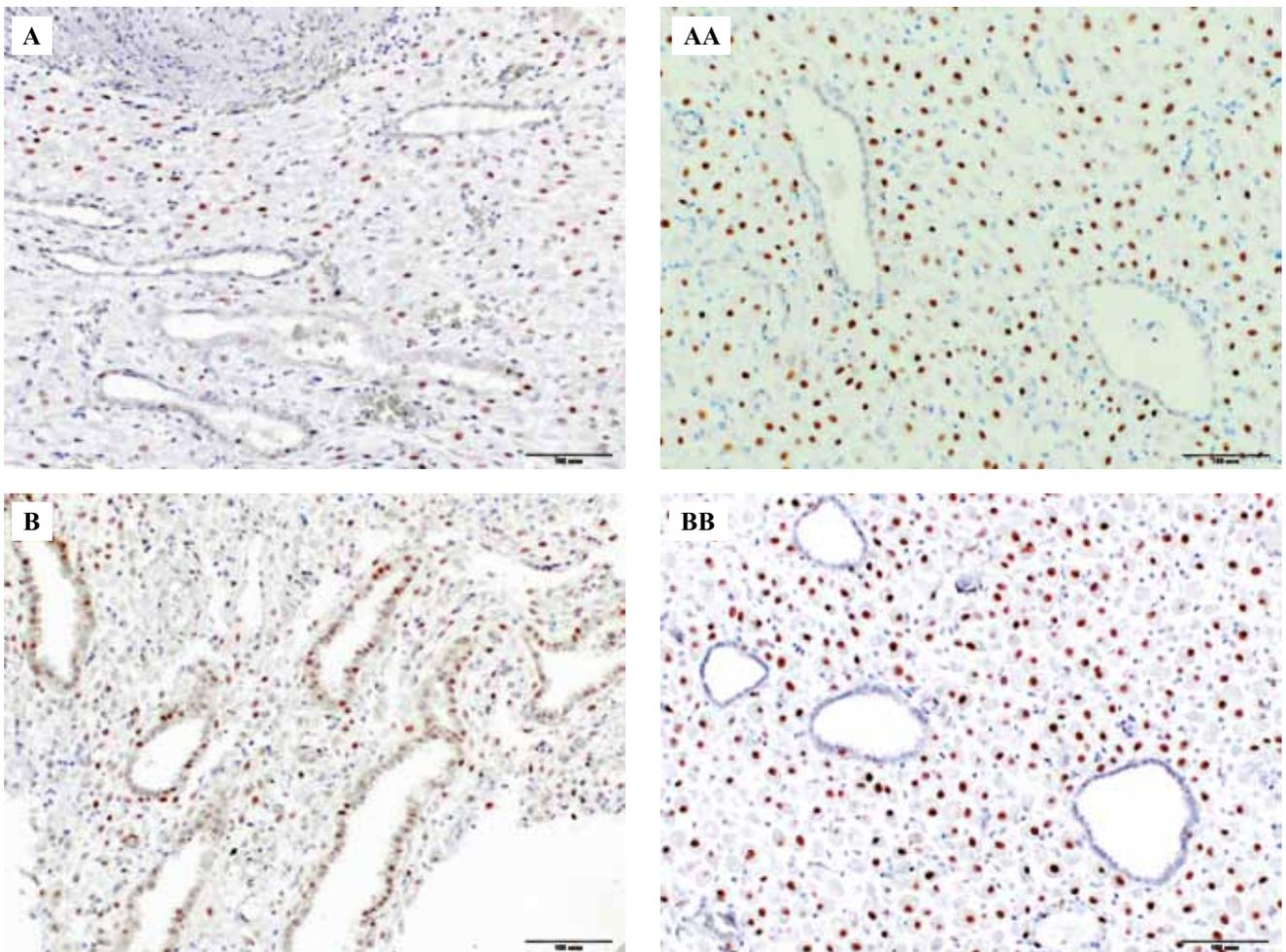


Рис. 2. Особенности экспрессии рецепторов эстрогена (ER) и прогестерона (PR) в строме и железах гравидарного эндометрия в абортивном материале. Контрольная группа: А – экспрессия ER, АА – экспрессия PR при полноценной гравидарной трансформации. После ЭКО: В – экспрессия ER, ВВ – экспрессия PR при полноценной гравидарной трансформации стромы и желез. Иммуногистохимическое исследование с антителами к рецепторам эстрогена (ER) и прогестерона (PR), $\times 200$

Fig. 2. Features of estrogen (ER) and progesterone (PR) receptor expression in the endometrial stroma and glands in missed abortion. Control group: А – ER expression, АА – PR expression in complete endometrial transformation. After IVF: В – ER expression, ВВ – PR expression in complete endometrial stromal and glandular transformation. Immunohistochemical assay with antibodies to ER and PR receptors, $\times 200$

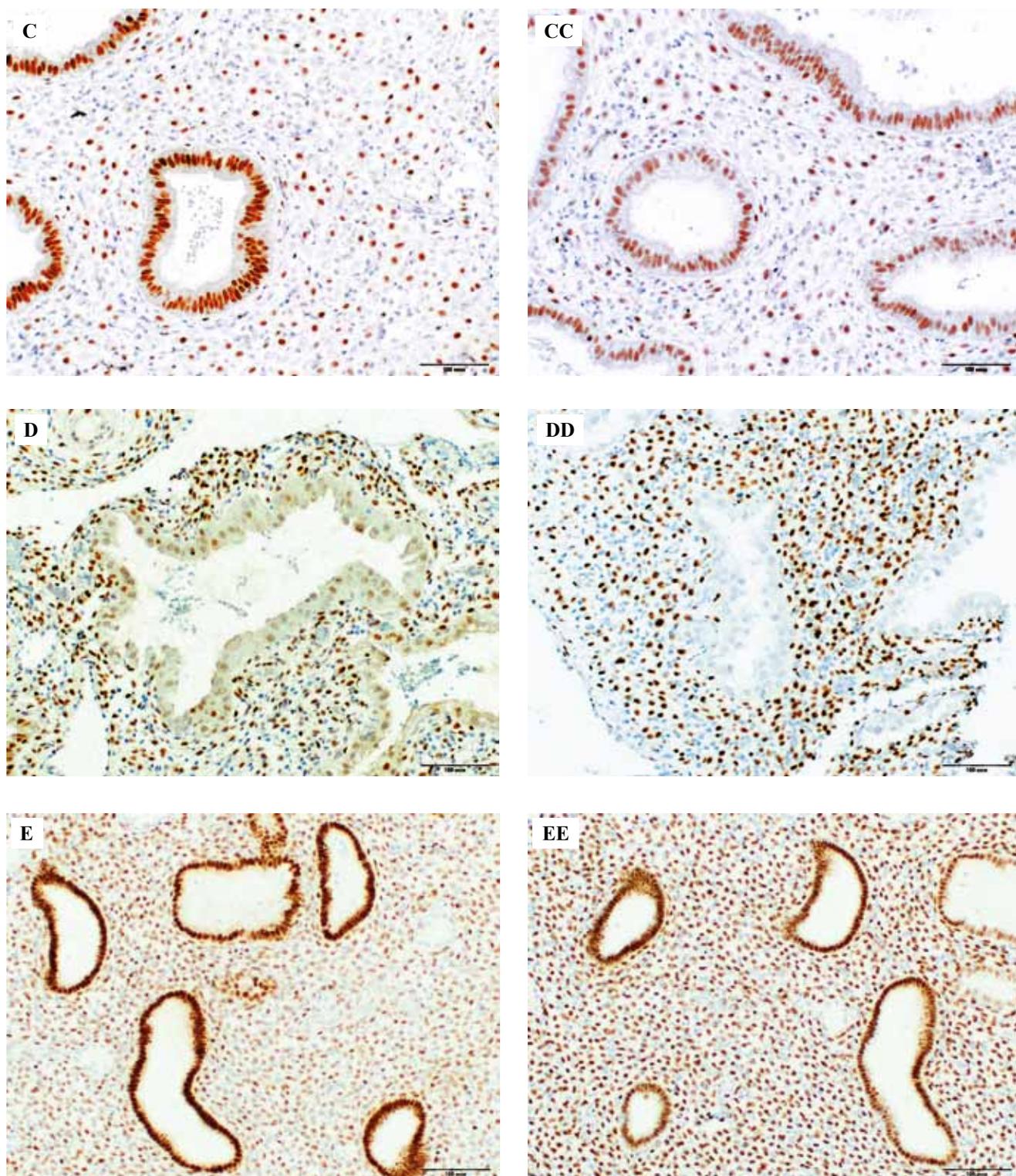


Рис. 2 (продолжение). С – экспрессия ER, СС – экспрессия PR при полноценной гравидарной трансформации стромы с железами секреторного типа; D – экспрессия ER, DD – экспрессия PR при неполноценной гравидарной трансформации стромы с железами секреторного типа; E – экспрессия ER, EE – экспрессия PR при неполноценной гравидарной трансформации стромы с железами пролиферативного типа. Иммуногистохимическое исследование с антителами к рецепторам эстрогена (ER) и прогестерона (PR), $\times 200$

Fig. 2 (continuation). C – ER expression, CC – PR expression in complete stromal transformation with glands of secretory type; D – ER expression, DD – PR expression in impaired stromal transformation with glands of secretory type; E – ER expression, EE – PR expression in impaired stromal transformation with glands of proliferative types. Immunohistochemical assay with antibodies to ER and PR receptors, $\times 200$

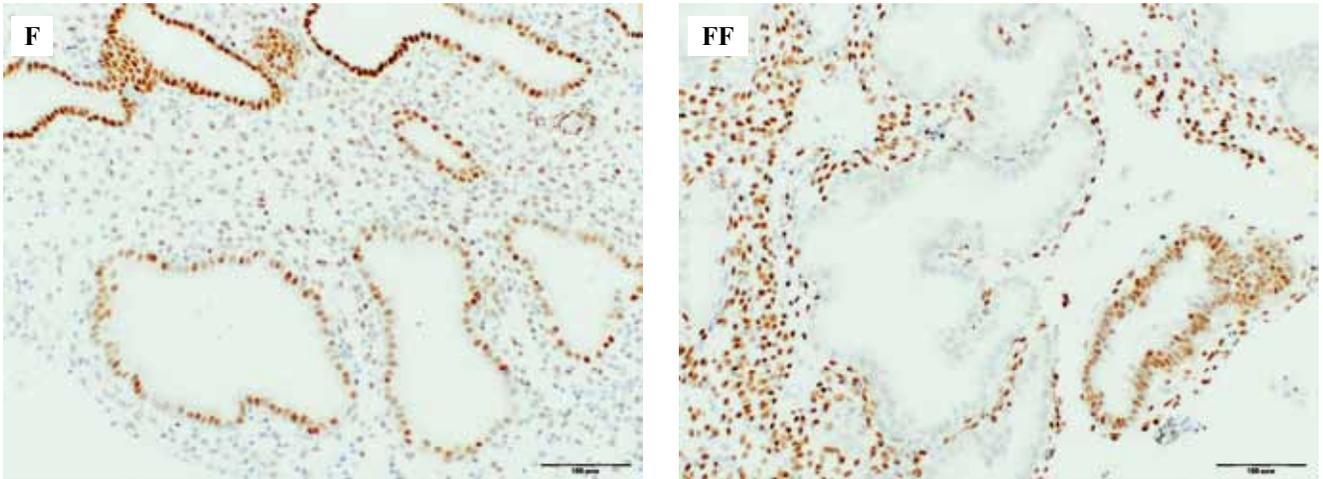


Рис. 2 (окончание). F – экспрессия ER, FF – экспрессия PR при неполноценной гравидарной трансформации стромы с железами секреторного и пролиферативного типа. Иммуногистохимическое исследование с антителами к рецепторам эстрогена (ER) и прогестерона (PR), $\times 200$

Fig. 2 (end). F – ER expression, FF – PR expression in impaired stromal transformation with glands of secretory and proliferative type. Immunohistochemical assay with antibodies to ER and PR receptors, $\times 200$

V вариант – неполноценная секреторная трансформация с железами секреторного и пролиферативного типа

В неполноценно сформированной отечной строме со слабо выраженными секреторными и прецидуальными изменениями определяются железы пролиферативного и секреторного типа. Присутствует неравномерно выраженная круглоклеточная инфильтрация. Железы секреторного типа округлой или овоидной формы с умеренно выраженной цитоплазмой и признаками неполноценной апокриновой секреции, неравномерной плотностью ядер. Железы пролиферативного типа тубулярного или слабо овоидного строения с пикнотическими гиперхромными ядрами, слабым развитием цитоплазмы без признаков апокриновой секреции. Слабая или умеренная инвазия трофобласта в плацентарном ложе. Слабо сформированные клубки спиральных артерий с тонкой мышечной интимой (рис. 1 F).

Иммуногистохимическое исследование выявило неравномерное распределение и умеренно выраженную экспрессию рецепторов эстрогена в строме и железах эндометрия ($115,5 \pm 8,7$ и $176,4 \pm 8,5$, соответственно). Рецепторный профиль прогестерона характеризуется дисинхронизмом экспрессии в строме и железах ($197,3 \pm 7,7$ и $146,0 \pm 8,5$). Учитывая неполноценность гравидарной трансформации стромы и наличие желез секреторного и пролиферативного типа, снижение экспрессии в стромальном компоненте соответствовало морфологической картине (рис. 2 F и FF).

Значимость рецепторов эстрогенов и прогестерона в циклической трансформации эндометрия и наступлении беременности известна давно, однако исследования рецепторного профиля гравидарного эндометрия (рецепторов эстрогена и прогестерона) представлены в виде единичных исследований [30, 31]. Иммуногистохимическое исследование экспрессии рецепторов

эстрогенов и прогестерона в гравидарном эндометрии при неразвивающейся беременности после ЭКО проведено с учетом уже имеющихся данных о нормальных уровнях экспрессии исследуемых рецепторов в абортном материале при искусственном прерывании беременности (хирургический кюретаж) по желанию женщины [32].

Известно, что полноценная секреторная трансформация эндометрия с соответствующим соотношением и распределением экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона, полноценный ангиогенез и иммунологический баланс детерминируют имплантацию, плацентацию и развитие беременности. В свою очередь, дисбаланс взаимодействия стероидогенеза, ангиогенеза и иммуногенеза приводит к неполноценной гравидарной трансформации и служит причиной репродуктивных потерь.

Полноценная гравидарная трансформация эндометрия у пациенток контрольной группы служила основным этапом верификации морфологических вариантов гравидарной трансформации абортного материала после ЭКО. По совокупности гистологическое и иммуногистохимическое исследования абортного материала от пациенток с развивающейся беременностью позволили определить качественные и количественные критерии верификации экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона в строме и железах гравидарного эндометрия. Полученные данные явились ключевым критерием выявления дисбаланса и десинхронизма рецепторного профиля в гравидарном эндометрии пациенток после протокола ЭКО, в том числе при гистологически установленной полноценной гравидарной трансформации стромы и желез эндометрия.

Поликаузальность репродуктивных потерь I триместра беременности не вызывает сомнений, однако они традиционно ассоциируются с хромосомной па-

тологией эмбриона, и роль морфологической диагностики гравидарной трансформации эндометрия при исследовании абортного материала, в том числе после ЭКО, остается вне фокуса внимания специалистов, хотя частота имплантации сохраняется низкой, несмотря на высококачественные эмбрионы.

Значимость факта наступления беременности в протоколе ЭКО при морфологических вариантах неполноценной гравидарной трансформации эндометрия еще раз актуализирует вопросы оптимального эмбрионально-эндометриального диалога в период «окна имплантации» даже в негативных условиях.

Заключение

Полученные данные комплексного морфологического исследования абортного материала после протокола ЭКО с выявлением разных вариантов гравидарной трансформации эндометрия и рецепторного профиля, несомненно, служат новым направлением верификации морфологических детерминант повторных неудач имплантации и репродуктивных потерь. Аспекты имплантационного потенциала эндометрия у пациенток с исходной эндометриальной дисфункцией и особенности трансформации эндометрия в ответ на экзогенное моделирование полноценного (структурного и рецепторного) эндометрия требуют дальнейшего изучения.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Т.Г. Траль, Г.Х. Толибова.

Сбор и обработка материала – Т.Г. Траль.

Написание текста – Т.Г. Траль, Г.Х. Толибова.

Редактирование – Г.Х. Толибова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – T.G. Tral, G.Kh. Tolibova.

Collected the data and performed the analysis – T.G. Tral.

Wrote the paper – T.G. Tral, G.Kh. Tolibova.

Edited the manuscript – G.Kh. Tolibova.

Литература/References

1. Айламазян Э.К., Толибова Г.Х., Траль Т.Г., Коган И.Ю., Ярмолинская М.И., Цыпурдеева А.А. и др. Новые подходы к оценке эндометриальной дисфункции. Журнал акушерства и женских болезней. 2017;66(3):8–15. DOI: 10.17816/JOWD6638-15. Aylamazyan EK, Tolibova GK, Tral TG, Kogan IU, Yarmolinskaya MI, Tsiपुरdееva AA et al. New approaches to the estimation of endometrial dysfunction. Journal of Obstetrics and Women's Diseases. 2017;66(3):8–15 (In Russ.). DOI: 10.17816/JOWD6638-15.
2. Benyamini Y, Todorova I. Women's reproductive health in sociocultural context. Int J Behav Med. 2017;24(6):799–802. DOI: 10.1007/s12529-017-9695-7.
3. Place JM, Litwack I, Vann S. Is infertility as visible as it needs to be given its importance to women's health? Results from a review of women's health journals. Sex Reprod Healthc. 2018;16:80–1. DOI: 10.1016/j.srhc.2018.02.009.
4. Tharakan T, Bettocchi C, Carvalho J, Corona G, Joensen UN, Jones H et al. Male sexual and reproductive health – does the urologist have a role in addressing gender inequality in life expectancy? Eur Urol Focus. 2020;6(4):791–800. DOI: 10.1016/j.euf.2019.10.009.
5. Souho T, Benlemlih M, Bennani B. Human papillomavirus infection and fertility alteration: A systematic review. PLoS One. 2015;10(5):e0126936. DOI: 10.1371/journal.pone.0126936.
6. Cuman C, Menkhorst EM, Rombauts LJ, Holden S, Webster D, Bilandzic M et al. Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative to IVF success. Hum Reprod. 2013;28(5):1161–71. DOI: 10.1093/humrep/det058.
7. Patel B, Elguero S, Thakore S, Dahoud W, Bedaiwy M, Mesiano S. Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. Hum Reprod Update. 2015;21(2):155–73. DOI: 10.1093/humupd/dmu056.
8. Robertson SA, Moldenhauer LM. Immunological determinants of implantation success. Int J Dev Biol. 2014;58(2–4):205–17. DOI: 10.1387/ijdb.140096sr.
9. DeMayo FJ, Lydon JP. 90 years of progesterone: New insights into progesterone receptor signaling in the endometrium required for embryo implantation. J Mol Endocrinol. 2020;65(1):T1–T14. DOI: 10.1530/JME-19-0212.
10. Cozzolino M, Diaz-Gimeno P, Pellicer A, Garrido N. Evaluation of the endometrial receptivity assay and the preimplantation genetic test for aneuploidy in overcoming recurrent implantation failure. J Assist Reprod Genet. 2020;37(12):2989–97. DOI: 10.1007/s10815-020-01948-7.
11. Михалева Л.М., Болтовская М.Н., Михалев С.А., Бабиченко И.И., Вандышева П.А. Клинико-морфологические аспекты эндометриальной дисфункции, обусловленной хроническим эндометритом. Архив патологии. 2017;79(6):22–29. DOI: 10.17116/patol201779622-29. Mikhaleva LM, Boltovskaya MN, Mikhalev SA, Babichenko II, Vandyshcheva PA. Endometrial dysfunction caused by chronic endometritis: Clinical and morphological aspects. Archive of Pathology. 2017;79(6):22–29 (In Russ.). DOI: 10.17116/patol201779622-29.
12. Johnston-MacAnanny EB, Hartnett J, Engmann LL, Nulsen JC, Sanders MM, Benadiva CA. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. Fertil Steril. 2010;93(2):437–41. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.12.131.
13. Kitaya K, Takeuchi T, Mizuta S, Matsubayashi H, Ishikawa T. Endometritis: New time, new concepts. Fertil Steril. 2018;110(3):344–50. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.012.
14. Zargar M, Ghafourian M, Nikbakht R, Mir Hosseini V, Moradi Choghakabodi P. Evaluating chronic endometritis in women with recurrent implantation failure and recurrent pregnancy loss by hysteroscopy and immunohistochemistry. J Minim Invasive Gynecol. 2020;27(1):116–21. DOI: 10.1016/j.jmig.2019.02.016.
15. Ewington LJ, Tewary S, Brosens JJ. New insights into the mechanisms underlying recurrent pregnancy loss. J Obstet Gynaecol Res. 2019;45(2):258–65. DOI: 10.1111/jog.13837.
16. Boss AL, Chamley LW, James JL. Placental formation in early pregnancy: How is the centre of the placenta made? Hum Reprod Update. 2018;24(6):750–60. DOI: 10.1093/humupd/dmy030.
17. Massimiani M, Lacconi V, La Civita F, Ticconi C, Rago R, Campagnolo L. Molecular signaling regulating endometrium-blas-

- tocyst crosstalk. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):23. DOI: 10.3390/ijms21010023.
18. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: Mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med.* 2007;25(6):445–53. DOI: 10.1055/s-2007-991042.
 19. Sharma S, Godbole G, Modi D. Decidual control of trophoblast invasion. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(3):341–50. DOI: 10.1111/aji.12466.
 20. Ng SW, Norwitz GA, Pavlicev M, Tilburgs T, Simón C, Norwitz ER. Endometrial decidualization: The primary driver of pregnancy health. *Int J Mol Sci.* 2020;8;21(11):4092. DOI: 10.3390/ijms21114092.
 21. Радзинский В.Е., Оразов М.Р., Михалева Л.М., Силантьева Е.С., Семенов П.А., Лагутина Е.В. и др. Предикторы неудач ЭКО при имплантационной несостоятельности эндометрия. *Трудный пациент.* 2021;19(1):23–26. DOI: 10.24412/2074-1995-2021-1-23-26.
Radzinsky VE, Orazov MR, Mihaleva LM, Silantyeva ES, Semenov PA, Lagutina EV et al. Predictors of IVF failures in implantation failure of the endometrium. *Difficult Patient.* 2021;19(1):23–26 (In Russ.). DOI: 10.24412/2074-1995-2021-1-23-26.
 22. Kim SM, Kim JS. A review of mechanisms of implantation. *Dev Reprod.* 2017;21(4):351–9. DOI: 10.12717/DR.2017.21.4.351.
 23. Fujiwara H, Ono M, Sato Y, Imakawa K, Iizuka T, Kagami K et al. Promoting roles of embryonic signals in embryo implantation and placentation in cooperation with endocrine and immune systems. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1885. DOI: 10.3390/ijms21051885.
 24. Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, Nautiyal J, Salter S, Lucas ES et al. Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep.* 2014;4:3894. DOI: 10.1038/srep03894.
 25. Modi DN, Bhartiya P. Physiology of embryo-endometrial cross talk. *J Biomed Res.* 2015;2(1):83–104. DOI:10.4103/2349-3666.240622.
 26. Gupta SK, Malhotra SS, Malik A, Verma S, Chaudhary P. Cell signaling pathways involved during invasion and syncytialization of trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(3):361–71. DOI: 10.1111/aji.12436.
 27. Mekinian A, Cohen J, Alijotas-Reig J, Carbillon L, Nicaise-Roland P, Kayem G et al. Unexplained recurrent miscarriage and recurrent implantation failure: Is there a place for immunomodulation? *Am J Reprod Immunol.* 2016;76(1):8–28. DOI: 10.1111/aji.12493.
 28. Schumacher A, Sharkey DJ, Robertson SA, Zenclussen AC. Immune cells at the fetomaternal interface: How the microenvironment modulates immune cells to foster fetal development. *J Immunol.* 2018;201(2):325–34. DOI: 10.4049/jimmunol.1800058.
 29. Fukui Y, Hirota Y, Matsuo M, Gebril M, Akaeda S, Hiraoka T, Osuga Y. Uterine receptivity, embryo attachment, and embryo invasion: Multistep processes in embryo implantation. *Reprod Med Biol.* 2019;18(3):234–40. DOI: 10.1002/rmb2.12280.
 30. Милованов А.П., Болтовская М.Н., Фокина Т.В., Старосветская Н.А., Назимова С.В. Неразвивающаяся беременность: гистологические и иммуногистохимические маркеры эндокринных нарушений в соскобах эндометрия. *Архив патологии.* 2008;70(6):22–25.
Milovanov AP, Boltovskaya MN, Fokina TV, Starosvetskaya NA, Nazimova SV. Non-developing pregnancy: Histological and immunohistochemical markers of endocrine disorders in endometrial scrapes. *Archive of Pathology.* 2008;70(6):22–25 (In Russ.).
 31. Траль Т.Г., Толибова Г.Х. Морфологические и иммуногистохимические особенности неразвивающейся беременности I триместра. *Журнал акушерства и женских болезней.* 2014;63(4):60–68. DOI: 10.17816/JOWD63460-68.
Tral TG, Tolibova GK. Morphological and immunohistochemical especially of stilled pregnancy the first trimester. *Journal of Obstetrics and Women's Diseases.* 2014;63(4):60–68 (In Russ.). DOI: 10.17816/JOWD63460-68.
 32. Т.Г. Траль, Г.Х. Толибова, А.А. Олина, И.Ю. Коган. Способ диагностики рецепторного профиля в абортном материале беременности раннего срока. Патент Российской Федерации 2744025. Заявитель и патентообладатель ФГБНУ НИИ АГиР им. Д.О. Отта – № 2020118774/20. Заявл. 29.05.2020; опубл. 02.03.2021, Бюл. № 7.
TG Tral, GH Tolibova, AA Olina, IYu Kogan. A method for diagnosing the receptor profile in the abortive material of early pregnancy. Patent No. 2744025 Russian Federation. Applicant and patent holder is D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology – No. 2020118774/20. Application 29.05.2020; publ. 02.03.21, Bul. No. 7.

Информация об авторах

Татьяна Георгиевна Траль – кандидат медицинских наук, заведующая патологоанатомическим отделением НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, доцент кафедры патологической анатомии с курсом судебной медицины Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета.

Гулрухсор Хайбуллоевна Толибова – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией иммуногистохимии НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта, доцент кафедры акушерства и гинекологии имени С.Н. Давыдова Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова.

Author information

Tatyana G. Tral – Cand. Sci. (Med.), Head of the Pathology Department, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, Department of Pathological Anatomy with course of Forensic Medicine, St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia.
<https://orcid.org/0000-0001-8948-4811>

Gulrukhsor Kh. Tolibova – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Immunohistochemistry, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Associate Professor, S.N. Davydov Department of Obstetrics and Gynecology, I.I. Mechnikov North-Western State Medical University of the Ministry of Health of Russia.
<https://orcid.org/0000-0002-6216-6220>

Клеточное и стромальное микроокружение при метастазирующей меланоме хориоидеи

Е.Л. Казачков¹, А.Ю. Шаманова^{1,2}, И.Е. Панова³, Д.М. Ростовцев², Т.Н. Шамаева¹

¹ ФГБОУ ВО Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Челябинск, Россия

² ГБУЗ Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины, Челябинск, Россия

³ Санкт-Петербургский филиал ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Меланома хориоидеи (МХ) – злокачественное новообразование собственной сосудистой оболочки глаза. Прогнозирование и предотвращение метастазирования данной опухоли являются главными задачами онкоофтальмологии, имеющими целью максимально продлить безрецидивную выживаемость пациентов. Цель исследования – определить особенности клеточно-стромального микроокружения метастазирующей меланомы хориоидеи на основе иммуногистохимической характеристики операционного материала.

Материалы и методы. Ретроспективно исследован операционный материал случаев МХ за 2013–2017 годы. Выборку составили две группы исследования: 1-я группа – случаи МХ без отдаленных метастазов (n=25), 2-я группа – случаи МХ с отдаленными метастазами в печень (n=18). Исследование проведено с применением историко-архивных, гистологических, иммуногистохимических, морфометрических и статистических методов.

Результаты. Во 2-й группе исследования статистически значимо преобладал уровень клеток, экспрессирующих маркеры CD4, – 138,5 (99,8;153,3), CD68 – 137 (99,5;173,8) и CD56 – 5 (3;6). Установлено, что показатели CD4 лимфоцитов >95 и CD68 макрофагов >104 позволяют прогнозировать появление отдаленных метастазов МХ с чувствительностью 83,3% и 72,2% и специфичностью 76% и 76%, соответственно. Такой же прогностической ценностью обладают показатели объемной плотности кровеносных сосудов в опухоли <3,9 (с чувствительностью 77,8%, специфичностью 64%).

Заключение. Метастазирующие МХ характеризуются особенностями клеточно-стромального микроокружения. Количественные показатели CD4 лимфоцитов, CD68 макрофагов и объемной плотности кровеносных сосудов в опухоли обладают прогностической ценностью с высокой чувствительностью и специфичностью для построения прогноза отдаленного метастазирования опухоли.

Ключевые слова: меланома хориоидеи, лимфоциты, макрофаги, метастазы, кровеносные сосуды опухоли

Для корреспонденции: Анна Юрьевна Шаманова. E-mail: anna-sha@bk.ru

Для цитирования: Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Панова И.Е., Ростовцев Д.М., Шамаева Т.Н. Клеточное и стромальное микроокружение при метастазирующей меланоме хориоидеи. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):52–60. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.52-60.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 27.09.2021. Получена после рецензирования 11.10.2021. Принята в печать 16.12.2021.

Cellular and stromal microenvironment of metastatic choroidal melanoma

E.L. Kazachkov¹, A.Yu. Shamanova^{1,2}, I.E. Panova³, D.M. Rostovcev², T.N. Shamaeva¹

¹ South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk Regional Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine, Chelyabinsk, Russia

³ S.N. Fedorov National Medical Research Center “Inter-Sectoral Research and Technical Complex “Eye microsurgery”, St. Petersburg Branch, Saint Petersburg, Russia

Introduction. Choroidal melanoma is a malignant neoplasm of the eye’s vascular membrane. Prognosing and preventing metastasis are the main objectives of ocular oncology, aimed at maximizing the relapse-free survival of patients. Our goal was to determine the features of the cellular and stromal microenvironment of metastatic choroidal melanoma based on the immunohistochemical characteristics of surgical specimens.

Materials and methods. We conducted a retrospective analysis of surgical specimens of cases of choroidal melanoma obtained from 2013 to 2017 and divided them into 2 study groups: group 1 included cases of

choroidal melanoma without distant metastases (n=25) and group 2 involved cases of choroidal melanoma with distant liver metastases (n=18). The study was conducted using medical records analysis, histological, immunohistochemical, morphometric, and statistical research methods.

Results. In group 2, the level of cells expressing CD4 markers – 138.5 (99.8;153.3), CD68 – 137 (99.5;173.8) and CD56 [5 (3;6)] prevailed significantly. The indicators of CD4 lymphocytes >95 and CD68 macrophages >104 were found to allow the prediction of the appearance of distant choroidal melanoma metastases with the sensitivity of 83.3% and 72.2% and specificity of 76% and 76%, respectively. The indicators of the volume density of blood vessels in the tumor <3.9 (with a sensitivity of 77.8% and specificity of 64%) were of the same prognostic value.

Conclusion. Metastatic choroidal melanoma is characterized by features of the cellular and stromal microenvironment. Quantitative indicators of CD4 lymphocytes and CD68-macrophages and the volume density of blood vessels in the tumor have prognostic value with high sensitivity and specificity for predicting distant tumor metastasis.

Keywords: choroidal melanoma, lymphocytes, macrophages, metastases, tumor blood vessels

Corresponding author: Anna Yu. Shamanova. E-mail: anna-sha@bk.ru

For citation: Kazachkov E.L., Shamanova A.Yu., Panova I.E., Rostovcev D.M., Shamaeva T.N. Cellular and stromal microenvironment of metastatic choroidal melanoma. 2021;10(S4):52–60. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.52-60 (In Russ.).

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

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

Received 27.09.2021. **Received in revised form** 11.10.2021. **Accepted** 16.12.2021.

Введение

Показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями (ЗНО) глаза и его придаточного аппарата в России в 2019 году составил 0,79 на 100 тысяч населения, а по Челябинской области – 1,52 на 100 тысяч [1]. В структуре ЗНО органа зрения внутриглазные опухоли занимают 2-е место и в 95% случаев представлены увеальной меланомой (УМ). УМ – ЗНО сосудистого тракта глаза, относящееся к меланоцитарным опухолям. Как любое ЗНО, данная опухоль является социально значимым заболеванием, оказывающим огромное воздействие на качество жизни пациентов [2].

В группе УМ на меланому хориоидеи (МХ) приходится 93,7% наблюдений. В структуре диагностируемых меланом различной локализации, включая меланомы кожи, каждая пятая – это МХ [3, 4]. Заболеваемость МХ в Челябинской области составляет 0,73 на 100 тысяч населения [1].

Методы лечения МХ представлены органосохраняющими (брахитерапия, транспупиллярная термотерапия и т.д.) и органонуносящими (энуклеация глазного яблока) [5, 6] вмешательствами. В литературе дискутируется возможность эндовитреального удаления МХ в качестве альтернативы энуклеации глаза [7], но операцией выбора зачастую является все-таки эта манипуляция.

МХ существенно отличается от меланомы кожи, в частности по набору хромосомных мутаций [8], по своему биологическому «поведению», по склонности к позднему метастазированию, порой спустя 10–15 лет после хирургического удаления первичной опухоли [9, 10]. На вероятность появления метастазов влияют размеры новообразования, клиничко-морфологические характеристики опухоли и прочее. Частота метастази-

рования, по данным ряда авторов, может варьировать в диапазоне 12–50% [11–13].

И.Е. Панова и соавт. [14] определяют критический срок формирования метастазов МХ равным 1–5 годам, когда регистрируют дочерние очаги опухоли в 77,2% наблюдений. При этом после ликвидационного лечения средние сроки метастазирования опухоли составляют 27,75±22,06 месяца, при органосохраняющем варианте терапии – 61,57±50,32 месяца [14]. Другие исследователи считают, что диссеминация опухолевого процесса при МХ не зависит от вида проведенного лечения [15].

В свете изложенного полагаем, что одной из актуальных задач современной онкоофтальмологии является определение критериев риска развития метастазов МХ. Среди последних упоминают некоторые особенности локализации и структуры опухоли – преэквадриальную топологию, большие размеры, грибовидную форму, пигментацию новообразования, смешанный и эпителиоидный гистотипы, отслойку сетчатки и прочее [14].

К неблагоприятным прогностическим морфологическим особенностям опухоли относят рост МХ за пределы склеры, инвазию в цилиохориоидальную зону, высокую плотность микрососудов, рост уровня макрофагов, контурирующиеся ядрышки в опухолевых клетках [16]. Имеются публикации, посвященные морфологическому анализу особенностей неблагоприятного течения МХ, а именно при рецидиве, продолженном росте, метастазировании. Так, показано [17, 18], что веретенчатый гистотип МХ имеет более благоприятный прогноз, а ранние клинические стадии опухоли коррелируют с более низким риском рецидива и метастазирования новообразования.

Микроокружение опухоли включает в себя как клеточный (лимфоциты, макрофаги, плазмоциты,

фибробласты и т.д.), так и стромально-сосудистый (экстрацеллюлярный матрикс и кровеносные сосуды) компоненты. При этом известно [19], что опухолевые клетки способны модулировать свое микроокружение и тем самым обеспечивать себе рост и метастазирование за счет активизации неоангиогенеза и уклонения от защитных иммунных реакций организма-опухолесителя.

Вместе с тем организм способен к иммунному надзору за опухолью посредством распознавания иммунокомпетентными клеточными элементами структур новообразования и их «уничтожения» цитотоксическими клетками. На примере колоректальной карциномы показано [20], что выраженная лимфоцитарная инфильтрация пара- и интраканкротной зон коррелирует с более высоким уровнем выживаемости пациентов.

Сегодня актуальным и перспективным направлением является иммунотерапия ЗНО различных локализаций (колоректальный рак, рак тела матки и придатков, рак легкого) [21, 22]. Возможная точка воздействия при данном варианте терапии – блокада взаимодействия между рецептором цитотоксического лимфоцита PD-1 и опухолевым лигандом PD-L1, что в свою очередь приводит к активации иммунной системы, а именно ее противоопухолевых потенций [23]. Известно [24], что инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL) – активный компонент адаптивного иммунного ответа на рост опухоли. Так, для HER2-позитивного и трижды негативного рака молочной железы уровень TIL является важным предиктивным и прогностическим фактором.

В настоящее время не существует абсолютно эффективных лечебных подходов к предотвращению метастазирования МХ, четко не определены структурные критерии прогнозирования отдаленного метастазирования данной опухоли. Таким образом, поиск возможных морфологических и иммуногистохимических критериев риска метастазирования МХ является актуальной задачей в онкоморфологии. Кроме того, активно дискутируется возможность активации клеточного микроокружения МХ не столько в первичном очаге (глазное яблоко), сколько в метастатических очагах (например, в ткани печени). В связи с этим остается открытым для научных поисков вопрос о роли микроокружения МХ и возможности стимуляции противоопухолевых потенций полиморфноклеточного параканкротного и интраканкротного инфильтрата посредством иммунотерапии.

Цель исследования – определить особенности клеточно-стромального микроокружения метастазирующей меланомы хориоидеи на основе иммуногистохимической характеристики операционного материала.

Материалы и методы

Проведено ретроспективное исследование операционного материала – 299 энуклеированных глаз от 299 пациентов, пролеченных по поводу МХ T2(a,b,c) N0M0-1 в 2013–2017 годах в Челябинском областном клиническом центре онкологии и ядерной медицины.

Критерии включения: соответствие МХ градации T2(a,b,c)N0M0-1; хирургическое лечение опухоли (энуклеация глазного яблока); беспигментные или слабопигментированные новообразования; локализация опухоли в хориоидеи; согласие пациента на проведение исследования операционного материала.

Критерии исключения: лечение опухоли, предшествовавшее энуклеации (брахитерапия и т.д.); терапевтический патоморфоз опухоли; синхронное и метакронное онкологическое заболевание.

Для сравнительного морфологического анализа особенностей клеточно-стромального микроокружения МХ в соответствии с критериями включения и исключения были сформированы две группы наблюдений. 1-ю группу составили пациенты с МХ без отдаленных метастазов опухоли, во 2-ю группу включены наблюдения МХ с отдаленными метастазами (в печень).

В работе использованы историко-архивный, гистологический (обзорная световая микроскопия материала с окрашиванием гематоксилином и эозином), морфометрический, иммуногистохимический (ИГХ) и статистический методы исследования. Оценивался клеточный компонент микроокружения МХ с идентификацией иммунофенотипа клеток ИГХ методом (CD4-экспрессирующие Т-лимфоциты/хелперы; CD8-экспрессирующие Т-цитотоксические клетки; CD68 макрофаги; CD56 натуральные киллеры). При исследовании экстрацеллюлярного матрикса особое внимание обращали на истинные кровеносные сосуды, для идентификации которых использовали маркер эндотелия CD34.

К TIL относили все мононуклеарные клеточные элементы в МХ, так как строма в этом новообразовании не выражена. Артефициальные зоны в ткани, некрозы, а также дендритные клетки, макрофаги, гранулоциты при подсчете TIL не учитывались. При оценке представительства TIL в опухоли использован полуколичественный метод: отсутствие TIL – 0% (0 баллов), ≤10% TIL – 1 балл, 10–50% TIL – 2 балла, >50% TIL – 3 балла.

Изучение оцифрованных изображений опухоли с количественной оценкой экспрессии маркеров CD4, CD8, CD68 и CD56 клеток в 10 полях зрения при ×400 выполнено с помощью программы Pannogamic Viewer (Version 1.15.4). В интерцеллюлярном матриксе новообразования подсчитывали истинные кровеносные сосуды, представляя результаты исследования в показателях объемной плотности (об%).

Результаты обработаны и проанализированы с помощью программы IBM SPSS Statistics 19. Поскольку объем выборки в группах составил менее 30 наблюдений, проверка гипотезы о виде закона распределения оценивалась с помощью критерия Шапиро–Уилка. При этом установлено, что распределение исследуемых признаков не подчинялось нормальному закону. В качестве параметров описательной статистики для интервальных и порядковых показателей рассчитывали медиану и квартили (Me [Q₁; Q₃]). При сравнении групп

по этим показателям применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. При описании номинальных признаков использовали абсолютную частоту и долю в процентах. Сравнение групп по этим признакам проводили при помощи непараметрического критерия χ^2 Пирсона. Взаимосвязи между исследуемыми количественными показателями оценивались по коэффициенту корреляции Спирмена (r_s). С целью определения ценности показателей количества клеток микроокружения опухоли для прогноза отдаленных метастазов проведен ROC-анализ. Рассчитывались площадь под ROC-кривой с указанием 95% доверительного интервала (AUC), чувствительность, специфичность, а также разделительные точки (пороговые значения) для количественных показателей.

Результаты

Исследовано 299 энуклеированных глаз от 299 пациентов. При этом сформированы две группы сравнимых наблюдений. 1-ю группу составили 25 случаев МХ без отдаленных метастазов T2(a,b,c)N0M0 с периодом динамического наблюдения 5–9 лет. Во вторую группу включено 18 наблюдений МХ T2(a,b,c)N0M1 с гистологически верифицированными отдаленными метастазами в печень. Средний промежуток времени от момента верификации первичной опухоли до появления метастазов во 2-й группе составил $3,25 \pm 0,36$ года. Для исключения ложных интерпретаций в ходе ИГХ-исследования при анализе микропрепаратов операционного материала в группы сравнения включены лишь слабопигментированные либо беспигментные МХ.

Пациенты групп сравнения были сопоставимы по полу и возрасту. Так, медиана возраста больных 1-й группы на момент верификации МХ составила 62 года

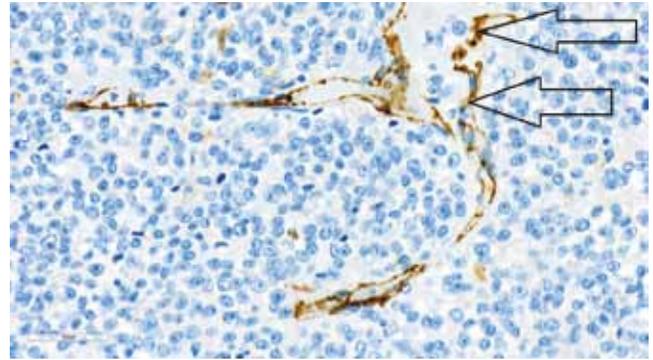


Рис. 1. Опухолевые эмболы в истинном кровеносном сосуде меланомы хориоидеи (стрелки). Иммуногистохимическое исследование с CD34, выявляющее эндотелиоциты кровеносного сосуда, $\times 200$

Fig. 1. Tumor emboli in the choroidal melanoma blood vessel (arrows). Immunohistochemical study with CD34 revealing endotheliocytes of the blood vessel, $\times 200$

(56; 66,5), среди них было 14 женщин и 11 мужчин. Медиана возраста 10 женщин и восьми мужчин, составивших 2-ю группу, оказалась равной 57 годам (49; 62,3). Во всех случаях верифицирован эпителиоидноклеточный либо веретенчатый вариант МХ.

В ходе гистологического исследования опухоли при окрашивании гематоксилином и эозином особое внимание обращали на наличие и количество опухолевых эмболов в истинных кровеносных сосудах, подтвержденных иммуногистохимической реакцией с CD 34 (рис. 1).

Сравнительная характеристика клеточных элементов и компонентов экстрацеллюлярного матрикса микроокружения МХ представлена в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 | Table 1

Сравнительная количественная и полуколичественная характеристика экспрессии маркеров CD4, CD8 лимфоцитов, TIL – инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, CD68 макрофагов, CD56 NK-клеток объемной плотности истинных кровеносных сосудов (CD 34, об%) микроокружения меланомы хориоидеи | Comparative quantitative and semi-quantitative characteristics of the expression of markers of CD4, CD8 lymphocytes, TIL (tumor-infiltrating lymphocytes), CD68 macrophages, and CD56 NK-cells of the volume density of blood vessels (CD 34, vol%) of the choroidal melanoma microenvironment

Исследуемые параметры Investigated parameters	Исследуемые группы Study groups		p, критерий Манна–Уитни p, the Mann–Whitney U test
	1-я группа group 1 (n=25)	2-я группа group 2 (n=18)	
Опухолевые эмболы в сосудах опухоли Tumor emboli in the tumor vessels	0,0 (0,0; 1,0)	3,0 (2,0; 4,0)	0,001*
CD4	68,0 (56; 97)	138,5 (99,8; 153,3)	0,001*
CD8	14,0 (11,5; 20,5)	16,5 (13,3; 24,5)	0,152
CD68	87,0 (69,0; 115,5)	137,0 (99,5; 173,8)	0,005*
CD56	2,0 (1,0; 4,5)	5,0 (3,0; 6,0)	0,046*
CD34	4,2 (3,0; 5,1)	2,3 (1,3; 3,9)	0,002*
TIL	1,0 (1,0; 1,0)	2,0 (1,0; 2,0)	0,001*

* Различия в группах сравнения статистически значимы | The differences in the comparison groups are significant

Таблица 2 | Table 2

Сравнительная количественная и полуколичественная характеристика TIL – инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, опухолевых эмболов в сосудах меланомы хориоидеи | Comparative quantitative and semi-quantitative characteristics of TIL tumor infiltrating lymphocytes, and tumor emboli in choroidal melanoma vessels

Исследуемые параметры Investigated parameters	Исследуемые группы Study groups		Критерий χ^2 Пирсона Pearson's chi-squared test
	1-я группа group 1 (n=25)	2-я группа group 2 (n=18)	
Отсутствие опухолевых эмболов Absence of tumor emboli	14 (56%)	1 (5,6%)	0,001*
Наличие опухолевых эмболов Presence of tumor emboli	11 (44%)	17 (94,4%)	
TIL	1 балл 1 point (88%, n=22) 2 балла 2 points (12%, n=3)	1 балл 1 point (44,4%, n=8) 2 балла 2 points (55,6%, n=10)	0,002*

* Различия в группах сравнения статистически значимы | The differences in the comparison groups are significant

Как видно из таблиц 1 и 2, сравнительный анализ представительства CD4 лимфоцитов, CD68 макрофагов, CD56 натуральных киллеров и объемной плотности сосудов в опухоли в 1-й и 2-й группах выявил статистически значимые различия. Так, в группе МХ с метастазами в печень показатели количества клеток (медиана, квартили), экспрессирующих CD4, CD68, CD56, составили, соответственно, 138,5 (99,8; 153,3), 137,0 (99,5; 173,8), 5,0 (3,0; 6,0), что статистически значимо превышало одноименные значения 1-й группы – 68,0 (56,0; 97,0), 87,0 (69,0; 115,5); 2,0 (1,0; 4,5). Медиана объемной плотности кровеносных сосудов в экстрацеллюлярном матриксе МХ с метастазами в печень, напротив, была статистически значимо ниже, чем в 1-й группе, – 2,3 (1,3; 3,9) против 4,2 (3,0; 5,1), соответственно ($p=0,002$).

При сравнительной оценке уровня TIL обнаружены значимые статистические различия (1,0 (1,0; 1,0) и 2,0 (1,0; 2,0) в 1-й и 2-й группах соответственно, критерий Манна–Уитни $p=0,001$). С помощью полуколичественного метода определения представительства TIL в группах установлено, что в 22 наблюдениях 1-й группы (88%) уровень составил 1 балл, в трех (12%) – 2 бал-

ла, а во 2-й группе уровень TIL, равный 1 баллу, зафиксирован у восьми пациентов (44,4%), 2 балла – у 10 (55,6%) (критерий χ^2 Пирсона $p=0,002$). Опухолевые эмболы регистрировались в 11 наблюдениях МХ без метастазов (44%), в то время как во 2-й группе (МХ с метастазами в печень) – в 17 (94,4%) (χ^2 Пирсона $p=0,001$). При этом медиана количества эмболов в сосудах МХ 2-й группы составила 3 (2; 4), а в 1-й группе – 0 (0; 1) (критерий Манна–Уитни $p=0,001$).

ROC-анализ проведен для всех анализируемых параметров в группах, но статистически значимые результаты были обнаружены лишь для CD4 лимфоцитов, CD68 макрофагов и CD34 (рис. 2, табл. 3).

При корреляционном анализе исследуемых параметров клеточного микроокружения в 1-й группе выявлена слабая по силе прямая связь между показателями TIL и CD56 натуральных киллеров (коэффициент Спирмена $r_s=0,401$; $p=0,047$). По остальным исследованным показателям 1-й группы (CD4, CD8, CD68, CD 34 маркеры, количество опухолевых эмболов) сравнительный анализ статистически значимых корреляций не обнаружил. Во 2-й группе наблюдений выявлены статистически значимая прямая слабая корреляционная связь между

Таблица 3 | Table 3

Сравнительная характеристика количественных показателей ROC-анализа CD4 лимфоцитов, CD68 макрофагов и объемной плотности кровеносных сосудов | Comparative characteristics of quantitative indicators of ROC analysis of CD4 lymphocytes, CD68 macrophages, and volume density of blood vessels

Тестовая переменная Test variable	Разделительная точка Cut-off	AUC, 95% ДИ	Значимость Significance	Чувствительность, % Sensitivity, %	Специфичность, % Specificity, %
CD4	>95	0,838 (0,697; 0,978)	0,001	83,3	76
CD68	>104	0,756 (0,605; 0,906)	0,005	72,2	76
CD34	<3,9 %	0,781 (0,638; 0,925)	0,002	77,8	64

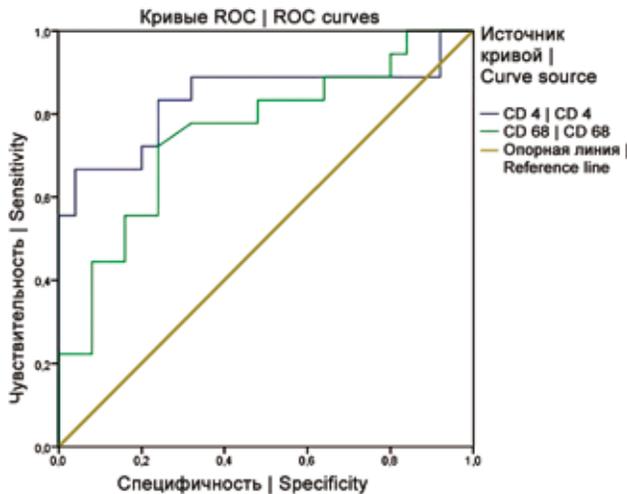


Рис. 2. ROC-кривые прогностической ценности количества CD4 лимфоцитов и CD68 макрофагов для прогноза отдаленного метастазирования меланомы хориоидеи
 Fig. 2. ROC curves of the prognostic value of the number of CD4 lymphocytes and CD68 macrophages for the prognosis of distant metastasis of choroidal melanoma

представительством CD68 макрофагов и CD34 маркеров эндотелиальных клеток ($r_s=0,449$; $p=0,049$), а также обратная корреляционная связь между CD68 и CD56 клетками ($r_s=-0,519$; $p=0,027$).

Обсуждение

Прогнозирование и предотвращение отдаленных метастазов МХ являются главными задачами онкоофтальмологии. Ранее нами показано [18], что количество опухолевых эмболов в сосудах новообразования статистически значимо различается при сравнении групп МХ с отдаленными метастазами и без них, тогда как особенности внутриоргана распространения новообразования (глубина инвазии в склеру, в глазничный нерв, периневральный рост) статистической значимости не имеют. Это косвенно указывает на склонность МХ к гематогенной диссеминации (в печень, реже в кости, легкие, головной мозг) [16] и согласуется с данными о том, что вне зависимости от метода и объема лечения до 50–70% случаев МХ сопровождается формированием отдаленных метастазов [14].

Развитие ЗНО представляет собой многоэтапный процесс, важную роль в котором играет иммунный ответ организма. Клеточное микроокружение опухоли, несомненно, оказывает влияние на рост и развитие новообразования. Противоопухолевые потенции иммунной системы проявляются путем активации врожденного и адаптивного звеньев иммунитета, результатом чего является, в частности, формирование микроокружения опухоли. При этом атипичные клетки оказывают влияние на свое клеточно-тканевое окружение, модифицируют его, влияют на формирование новообразованных сосудов, уклоняются от воздействия иммунокомпетентных элементов, проявляя склонность

с агрессивному росту и образованию метастазов [25]. Логично предположить, что особенности клеточного состава опухолевого микроокружения (выраженность, соотношение различных клеточных популяций, корреляционные связи между клетками) могут помочь в поисках маркеров метастазирования МХ, а также показать возможные перспективные точки воздействия на опухоль, в том числе через компоненты ее микроокружения посредством иммунотерапии [26, 27].

К числу важных прогностических показателей метастазирования УМ помимо ее хромосомного набора и характеристики клеточного субстрата относят особенности сосудистого русла в опухоли, а именно обильную и разветвленную васкуляризацию новообразования. По данным ряда авторов [28, 29], повышенная сосудистая плотность в УМ статистически значимо коррелирует с низкими показателями выживаемости.

А. J. Maniotis et al. [30] описали сосудистые каналы при высокоагрессивных УМ, образованные клетками опухоли, и назвали этот феномен васкулогенной мимикрией. Наряду с этим уместно предположить, что через обильное сосудистое русло в ткань опухоли должны мигрировать иммунные клетки в рамках их противоопухолевого иммунного надзора.

В последние десятилетия активно изучается вопрос влияния клеточного микроокружения на рост, развитие опухолей иных локализаций и их способность к метастазированию (рак почки, кишки, гортани) [31]. Тем не менее вопрос об иммунной реактивности клеток окружения МХ остается дискуссионным.

Исследования показали [32, 33], что УМ плохо реагирует на лечение ингибиторами иммунных контрольных точек. Вероятно, это связано с тем, что в строме УМ глаза скудно представлены элементы воспалительного клеточного микроокружения. Глаз – это иммунопривилегированный орган, который хорошо защищен от возникновения местных воспалительных реакций посредством иммунологических барьеров с целью сохранения функциональной активности эндотелиальных клеток роговицы и сетчатки, которые не склонны к регенерации [34, 35]. Несмотря на это, по данным ряда авторов [36, 37], наличие инфильтрирующих иммунных клеток при первичной УМ является маркером плохого прогноза.

Некоторые исследователи [38, 39] полагают, что УМ «ускользает» от воздействия иммунной системы организма. Однако, несмотря на выраженную иммуносупрессивную активность клеток УМ, имеющееся лимфоцитарное микроокружение, несомненно, оказывает воздействие на опухоль, что может явиться обоснованием к иммунотерапевтическому подходу в лечении данного новообразования. Так, L. D. Rothermel et al. [40] в экспериментальном исследовании *in vitro* на популяции клеток УМ в метастазах обнаружили иммуногенную группу опухолевых клеток. Авторы выделили клеточные линии УМ, меланомы кожи, лимфоцитов из метастазов в печень и провели анализ

иммунофенотипа TIL, полученных из этих двух форм меланом. При меланоме кожи TIL были преимущественно CD8 лимфоцитами, в то время как при УМ – CD4 клетками. Несмотря на то, что при меланоме кожи реактивность лимфоцитов против аутологичной опухоли была значительно выше, чем в случаях УМ, авторы обнаружили в УМ популяцию лимфоцитов с устойчивой противоопухолевой реактивностью [40].

В публикации A. Javed et al. [34] отмечается перспективность натуральных киллеров в вероятных противоопухолевых потенциях, особенно в метастазах УМ в печень. Уровень представительства иммунных клеток в микроокружении УМ существенно повышается, когда клетки опухоли выходят за пределы первичного очага (метастазируют в печень). Наши данные согласуются с результатами работ зарубежных исследователей [16]. На примере натуральных киллеров показано, что разнонаправленные противоопухолевые эффекторные реакции NK-клеток могут быть использованы при поиске действенной терапии [16, 34].

Обнаруженные в ходе нашего исследования статистически значимые различия в клеточно-стромальном окружении неметастазирующих и метастазирующих МХ указывают пути для поиска прогностических морфологических критериев метастазирования опухоли, а также намечают подходы к возможной иммунотерапии данного ЗНО. Тем не менее за рамками данной статьи остается пока не совсем ясный вопрос о характере взаимодействия иммунокомпетентных клеток организма и клеток УМ в отдаленных метастазах.

Заключение

Метастазирующие меланомы хориоидеи имеют особенности клеточно-стромального микроокружения.

Нами обнаружено, что показатели экспрессии CD4 и CD68 обладают высокой прогностической ценностью для определения вероятности появления отдаленных метастазов. В ходе нашего исследования разделительной точкой (пороговым значением) для маркера CD4 определен показатель 95 с высокой чувствительностью (83,3%) и специфичностью (76%). В ходе проведенного ROC-анализа для CD68 клеток разделительной точкой явился показатель количества макрофагов 104 (чувствительность 72,2%, специфичность 76%). Таким образом показатели CD4 лимфоцитов >95 и CD68 макрофагов >104 прогнозируют появление отдаленных метастазов меланомы хориоидеи. Значение показателя объемной плотности кровеносных сосудов в опухоли <3,9 также следует считать прогностическим для меланомы хориоидеи с отдаленными метастазами (чувствительность 77,8%, специфичность 64%). Результаты нашего исследования подтверждают важность дальнейшего изучения иммуноопосредованного противоопухолевого воздействия на увеальную меланому, а также необходимость разработки морфологических подходов к ее иммунотерапии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.Л. Казачков, И.Е. Панова, А.Ю. Шаманова, Д.М. Ростовцев.

Сбор и обработка материала – А.Ю. Шаманова, Т.Н. Шамаева.

Написание текста – А.Ю. Шаманова.

Редактирование – Е.Л. Казачков, И.Е. Панова, Д.М. Ростовцев.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.L. Kazachkov, I.E. Panova, A. Yu. Shamanova, D.M. Rostovtsev.

Collected the data and performed the analysis – A. Yu. Shamanova, T.N. Shamaeva.

Wrote the paper – A. Yu. Shamanova.

Edited the manuscript – E.L. Kazachkov, I.E. Panova, D.M. Rostovtsev.

Литература/References

1. А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова (ред.). Состояние онкологической помощи населению России в 2019 году. Москва: Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Минздрава России, 2020. 239 с.
AD Kaprin, VV Starinskiy, AO Shakhzadova (eds.). The state of cancer care for the population of Russia in 2019. Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2020, 239 p. (In Russ.).
2. Перечень социально значимых заболеваний: постановление Правительства Российской Федерации от 01.12.2004 № 715. Доступно по адресу: <https://base.garant.ru/12137881/> (получено 12.09.2021).
List of socially significant diseases: Decree of the Government of the Russian Federation of 01.12.2004 № 715 (In Russ.). Available from: <https://base.garant.ru/12137881/> (Accessed 12 september 2021).
3. *Важенин А.В., Панова И.Е.* Избранные вопросы онкоофтальмологии. Москва: Изд-во РАМН, 2006. 188 с.
Vazhenin AV, Panova IE. Selected issues of oncoophthalmology. Moscow: RAMS Publishing House, 2006. 188 p. (In Russ.).
4. *Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Mashayekhi, Shields JA.* Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina.* 2012;32(7):1363–72. DOI: 10.1097/IAE.0b013e31824d09a8.
5. А.Ф. Бровкина (ред.). Офтальмоонкология: Руководство для врачей. Москва: Медицина, 2002. 424 с.
AF Brovkina (ed.). Ophthalmooncology: A guide for doctors. Moscow: Izdatelstvo Meditsina, 2002. 424 p. (In Russ.).
6. *Kaliki S, Shields CL.* Uveal melanoma: Relatively rare but deadly cancer. *Eye (Lond).* 2017;31(2):241–57. DOI: 10.1038/eye.2016.275.
7. *Hamza HS, Elhusseiny AM.* Choroidal melanoma resection. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2018;25(2):65–70. DOI: 10.4103/meajo.MEAJO_73_18.
8. *Shields JA, Shields CL.* Management of posterior uveal melanoma: Past, present, and future. The 2014 Charles L. Schepens lecture. *Ophthalmology.* 2015;122(2):414–28. DOI: 10.1016/j.optha.2014.08.046.
9. *Amaro A, Gangemi R, Piaggio F, Angelini G, Barisione G, Ferrini S et al.* The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Reviews.* 2017;36(1):109–40. DOI: 10.1007/s10555-017-9663-3.

10. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology*. 2011;118(9):1881–5. DOI: 10.1016/j.opthta.2011.01.040.
11. Li Y, Shi J, Yang J, Ge S, Zhang J, Jia R et al. Uveal melanoma: progress in molecular biology and therapeutics. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12:1758835920965852. DOI: 10.1177/1758835920965852.
12. Beran TM, McCannel TA, Stanton AL, Straatsma BR, Burgess BL. Reactions to and desire for prognostic testing in choroidal melanoma patients. *J Genet Couns*. 2009;18(3):265–74. DOI: 10.1007/s10897-009-9223-2.
13. Damato BE, Heimann H, Kalirai H, Coupland SE. Age, survival predictors, and metastatic death in patients with choroidal melanoma: tentative evidence of a therapeutic effect on survival. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132(5):605–13. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2014.77.
14. Панова И.Е., Власова О.С., Гюнтер Е.И., Самкович Е.В., Шаманова А.Ю. Клинико-инструментальные критерии риска метастазирования меланомы хориоидеи. *Российский офтальмологический журнал*. 2019;12(3):30–36. DOI: 10.21516/2072-0076-2019-12-3-30-36.
Panova IE, Vlasova OS, Gyunter EI, Samkovich EV, Shamanova AY. Determining the risk of metastasis of choroidal melanoma: clinical and instrumental criteria. *Russian Ophthalmological Journal*. 2019;12(3):30–36 (In Russ.). DOI: 10.21516/2072-0076-2019-12-3-30-36.
15. Pham CM, Custer PL, Couch SM. Comparison of primary and secondary enucleation for uveal melanoma. *Orbit*. 2017;36(6):422–7. DOI: 10.1080/01676830.2017.1337183.
16. H.E. Grossniklaus, C.G. Eberhart, T.T. Kivelä (eds.). *WHO Classification of tumours of the eye*. 4th ed., vol. 1. Lyon: IARC, 2018. 228 p.
17. Coroi MC, Bakraoui A, Sala C, Ţica O, Ţica OA, Jurcă MC et al. Choroidal melanoma, unfavorable prognostic factors. Case report and review of literature. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(2):673–8. PMID: 31658343.
18. Казачков Е.Л., Шаманова А.Ю., Важенин А.В., Панова И.Е., Семенова А.Б., Матвеева Т.А. и др. Морфологические особенности внутриорганного распространения меланомы хориоидеи и подходы к поиску факторов прогноза ее метастазирования. *Уральский медицинский журнал*. 2020;3(186):18–22. DOI: 10.25694/URMJ.2020.03.03.
Kazachkov EL, Shamanova AY, Vagenin AV, Panova IE, Semenova AB, Matveeva TA et al. Morphological features of the intraorgan spread of melanoma of the choroid and approaches to the search for factors predicting its metastasis. *Ural Medical Journal*. 2020;3(186):18–22 (In Russ.). DOI: 10.25694/URMJ.2020.03.03.
19. Jindal V. Role of immune checkpoint inhibitors and novel immunotherapies in uveal melanoma. *Chin Clin Oncol*. 2018;7(1):8. DOI: 10.21037/cco.2018.01.05.
20. Zhang X, Kelaria S, Kerstetter J, Wang J. The functional and prognostic implications of regulatory T-cells in colorectal carcinoma. *J Gastrointest Oncol*. 2015;6(3):307–13. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.017.
21. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the immune system: The history and background of immunotherapy. *Semin Oncol Nurs*. 2019;35(5):150923. DOI: 10.1016/j.soncn.2019.08.002.
22. Paijens ST, Leffers N, Daemen T, Helfrich W, Boezen HM, Cohlen BJ et al. Antigen-specific active immunotherapy for ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;9(9):CD007287. DOI: 10.1002/14651858.CD007287.pub4.
23. Carbognin L, Pilotto S, Milella M, Vaccaro V, Brunelli M, Calìò A et al. Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and MPDL3280A according to the tumor expression of programmed death-ligand-1 (PD-L1): Sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genitourinary cancers. *PloS One*. 2015;10(6):e0130142. DOI: 10.1371/journal.pone.0130142.
24. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruner G et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259–71. DOI: 10.1093/annonc/mdu450.
25. Dong ZY, Wu SP, Liao RQ, Huang SM, Wu YL. Potential biomarker for checkpoint blockade immunotherapy and treatment strategy. *Tumour Biol*. 2016;37(4):4251–61. DOI: 10.1007/s13277-016-4812-9.
26. Bender C, Enk A, Gutzmer R, Hassel JC. Anti-PD-1 antibodies in metastatic uveal melanoma: A treatment option? *Cancer Med*. 2017;6(7):1581–6. DOI: 10.1002/cam4.887.
27. Algazi AP, Tsai KK, Shoushtari AN, Munhoz RR, Eroglu Z, Piulats JM et al. Clinical outcomes in metastatic uveal melanoma treated with PD-1 and PD-L1 antibodies. *Cancer*. 2016;122(21):3344–53. DOI: 10.1002/cncr.30258.
28. Chen X, Maniotis AJ, Majumdar D, Pe'er J, Folberg R. Uveal melanoma cell staining for CD 34 and assessment of tumor vascularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(8):2533–9. PMID: 12147581.
29. Cong R, Sun Q, Yang L, Gu H, Zeng Y, Wang BJ. Effect of Genistein on vasculogenic mimicry formation by human uveal melanoma cells. *Exp Clin Cancer Res*. 2009;28(1):124. DOI: 10.1186/1756-9966-28-124.
30. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Sefter EA, Gardner LM, Pe'er J et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999;155(3):739–52. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5.
31. Wang JJ, Lei KF, Han F. Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(12):3855–64. DOI: 10.26355/eurrev_201806_15270.
32. Rossi E, Pagliara MM, Orteschi D, Dosa T, Sammarco MG, Caputo CG et al. Pembrolizumab as first-line treatment for metastatic uveal melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2019;68(7):1179–85. DOI: 10.1007/s00262-019-02352-6.
33. Zimmer L, Vaubel J, Mohr P, Hauschild A, Utikal J, Simon J et al. Phase II DeCOG-study of ipilimumab in pretreated and treatment-naïve patients with metastatic uveal melanoma. *PLoS ONE*. 2015;10(3):e0118564. DOI: 10.1371/journal.pone.0118564.
34. Javed A, Milhem M. Role of natural killer cells in uveal melanoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):3694. DOI: 10.3390/cancers12123694.
35. Niederhorn JY. Ocular immune privilege and ocular melanoma: Parallel universes or immunological plagiarism? *Front Immunol*. 2012;3:148. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00148.

36. *Berus T, Halon A, Markiewicz A, Orłowska-Heitzman J, Romanowska-Dixon B, Donizy P.* Clinical, histopathological and cytogenetic prognosticators in uveal melanoma – A comprehensive review. *Anticancer Res.* 2017;37(12):6541–9. DOI: 10.21873/anticancerres.12110.
37. *Bronkhorst IH, Jager MJ.* Uveal melanoma: the inflammatory microenvironment. *J Innate Immun.* 2012;4(5-6):454–62. DOI: 10.1159/000334576.
38. *Kim DW, Anderson J, Patel SP.* Immunotherapy for uveal melanoma. *Melanoma Manag.* 2016;3(2):125–35. DOI: 10.2217/mmt-2015-0006.
39. *Jindal V.* Role of immune checkpoint inhibitors and novel immunotherapies in uveal melanoma. *Chin Clin Oncol.* 2018;7(1):8. DOI: 10.21037/cco.2018.01.05.
40. *Rothermel LD, Sabesan AC, Stephens DJ, Chandran SS, Paria BC, Srivastava AK et al.* Identification of an immunogenic subset of metastatic uveal melanoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(9):2237–49. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2294.

Информация об авторах

Евгений Леонидович Казачков – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ.

Анна Юрьевна Шаманова – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии и судебной медицины имени профессора В.Л. Коваленко ЮУГМУ, врач-патологоанатом лабораторно-диагностической службы Челябинского областного клинического центра онкологии и ядерной медицины.

Ирина Евгеньевна Панова – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по науке МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова.

Дмитрий Михайлович Ростовцев – доктор медицинских наук, главный врач Челябинского областного клинического центра онкологии и ядерной медицины.

Татьяна Николаевна Шамаева – кандидат педагогических наук, доцент кафедры математики, медицинской информатики, информатики и статистики, физики ЮУГМУ.

Author information

Evgeny L. Kazachkov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the V.L. Kovalenko Department of Anatomical Pathology and Forensic Medicine, South-Ural State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0002-4512-3421>

Anna Yu. Shamanova – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, V.L. Kovalenko Department of Anatomical Pathology and Forensic Medicine, South-Ural State Medical University; Pathologist, Laboratory and Diagnostic Service, Chelyabinsk Regional Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine.
<https://orcid.org/0000-0002-9280-0608>

Irina E. Panova – Dr. Sci. (Med.), Professor, Deputy Director for Science, S.N. Fedorov National Medical Research Center “Inter-Sectoral Research and Technical Complex 'Eye microsurgery'”, St. Petersburg Branch.
<https://orcid.org/0000-0001-7443-4555>

Dmitry M. Rostovcev – Dr. Sci. (Med.), Chief Medical Officer, Chelyabinsk Regional Clinical Center of Oncology and Nuclear Medicine.
<https://orcid.org/0000-0002-8956-7921>

Tatyana N. Shamaeva – Cand. Sci. (Ped.), Associate Professor, Department of Mathematics, Medical Informatics, Computer Science and Statistics; Physics, South-Ural State Medical University.
<https://orcid.org/0000-0001-6327-2685>

Прогностическая значимость экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели PD-L1 в хордомимах

О.В. Ковалева¹, И.В. Булычева¹, А.Н. Грачев¹, Н.С. Бабкин¹, Э.Р. Мусаев², Н.Е. Кушлинский¹

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

² ГБУЗ Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения города Москвы, Красногорск, Россия

Введение. Хордомы – редкие злокачественные новообразования, характеризующиеся высокой частотой рецидивов и ограниченными способами лечения. Инвазия в жизненно важные структуры нервной системы усложняет их терапию и повышает показатели смертности. Поиск новых методов лекарственной терапии данного типа опухолей является актуальной проблемой. Цель исследования – изучение экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках и в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах в ткани хордом и ее ассоциация с клинико-морфологическими характеристиками опухолей.

Материалы и методы. Иммуногистохимическим методом проведен анализ экспрессии PD-L1 в 30 первичных хордомимах. Для определения статистически значимых различий в независимых группах использовали критерии χ^2 и Краскела–Уоллиса. Анализ выживаемости проводили путем построения кривых выживаемости по методу Каплана–Майера. Сравнение достоверности различий выполняли при помощи логарифмического рангового критерия. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. Экспрессия PD-L1 обнаружена в опухолевых клетках в 43% образцов, а также в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах в 80% образцов. Показано, что экспрессия PD-L1 практически не ассоциирована с клиническими характеристиками заболевания. Тем не менее экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках во всех образцах положительно коррелирует с содержанием данного маркера в лимфоцитах ($r=0,409$, $p=0,028$). Показано, что различные гистологические варианты хордом отличаются по содержанию PD-L1 как в опухолевых клетках, так и в лимфоцитах. Экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках не является прогностическим фактором заболевания, в то время как экспрессия данного белка в лимфоцитах имеет тенденцию к благоприятному прогнозу ($HR=0,1429$; $p=0,0570$).

Заключение. На основании проведенного исследования в дедифференцированной хордоме обнаружен наименьший уровень экспрессии PD-L1 как в клетках опухоли, так и в лимфоцитах. Экспрессия PD-L1 в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах связана с благоприятным прогнозом хордом и указывает на перспективы использования ингибиторов контрольных точек иммунитета в терапии.

Ключевые слова: хордома, PD-L1, лимфоциты, прогноз, выживаемость

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

Для цитирования: Ковалева О.В., Булычева И.В., Грачев А.Н., Бабкин Н.С., Мусаев Э.Р., Кушлинский Н.Е. Прогностическая значимость экспрессии лиганда рецептора программируемой клеточной гибели PD-L1 в хордомимах. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):61–67. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.61-67.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.07.2021. Получена после рецензирования 23.08.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Prognostic significance of programmed cell death receptor ligand PD-L1 expression in chordoma

O.V. Kovaleva¹, I.V. Boulytcheva¹, A.N. Gratchev¹, N.S. Babkin¹, E.R. Musaev², N.E. Kushlinskiy¹

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

² Moscow City Oncology Hospital No. 62 of the Moscow Healthcare Department, Krasnogorsk, Russia

Introduction. Chordomas are rare malignant neoplasms that are highly recurrent and with limited treatment options. Invasion of the vital structures of the nervous system complicates their treatment. The search for new methods of drug therapy for chordomas is an urgent problem. The aim of the research was to study PD-L1 expression in tumor cells and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in chordoma samples and its interrelation with tumor characteristics and prognosis.

Materials and methods. We analyzed PD-L1 expression in 30 primary chordomas using immunohistochemistry and differences in independent groups using Chi-square and Kruskal–Wallis tests. Survival analysis was performed by constructing Kaplan–Meier survival curves. We compared the significance of differences with the logarithmic rank test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results. PD-L1 expression was detected in tumor cells in 43% of samples and in TILs in 80%. PD-L1 expression in tumor cells and TILs was not associated with the clinical features of the disease. However, PD-L1 expression in tumor cells in all samples correlates positively with the content of this marker in TILs ($r = 0.409$, $p = 0.028$). Different histological variants of chordomas were shown to differ in the content of PD-L1 in both tumor cells and TILs. PD-L1 expression in tumor cells is not a predictor of the disease, while its expression in TILs tends to be a marker of a favorable prognosis ($HR = 0.1429$; $p = 0.0570$).

Conclusion. We found the lowest level of PD-L1 expression in both tumor cells and TILs in dedifferentiated chordoma. PD-L1 expression in TILs is associated with a favorable prognosis of chordomas and indicates the potential for the use of checkpoint inhibitors in therapy.

Keywords: chordoma, PD-L1, lymphocytes, prognosis, survival

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

For citation: Kovaleva O.V., Boulytcheva I.V., Gratchev A.N., Babkin N.S., Musaev E.R., Kushlinskii N.E. Prognostic significance of programmed cell death receptor ligand PD-L1 expression in chordoma. Clin. exp. morphology. 2021;10(S4):61–67. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.61-67 (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 20.07.2021. **Received in revised form** 23.08.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

За последние годы иммунотерапия совершила значительный прорыв в лечении онкологических заболеваний. Однако ввиду того, что некоторые типы опухолей встречаются эпизодически, данные о результатах иммунотерапии при редких опухолях костей, в том числе хордомы, крайне ограничены. Хордома представляет собой опухоль, иммунофенотипически связанную с нотохордом, что объясняет ее локализацию в любом отделе позвоночника, а также в области основания черепа. Нотохорд (от греч. *noton* – спина, *chorde* – струна) представляет собой клеточный тяж или временный скелет зародыша, который в норме устраняется к 8-й неделе внутриутробного развития [1, 2]. Наиболее частой локализацией хордомы является крестцово-копчиковая область (50–60%), затем следуют кости основания черепа (30%) [3–5].

Золотым стандартом лечения хордомы является радикальное хирургическое удаление опухоли. Тем не менее выполнение радикальной операции остается технически сложной задачей, поскольку опухоль часто прилегает к жизненно важным структурам, инвазирует окружающие мягкие ткани, обладает миксоидным матриком [6]. Важно отметить, что после хирургического удаления опухоли остается высокий риск развития локального рецидива [7, 8] и у 5–40% пациентов после операции развиваются метастазы [9, 10]. У пациентов с метастатическим заболеванием медиана выживаемости составляет около 1 года [11]. Необходимо отметить, что хордомы нечувствительны к системной химиотерапии, а также для них не существует таргетных лекарственных препаратов. Таким образом, для этих пациентов крайне необходима разработка новых терапевтических стратегий, и, возможно, иммунотерапия ингибиторами

контрольных точек иммунитета могла бы улучшить успехи лечения хордомы.

Одним из иммуносупрессорных механизмов опухолей является взаимодействие PD-1/PD-L1 [12, 13]. Связывание PD-L1 с его рецептором, PD-1, генерирует ингибирующие сигналы, что приводит к уходу опухоли из-под иммунного надзора. PD-L1 – один из мембраносвязанных лигандов программируемой клеточной гибели, который экспрессируется на различных типах клеток. В опухолях PD-L1 экспрессируется как непосредственно в клетках опухоли, так и в стромальных клеточных элементах ее микроокружения. Для многих типов солидных злокачественных опухолей показана корреляционная связь экспрессии PD-L1 с неблагоприятным прогнозом заболевания [14–16].

Ввиду того что хордома встречается редко, исследований, посвященных изучению экспрессии PD-L1 в данном типе опухолей, мало, а попытки применения ингибиторов контрольных точек при терапии у таких пациентов представляют собой в основном единичные наблюдения [17–19]. При этом даже такое небольшое количество исследований показывает обнадеживающие результаты и позволяет предположить, что хордома является иммуногенной опухолью и имеет перспективы успешной терапии ингибиторами контрольных точек иммунитета.

В своем исследовании мы оценили экспрессию PD-L1 в образцах хордом и в инфильтрирующей опухоли лимфоцитах (TILs), а также их связь с клинико-морфологическими данными и прогнозом у 30 пациентов.

Материалы и методы

В исследование включены 30 пациентов с хордомой крестца в возрасте от 32 до 72 лет (средний возраст

56 лет). Все пациенты проходили обследование и лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии имени Н.Н. Блохина. Новообразование кости у всех выявлено впервые и подтверждено данными морфологического исследования согласно Международной классификации опухолей костей (ВОЗ, 2020). Важным в диагностике хордомы оказался иммуногистохимический метод, выявляющий экспрессию цитокератинов, эпителиального мембранного антигена (EMA), глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP), S-100, брахиури. Для исключения из исследования метастазов опухолей различной локализации дополнительно проводили окрашивание с хромогранном А, подопланином (D2-40), а также с антителами к органоспецифическим белкам (ТТФ-1, маммаглобин, PSA, CDX-2).

В исследование включены два гистологических типа хордомы: классическая хордома (25 образцов), а также дедифференцированная хордома (пять образцов). Это выделенный отдельно вариант хордомы по классификации ВОЗ 2020 года, ICD-code 9372/3. Дедифференцированный вариант характеризуется сочетанием структуры классической хордомы и недифференцированной саркомы. Среди случаев классической хордомы в соответствии с классификацией ВОЗ 2020 года выделен подтип хондроидной хордомы (шесть образцов). Данные о пациентах с хордомами представлены в таблице 1.

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимический (ИГХ) анализ проводили в автоматизированном ИГХ стейнере Ventana Bench Mark ULTRA (Ventana Medical Systems, США) с использованием оптимизированного протокола и антител анти-PD-L1 (клон SP142, Abcam, Великобритания), 1:50. Для контроля протокола ИГХ исследования использовали внутрилабораторные тканевые позитивные контроли (ткани миндалин, плаценты, немелкоклеточного рака легкого). При оценке экспрессии PD-L1 в TILs образцы опухолей разделили на четыре группы с учетом количества PD-L1⁺ клеток: 0 – отсутствие PD-L1⁺ TILs, 1 – содержание PD-L1⁺ TILs менее 25%, 2 – содержание PD-L1⁺ TILs 25–50% и 3 – содержание PD-L1⁺ TILs более 50%. В зависимости от экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках образцы были разделены на две группы: с наличием и отсутствием экспрессии.

Статистический анализ данных

Полученные данные обрабатывали с использованием программы GraphPad Prism 9.0. При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали критерии χ^2 и Краскела–Уоллиса. Корреляционный анализ проводили с помощью определения коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для анализа выживаемости группы были сформированы относительно содержания PD-L1 в опухолевых клетках (наличие или отсутствие экспрессии) и инфильтрирующих опухоль лимфоци-

Таблица 1 | Table 1

Характеристика пациентов с хордомой | Clinicopathological characteristics of patients with chordoma

Характеристика Characteristic	Значение (N)
Возраст, лет Age, years	56 (32–73)
Пол Sex	
мужской male	14
женский female	16
Размер опухоли Tumor size	
≤10 см ≤10 cm	19
>10 см >10 cm	11
Гистологический тип Histology type	
классическая (хондроидная) conventional (chondroid)	25 (6)
дедифференцированная dedifferentiated	5
Общая выживаемость, месяцев Overall survival, months	44,6 (2–161)
Безрецидивная выживаемость, месяцев Recurrence-free survival, months	25,9 (2–124)

тах (пороговое значение 50%). Способ количественной оценки PD-L1 варьирует в зависимости от типа опухоли и используемого клона антител. Для анализа экспрессии данного белка в хордомах на сегодняшний день стандарт не определен, что позволяет устанавливать любое пороговое значение. Анализ выживаемости проводили путем построения кривых выживаемости по методу Каплана–Майера. Сравнение статистической значимости различий выполняли при использовании логарифмического рангового критерия. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ экспрессии PD-L1 в зависимости от клиничко-морфологических характеристик заболевания

Проведен анализ экспрессии PD-L1 в хордомах. Анализ экспрессии PD-L1 проводили в опухолевых клетках и инфильтрирующих опухоль лимфоцитах. В дедифференцированных опухолях анализ экспрессии PD-L1 проводился в хордомном компоненте. Методом ИГХ показано, что PD-L1 экспрессируется в опухолевых клетках хордом в 43,3% образцов (13 из 30). Экспрессию PD-L1 в лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, наблюдали в 80% образцов (24 из 30). Пример экспрессии PD-L1 в образцах хордом представлен на рисунке 1.

Провели анализ ассоциации экспрессии PD-L1 в зависимости от клиничко-морфологических характеристик заболевания. Результаты представлены в таблице 2.

Как видно из представленных данных, в целом экспрессия PD-L1 как в опухолевых клетках, так и в лимфоцитах практически не ассоциирована с клиническими характеристиками, за исключением пола пациентов (экспрессию PD-L1 в опухолевых клетках чаще наблюдали у женщин).

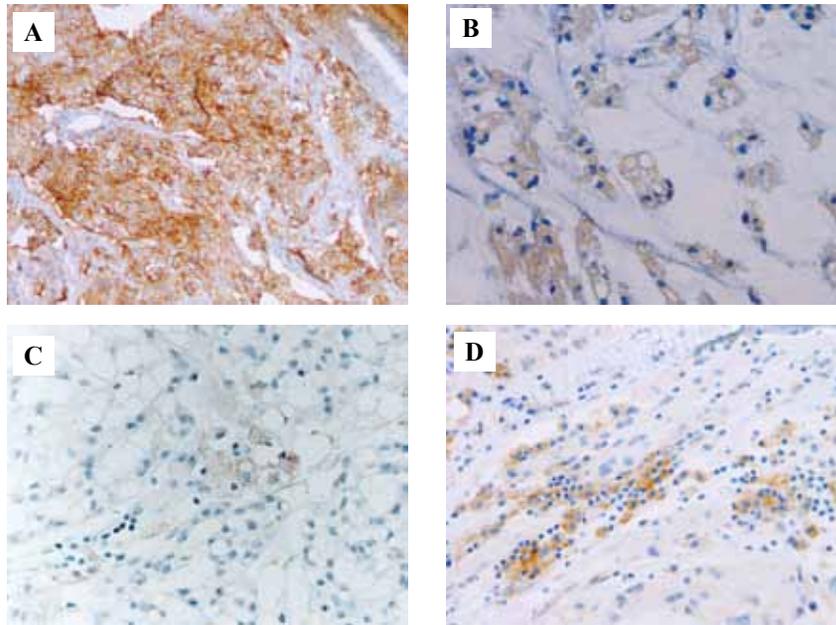


Рис. 1. Пример иммуногистохимического окрашивания с антителами к PD-L1.

А – контроль. PD-L1 положительный образец инфильтративного плоскоклеточного рака легкого, $\times 100$. В – классическая хордома крестца. Экспрессия PD-L1 в цитоплазме и мембранах опухолевых клеток, $\times 200$. С – классическая хордома крестца. Экспрессия PD-L1 в цитоплазме и мембранах опухолевых клеток, $\times 200$. D – классическая хордома крестца. Экспрессия PD-L1 в мембранах опухолевых клеток и в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, $\times 200$

Fig. 1. Immunohistochemical staining with PD-L1 antibodies.

A – control. PD-L1-positive tissue of infiltrative squamous cell lung cancer, $\times 100$. B – conventional sacral chordoma. PD-L1 expression in the cytoplasm and membranes of tumor cells, $\times 200$. C – conventional sacral chordoma. PD-L1 expression in the cytoplasm and membranes of tumor cells, $\times 200$. D – conventional sacral chordoma. PD-L1 expression in the membranes of tumor cells and in tumor-infiltrating lymphocytes, $\times 200$

Таблица 2 | Table 2

Ассоциация экспрессии PD-L1 с клинико-морфологическими характеристиками пациентов | Association between PD-L1 expression and clinical and morphological characteristics of chordoma patients

	PD-L1 опухоль PD-L1 tumor			PD-L1 TILs		
	+	-	P	<50%	>50%	p
Возраст Age						
≤ 56 лет ≤ 56 years old	6	8	>0,9999	11	3	>0,9999
>56 лет >56 years old	7	9		13	3	
Пол Sex						
мужской male	3	11	0,0329*	12	2	0,6567
женский female	10	6		1	4	
Размер опухоли Tumor size						
≤ 10 см ≤ 10 cm	8	11	>0,9999	16	3	0,6410
>10 см >10 cm	5	6		8	3	

* Различия в группах сравнения статистически значимы ($p < 0,05$) | The differences in the comparison groups are significant ($p < 0,05$)

Экспрессия PD-L1 в зависимости от гистологического типа хордомы

Провели статистический анализ уровня экспрессии PD-L1 в образцах хордом в зависимости от гистологического типа и подтипа опухоли. Во всех исследованных гистологических типах опухолей наблюдали экспрессию PD-L1 как в опухолевых клетках, так и в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах. Тем не менее следует отметить, что экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках выявлена в 44% образцов классической хордомы в целом и в 67% образцов группы подтипа классической хондронной хордомы, а также в 40% образцов дедифференцированного варианта в клетках опухоли хордомного компонента. Экспрессия PD-L1 обнаружена в лимфоцитах большинства образцов каждого гистологического типа опухолей, однако наибольшее их количество было характерно для подтипа классической хондронной хордомы, а наименьшее для дедифференцированных хордом. Статистический анализ полученных результатов представлен на рисунке 2.

Как видно из представленных графиков, содержание PD-L1 в опухолевых клетках хордом значимо не отличается между группами опухолей различных гистологических типов. Для PD-L1⁺ лимфоцитов показано, что наименьшее их количество наблюдается в дедифференцированных опухолях. Таким образом, можно

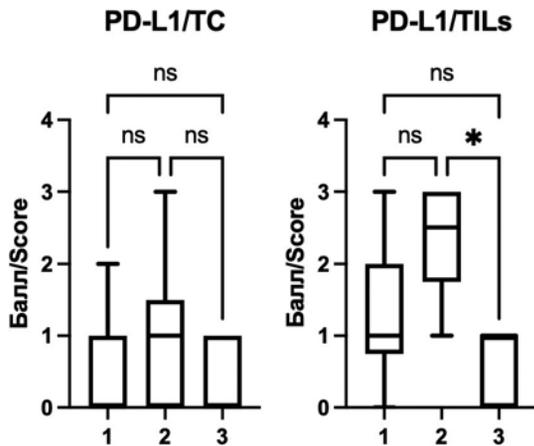


Рис. 2. Анализ экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках и инфильтрирующих опухоль лимфоцитах в образцах различных гистологических типов хордом.

1 – классическая хордома, 2 – классическая хондроидная хордома, 3 – дедифференцированная хордома

Fig. 2. PD-L1 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes in samples of various histological types of chordomas.

1 – classical chordoma, 2 – classical chondroid chordoma, 3 – dedifferentiated chordoma

утверждать, что наименьший уровень экспрессии PD-L1 выявляется в случаях дедифференцированных опухолей, в то время как наибольший в классических хондроидных хордоми. Наряду с этим необходимо отметить, что уровень экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках во всех образцах положительно коррелирует с содержанием исследуемого маркера в лимфоцитах ($r=0,409$, $p=0,028$).

Анализ прогностической значимости экспрессии PD-L1 в хордоми

Проведен анализ прогностической значимости экспрессии PD-L1 как в опухолевых клетках хордомы, так и в инфильтрирующей опухоли лимфоцитах. Дедифференцированные варианты опухоли сами по себе имеют неблагоприятный прогноз заболевания, поэтому анализ выживаемости проведен для классических вариантов опухолей. Результаты представлены на рисунке 3.

Как видно из графиков, экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках хордомы не является прогностически значимой при оценке общей выживаемости пациентов, в то время как высокое содержание в опухоли PD-L1⁺ лимфоцитов имеет тенденцию к благоприятному прогнозу ($HR=0,1429$; $p=0,0570$). Анализ безрецидивной выживаемости показал отсутствие связи между уровнем экспрессии PD-L1 и временем возникновения рецидива.

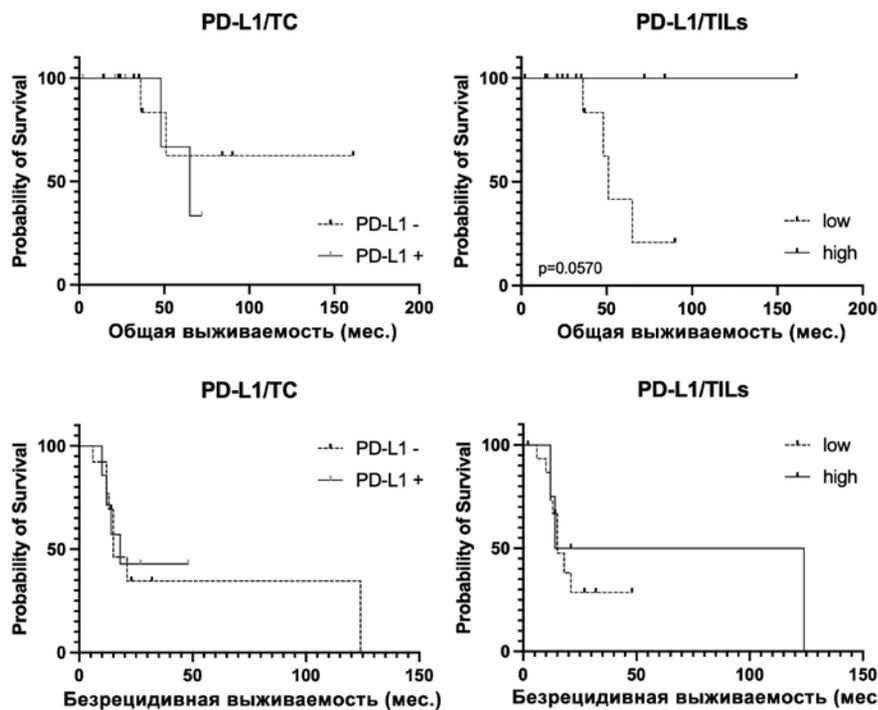


Рис. 3. Анализ общей и безрецидивной выживаемости в зависимости от экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках (TC) и инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (TILs) при классической хордоме

Fig. 3. Analysis of overall and recurrence-free survival depending on PD-L1 expression in tumor cells (TC) and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in conventional chordoma

Обсуждение

В исследовании проведен анализ экспрессии PD-L1 в образцах первично диагностированных различных гистологических вариантов хордомы. Проведена оценка прогностической значимости экспрессии PD-L1 в клетках опухоли и в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах. Хордома представляет собой специфическую мезенхимальную опухоль, гистогенетическую связанную с нотохордом, развивающуюся в аксиальном скелете. В настоящее время для терапии хордом рекомендовано только несколько таргетных препаратов, например иматиниб и дазатиниб [20, 21], поэтому проводятся дополнительные исследования, посвященные изучению эффективности иммунотерапии при данном типе новообразований.

Известно, что PD-L1 гиперэкспрессирован в опухолевых клетках многих солидных опухолей и уровень его содержания является показанием для назначения иммунотерапии. Для хордом в литературе описаны единичные наблюдения применения иммунопрепаратов, направленных на PD-1/PD-L1 взаи-

модействие, результаты которых позволяют надеяться на дальнейший успех их клинического использования [22]. Мы показали, что PD-L1 экспрессируется как непосредственно в опухолевых клетках хордом, так и в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах, причем его экспрессия в опухоли коррелирует с количеством PD-L1⁺ лимфоцитов. Нами проведен анализ содержания PD-L1 и непосредственно в опухолевых клетках, и в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах. Показано, что экспрессия PD-L1 не была ассоциирована с основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания, за исключением пола. Полученные нами результаты об отсутствии ассоциаций в целом согласуются с немногочисленными данными медицинской литературы, посвященными анализу PD-1/PD-L1 в хордомах [23].

При оценке прогностической значимости Y. Feng et al. показали, что экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками хордомы является неблагоприятным прогностическим признаком, однако эти данные не достигли статистической значимости [24]. Результаты проведенного нами исследования продемонстрировали отсутствие связи экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках с прогнозом хордом. При этом анализ экспрессии PD-L1 в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах показал, что их повышенное количество в опухоли является фактором благоприятного прогноза. Это согласуется с данными литературы, демонстрирующими неблагоприятную роль большого содержания PD-1⁺ лимфоцитов в опухоли и хорошую прогностическую значимость для PD-L1⁺ лимфоцитов первичной опухоли [25]. Опубликовано и еще одно исследование, показывающее, что экспрессия PD-L1 в TILs является независимым фактором благоприятного прогноза безрецидивной и общей выживаемости пациентов с хордовой [23].

Заключение

В настоящее время продолжается ряд клинических исследований с использованием анти-PD-1 и анти-PD-L1 препаратов при лечении пациентов с хордовой. Так, одно исследование посвящено монотерапии хордом ниволумабом (NCT03173950), а другое терапии ниволумабом в сочетании со стереотаксической радиохирургией (NCT02989636). Критерии назначения иммунотерапии хордом еще предстоит установить, но накапливающиеся данные позволяют надеяться на успех применения иммунотерапии в их комплексном лечении.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Н.Е. Кушлинский.
Сбор и обработка материала – И.В. Булычева, А.Н. Грачев, Н.С. Бабкин, Э.Р. Мусаев.
Написание текста, анализ данных – О.В. Ковалева.
Редактирование – О.В. Ковалева, И.В. Булычева

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – N.E. Kushlinskii.

Collected the data and performed the analysis – I.V. Boulytcheva,
A.N. Gratchev, N.S. Babkin, E.R. Musaev.
Wrote the paper, data analysis – O.V. Kovaleva.
Edited the manuscript – O.V. Kovaleva, I.V. Boulytcheva.

Литература/References

1. *Whelan JS, Davis LE.* Osteosarcoma, chondrosarcoma, and chordoma. *J Clin Oncol.* 2018;36(2):188–93. DOI: 10.1200/JCO.2017.75.1743.
2. *Травкина Ю.В., Жевак Т.Н., Литвицкий П.Ф.* Хордома: этиология, патогенез, диагностика, лечение. *Вопросы современной педиатрии.* 2018;17(4):266–71. DOI: 10.15690/vsp.v17i4.1917.
Travkina YuV, Zhevak TN, Litvitsky PF. Chordoma: Etiology, pathogenesis, diagnosis, treatment. *Current Pediatrics.* 2018;17(4):266–271 (In Russ.). DOI: 10.15690/vsp.v17i4.1917.
3. *Soft tissues and bone tumours.* WHO classification of tumors. 5th ed. V. 3. Lyon: IARC Press, 2020. 617 p.
4. *Lauer SR, Edgar MA, Gardner JM, Sebastian A, Weiss SW.* Soft tissue chordomas: A clinicopathologic analysis of 11 cases. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(5):719–26. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31827813e7.
5. *Heffelfinger MJ, Dahlin DC, MacCarty CS, Beabout JW.* Chordomas and cartilaginous tumors at the skull base. *Cancer.* 1973; 32(2):410–20. DOI: 10.1002/1097-0142(197308)32:2<410::aid-cncr2820320219>3.0.co;2-s.
6. *Kayani B, Sewell MD, Tan KA, Hanna SA, Williams R, Pollock R et al.* Prognostic factors in the operative management of sacral chordomas. *World Neurosurg.* 2015;84(5):1354–61. DOI: 10.1016/j.wneu.2015.06.030.
7. *Ariel IM, Verdu C.* Chordoma: An analysis of twenty cases treated over a twenty-year span. *J Surg Oncol.* 1975;7(1):27–44. DOI: 10.1002/jso.2930070106.
8. *Rich TA, Schiller A, Suit HD, Mankin HJ.* Clinical and pathologic review of 48 cases of chordoma. *Cancer.* 1985;56(1): 182–7. DOI: 10.1002/1097-0142(19850701)56:1<182::aid-cncr2820560131>3.0.co;2-j.
9. *Yonemoto T, Tatezaki S, Takenouchi T, Ishii T, Satoh T, Moriya H.* The surgical management of sacrococcygeal chordoma. *Cancer.* 1999;85(4):878–83. PMID: 10091765.
10. *Bergh P, Kindblom LG, Gunterberg B, Remotti F, Ryd W, Meis-Kindblom JM.* Prognostic factors in chordoma of the sacrum and mobile spine: A study of 39 patients. *Cancer.* 2000;88(9): 2122–34. DOI: 10.1002/(sici)1097-0142(20000501)88:9<2122::aid-cncr19>3.0.co;2-1.
11. *Baratti D, Gronchi A, Pennacchioli E, Lozza L, Colecchia M, Fiore M et al.* Chordoma: Natural history and results in 28 patients treated at a single institution. *Ann Surg Oncol.* 2003;10(3):291–6. DOI: 10.1245/aso.2003.06.002.
12. *Qin W, Hu L, Zhang X, Jiang S, Li J, Zhang Z et al.* The Diverse function of PD-1/PD-L pathway beyond cancer. *Front Immunol.* 2019;10:2298. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02298.
13. *Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B et al.* Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Mol Cancer.* 2019;18(1):10. DOI: 10.1186/s12943-018-0928-4.

14. Vrankar M, Zwitter M, Kern I, Stanic K. PD-L1 expression can be regarded as prognostic factor for survival of non-small cell lung cancer patients after chemoradiotherapy. *Neoplasma*. 2018;65(1):140–6. DOI: 10.4149/neo_2018_170206N77.
15. Lin YM, Sung WW, Hsieh MJ, Tsai SC, Lai HW, Yang SM et al. High PD-L1 expression correlates with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142656. DOI: 10.1371/journal.pone.0142656.
16. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and survival in solid tumors: A meta-analysis. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131403. DOI: 10.1371/journal.pone.0131403.
17. Migliorini D, Mach N, Aguiar D, Vernet R, Landis BN, Becker M et al. First report of clinical responses to immunotherapy in 3 relapsing cases of chordoma after failure of standard therapies. *Oncimmunology*. 2017;6(8):e1338235. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1338235.
18. Traylor JI, Pernik MN, Plitt AR, Lim M, Garzon-Muvdi T. Immunotherapy for chordoma and chondrosarcoma: Current evidence. *Cancers (Basel)*. 2021;13(10):2408. DOI: 10.3390/cancers13102408.
19. Fujii R, Friedman ER, Richards J, Tsang KY, Heery CR, Schlom J et al. Enhanced killing of chordoma cells by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity employing the novel anti-PD-L1 antibody avelumab. *Oncotarget*. 2016;7(23):33498–511. DOI: 10.18632/oncotarget.9256.
20. Stacchiotti S, Morosi C, Lo Vullo S, Casale A, Palassini E, Frezza AM et al. Imatinib and everolimus in patients with progressing advanced chordoma: A phase 2 clinical study. *Cancer*. 2018;124(20):4056–63. DOI: 10.1002/cncr.31685.
21. Schuetze SM, Bolejack V, Choy E, Ganjoo KN, Staddon AP, Chow WA et al. Phase 2 study of dasatinib in patients with alveolar soft part sarcoma, chondrosarcoma, chordoma, epithelioid sarcoma, or solitary fibrous tumor. *Cancer*. 2017;123(1):90–7. DOI: 10.1002/cncr.30379.
22. Wu X, Lin X, Chen Y, Kong W, Xu J, Yu Z. Response of metastatic chordoma to the immune checkpoint inhibitor pembrolizumab: A case report. *Front Oncol*. 2020;10:565945. DOI: 10.3389/fonc.2020.565945.
23. Zou MX, Peng AB, Lv GH, Wang XB, Li J, She XL et al. Expression of programmed death-1 ligand (PD-L1) in tumor-infiltrating lymphocytes is associated with favorable spinal chordoma prognosis. *Am J Transl Res*. 2016;8(7):3274–87. PMID: 27508049.
24. Feng Y, Shen J, Gao Y, Liao Y, Cote G, Choy E et al. Expression of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) and prevalence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in chordoma. *Oncotarget*. 2015;6(13):11139–49. DOI: 10.18632/oncotarget.3576.
25. Zou MX, Guo KM, Lv GH, Huang W, Li J, Wang XB et al. Clinicopathologic implications of CD8+/Foxp3+ ratio and miR-574-3p/PD-L1 axis in spinal chordoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(2):209–24. DOI: 10.1007/s00262-017-2080-1.

Информация об авторах

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

Ирина Владиславовна Булычева – доктор медицинских наук, врач-патологоанатом НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

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

Никита Сергеевич Бабкин – врач-онколог НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Эльмар Расимович Мусаев – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, руководитель Московского городского научно-практического центра опухолей костей, мягких тканей и кожи МГОБ № 62.

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

Author information

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

Irena V. Boulytcheva – Dr. Sci. (Med.), Pathologist, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0001-7592-4249>

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

Nikita S. Babkin – Oncologist, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology.
<https://orcid.org/0000-0003-1395-5132>

Elmar R. Musaev – Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Moscow City Scientific and Practical Center for Bone, Soft Tissue and Skin Tumors, Moscow City Oncology Hospital No. 62.
<https://orcid.org/0000-0002-1241-3019>

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

Влияние хронической алкогольной интоксикации и постоянного освещения на морфофункциональное состояние печени

Ю.А. Кириллов¹, М.А. Козлова¹, Л.А. Макартеца¹, И.А. Чернов², Д.А. Арешидзе^{1,3}

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, Тюмень, Россия

³ ФГБУН Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия

Введение. Злоупотребление алкоголем – одна из наиболее острых медико-социальных проблем современного общества, сущность которой заключается в увеличении показателей заболеваемости и смертности не только от алкогольной болезни и ее осложнений, но и от ассоциированной с ней коморбидной патологии. Наиболее значительно повреждающее действие этанола и его метаболитов реализуется в печени. Весомым фактором, ведущим к возникновению в ней мелатонин-ассоциированных морфологических проявлений, является нарушение сложившегося в популяции режима света–темноты, так называемое световое загрязнение. При этом алкогольные эксцессы и иные формы алкогольной болезни часто бывают сопряжены с различными нарушениями сна. Целью исследования стало изучение морфофункционального состояния печени крыс линии Вистар при экспериментальной алкогольной интоксикации в условиях фиксированного светового режима и постоянного освещения. **Материалы и методы.** Исследование проведено на 160 самцах крыс, содержащихся при фиксированном световом режиме, постоянном освещении, а также при сочетании обоих световых режимов с одновременной экспериментальной алкогольной интоксикацией. Проведено патоморфологическое исследование печени, установлены морфометрические показатели, плоидность и доля двуядерных гепатоцитов. **Результаты.** Употребление лабораторными животными 15% раствора этанола в качестве питья ad libitum в течение 3 недель при фиксированном световом режиме вызывает развитие в печени жировой дистрофии. На этом фоне изменение фиксированного освещения на постоянное сопровождается возникновением алкогольного гепатита примерно у половины животных. Результаты микроморфометрии свидетельствуют о значительных изменениях исследованных параметров гепатоцитов, наименее выраженных при употреблении этанола в условиях фиксированного освещения и в наибольшей степени затрагивающих клетки паренхимы печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией на фоне постоянного освещения.

Заключение. Алкогольная интоксикация, реализующаяся на фоне дефицита мелатонина, вызванного постоянным освещением, сопровождается значительно большей выраженностью, распространенностью и интенсивностью воспалительных тканевых реакций и разнообразием проявлений патологии печени.

Ключевые слова: гепатоцит, алкоголь, световой режим, стресс, жировая дистрофия

Для корреспонденции: Давид Александрович Арешидзе. E-mail: labcelpat@mail.ru

Для цитирования: Кириллов Ю.А., Козлова М.А., Макартеца Л.А., Чернов И.А., Арешидзе Д.А. Влияние хронической алкогольной интоксикации и постоянного освещения на морфофункциональное состояние печени. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):68–76. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.68-76.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 20.09.2021. Получена после рецензирования 21.10.2021. Принята в печать 16.12.2021.

The effect of chronic alcohol intoxication and constant illumination on the morphological and functional state of the liver

Yu.A. Kirillov¹, M.A. Kozlova¹, L.A. Makartseva¹, I.A. Chernov², D.A. Areshidze^{1,3}

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² Tyumen State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Tyumen, Russia

³ Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Science, Chernogolovka, Russia

Introduction. Alcohol abuse is one of major health and social problems of modern society, the essence of which is an increase in morbidity and mortality not only from alcohol misuse and its complications, but also from associated comorbid pathologies. The liver is the organ that is affected most by ethanol and its

metabolites. A significant factor leading to melatonin-associated morphological manifestations in the liver is the so-called light pollution, a violation of the light–dark regime. At the same time, heavy consumption of alcohol over a short period of time (alcoholic excesses) and other forms of alcoholic illness are often associated with various sleep disorders. The aim of the study was to investigate the morphological and functional state of the liver of Wistar rats under experimental alcohol intoxication in conditions of a fixed light regime and constant illumination.

Materials and methods. Male rats (n=160) were kept under a fixed light regime, constant illumination, and at a combination of both light regimes with simultaneous experimental alcohol intoxication. We performed a pathological examination of the liver and determined morphometric parameters, hepatocyte ploidy, and the proportion of binuclear hepatocytes.

Results. The consumption of 15% ethanol solution as a drink *ad libitum* for 3 weeks at a fixed light regime causes the development of fatty degeneration in the liver of laboratory animals. Secondary to it, changing lighting from fixed to constant is accompanied by the development of alcoholic hepatitis in about half of the animals. The results of micromorphometry indicate significant changes in the studied parameters of hepatocytes, which are expressed least of all in the case of ethanol consumption under fixed lighting conditions and affect most the cells of the liver parenchyma of rats with chronic alcohol intoxication secondary to constant lighting.

Conclusion. Alcohol intoxication that occurs secondary to a melatonin deficiency caused by constant lighting is accompanied by a much greater severity, prevalence, and intensity of inflammatory tissue reactions and a variety of manifestations of liver pathology.

Keywords: hepatocyte, alcohol, lighting regime, stress, fatty degeneration

Corresponding author: David A. Areshidze. E-mail: labelpat@mail.ru

For citation: Kirillov Yu.A., Kozlova M.A., Makartseva L.A., Chernov I.A., Areshidze D.A. The effect of chronic alcohol intoxication and constant illumination on the morphological and functional state of the liver. *Clin. exp. morphology.* 2021;10(S4):68–76. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.68-76 (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 20.09.2021. Received in revised form 21.10.2021. Accepted 16.12.2021.

Введение

Злоупотребление алкоголем – одна из наиболее острых медико-социальных проблем современного общества. При этом внимание специалистов в основном сосредоточено на пациентах, страдающих заключительной стадией алкогольной болезни, хотя значительная часть людей (до 90% от общего числа подтвержденных хронической алкогольной интоксикации, ХАИ), злоупотребляющих алкоголем в течение длительного времени, остается в этом статусе, не достигая стадии алкоголизма [1]. Одним из органов, в которых в условиях алкогольной интоксикации наиболее значительно проявляется повреждающее действие этанола и его метаболитов, является печень, а нарушение ее функций сказывается на метаболизме других систем организма [2].

Печень также служит местом реализации многочисленных мелатонин-ассоциированных эффектов, имеющих морфологическое проявление и возникающих вследствие нарушения режима света–темноты, так называемого светового загрязнения. В частности, мелатонин проявляет гепатопротекторные свойства при нарушениях углеводного и жирового обмена, холангиопатии, фиброзе, поражении органа при ишемии–реперфузии и разнообразных токсических повреждениях [3]. Также этот гормон принимает участие в регуляции процессов апоптоза и пролиферации гепатоцитов [4]. В силу ряда социальных причин человек в настоящее

время подвергается обильному воздействию искусственного освещения в темное время суток, что помимо сильного стрессорного воздействия может привести к развитию десинхроноза [5]. В свою очередь, и алкоголь обладает выраженным хронотоксическим действием, вызывая десинхроноз [6–8].

Резонно предположить, что сочетание нарушения светового режима и ХАИ может привести к более выраженным изменениям в строении и функциональном состоянии печени, чем воздействие каждого из них в отдельности. Значимыми параметрами для оценки состояния печени являются совокупность микроморфометрических параметров гепатоцитов, а также их плоидность [9].

В связи с этим целью настоящего исследования стало изучение морфофункционального состояния печени крыс линии Вистар при экспериментальной алкогольной интоксикации в условиях фиксированного светового режима и постоянного освещения.

Материалы и методы

Животные

Исследование проведено на 160 самцах крыс линии Вистар в возрасте 6 месяцев массой 300±20 граммов, полученных из питомника НЦБМТ ФМБА России «Столбовая».

Дизайн эксперимента

Все лабораторные животные были разделены на четыре равные группы (по 40 особей в каждой) и содержались в стандартных лабораторных условиях (пластиковые клетки, свободный доступ к питью и пище) в течение 3 недель.

Животных контрольной группы содержали при фиксированном световом режиме (свет–темнота 10:14 часов с включением света в 08.00 и выключением в 18.00).

Животным 1-й группы при сохранении светового режима, установленного для особей контрольной группы, в качестве питья был предоставлен 15% водный раствор этанола *ad libitum*.

2-ю группу животных содержали при постоянном освещении.

Режим участия в эксперименте животных 3-й группы предусматривал их нахождение при постоянном освещении и использовании в качестве питья 15% водного раствора этанола *ad libitum*.

Критерием отбора крыс в исследование наряду с отсутствием видимых отклонений в состоянии здоровья и поведении было исходное предпочтение 15% раствора этилового спирта водопроводной воде, установленное в предварительном эксперименте с предоставлением свободного доступа к обеим жидкостям.

Выведение из эксперимента осуществляли спустя 3 недели после его начала в углекислотной камере, оборудованной устройством для верхней подачи газа (100% CO₂) в 09.00, 15.00, 21.00 и 03.00. Заполнение объема камеры газом производили со скоростью 20% в минуту во избежание возникновения у животных диспноэ и боли. Предварительно им измеряли ректальную температуру.

После выведения животных из эксперимента проводили эвисцерацию, печень фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, образцы заливали в парафин, полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином, микрофуксином по ван Гизону–Фуше. Для идентификации жировой дистрофии использовали стандартное селективное окрашивание замороженных срезов раствором судана-III в 70% этиловом спирте. Для плоидометрии изготавливали мазки-отпечатки печени, которые окрашивали по Фельгену; для установления контрольных значений плоидности (2n), то есть диплоидного набора хромосом, аналогично окрашивали ДНК ядер малых лимфоцитов. Плоидность гепатоцитов рассчитывали в единицах плоидности относительно оптической плотности результатов окрашивания диплоидных ядер малых лимфоцитов [10]. Также определяли долю двуядерных гепатоцитов.

Микроскопию гистологических препаратов проводили на цифровом микроскопе Nikon Eclipse 80I с применением цифровой фотокамеры Nikon DI-FI (Nikon, Япония). С каждого исследованного препарата выполняли по 10 цифровых снимков случайно выбранных полей зрения при $\times 400$, $\times 1000$, которые в дальнейшем использовали для карио- и цитометрии. Для проведения морфометрических исследований применяли про-

грамму ImageJ (США) с использованием библиотеки плагинов MorphoLibJ. Осуществляли микроморфометрию гепатоцитов без признаков патологических изменений. Определяли площадь поперечного сечения ядра (площадь ядра, S_я), короткий (d) и длинный (D) диаметры ядра, периметр ядра (P_я), площадь поперечного сечения клетки (площадь клетки, S_{кел}), короткий (a) и длинный (b) диаметры клетки [10–13].

В дальнейшем с помощью соответствующих формул вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО), объем ядер, объем клеток, отношение объема ядра к площади ядра (V/A коэффициент), индекс удлинненности ядра, индекс контура ядра и коэффициент формы ядра [14, 15].

Иммуногистохимически исследовали экспрессию белка Ki-67, для чего использовали первичные кроличьи поликлональные антитела (Cloud-Clone Corp., США), 1:300. Срезы инкубировали с антителами в течение 60 минут при комнатной температуре. В качестве системы детекции применяли набор UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific, США). Контролем служили реакции с заменой первичных антител на раствор фосфатного буфера. Оценку проводили в 4 полях зрения при $\times 400$. На препаратах подсчитывали ядра гепатоцитов, окрашенные с помощью антител, затем вычисляли соответствующий индекс как отношение числа окрашенных ядер гепатоцитов к их общему числу в процентах.

Все эксперименты проведены в соответствии с требованиями директивы ЕС 86/609/ЕЕС и российского законодательства, регулирующего эксперименты на животных. Эксперимент одобрен этическим комитетом Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына (протокол № 27/3 от 11.10.2021).

Методы статистической обработки

Полученные данные анализировали с использованием программы Graph Pad Prism 6.0 путем расчета средних величин, стандартного отклонения, средней ошибки средней арифметической. Статистическую разницу определяли с использованием теста Краскела–Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Исследование среднесуточных значений микроморфометрических и иммуногистохимических параметров гепатоцитов

Периметр ядер гепатоцитов, площадь их поперечного сечения и объем в 1-й и 2-й экспериментальных группах практически соответствовали показателям контроля, но в 3-й экспериментальной группе отмечено существенное достоверное снижение этих параметров относительно контроля (табл.). В то же время значение ЯЦО было наименьшим, а среднего диаметра ядра ге-

Результаты микроморфометрических исследований гепатоцитов крыс |
Results of micromorphometric study of hepatocytes of rats

	Контроль Control	1-я группа Group 1	2-я группа Group 2	3-я группа Group 3
Площадь поперечного сечения ядра, мкм ² Cross-sectional area of the nucleus, μm ²	41,79±8,13	42,65±4,80	42,72±5,63	35,50±3,01***
Объем ядра, мкм ³ Volume of the nucleus, μm ³	205,90±59,54	210,51±35,39	211,30±41,67	159,59±20,23***
Отношение объема ядра к площади ядра (V/A коэффициент) Volume of the nucleus to nucleus area ratio (V/A coefficient)	4,84±0,47	4,90±0,27	4,90±0,12***	4,48±0,19**
Периметр ядра, мкм Perimeter of the nucleus, μm	14,96±4,78	15,34±4,78	15,11±3,39	9,59±2,49***
Длинный диаметр ядра, мкм Long diameter of the nucleus, μm	7,98±0,58	8,04±0,50	8,26±0,55	7,78±0,52
Короткий диаметр ядра, мкм Small diameter of the nucleus, μm	6,52±0,51	6,63±0,58	7,29±0,61***	6,56±0,38
Средний диаметр ядра, мкм Mean diameter of the nucleus, μm	7,25±0,91	7,34±0,89	7,77±0,75***	7,17±0,76
Индекс удлинненности ядра Elongation index of the nucleus	1,23±0,06	1,22±0,08	1,14±0,05***	1,19±0,07
Коэффициент формы Coefficient of form	2,35±0,11	2,28±0,15	2,35±0,11	4,85±0,17*
Индекс контура Contour index	2,31±0,10	2,35±0,13	2,31±0,11	1,61±0,18***
Площадь поперечного сечения клетки, мкм ² Cross-sectional area of cell, μm ²	185,80±31,95	190,10±34,03	261,90±55,30***	184,80±21,67
Объем клетки, мкм ³ Volume of the cell, μm ³	1926,01±486,21	1994,02±510,02	3317,21±818,81***	1898,25±326,85
ЯЦО N:C ratio	0,230±0,056	0,233±0,055	0,162±0,022***	0,194±0,018**
Плоидность гепатоцитов, n Ploidy of hepatocytes, n	4,47±2,12n	5,02±2,18n	4,04±2,16n*	5,18±2,14n
Доля двуядерных гепатоцитов, % Proportion of binuclear hepatocytes, %	7,44±2,66	8,92±3,60	4,73±2,03**	6,51±2,56

* (p≤0,05); ** (p≤0,005); *** (p≤0,0005) – в сравнении с показателями контрольной группы

* (p≤0,05); ** (p≤0,005); *** (p≤0,0005) – in comparison with the parameters of the control group

патоцитов, напротив, достоверно наибольшим во 2-й экспериментальной группе.

Во 2-й опытной группе отмечено также увеличение короткого и среднего диаметров ядер гепатоцитов, что свидетельствовало об изменении индекса удлинненности и формы ядер. В гепатоцитах крыс 3-й экспериментальной группы по сравнению с контролем были существенно снижены значения площади поперечного сечения, периметра, объема ядра, ЯЦО, а также отношения объема ядра к его площади. Сочетанное воздействие этанола и постоянного освещения выразилось в снижении средних показателей площади поперечного сечения клеток и периметра ядра по сравнению со 2-й группой.

Изменения плоидности гепатоцитов и доли двуядерных клеток отмечены во всех экспериментальных группах. При этом максимальный показатель плоидности зафиксирован у особей 3-й экспериментальной группы, а доля двуядерных гепатоцитов была наибольшей в 1-й, однако к статистически значимым могли быть отнесены лишь показатели животных 2-й экспериментальной группы.

В печени крыс контрольной группы число Ki-67⁺ гепатоцитов было крайне незначительным – 1,0±0,17%. Среди гепатоцитов 1-й и 2-й экспериментальных групп доля пролиферирующих клеток была также невелика – 1,03±0,15% и 1,35±0,50%, соответственно. В 3-й экспериментальной группе обнаружено существенное увеличение числа Ki-67⁺ гепатоцитов – до 5,73±0,35%.

Исследование морфологического состояния печени

На светооптическом уровне печень особей контрольной группы соответствовала возрастной норме (рис. 1 А). В печени животных 1-й экспериментальной группы (рис. 1 В) обнаружены проявления мелкокапельной жировой дистрофии, умеренное расширение синусоидов, отек стромы, некроз и апоптоз единичных гепатоцитов (рис. 2 А).

В печени особей 2-й экспериментальной группы наблюдали белковую дистрофию гепатоцитов и очаговую клеточную инфильтрацию по ходу синусоидов (рис. 1 С).

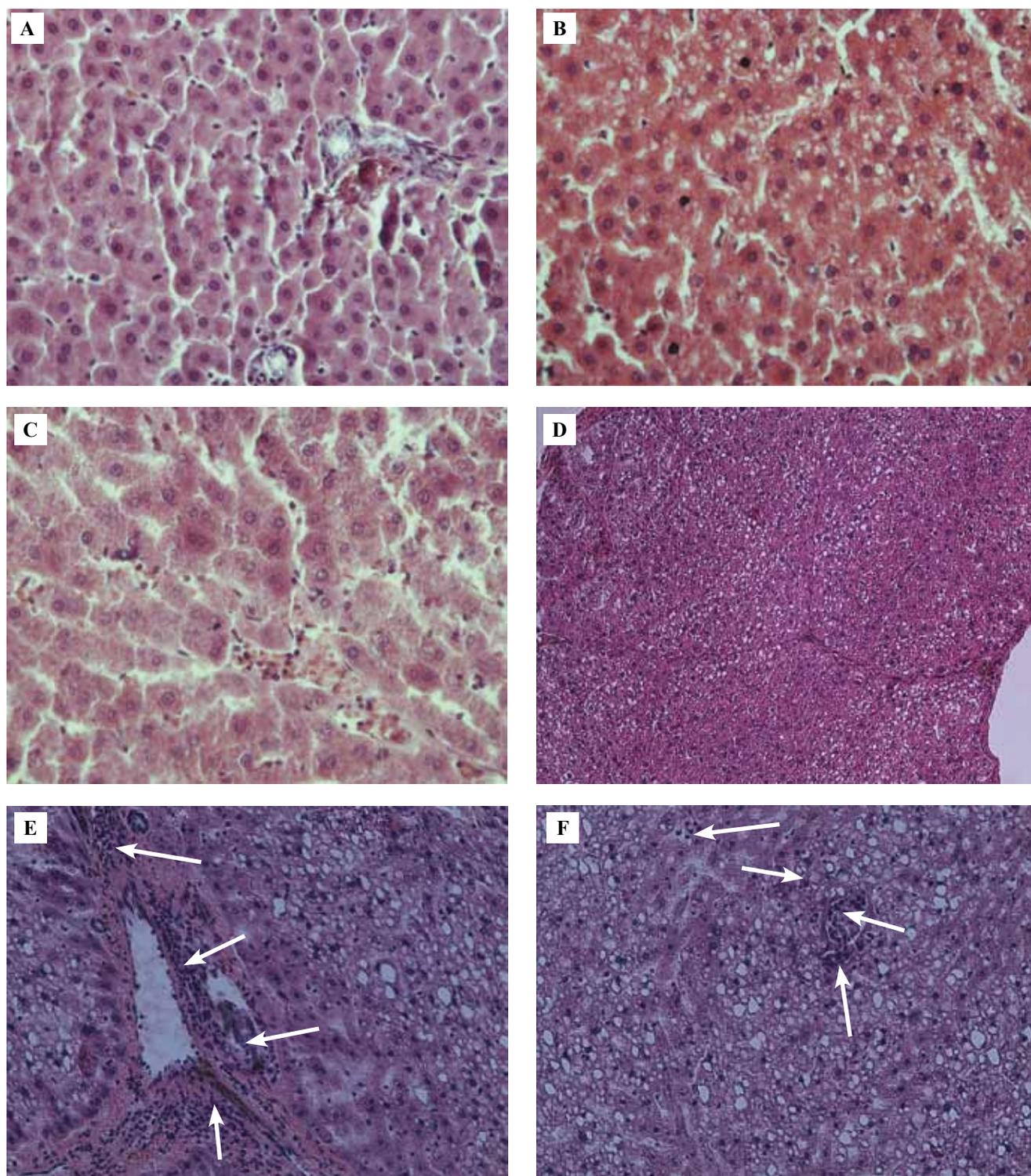


Рис. 1. Печень крыс. А – контрольная группа, В – 1-я экспериментальная группа, С – 2-я экспериментальная группа, D, E, F – 3-я экспериментальная группа, стрелками указаны скопления воспалительного инфильтрата. G – печень крыс 3-й экспериментальной группы, стрелками обозначены тельца Мэллори–Денка. H – скопления липофуцина в гепатоцитах крыс 3-й экспериментальной группы. Окраска гематоксилином и эозином. А, В, С, E, F, G, H $\times 400$, D $\times 200$

Fig. 1. Liver of rats. A – control group, B – experimental group 1, C – experimental group 2, D, E, F – experimental group 3, arrows show the accumulations of inflammatory infiltrate. G – livers of rats of experimental group 3, arrows indicate the Mallory–Denk bodies, H – lipofuscin aggregates in hepatocytes of rats of experimental group 3. H&E stain. A, B, C, E, F, G, H $\times 400$, D $\times 200$

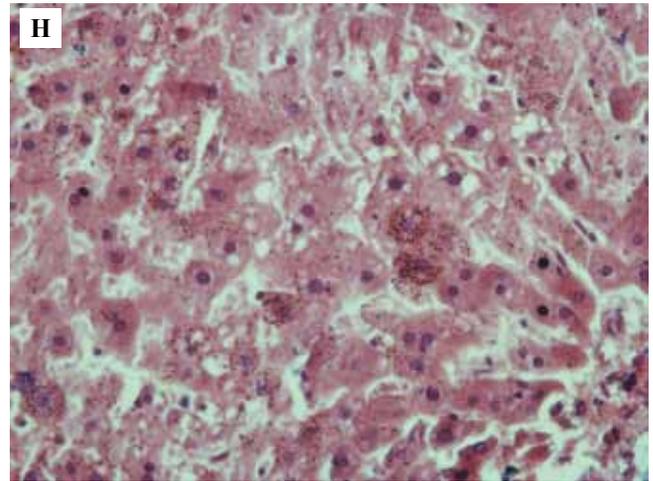
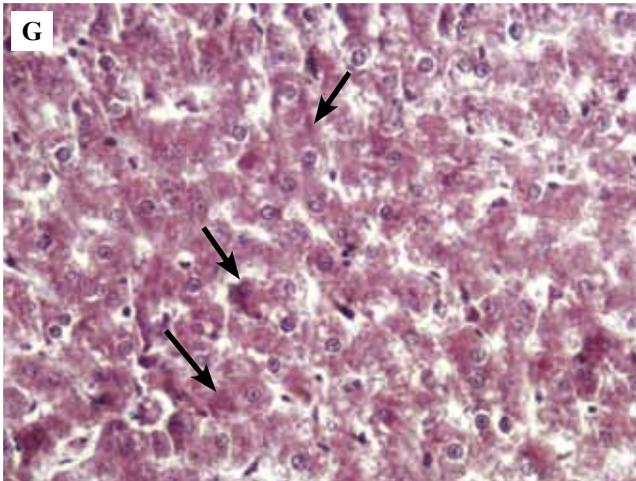


Рис. 1 (окончание)
Fig. 1 (end)

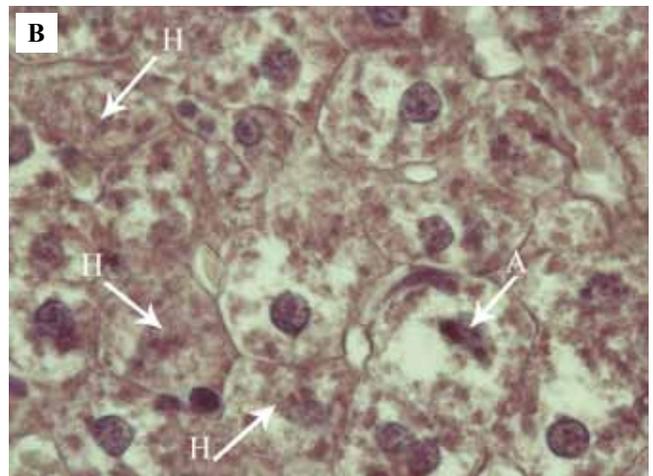
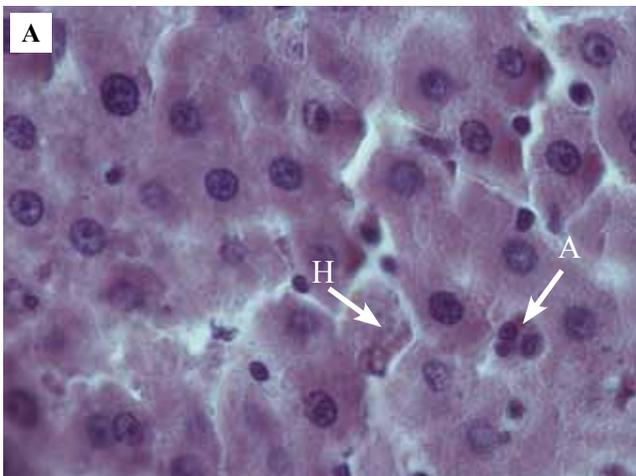


Рис. 2. Печень крыс. А – 1-я экспериментальная группа, В – 3-я экспериментальная группа. Стрелками обозначены клетки в состоянии апоптоза (А), некроза (Н). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$
Fig. 2. Liver of rats. А – experimental group 1, В – experimental group 2. Arrows indicate cells in the state of apoptosis (А), necrosis (Н). H&E staining, $\times 1000$

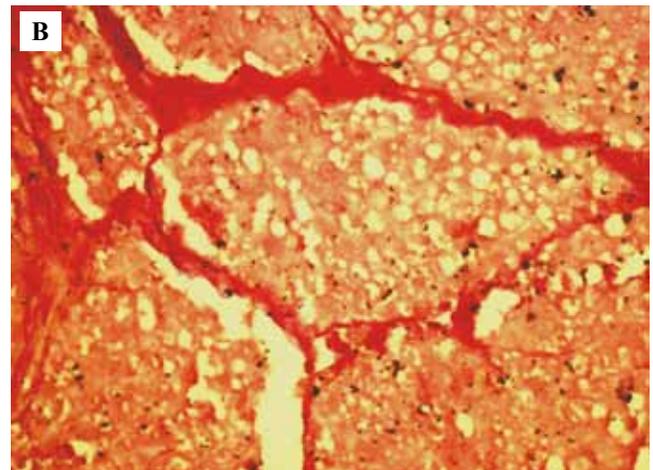
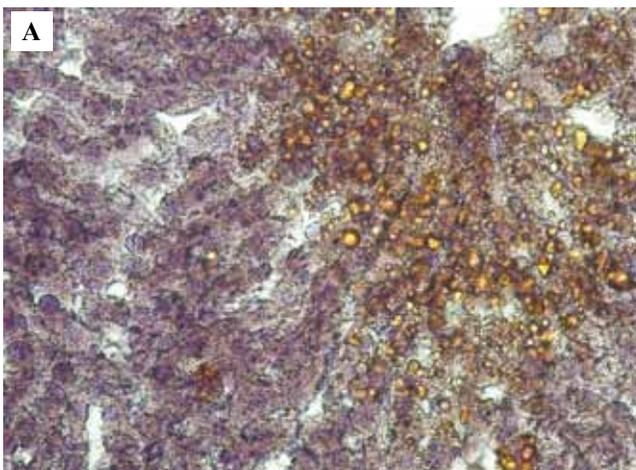


Рис. 3. А – липидосодержащие вакуоли в клетках печени животных 3-й экспериментальной группы. Окраска суданом-III с докраской гематоксилином, $\times 200$. В – ложная долька, образованная прослойками соединительной ткани в печени животных 3-й экспериментальной группы. Окраска пикрофуксином по ван Гизону–Фуше, $\times 200$
Fig. 3. А – lipid-containing vacuoles in the liver cells of animals of experimental group 3. Sudan III staining with hematoxylin after stain, $\times 200$. В – false lobule formed with connective tissue layers in the livers of animals of experimental group 3. Van Gieson–Fouchet picrofuchsin staining, $\times 200$

В половине случаев в печени крыс 3-й экспериментальной группы обнаружены очаговая, а местами распространенная мелко- и крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов (рис. 1 D), дисконфракция печеночных балок, инфильтрация портальных трактов нейтрофильными лейкоцитами и макрофагами (рис. 1 E, F). В другой части случаев выявлены гепатоциты, содержавшие в цитоплазме включения липофусцина (15% случаев) и тельца Мэллори–Денка (10% случаев) (рис. 1 G, H), многочисленные некротизированные клетки, а также гепатоциты, находившиеся в состоянии апоптоза (рис. 2 B). В двух наблюдениях отметили преобладание мелко- и крупнокапельной жировой дистрофии (рис. 3 A), нарушение балочного строения печени с появлением мелких узлов-регенератов, разделенных узкими прослойками соединительной ткани (рис. 3 B).

Обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что алкогольная интоксикация в течение 3 недель в условиях фиксированного светового режима обусловила реализацию комплекса стереотипных морфологических изменений в паренхиме печени. Сущность и особенности альтеративных и эксудативных проявлений и механизм токсического воздействия этанола и его метаболитов на структуры печени подробно изложены в работах В.С. Паукова и его учеников [2]. В то же время воздействие этанола не вызвало существенных изменений большинства исследованных микроморфометрических параметров гепатоцитов, что связано, по-видимому, с его непродолжительным воздействием на печень. Вместе с тем доля двуядерных гепатоцитов в данной экспериментальной группе была наибольшей, что может быть расценено в качестве предтечи инициации пролиферативной реакции в органе.

В печени крыс 2-й экспериментальной группы обнаружены существенные отклонения отдельных показателей от значений контрольной группы (увеличение площади и объема гепатоцитов, диаметров ядер и т.д.), а также уменьшение плоидности и снижение доли двуядерных клеток. Есть мнение, что в отдельных случаях это наблюдается при снижении интенсивности пролиферативных процессов [16]. Темновая депривация также сопровождается отсутствием многих эффектов мелатонина. Если в условиях стандартного светового режима мелатонин обладает способностью активировать пролиферацию гепатоцитов за счет ингибирования IKK α , JNK1 и cJUN (c-Jun N-terminal kinases), угнетающих митотическую и апоптотическую активность [17], то в отсутствие эпифизарного мелатонина наблюдается их резкое снижение [18]. Известно, что одним из эффектов мелатонина является увеличение плоидности и доли двуядерных гепатоцитов [19, 20], а эпифизэктомия снижает интенсивность пролиферации в печени после ее частичной резекции [21].

Увеличение площади и объема гепатоцитов обычно связывают с повышением уровня гормонов стресса. Стимуляция α 1-адренорецепторов увеличивает ядерный объем гепатоцитов и плотность ядрышек вследствие высвобождения внутриклеточного Ca²⁺ и последующей активации ДНК-полимеразы. Помимо этого эндотоксины и ФНО α увеличивают объем гепатоцитов за счет активации сигнальных путей и задержки Na⁺ и воды [22, 23].

Набухание гепатоцитов увеличивает экскрецию желчи и имеет гепатопротективный эффект [24], вызывает анаболический ответ, считается своеобразным триггером, запускающим подавление пролиферации при регенерации клеток печени [25].

Развитие мелкокапельной жировой дистрофии в гепатоцитах при стрессе коррелирует с продолжительностью стрессорного воздействия [26, 27], ассоциируется с повышением уровня гормонов коры надпочечников, в первую очередь глюкокортикоидов, что вызывает усиление экспрессии серотониновых рецепторов 5-HT_{2A} и 5-HT_{2B}, триптофангидроксилазы 1 и синтеза серотонина [28]. Накопление гепатоцитами липидных капель при стрессе сопровождается усилением экспрессии генов липолиза и β -окисления жирных кислот [29, 30].

Увеличение среднего диаметра ядер при одновременном уменьшении их индекса удлинённости и тенденции к увеличению размеров свидетельствует о развитии паранекроза [31, 32].

В гепатоцитах крыс 3-й экспериментальной группы отклонения величин исследованных кариометрических параметров (уменьшение площади поперечного сечения, периметра и объема ядра, снижение ЯЦО, а также отношения объема ядра к площади, рост доли двуядерных гепатоцитов) от показателей контроля носят более выраженный характер. Вместе с тем снижение индекса контура на фоне возросшего коэффициента формы очевидно свидетельствует о большей выраженности альтеративных процессов вследствие кумуляции токсического воздействия этанола и его метаболитов в результате отсутствия мелатонин-ассоциированных эффектов [33].

В то же время в гепатоцитах животных данной группы имеет место существенное увеличение экспрессии Ki-67, что свидетельствует об интенсификации пролиферативного процесса.

Заключение

Анализ патоморфологических изменений печени позволил установить, что совместное влияние двух факторов – постоянного освещения и алкогольной интоксикации в течение 3 недель вызывает выраженные альтеративные изменения в структуре органа у всех животных.

Токсическое воздействие этанола и его метаболитов в условиях стандартного фиксированного светового режима приводит к развитию альтеративных (жировая дистрофия, некроз гепатоцитов), эксудативных (рас-

стройства кровообращения, отек) и пролиферативных (увеличение доли двуядерных гепатоцитов) изменений, наблюдаемых у 70% животных. Алкогольная интоксикация, реализующаяся на фоне дефицита мелатонина, вызванного постоянным освещением, сопровождается значительно большей выраженностью, распространенностью, интенсивностью воспалительных тканевых реакций и разнообразием проявлений патологии печени у всех животных. В этих условиях понимание сущности моделированной патологии открывает перспективы как этиотропного лечения, так и патогенетического таргетирования.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Ю.А. Кириллов,

Д.А. Арешидзе

Сбор и обработка материала – М.А. Козлова, Л.А. Макарецова, И.А. Чернов.

Написание текста – М.А. Козлова.

Редактирование – Ю.А. Кириллов, Д.А. Арешидзе.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Yu.A. Kirillov, D.A. Areshidze.

Collected the data and performed the analysis – M.A. Kozlova, L.A. Makartseva, I.A. Chernov.

Wrote the paper – M.A. Kozlova.

Edited the manuscript – Yu.A. Kirillov, D.A. Areshidze.

Литература/References

1. Лебедева-Несебря Н.А., Жданова-Заплевичко И.Г., Рерке В.И., Барг А.О. Потребление алкоголя как фактор риска здоровью населения: обзор российских исследований. Анализ риска здоровью. 2017;4:147–160. DOI: 10.21668/health.risk/2017.4.15. Lebedeva-Nesevrya NA, Zhdanova-Zaplevichko IG, Rerke VI, Barg AO. Alcohol consumption as a factor causing risks for population health (Russian research review). Health Risk Analysis. 2017;4:147–160 (In Russ.). DOI: 10.21668/health.risk/2017.4.15.
2. Пауков В.С., Ерохин Ю.А. Патологическая анатомия алкогольной болезни. Альманах клинической медицины. 2020;48(2):84–93. DOI: 10.18786/2072-0505-2020-48-015. Paukov VS, Erokhin Yu.A. The pathological anatomy of alcoholic disease. Almanac of Clinical Medicine. 2020;48(2):84–93 (In Russ.). DOI: 10.18786/2072-0505-2020-48-015.
3. Арушанян Э.Б. Мелатонин и деятельность печени. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2018;81(11):32–37. DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-11-32-37. Arushanyan EB. Melatonin and liver activity. Experimental and Clinical Pharmacology. 2018;81(11):32–37 (In Russ.). DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-11-32-37.
4. Majidinia M, Reiter RJ, Shakouri SK, Mohebbi I, Rastegar M, Kaviani M et al. The multiple functions of melatonin in regenerative medicine. Ageing Res Rev. 2018;45:33–52. DOI: 10.1016/j.arr.2018.04.003.
5. Fárková E, Schneider J, Šmotek M, Bakštein E, Herlesová J, Koprřivová J et al. Weight loss in conservative treatment of obesity in women is associated with physical activity and circadian phenotype: A longitudinal observational study. Biopsychosoc Med. 2019;13:24. DOI: 10.1186/s13030-019-0163-2.
6. Kovanen L, Saarikoski ST, Haukka J, Pirkola S, Aromaa A, Lönnqvist J et al. Circadian clock gene polymorphisms in alcohol use disorders and alcohol consumption. Alcohol Alcohol. 2010;45(4):303–11. DOI: 10.1093/alcal/agq035.
7. Hasler BP, Soehner AM, Clark DB. Sleep and circadian contributions to adolescent alcohol use disorder. Alcohol. 2015;49(4):377–87. DOI: 10.1016/j.alcohol.2014.06.010.
8. Seggio JA, Fixaris MC, Reed JD, Logan RW, Rosenwasser AM. Chronic ethanol intake alters circadian phase shifting and free-running period in mice. J Biol Rhythms. 2009;24(4):304–12. DOI: 10.1177/0748730409338449.
9. Junatas KL, Tonar Z, Kubíková T, Liška V, Pálek R, Mik P et al. Stereological analysis of size and density of hepatocytes in the porcine liver. J Anat. 2017;230(4):575–88. DOI: 10.1111/joa.12585.
10. Автандилов Г.Г. Диагностическая медицинская плоидометрия: Учебное пособие. Москва: Медицина, 2006. 191 с. Avtandilov GG Diagnostic medical ploidyometry: Tutorial. Moscow: Medicina, 2006. 191 p. (In Russ.).
11. Legland D, Arganda-Carreras I, Andrey P. MorphoLibJ: Integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. Bioinformatics. 2016;32(22):3532–4. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw413.
12. Soille P. Morphological image analysis: Principles and applications. 2nd ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 2013. 392 p. DOI:10.1007/978-3-662-05088-0.
13. Худоевков Р.М. Методы компьютерной морфометрии в нейроморфологии: Учебное пособие. Москва: ФГБУ НЦН РАМН, 2014. 53 с. Khudoerkov RM. Methods of computer morphometry in neuro-morphology: Tutorial. Moscow: Scientific Center of Neurology of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014. 53 p. (In Russ.)
14. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии: Учебное пособие. Москва: Медицина, 2002. 240 с. Avtandilov GG. Fundamentals of Quantitative Pathological Anatomy: Tutorial. Moscow: Medicina, 2002. 240 p. (In Russ.)
15. Smitha T, Sharada P, Girish H. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis. J Oral Maxillofac Pathol. 2011;15(1):26–33. DOI: 10.4103/0973-029X.80034.
16. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. Curr Biol. 2012;22(13):1166–75. DOI:10.1016/j.cub.2012.05.016.
17. Stiegler P, Bausys A, Leber B, Strupas K, Schemmer P. Impact of melatonin in solid organ transplantation – is it time for clinical trials? A comprehensive review. Int J Mol Sci. 2018;19(11):3509. DOI:10.3390/ijms19113509.
18. Liang R, Nickkholgh A, Hoffmann K, Kern M, Schneider H, Sobirey M et al. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. J Pineal Res. 2009;46(1):8–14. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2008.00596.x.
19. Zavodnik LB, Zavodnik IB, Lapshina EA, Belonovskaya EB, Martinchik DI, Kravchuk RI et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. Cell Biochem Funct. 2005;23(5):353–9. DOI: 10.1002/cbf.1160.

20. *Mathes AM*. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors. *World J Gastroenterol*. 2010;16(48):6087–97. DOI: 10.3748/wjg.v16.i48.6087.
21. *Abbasoglu O, Berker M, Ayhan A, Palaoglu S, Sayek I*. The effect of the pineal gland on liver regeneration in rats. *J Hepatol*. 1995;23(5):578–81. DOI: 10.1016/0168-8278(95)80065-4.
22. *Wilkinson PD, Duncan AW*. Differential roles for diploid and polyploid hepatocytes in acute and chronic liver injury. *Semin Liver Dis*. 2020;41(1):42–9. DOI: 10.1055/s-0040-1719175.
23. *Kobayashi T, Saito Y, Ohtake Y, Maruko A, Yamamoto Y, Yamamoto F et al*. Effect of aging on norepinephrine-related proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(7):G861–9. DOI: 10.1152/ajpgi.00081.2012.
24. *Häussinger D, Graf D, Weiergräber O.H*. Glutamine and cell signaling in liver. *J Nutr*. 2001;131(9 Suppl):2509S–14S; discussion 2523S–4S. DOI:10.1093/jn/131.9.2509S.
25. *Bardeck N, Paluschinski M, Castoldi M, Luedde T, Häussinger D, vom Dahl S et al*. Liver cell swelling leads to upregulation of miR-141-3p in perfused rat liver and primary rat hepatocytes. *Z Gastroenterol*. 2021;59(01):1–16. DOI: 10.1055/s-0040-1721965.
26. *Lang F*. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr*. 2007;26(5 Suppl):613S–623S. DOI: 10.1080/07315724.2007.10719667.
27. *Corona-Pérez A, Díaz-Muñoz M, Rodríguez IS, Cuevas E, Martínez-Gómez M, Castelán et al*. High sucrose intake ameliorates the accumulation of hepatic triacylglycerol promoted by restraint stress in young rats. *Lipids*. 2015;50(11):1103–13. DOI: 10.1007/s11745-015-4066-0.
28. *Vásquez B, Sandoval C, Smith RL, del Sol M*. Effects of early and late adverse experiences on morphological characteristics of Sprague–Dawley rat liver subjected to stress during adulthood. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(8):4627–35. PMID: 25197335.
29. *Fu J, Ma S, Li X, An S, Li T, Guo K et al*. Long-term stress with hyperglucocorticoidemia-induced hepatic steatosis with VLDL overproduction is dependent on both 5-HT2 receptor and 5-HT synthesis in liver. *Int J Biol Sci*. 2016;12(2):219–34. DOI: 10.7150/ijbs.13062.
30. *Konstandi M, Shah YM, Matsubara T, Gonzalez FJ*. Role of PPAR α and HNF4 α in stress-mediated alterations in lipid homeostasis. *PLoS One*. 2013;8(8):e70675. DOI: 10.1371/journal.pone.0070675.
31. *Schott MB, Rasineni K, Weller SG, Schulze RJ, Sletten AC, Casey CA et al*. β -Adrenergic induction of lipolysis in hepatocytes is inhibited by ethanol exposure. *J Biol Chem*. 2017;292(28):11815–28. DOI: 10.1074/jbc.M117.777748.
32. *Rodrigues FM, Adélio JI, Santana VO, De Marco Ornelas E, de Souza RR, Cardoso CG et al*. Physical exercise alters hepatic morphology of low-density lipoprotein receptor knockout ovariectomized mice. *Med Mol Morphol*. 2019;52(1):15–22. DOI: 10.1007/s00795-018-0198-7.
33. *Tsomaia K, Patarashvili L, Karumidze N, Bebiashvili I, Azmaipharashvili E, Modebadze I et al*. Liver structural transformation after partial hepatectomy and repeated partial hepatectomy in rats: A renewed view on liver regeneration. *World J Gastroenterol*. 2020;26(27):3899–916. DOI: 10.3748/wjg.v26.i27.3899.

Информация об авторах

Юрий Александрович Кириллов – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Мария Александровна Козлова – научный сотрудник лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Людмила Андреевна Макарецва – младший научный сотрудник лаборатории патологии клетки НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Игорь Алексеевич Чернов – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой патологической анатомии и судебной медицины Тюменского ГМУ.

Давид Александрович Арешидзе – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией патологии клетки НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, ведущий научный сотрудник лаборатории физико-химической биологии физиологически активных соединений Института проблем химической физики РАН.

Author information

Yuri A. Kirillov – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Clinical Morphology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0003-3555-0902>

Maria A. Kozlova – Researcher, Laboratory of Cell Pathology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0001-6251-2560>

Lyudmila A. Makartseva – Junior Researcher, Laboratory of Cell Pathology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology. <https://orcid.org/0000-0002-1882-8848>

Igor A. Chernov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Tyumen State Medical University. <https://orcid.org/0000-0002-6475-5731>

David A. Areshidze – Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Cell Pathology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology; Leading Researcher of the Laboratory of Physicochemical Biology of Physiologically Active Compounds, Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences. <https://orcid.org/0000-0003-3006-6281>

Морфологическая характеристика нефротоксического действия доксорубина и наносомальной формы поли-лактид-ко-гликолид (PLGA)-доксорубина

И.С. Цветков¹, Н.А. Золотова¹, А.М. Косырева¹, Д.Ш. Джалилова¹, В.В. Куделькина¹, В.П. Черников¹, В.А. Мхитаров¹, Л.П. Михайлова¹, Н.И. Соболева², В.А. Разживина³, М.Т. Добрынина⁴, С.Э. Гельперина^{3,5}, О.В. Макарова^{1,4}

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Москва, Россия

² ФГБУ Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия

³ ООО «Технология лекарств», Химки, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Доксорубин – противоопухолевый химиотерапевтический препарат, который оказывает кардиотоксическое, гепатотоксическое и нефротоксическое действие. Для снижения токсических эффектов доксорубина разработана его наносомальная форма – PLGA-доксорубин (Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)). PLGA – биоразлагаемый полимер, применяемый как средство доставки лекарственных веществ. Нефротоксическое действие PLGA-доксорубина не изучено. Цель исследования – провести в эксперименте сравнительную оценку нефротоксического эффекта терапевтических доз доксорубина в стандартной форме (Докс) или PLGA-доксорубина (PLGA-Докс).

Материалы и методы. Половозрелым самцам крыс Вистар внутривенно трехкратно вводили раствор Докс или PLGA-Докс в терапевтической дозе 1,75 мг/кг. Животных выводили из эксперимента на 8-е и 21-е сутки. Проводили морфологическое, гистохимическое и ультраструктурное исследование почки.

Результаты. При воздействии Докс или PLGA-Докс в почках на 8-е и 21-е сутки эксперимента при гистологическом и ультраструктурном исследовании были выявлены дистрофические изменения проксимальных канальцев с разрушением щеточной каемки, в дистальных канальцах и собирательных трубочках – белковые цилиндры. Дистрофические изменения на 21-е сутки были более выражены, чем на 8-е. В оба срока эксперимента PLGA-Докс вызывал менее выраженные дистрофические изменения эпителия, чем при введении Докс, что подтверждается морфометрической оценкой числа проксимальных канальцев с разрушенной щеточной каемкой.

Заключение. Наносомальная форма PLGA-доксорубин по сравнению с доксорубином в стандартной форме оказывает менее выраженное нефротоксическое действие.

Ключевые слова: нефротоксическое действие, доксорубин, наночастицы, PLGA, морфология

Для корреспонденции: Иван Сергеевич Цветков. E-mail: davedm66@gmail.com

Для цитирования: Цветков И.С., Золотова Н.А., Косырева А.М., Джалилова Д.Ш., Куделькина В.В., Черников В.П., Мхитаров В.А., Михайлова Л.П., Соболева Н.И., Разживина В.А., Добрынина М.Т., Гельперина С.Э., Макарова О.В. Морфологическая характеристика нефротоксического действия доксорубина и наносомальной формы поли-лактид-ко-гликолид (PLGA)-доксорубина. Клини. эксп. морфология. 2021;10(S4):77–86. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.77-86.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 02.09.2021. Получена после рецензирования 17.09.2021. Принята в печать 22.09.2021.

Morphological characteristics of nephrotoxicity of doxorubicin and doxorubicin PLGA-nanoparticles

I.S. Tsvetkov¹, N.A. Zolotova¹, A.M. Kosyreva¹, D.Sh. Dzhailova¹, V.V. Kudelkina¹, V.P. Chernikov¹, V.A. Mkhitarov¹, L.P. Mikhailova¹, N.I. Soboleva², V.A. Razzhivina³, M.T. Dobrynina⁴, S.E. Gelperina^{3,5}, O.V. Makarova^{1,4}

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

² The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality, Moscow, Russia

³ LLC Drugs Technology, Khimki, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

Introduction. Doxorubicin is an anticancer chemotherapy drug that has cardiotoxic, hepatotoxic, and nephrotoxic effects. To reduce the toxic effects of doxorubicin, its nanosomal form, PLGA-doxorubicin [Poly(Lactico-Glycolic Acid)], has been developed. PLGA is a biodegradable polymer used as a drug delivery system. The nephrotoxic effects of PLGA-doxorubicin have not been studied yet. The aim was to compare the nephrotoxic effects of therapeutic doses of doxorubicin in standard form (Dox) and PLGA-doxorubicin (PLGA-Dox).

Materials and methods. Mature male Wistar rats were injected intravenously three times with Dox or PLGA-Dox solution, at a therapeutic dose of 1.75 mg/kg. The animals were sacrificed on days 8 and 21. We carried out morphological, histochemical, and ultrastructural studies of the kidneys.

Results. Under the influence of Dox or PLGA-Dox in the kidneys on days 8 and 21 of the experiment, histological and ultrastructural examination revealed dystrophic changes in the proximal tubules with the destruction of the brush border; in the distal tubules and collecting ducts, protein cylinders were located. Dystrophic changes were more pronounced on day 21 than on day 8. During both periods of the experiment, PLGA-Dox caused less pronounced dystrophic changes in the epithelium than Dox that is confirmed by a morphometric assessment of the number of proximal tubules with a destroyed brush border.

Conclusion. The nanosomal PLGA-doxorubicin form has a less pronounced nephrotoxic effect than the classical form of doxorubicin.

Keywords: nephrotoxic effect, doxorubicin, nanoparticles, PLGA, morphology

Corresponding author: Ivan S. Tsvetkov. E-mail: davedm66@gmail.com

For citation: Tsvetkov I.S., Zolotova N.A., Kosyreva A.M., Dzhailova D.Sh., Kudelkina V.V., Chernikov V.P., Mkhitarov V.A., Mikhailova L.P., Soboleva N.I., Razzhivina V.A., Dobrynina M.T., Gelperina S.E., Makarova O.V. Morphological characteristics of nephrotoxicity of doxorubicin and doxorubicin PLGA-nanoparticles. Clin. exp. morphology. 2021;10(S4):77–86. DOI: 10.31088/CEM2021.10.S4.77-86 (In Russ.).

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

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

Received 02.09.2021. **Received in revised form** 17.09.2021. **Accepted** 22.09.2021.

Введение

Доксорубин – противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, который оказывает антимиотическое и антипролиферативное действие и широко применяется в терапии многих опухолевых заболеваний [1, 2]. При введении препаратов доксорубина в стандартной форме – доксорубина гидрохлорид растворимый (Докс) – отмечается много побочных эффектов на сердечно-сосудистую систему, пищеварительную систему, кожу, нервную систему и головной мозг [3]. Показано, что Докс оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на сердце, печень, почки, семенники [4]. Одним из наиболее распространенных эффектов антрациклиновых антибиотиков является нефротоксичность [5]. Докс способствует увеличению проницаемости клубочков почки и может вызывать дистрофию эпителия канальцев [6].

Терапевтические и токсические эффекты Докс связаны с тем, что он встраивается в ДНК, ингибируя

топоизомеразу IIb. Его молекулы подвергаются восстановлению до семихинона, вызывая образование активных форм кислорода с развитием окислительного стресса [7]. Докс метаболизируется преимущественно в печени и выводится с желчью (40%) в течение 5 дней, а около 12% препарата элиминируется почками с мочой в течение 7 дней [8].

Для снижения токсических эффектов доксорубина и сохранения его высокой противоопухолевой активности разрабатываются различные системы доставки – липосомы, гидрогели и наночастицы. Одним из наиболее распространенных и перспективных полимеров, используемых для изготовления высокоэффективных систем доставки лекарств, является сополимер молочно-гликолевой (молочной и гликолевой) кислоты – PLGA наночастицы [7–10]. Выбор PLGA обусловлен тем, что этот полимер биосовместим и биоразлагаем; мономеры PLGA – молочная и гликолевая кислоты, относятся к числу естественных метаболитов цикла

трикарбоновых кислот [9, 10]. PLGA демонстрирует широкий диапазон времени гидролиза молекулы и ее выведения, а также позволяет изменять форму и размер наночастиц. Применение полимера PLGA одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) и Европейским медицинским агентством (European Medicines Agency) [11–13]. Доксорубин в составе PLGA-наночастиц (PLGA-Докс) по сравнению с Докс оказывает менее выраженное воздействие на печень и сердце [14]. При этом не изучено влияние терапевтических доз PLGA-Докс на почки.

Цель работы – провести в эксперименте сравнительную оценку нефротоксического эффекта терапевтических доз доксорубина и PLGA-доксорубина.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 24 половозрелых самцах крыс Вистар массой тела 220–240 граммов (филиал «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России). Животных перед началом эксперимента выдерживали на карантине в течение 14 суток, содержали в виварии в условиях естественного освещения при комнатной температуре, относительной влажности 35–65% в клетках типа Т4, доступ к корму и воде *ad libitum*. Эксперимент проводили с соблюдением прав и принципов, изложенных в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). На проведение эксперимента получено разрешение биоэтической комиссии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына (протокол № 24 от 29.03.2021). Животным внутривенно трехкратно, на 1-е, 3-е и 5-е сутки эксперимента, в терапевтической дозе 1,75 мг/кг вводили раствор Докс (доксорубин гидрохлорид растворимый, Teva, Израиль) ($n=10$) или PLGA-Докс (доксорубин в составе полилактидгликолидных частиц (Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)) (ООО «Технология лекарств», Россия) ($n=10$). Животных выводили из эксперимента (по пять особей в группе Докс и PLGA-Докс) на 8-е и 21-е сутки передозировкой золетила 15 мг/кг (Virbac, Франция). Контрольная группа была представлена четырьмя интактными крысами.

Для морфологического исследования забирали правую почку и разрезали ее продольно. Одну половину фиксировали в 10% нейтральном формалине (Biovitrum, Россия). Обезжизнение, проводку в спиртах возрастающих концентраций, ксилоле и парафине осуществляли в автоматизированном гистологическом процессоре Tissue-Tek VIP 5 Jr (Sakura, Япония), заливку блоков проводили в аппарате Tissue-Tek TEC-5 (Sakura, Япония). Срезы изготавливали на ротационном микротоме Microm GmbH HM-340 (Thermo Scientific, Германия). Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. С целью выявления щеточной каемки в эпителии канальцев почки проводили ШИК-реакцию. Для заключения гистологических препаратов использовали

синтетическую монтирующую среду (Biovitrum, Россия).

Вторую часть почки использовали для оценки ультраструктурных изменений. Вырезали фрагмент ткани на границе коркового и мозгового вещества размерами не более $3 \times 3 \times 3$ мм, фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде на фосфатном буфере (0,1M pH 7,3) в течение 2 часов. После двукратного промывания в 0,1M фосфатном буфере фиксировали в 1% растворе OsO_4 в течение 60 минут при температуре $+4^\circ C$. Далее проводили обезжизнение в спиртах восходящей концентрации и заливали в смесь Epon-Araldite. Полутонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме 8800 Ultratome III (LKB, Швеция) с помощью стеклянных ножей, окрашивали метиленовым синим и исследовали их под световым микроскопом. Выбирали интересующую область, затачивали эпоновый блок и изготавливали ультратонкие срезы, которые монтировали на сетки для электронной микроскопии. Исследование образцов проводили на просвечивающем электронном микроскопе TEM Libra120 (Carl Zeiss, Германия). Для определения размера наночастиц препарат PLGA-Докс наносили на сетки для электронной микроскопии и проводили негативное контрастирование раствором Рейнольдса, на фотоснимках с электронного микроскопа измеряли диаметры наночастиц в программе ImageJ.

Для определения тяжести поражения проксимальных канальцев почки оценивали долю канальцев со слабой ШИК-реакцией и разрушением щеточной каемки. В каждом наблюдении просматривали 500 канальцев.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.). Данные проверяли на соответствие нормальному распределению методом Колмогорова–Смирнова. Для сравнения применяли непараметрический критерий Конновера. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (L25; U75). Различия между показателями считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Клиническая эффективность PLGA-Докс и его токсические эффекты во многом определяются размерами наночастиц, от которых зависят их биодеградация и распределение в кровотоке [15]. С помощью электронной микроскопии мы оценили размеры наночастиц PLGA-Докс. Диаметр наночастиц варьировал от 20 до 240 нм, преобладали частицы диаметром 20–100 нм (92%) (рис. 1).

При морфологическом исследовании у животных контрольной группы патологические изменения в почках не выявлены (рис. 2 А–С, 3 А–С, 4 А). Клубочки почки у всех животных этой группы были с неравномерным полнокровием капиллярных петель. Просветы капсулы Шумлянско–Боумена узкие, свободные от содержимого, эпителий наружного листка плоский. Просветы проксимальных и прямых извитых каналь-

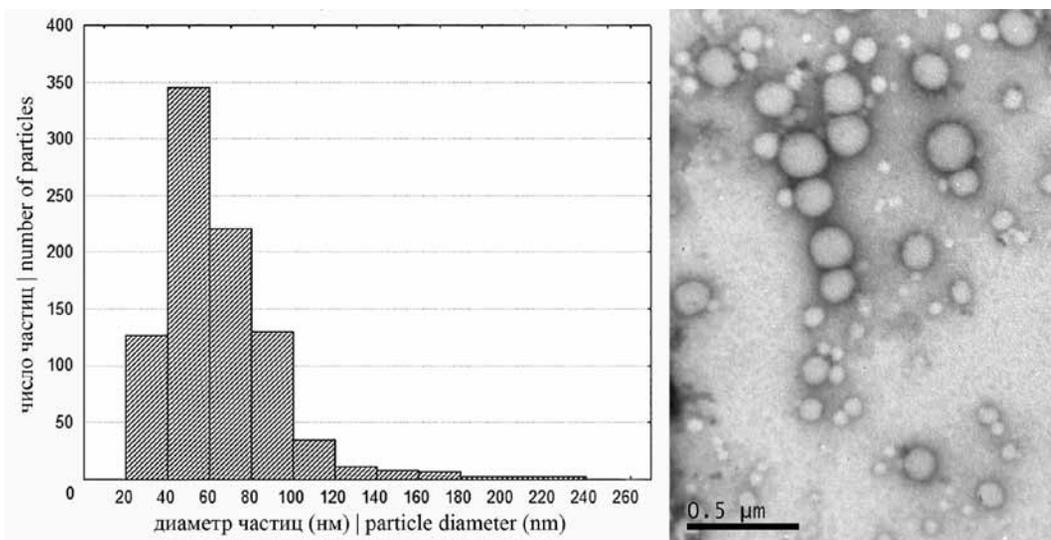


Рис. 1. Распределение микрочастиц PLGA по размеру (n=886), ТЭМ
 Fig. 1. PLGA nanoparticles size distribution (n=886), TEM

цев узкие, а в части из них они не определяются, щеточная каемка ярко эозинофильная, с выраженной равномерной ШИК-положительной реакцией. Петли Генле выстланы уплощенным эпителием, их просветы свободные. Дистальные извитые и прямые канальцы с широкими свободными просветами, эпителий кубический с четко контурируемыми границами ядра и цитоплазмы, включая ее люминальную поверхность. Собирательные трубочки с широкими просветами без содержимого, выстланы плоским эпителием. Просветы лоханки у всех крыс контрольной группы свободные, выстланы плоским эпителием, в собственной пластинке слизистой оболочки выявлены единичные лимфоциты. В рыхлой строме коркового вещества у трех крыс небольшие скопления лимфоцитов и гистиоцитов. Строма мозгового вещества рыхлая, представлена продольно ориентированными пучками тонких коллагеновых волокон. При ультраструктурном исследовании эпителиоциты проксимальных и дистальных канальцев и собирательных трубочек имели нормальное строение.

На 8-е сутки эксперимента у всех животных после введения Докс (рис. 2 D–F, 3 D–F, 4 B) и PLGA-Докс (рис. 2 G–I, 3 G–I, 4 C) клубочки почки с полнокровными капиллярными петлями. Просветы многих проксимальных извитых и прямых канальцев были расширены, в них выявлены единичные десквамированные эпителиальные клетки и небольшие отложения зернистых масс, наблюдали снижение интенсивности ШИК-реакции и разрушение щеточной каемки. Просветы дистальных извитых и прямых канальцев расширены, во многих из них на светооптическом уровне выявлены зернистое содержимое и десквамированный эпителий, люминальная поверхность эпителиоцитов с нечеткими границами. В просветах собирательных трубочек были гомогенные зернистые эозинофильные массы (цилиндры). В корковом веществе у четырех из пяти крыс в каждой экспериментальной группе наблюдались

множественные очаги лимфоидно-гистиоцитарной инфильтрации. При ультраструктурном исследовании в проксимальных канальцах обнаружено повреждение щеточной каемки, в дистальных канальцах и собирательных трубочках – набухание ядер эпителиоцитов, образование крупных вакуолей в цитоплазме клеток, десквамация эпителия.

При морфологическом исследовании на 21-е сутки эксперимента у животных после введения Докс (рис. 2 J–L, 3 J–L, 4 D) и PLGA-Докс (рис. 2 M–O, 3 M–O, 4 F) наблюдались клубочки почек с неравномерным расширением капиллярных петель и интрагломерулярного пространства. В отдельных клубочках интрагломерулярные пространства были заполнены гомогенными эозинофильными массами. Проксимальные извитые и прямые канальцы с расширенными просветами, разрушенной щеточной каемкой. В проксимальных и дистальных прямых и извитых канальцах и петлях Генле выявлены эозинофильные массы и десквамированный эпителий. Границы люминальной поверхности эпителиоцитов дистальных канальцев нечеткие. Во многих собирательных трубочках обнаружены цилиндры. Отмечались диффузно-очаговая воспалительная инфильтрация коркового вещества и отек стромы мозгового. Выявленные патоморфологические изменения были более выраженными у животных, которым вводили Докс в стандартной форме, по сравнению с PLGA-Докс. При ультраструктурном исследовании наблюдались нарушение структуры щеточной каемки в проксимальных канальцах, появление крупных вакуолей в цитоплазме и некроз эпителиальных клеток дистальных канальцев и собирательных трубочек, заполнение просветов дистальных канальцев и собирательных трубочек волокнистыми структурами и фрагментами гибнущих клеток.

Морфометрическое исследование доли проксимальных канальцев с нарушением щеточной каемки показало, что на 21-е сутки выраженность этих изменений

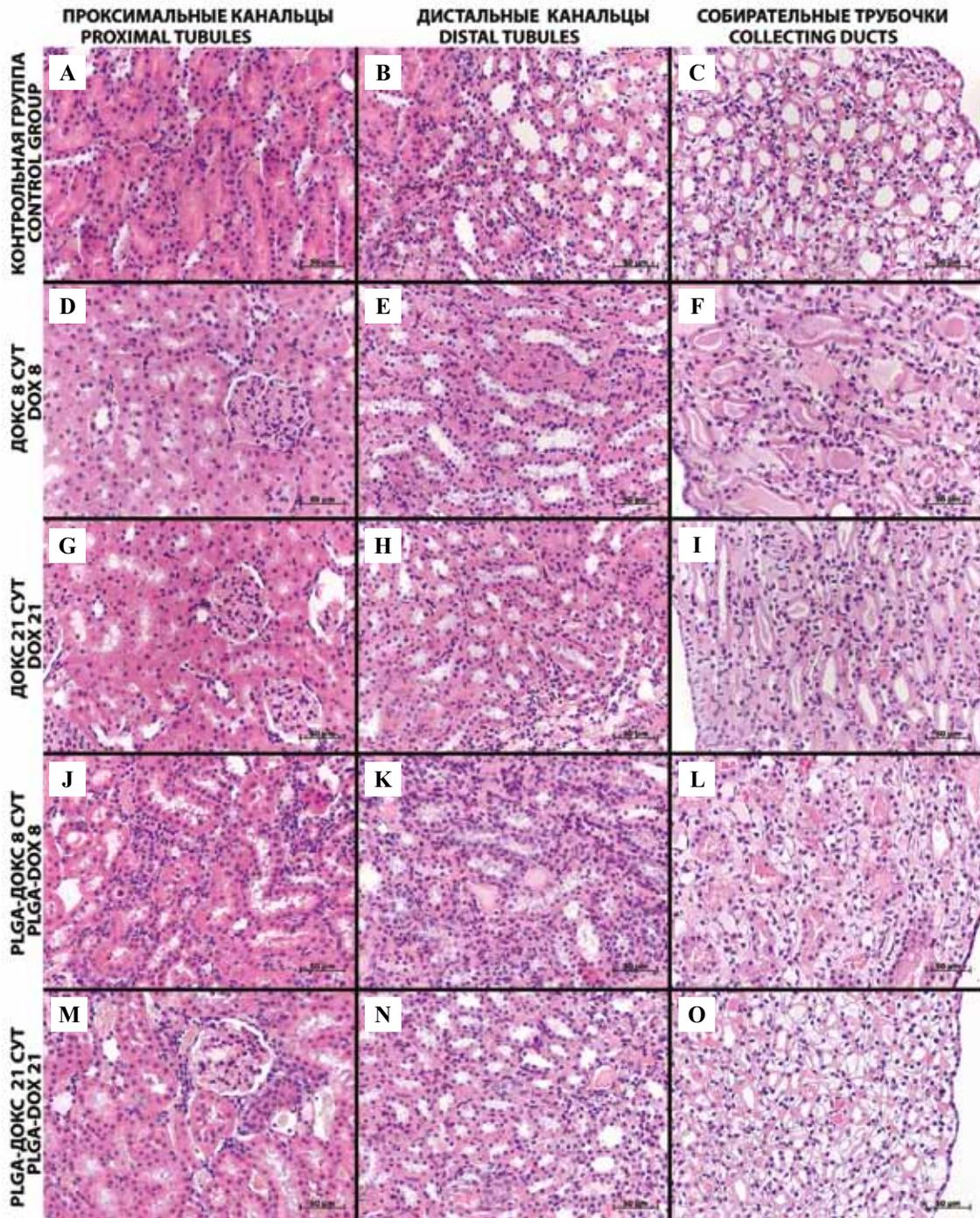


Рис. 2. Столбцы: 1) – проксимальные канальцы, 2) дистальные канальцы, 3) собирательные трубочки. Строки: 1) контроль, 2) Докс, 8-е сутки, 3) PLGA-Докс, 8-е сутки, 4) Докс, 21-е сутки, 5) PLGA-Докс, 21-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином. А, В, С – патологические изменения отсутствуют, D, G, J, М – просветы проксимальных канальцев расширены, щеточная каемка разрушена. Е, Н, К, N – просветы дистальных канальцев расширены, в них зернистое содержимое, десквамированный эпителий. С – контрольная группа, собирательные трубочки выстланы уплощенным эпителием, просветы свободны. F, I, L, O – просветы собирательных трубочек расширены, в них гомогенные и зернистые эозинофильные массы

Fig. 2. Columns: 1) proximal tubules, 2) distal tubules, 3) collecting ducts. Lines: 1) control, 2) DOX day 8, 3) PLGA-doxorubicin day 8, 4) DOX day 21, 5) PLGA-doxorubicin day 21. H&E stain. A, B, C – no pathological changes, D, G, J, M – the lumens of the proximal tubules are dilated; the brush border is destroyed. E, H, K, N – the lumens of the distal tubules are dilated and filled with granular contents and desquamated epithelium. C – control group, collecting ducts are lined with flattened epithelium, the lumens are empty. F, I, L, O – the lumens of the collecting ducts are dilated and filled with homogeneous and granular eosinophilic masses

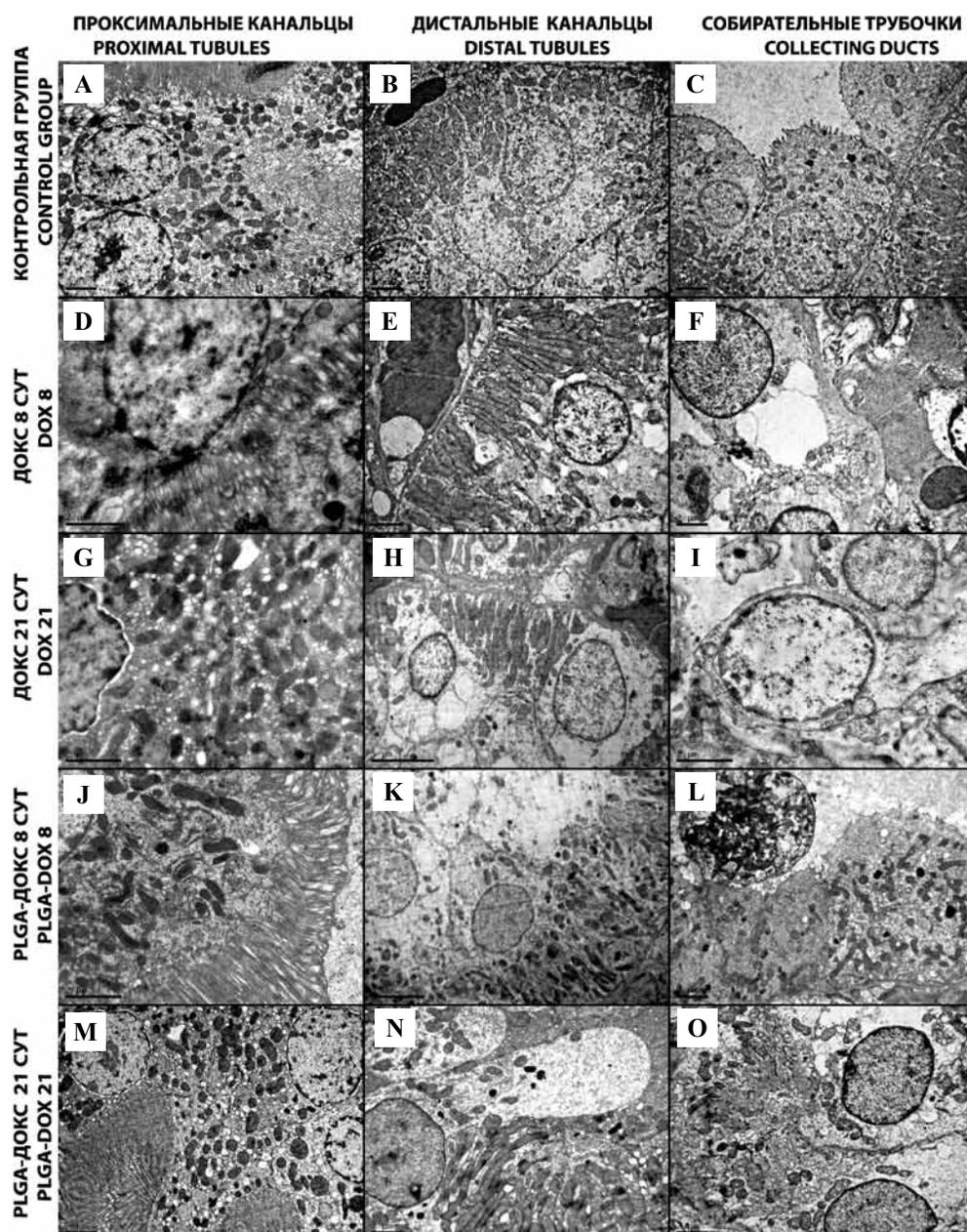


Рис. 3. Столбцы: 1) – проксимальные каналцы, 2) дистальные каналцы, 3) собирательные трубочки. Строки: 1) контроль, 2) Докс, 8-е сутки, 3) PLGA-Докс, 8-е сутки, 4) Докс, 21-е сутки, 5) PLGA-Докс, 21-е сутки. А–С – у животных контрольной группы эпителиоциты проксимальных и дистальных каналцев и собирательных трубочек почки имеют нормальное строение, просветы свободные. D, G – повреждение щеточной каемки в проксимальных каналцах при воздействии Докс. J, M – эпителиоциты проксимальных каналцев без выраженных изменений при воздействии PLGA-Докс. E, K – крупные вакуоли в цитоплазме эпителиоцитов дистальных каналцев на 8-е сутки у животных экспериментальных групп. H, N – разрушение апикальной части клеток (некроз) и заполнение просвета дистального каналца почки фрагментами гибнущих клеток у животных экспериментальных групп на 21-сутки. E – вакуолизация цитоплазмы и разрушение митохондрий, I – отек ядра, L – десквамированная клетка в просвете, O – заполнение просвета фрагментами разрушенных клеток в собирательных трубочках животных опытных групп

Fig. 3. Columns: 1) proximal tubules, 2) distal tubules, 3) collecting ducts. Lines: 1) control, 2) DOX, day 8, 3) PLGA-doxorubicin, day 8, 4) DOX, day 21, 5) PLGA-doxorubicin, day 21. A–C – in the control group, the epithelial cells of the proximal and distal tubules and collecting tubules of the kidney have a normal structure, the lumens are empty. D, G – damaged brush border of the proximal tubules due to Dox exposure. J, M – epithelial cells of the proximal tubules without pronounced changes due to PLGA-Dox exposure. E, K – large cytoplasmic vacuoles in the epithelial cells of the distal tubules on day 8 in animals of the experimental groups. H, N – destruction of the apical part of cells (necrosis); the lumens of the distal tubules of the kidney are filled with fragments of dying cells in animals of the experimental groups on day 21. E – cytoplasmic vacuolization and destruction of mitochondria, I – edema of the nucleus, L – desquamated cell in the lumen, O – the lumen is filled with fragments of destroyed cells in the collecting ducts in the animals of the experimental groups

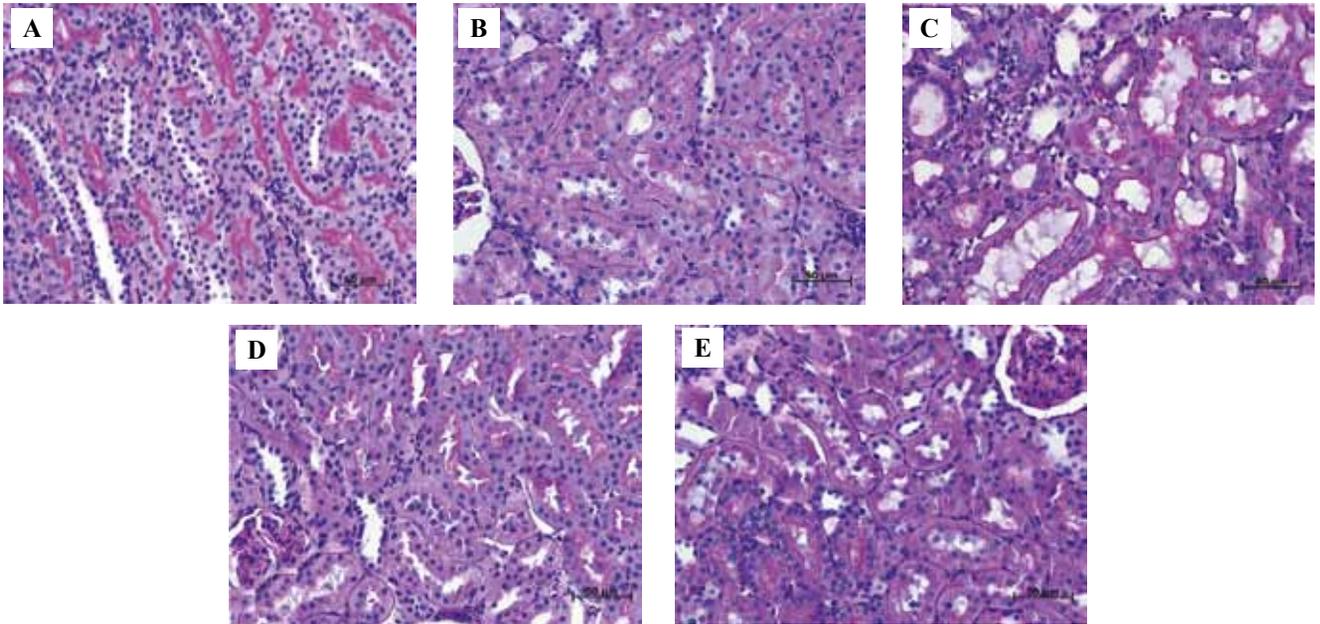


Рис. 4. Щеточная каемка в проксимальных канальцах почки. Контрольная группа (А), Докс, 8-е сутки (В), Докс, 21-е сутки (С). PLGA-доксорубин, 8-е сутки (D), PLGA-доксорубин, 21-е сутки (Е). ШИК-реакция, гематоксилин. А – контрольная группа – щеточная каемка проксимальных канальцев почки определяется на всем протяжении, ШИК-реакция выражена. В, С, D, Е – просветы проксимальных канальцев почки расширены, щеточная каемка слабо ШИК-положительна и разрушена

Fig. 4. Proximal tubules in rats of the control group (A), DOX, day 8 (B), DOX, day 21 (C), PLGA-doxorubicin, day 8 (D), PLGA-doxorubicin, day 21 (E). PAS-staining, hematoxylin. A – control group: the brush border of the proximal kidney tubules is determined along its entire length, the PAS-response is pronounced. B, C, D, E – the lumens of the proximal kidney tubules are dilated; the brush border is weakly PAS-positive and destroyed

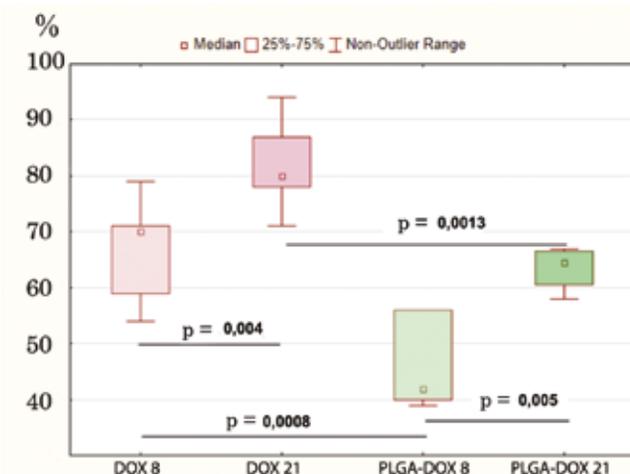


Рис. 5. Доля проксимальных извитых и прямых канальцев почки с нарушенной щеточной каемкой у крыс после введения доксорубина (DOX) и PLGA-Докс (PLGA-DOX) на 8-е и 21-е сутки

Fig. 5. The part of proximal convoluted and straight kidney tubules with a damaged brush border in rats treated with doxorubicin (DOX) and PLGA-doxorubicin (PLGA-DOX) on days 8 and 21

выше, чем на 8-е сутки, и что в оба срока нефротоксическое действие Докс более выражено, чем у PLGA-Докс (рис. 4, 5).

Обсуждение

Для снижения общей токсичности и обеспечения эффективной доставки доксорубина в опухоли используют различные носители, в том числе липосомы и наночастицы [15–20]. Согласно данным литературы, гепатотоксичность и кардиотоксичность менее выражены у PLGA-Докс, чем у Докс [15–17]. Как было показано ранее в нашей работе, PLGA-Докс не изменяет качественные патоморфологические характеристики кардиотоксичности, но приводит к снижению распространенности и выраженности воспалительных альтеративных изменений в печени и сердце [21]. По данным P. Shivakumar et al., четырехкратное введение Докс интактным крысам Вистар вызывает дистрофические изменения канальцев почки [22]. При этом в литературе отсутствуют сведения о нефротоксическом эффекте терапевтических доз PLGA-Докс по сравнению с Докс.

Нами показано, что при введении как Докс, так и PLGA-Докс у животных в почках развиваются дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных извитых и прямых канальцев, очаговая лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация в корковом веществе почек, разрушение щеточной каемки и сниже-

ние содержания в ней гликопротеинов в проксимальных канальцах. Выявленные изменения прогрессируют от 8-х к 21-м суткам. Использование наносомальной формы Докс снижает его нефротоксические эффекты в оба срока.

Нами использован в качестве носителя доксорубицина PLGA – наночастицы, которые в настоящее время широко применяются в качестве системы доставки лекарственных средств. Отрицательно заряженные частицы PLGA имеют гладкую поверхность, они относительно устойчивы к изменению pH и осмотического давления, медленно высвобождают иммобилизованные лекарственные средства путем гидролиза [23, 24]. Снижение нефротоксического эффекта наносомальной формы доксорубицина связано с медленной скоростью высвобождения из PLGA частиц, что снижает его пиковые концентрации в крови и первичной моче [25]. Таким образом, нами впервые показано, что использование наносомальной формы PLGA-Докс снижает нефротоксические эффекты доксорубицина.

Заключение

При трехкратном введении терапевтической дозы доксорубицина в стандартной форме и доксорубицина в составе PLGA-наночастиц как на 8-е, так и на 21-е сутки эксперимента в почках выявлены дистрофические изменения эпителия проксимальных и дистальных извитых и прямых канальцев, очаговая лимфоидно-гистиоцитарная инфильтрация в корковом веществе почек. В проксимальных канальцах обнаружены разрушение щеточной каемки и снижение содержания в ней гликопротеинов.

По сравнению с доксорубицином в стандартной форме при введении PLGA-доксорубицина доля проксимальных канальцев с разрушенной щеточной каемкой статистически значимо ниже как на 8-е сутки, так и на 21-е.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – О.В. Макарова, В.А. Разживина.
Сбор и обработка материала – Н.А. Золотова, В.П. Черников, И.С. Цветков, В.В. Куделькина.
Статистическая обработка данных – В.А. Мхитаров.
Написание текста – О.В. Макарова, И.С. Цветков, Л.П. Михайлова.
Редактирование – О.В. Макарова, А.М. Косырева, Д.Ш. Джалилова, М.Т. Добрынина, Н.И. Соболева, С.Э. Гельперина.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – O.V. Makarova, V.A. Razzhivina.
Collected and processed the data – N.A. Zolotova, V.P. Chernikov, I.S. Tsvetkov, V.V. Kudelkina.
Statistical analysis – V.A. Mkhitarov.
Wrote the paper – O.V. Makarova, I.S. Tsvetkov, L.P. Mikhailova.
Edited the manuscript – O.V. Makarova, A.M. Kosyreva, D.Sh. Dzhaililova, M.T. Dobrynina, N.I. Soboleva, S.E. Gelperina.

Литература/References

1. Torres-Roman JS, Lopez-Abente G, Sanz-Anquela JM. Risk of malignant mesothelioma in Spain from environmental asbestos exposure. *Ann Oncol.* 2017;28(Suppl. 5):514. DOI: 10.1093/annonc/mdx385.
2. Choi Y, Yoon HY, Kim J, Yang S, Lee J, Choi JW et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for cancer therapy: Molecular weight effect of PLGA in doxorubicin release for controlling immunogenic death. *Pharmaceutics.* 2020;12(12):1165. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121165.
3. Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, Jacob JA, Karuppusamy I et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life Sci.* 2018;200:26–30. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.03.023.
4. Elbaky NAA, Ali AA, Ahmed RA. Cardioprotective effect of simvastatin on doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *J Basic Appl Sci.* 2010;6(1):29–38.
5. Oktem G, Ayla S, Seckin I, Tanriverdi G, Cengiz M, Eser M et al. Doxorubicin induced nephrotoxicity: Protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol.* 2011;2011:390238. DOI: 10.1155/2011/390238.
6. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton).* 2011;16(1):30–8. DOI:10.1111/j.1440-1797.2010.01383.x
7. Jawad B, Poudel L, Podgornik R, Steinmetz NF, Ching WY. Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA. *Phys Chem Chem Phys.* 2019;21(7):3877–93. DOI: 10.1039/C8CP06776G.
8. van der Zanden SY, Qiao X, Neefjes J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *FEBS J.* 2020 [published online ahead of print]. DOI: 10.1111/FEBS.15583.
9. Yildiz T, Gu R, Zauscher S, Betancourt T. Doxorubicin-loaded protease-activated near-infrared fluorescent polymeric nanoparticles for imaging and therapy of cancer. *Int J Nanomedicine.* 2018;31:6961–86. DOI: 10.2147/IJN.S174068.
10. Park K, Otte A, Sharifi F, Garner J, Skidmore S, Park H et al. Formulation composition, manufacturing process, and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *J Control Release.* 2021;329:1150–61. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.10.044.
11. Essa D, Kondiah PPD, Choonara YE, Pillay V. The design of Poly(lactide-co-glycolide) nanocarriers for medical applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:48. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00048.
12. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel).* 2011;3(3):1377–97. DOI:10.3390/polym3031377.
13. Steiniger SCJ, Kreuter J, Khalansky AS, Skidan IN, Bobruskin AI, Smirnova ZS et al. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int J Cancer.* 2004;109:759–67. DOI 10.1002/ijc.20048.
14. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MN. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2007;119(1):77–85. DOI:10.1016/j.jconrel.2007.01.016.

15. Федосеева В.В., Халанский А.С., Мхитаров В.А., Цветков И.С., Малиновская Ю.А., Максименко О.О. и др. Противоопухолевая активность доксорубина в составе наночастиц при экспериментальной глиобластоме. Клиническая и экспериментальная морфология. 2017;2(22):65–71. Fedoseeva VV, Khalansky AS, Mkhitarov VA, Tsvetkov IS, Malinovskaya YA, Maksimenko OO et al. Anti-tumor activity of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in the experimental glioblastoma. Clinical and experimental morphology. 2017;22(2):65–71 (In Russ.).
16. Kumsikova N, Ermolenko Y, Osipova N, Semyonkin A, Kildeeva N, Gorshkova M et al. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release. J Microencapsul. 2020;37(3):283–95. DOI: 10.1080/02652048.2020.1729885.
17. McGuire WP, Penson RT, Gore M, Herraes AC, Peterson P, Shahir A et al. Randomized phase II study of the PDGFR α antibody olaratumab plus liposomal doxorubicin versus liposomal doxorubicin alone in patients with platinum-refractory or platinum-resistant advanced ovarian cancer. BMC Cancer. 2018;18(1):1292. DOI: 10.1186/s12885-018-5198-4.
18. Maksimenko O, Malinovskaya J, Shipulo E, Osipova N, Razzhivina V, Arantseva D et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. Int J Pharm. 2019;572:118733. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733.
19. Gao J, Liu J, Xie F, Lu Y, Yin C, Shen X. Co-delivery of docetaxel and salinomycin to target both breast cancer cells and stem cells by PLGA/TPGS nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2019;14:9199–216. DOI: 10.2147/IJN.S230376.
20. Deepika MS, Thangam R, Sheena TS, Vimala RTV, Sivasubramanian S, Jeganathan K et al. Dual drug loaded PLGA nanospheres for synergistic efficacy in breast cancer therapy. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;103:109716. DOI:10.1016/j.msec.2019.05.001.
21. Куделькина В.В., Халанский А.С., Макарова О.В., Цветков И.С., Косырева А.М., Алексеева А.И. и др. Сравнительная морфологическая и биохимическая характеристика токсического действия доксорубина и наносомальной формы PLGA-доксорубина при лечении экспериментальной глиобластомы. Клиническая и экспериментальная морфология. 2021;10(1):58–65. DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.58-65. Kudelkina VV, Khalanskiy AS, Makarova OV, Tsvetkov IS, Kosyreva AM, Alekseeva AI et al. Comparative morphological and biochemical characteristics of the toxic effects of doxorubicin and nanosomal plga-doxorubicin form in the experimental glioblastoma treatment. Clinical and experimental morphology. 2021;10(1):58–65 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2021.10.1.58-65.
22. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs. Toxicol Int. 2012;19(3):241–4. DOI: 10.4103/0971-6580.103656.
23. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. J Control Release. 2012;20;161(2):505–22. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
24. Kovshova T, Osipova N, Alekseeva A, Malinovskaya J, Belov A, Budko A et al. Exploring the interplay between drug release and targeting of lipid-like polymer nanoparticles loaded with doxorubicin. Molecules. 2021;5;26(4):831. DOI: 10.3390/molecules2604083.
25. Allahyari M, Mohit E. Peptide/protein vaccine delivery system based on PLGA particles. Hum Vaccin Immunother. 2016;12(3):806–28. DOI: 10.1080/21645515.2015.1102804.

Информация об авторах

Иван Сергеевич Цветков – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Наталья Александровна Золотова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Анна Михайловна Косырева – доктор биологических наук, заведующая лабораторией нейроморфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Джулия Шавкатовна Джалилова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Вера Владимировна Куделькина – научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Валерий Петрович Черников – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии клетки НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Владимир Аршакович Мхитаров – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Лилия Петровна Михайлова – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына.

Наталья Игоревна Соболева – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории контроля качества лекарственных средств Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов.

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

Мариэтта Тиграновна Добрынина – кандидат биологических наук, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

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

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

Author information

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Valeriy P. Chernikov – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Experimental Cell Pathology, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-3253-6729>

Vladimir A. Mkhitarov – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

<https://orcid.org/0000-0002-4427-1991>

Liliya P. Mikhailova – Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology.

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

Natalia I. Soboleva – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Quality Control of Drugs, The Russian State Center for Animal Feed and Drug Standardization and Quality.

<https://orcid.org/0000-0003-2558-4113>

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

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

Marietta T. Dobrynina – Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University.

<https://orcid.org/0000-0003-0361-1184>

Svetlana E. Gelperina – Dr. Sci. (Chem.), Head of the Drug Delivery System Laboratory, LLC Drugs Technology; Professor of the Department of Chemistry and Technology of Biomedical Drugs, D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia.

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

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

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

Юбилейная конференция НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына

Conference on the 60th Anniversary of A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology

18–19 ноября 2021 года в Москве прошла Всероссийская научная конференция с международным участием, посвященная 60-летию Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына». В связи с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой по инфекции COVID-19 конференция проходила в гибридном очно-заочном режиме с присоединением ряда участников и гостей посредством дистанционных интернет-технологий. Всего в мероприятии приняли участие более 350 человек, 150 из них в онлайн-режиме.

Открыла конференцию директор Института морфологии человека имени академика А.П. Авцына, доктор медицинских наук, профессор Л.М. Михалева. С приветствиями на открытии конференции выступили ведущие специалисты в области клинической и теоретической медицины, организаторы здравоохранения и науки, среди которых были вице-президент Российской академии наук академик РАН В.П. Чехонин, заместитель академика-секретаря Отделения медицинских наук РАН академик РАН В.В. Береговых, руководитель секции медико-биологических наук отделения медицинских наук РАН академик РАН А.М. Дыгай, заместитель руководителя секции медико-биологических наук отделения медицинских наук РАН академик РАН

В.А. Сандриков, почетный профессор кафедры акушерства и гинекологии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова академик РАН Г.М. Савельева, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии с курсом перинатологии Российского университета дружбы народов член-корреспондент РАН В.Е. Радзинский, директор Федерального исследовательского центра питания и биотехнологии член-корреспондент РАН Д.Б. Никитюк.

С ведущим докладом «Институт морфологии человека: вчера, сегодня, завтра» выступила доктор медицинских наук, профессор Л.М. Михалева. Она осветила этапы становления и развития института, охарактеризовала его основные научные достижения и перспективы, подробно остановилась на роли академика А.П. Авцына в создании Института морфологии, формировании научного коллектива и создании оригинальных научных направлений – географической патологии, микроэлементологии, биогеохимических эндемий, патологии клетки. На первом пленарном заседании выступили с докладами академики РАН Г.Т. Сухих, М.А. Курцер, Н.Е. Кушлинский, член-корреспондент РАН В.Е. Радзинский. На втором пленарном заседании докладчиками были ведущие специалисты в разных областях клинической медицины и патологической ана-





томии – профессора А.В. Шапошников, М.Р. Оразов, О.В. Зайратьянц, Е.А. Коган, И.И. Бабиченко, Л.В. Кактурский, О.Д. Мишнев, М.Г. Рыбакова, Е.Л. Туманова. На третьем пленарном заседании выступили член-корреспондент РАН В.В. Банин, профессора и доктора наук А.В. Ковалев, М.Ю. Яковлев, Т.Х. Фатхудинов, С.В. Савельев, Н.В. Яглова, А.М. Косырева, А.Е. Прощина, А.В. Ельчанинов, кандидат медицинских наук Д.А. Арешидзе. В четырех секционных заседаниях представили свои научные достижения ученые разных научных поколений – зрелые специалисты и научная молодежь. Постерная сессия включала 21 доклад.

В рамках конференции был проведен конкурс молодых ученых.

Победители конкурса по специальности «клеточная биология»:

Джулия Шавкатовна Джалилова, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, кандидат биологических наук – 1-е место;

Алексей Михайлович Емелин, старший лаборант кафедры патологической анатомии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова – 2-е место;

Марина Игоревна Буян, студентка факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова – 3-е место.



Победители конкурса по специальности «патологическая анатомия»:

Константин Юрьевич Мидибер, научный сотрудник лаборатории клинической морфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, врач-патологоанатом московской городской клинической больницы № 31 – 1-е место;

Акмалжон Адхамжонович Одилов, аспирант кафедры патологической анатомии Медицинского института Российского университета дружбы народов – 2-е место;

Ксения Сергеевна Масленкина – врач-патологоанатом московской городской клинической больницы № 31 – 3-е место.

Призовые места в конкурсе стендовых докладов завоевали:

Наталья Александровна Золотова, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, кандидат биологических наук – 1-е место;

Анна Игоревна Алексева, младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына – 2-е место

Всего на конференции было сделано 59 устных и 19 стендовых докладов. Мероприятие вызвало большой положительный резонанс научной общественности и продемонстрировало ведущую роль Института морфологии человека в развитии морфологических дисциплин.

*Л.В. Кактурский,
член-корреспондент РАН,
научный руководитель
НИИ морфологии человека
имени академика А.П. Авцына*

*О.А. Васюкова,
руководитель научно-организационного отдела
НИИ морфологии человека
имени академика А.П. Авцына*